

## **TABLE DES MATIÈRES**

<b><u>INDEX DES TABLEAUX</u></b>	<b><u>6</u></b>
<b><u>INDEX DES FIGURES</u></b>	<b><u>8</u></b>
<b><u>LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES</u></b>	<b><u>9</u></b>
<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b><u>11</u></b>
<b><u>I. SALMONELLES ET SALMONELLOSES</u></b>	<b><u>13</u></b>
<b><u>I.A. Les salmonelles</u></b>	<b><u>13</u></b>
I.A.1. Classification et nomenclature .....	13
I.A.2. Virulence et pouvoir pathogène .....	13
I.A.3. Identification des souches .....	14
I.A.3.1. Biotypage .....	14
I.A.3.2. Sérotypage .....	15
I.A.3.3. Lysotypage .....	15
I.A.3.4. Empreinte génétique par électrophorèse en champ pulsé .....	16
I.A.4. Résistance .....	16
<b><u>I.B. Les salmonelloses aviaires</u></b>	<b><u>17</u></b>
I.B.1. Introduction .....	17
I.B.2. Pathogénie .....	17
I.B.2.1. Etapes de l'infection .....	17
I.B.2.2. Symptômes et lésions .....	18
I.B.3. La contamination de l'œuf .....	19
I.B.3.1. Contaminations de surface des œufs (transmission horizontale) .....	19
I.B.3.2. Contamination interne des œufs (lors de la contamination verticale) .....	19
I.B.4. Epidémiologie .....	21
I.B.4.1. Descriptive .....	21
I.B.4.2. Analytique .....	22
I.B.4.2.1. Sources de l'infection .....	22
I.B.4.2.2. Réceptivité et sensibilité .....	22
I.B.4.2.3. Modes de transmission .....	22
I.B.4.3. Synthétique .....	24
I.B.5. Diagnostic expérimental .....	24
I.B.5.1. Diagnostic bactériologique .....	24
I.B.5.2. Diagnostic sérologique .....	25
<b><u>I.C. Les salmonelloses humaines</u></b>	<b><u>25</u></b>
I.C.1. Définition .....	25
I.C.2. Importance .....	26
I.C.3. Pathologies .....	27

I.C.3.1. Toxi-infection alimentaire .....	27
I.C.3.2. Infection salmonellique.....	28
I.C.3.3. Pathogénie .....	28
I.C.4. Epidémiologie .....	28
I.C.4.1. Sources .....	28
I.C.4.2. Dose infectieuse.....	29
I.C.4.3. Saisonnalité annuelle .....	29
I.C.4.4. Principales souches .....	30
I.C.4.5. Circonstances de la survenue.....	31
<b><u>II. LA PRODUCTION D'ŒUFS</u></b>	<b><u>33</u></b>
<b><u>II.A. La filière œufs de consommation</u></b>	<b><u>33</u></b>
II.A.1. Organisation générale de la filière œufs de consommation .....	33
II.A.2. Etages de la filière.....	34
II.A.2.1. Chaîne de production de l'œuf de consommation.....	34
II.A.2.2. Sélection des races de poules pondeuses.....	35
II.A.2.3. Etage de la multiplication .....	36
II.A.2.4. Etage de la production .....	36
II.A.3. Systèmes d'élevage des poules pondeuses .....	36
II.A.4. Périodes à risques .....	38
II.A.4.1. Les poussins et le couvoir .....	38
II.A.4.2. L'élevage .....	38
II.A.4.3. La mue .....	39
II.A.5. La production française d'œufs de consommation .....	39
II.A.6. La consommation d'œufs.....	39
<b><u>II.B. L'organisation de la lutte contre les salmonelles</u></b>	<b><u>40</u></b>
II.B.1. Défis de la lutte contre les salmonelles .....	41
II.B.2. Les différents axes de la lutte contre les Salmonelles .....	41
II.B.2.1. Epidémiosurveillance .....	41
II.B.2.2. Limitation et assainissement (police sanitaire).....	44
II.B.2.3. Biosécurité.....	44
II.B.2.4. Prophylaxie sanitaire .....	44
II.B.2.5. Recherche et la sélection génétique .....	45
II.B.2.6. Méthodes complémentaires ou alternatives.....	45
II.B.2.7. Information des consommateurs .....	46
II.B.3. Programme de contrôle européen .....	46
II.B.4. Programme national de maîtrise .....	48
II.B.5. Vaccination dans le programme de contrôle .....	50
II.B.6. Flores de barrière et probiotiques dans le programme de contrôle .....	50
<b><u>III. LA VACCINATION</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b><u>III.A. Les objectifs de la vaccination</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b><u>III.B. Les bases de la vaccination</u></b>	<b><u>52</u></b>
III.B.1. Différents types vaccins .....	52
III.B.1.1. Classification des différents types de vaccins .....	52
III.B.1.2. Vaccins vivants.....	53

III.B.1.2.1. Vaccins atténués dits conventionnels.....	54
III.B.1.2.2. Vaccins atténués par mutagenèse dirigée (vaccins délétés) .....	54
III.B.1.2.3. Vaccins vectorisés réplicatifs.....	55
III.B.1.3. Vaccins inertes .....	55
III.B.1.3.1. Vaccins inactivés .....	56
III.B.1.3.2. Fractions antigéniques ou vaccins sous- unités .....	56
III.B.1.4. Vaccins intermédiaires .....	56
III.B.1.4.1. Systèmes de délivrance d'antigènes .....	56
III.B.1.4.2. Vaccins à ADN ou ARN nu.....	56
III.B.2. Immunologie.....	57
III.B.2.1. Système immunitaire de la Poule.....	57
III.B.2.1.1. Organes lymphoïdes .....	57
III.B.2.1.2. Système immunitaire muqueux associé au tube digestif.....	59
III.B.2.1.3. Immunité humorale.....	60
III.B.2.1.4. Immunité cellulaire.....	61
III.B.2.2. Réponse immunitaire et ses variations .....	62
III.B.2.3. Immunité spécifique antisalmonellique.....	63
III.B.2.3.1. Chez l'adulte.....	63
III.B.2.3.2. Chez le poussin .....	64
<b><u>III.C. Efficacité : résultats des essais de laboratoire ou de terrain</u></b>	<b>67</b>
III.C.1. Essais vaccinaux à vaccins inertes.....	68
III.C.1.1. Importance des adjuvants, de la voie, de l'âge et de la dose .....	69
III.C.1.2. Vaccins tués (bactérines).....	69
III.C.1.3. Vaccins sub-unitaires .....	71
III.C.1.3.1. Anatoxines .....	71
III.C.1.3.2. Antigènes candidats .....	71
III.C.1.4. Limites actuelles.....	72
III.C.2. Essais vaccinaux à vaccins vivants .....	72
III.C.2.1. Importance de la voie d'administration.....	72
III.C.2.2. Souches vaccinales atténuées.....	73
III.C.2.3. Limites actuelles.....	76
III.C.3. Etudes comparatives vaccins vivants/vaccins inertes .....	77
III.C.4. Différents sérovars et la protection croisée.....	78
III.C.5. Durée de la protection.....	78
<b><u>III.D. Usage de la vaccination</u></b>	<b>78</b>
III.D.1. Enjeux .....	78
III.D.1.1. Interférences .....	79
III.D.1.1.1. Avec le diagnostic bactériologique .....	79
III.D.1.1.2. Avec le diagnostic sérologique.....	79
III.D.1.1.3. Avec les autres méthodes de contrôle .....	80
III.D.1.1.4. Avec les résistances aux antimicrobiens.....	80
III.D.1.2. Santé publique .....	80
III.D.1.3. Santé et bien-être animal .....	81
III.D.1.4. Environnement .....	82
III.D.2. Autorisation des vaccins .....	82
III.D.2.1. Procédures.....	82
III.D.2.2. Etudes préalables .....	84
III.D.3. Statut de la vaccination en Europe .....	84
III.D.3.1. Vaccination dans les états membres .....	84
III.D.3.2. Vaccination en France .....	85
III.D.3.2.1. Elevages reproducteurs .....	86

III.D.3.2.2. Troupeaux de production .....	86
III.D.3.2.3. Vaccins disponibles en France.....	86
<b><u>III.E. Conclusion</u></b> .....	<b><u>87</u></b>
<b><u>IV. LES FLORES BACTERIENNES</u></b> .....	<b><u>91</u></b>
<b><u>IV.A. Définitions et objectifs</u></b> .....	<b><u>91</u></b>
IV.A.1. Flores probiotiques .....	91
IV.A.2. Flores de barrière .....	93
<b><u>IV.B. Les bases de l'utilisation des flores bacteriennes</u></b> .....	<b><u>93</u></b>
IV.B.1. Système digestif de la poule .....	93
IV.B.1.1. Anatomie et physiologie.....	93
IV.B.1.2. Ecosystème digestif .....	96
IV.B.1.2.1. Caractérisation.....	96
IV.B.1.2.2. Facteurs de variation.....	97
IV.B.1.2.3. Rôle de la microflore digestive .....	97
IV.B.2. Différents mécanismes d'action.....	98
IV.B.2.1. Compétition nutritionnelle .....	99
IV.B.2.2. Compétition spatiale pour des sites d'attachement .....	99
IV.B.2.3. Production de substances à effet inhibiteur .....	100
IV.B.2.4. Production de bactériocines.....	101
IV.B.2.5. Diminution du potentiel d'oxydoréduction .....	101
IV.B.2.6. Stimulation du système immunitaire .....	101
IV.B.2.7. Cas des probiotiques .....	102
<b><u>IV.C. Efficacité : les résultats des essais expérimentaux</u></b> .....	<b><u>103</u></b>
IV.C.1. Importance des caractéristiques biochimiques des flores .....	104
IV.C.1.1. Flores anaérobies .....	104
IV.C.1.2. Flores aérobies ou anaérobies facultatives .....	104
IV.C.2. Importance de l'adhésivité.....	104
IV.C.3. Composition des flores .....	105
IV.C.3.1. Flores indéfinies (ou microflores natives) .....	105
IV.C.3.2. Préparations définies (les cultures pures) .....	107
IV.C.4. Polyvalence des flores.....	108
IV.C.5. Effet barrière sur le poussin.....	108
IV.C.6. Probiotiques.....	110
IV.C.7. Flores et antibiotiques .....	110
IV.C.7.1. Essais comparatifs flores/antibiotiques.....	110
IV.C.7.2. Thérapie combinée antibiotique/flores.....	111
IV.C.7.3. Action des antibiotiques sur les flores .....	112
IV.C.8. Flores et bactériophages .....	112
IV.C.9. Pouvoir protecteur .....	112
<b><u>IV.D. L'usage des flores bacteriennes.</u></b> .....	<b><u>113</u></b>
IV.D.1. Sécurité .....	113
IV.D.1.1. Santé et bien être animal.....	113
IV.D.1.2. Santé publique.....	114
IV.D.2. Programmes de maîtrise et l'efficacité des flores.....	114

IV.D.3. Antibiorésistance et flores .....	115
IV.D.4. Procédure d'autorisation des additifs .....	115
IV.D.5. Usages .....	115
IV.D.5.1. Aux différents étages de la filières.....	115
IV.D.5.1.1. Sur les poussins.....	115
IV.D.5.1.2. Sur les futurs reproducteurs.....	116
IV.D.5.1.3. Sur les poulettes et les poules .....	116
IV.D.5.2. Doses.....	116
IV.D.5.3. Conservation.....	117
IV.D.5.4. Techniques .....	117
IV.D.5.4.1. Dans l'eau de boisson.....	117
IV.D.5.4.2. En spray.....	117
<b><u>IV.E. Prébiotiques et symbiotiques</u></b>	<b><u>117</u></b>
<b><u>IV.F. Flores bactériennes pour coloniser les bâtiments</u></b>	<b><u>118</u></b>
IV.F.1. Bâtiment et matériel .....	119
IV.F.2. Litière .....	119
<b><u>IV.G. Conclusion</u></b>	<b><u>119</u></b>
<b><u>V. COMBINAISON DES DEUX METHODES</u></b>	<b><u>121</u></b>
<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b><u>123</u></b>
<b><u>VI. BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b><u>125</u></b>
<b><u>VII. ANNEXES</u></b>	<b><u>137</u></b>
<b><u>VII.A. Arrêté du 26 octobre 1998</u></b>	<b><u>137</u></b>
<b><u>VII.B. Règlement 2160/2003</u></b>	<b><u>144</u></b>

## **INDEX DES TABLEAUX**

Tableau 1: Taux d'infection à <i>Salmonella</i> Enteritidis des troupeaux de la filière ponte en dépistage obligatoire. (38) .....	21
Tableau 2 : Taux d'infection à <i>Salmonella</i> Typhimurium des troupeaux de la filière ponte en dépistage obligatoire. (38) .....	22
Tableau 3 : Sérologies salmonelles : spécificités (141). .....	25
Tableau 4 : Évaluation des risques liés à <i>Salmonella</i> dans les œufs et les poulets de chair (48). .....	26
Tableau 5 : Répartition des foyers par type en 2000, 2001 et 2002 (30) .....	26
Tableau 6 : nombre annuel d'isolements reçus ou signalés (30) 1997-1999 .....	27
Tableau 7 TIAC 1999 et 2000 (64) .....	27
Tableau 8 : Agents identifiés ou suspectés et aliments responsables ou suspectés 2001-à 2003 (39). .....	29
Tableau 9 : Importance relative des souches les plus fréquemment isolées chez l'Homme en 2002 et 2001 (30). .....	30
Tableau 10 : Répartition des sérotypes de <i>Salmonella</i> isolés chez l'Homme en France en 2002 (30). .....	30
Tableau 11: Evolution des souches Enteritidis humaines dans les pays européens entre 1998 et 2003. (51). .....	30
Tableau 12 : Part des facteurs ayant contribué à l'incident (foyers où au moins un facteur a été identifié). TIAC déclarées en France entre 2001 et 2003. (39) .....	31
Tableau 13 : Elevages visés par le dépistage obligatoire en 2004 (18) .....	33
Tableau 14 : Evolution du nombre de cheptels de poules pondeuses d'œufs de consommation entre les recensements de 2000 et 2005 (105). .....	34
Tableau 15 : La pyramide de production de la filière œufs de consommation (119). .....	34
Tableau 16: Les sélectionneurs et les races de poules pondeuses (104) .....	35
Tableau 17 : Proportion des différents systèmes d'élevage 2004 (105) .....	37
Tableau 18 : Avantages (+) et inconvénients (-) des différents systèmes d'élevage (78) .....	38
Tableau 19 : La production d'œufs (1000 tonnes) (116) .....	39
Tableau 20: La consommation d'œufs. (116) .....	40
Tableau 21: Nombre de souches de salmonelles enregistrées au CNR-Salm en 1999 et 2003 en France (155)). .....	43
Tableau 22: Prélèvements réglementaires. Annexe I de l'arrêté du 26 octobre 1998 relatif à la lutte contre les infections à <i>Salmonella</i> Enteritidis ou Typhimurium dans les troupeaux de l'espèce <i>Gallus gallus</i> en filière ponte d'œufs de consommation. ....	49
Tableau 23 : Taux d'adhésion à la charte sanitaire en filière ponte. (38) .....	49
Tableau 24: Les différents types de vaccins (46) .....	53
Tableau 25 : Les immunoglobulines de la Poule. ....	61
Tableau 26: formule leucocytaire du poulet. D'après A. CONSTANTIN (32). .....	62
Tableau 27 : Pouvoir inhibiteur de différentes souches ou préparation vis-à-vis des salmonelles (99). .....	66
Tableau 28 : Nombre de salmonelles dans différents prélèvements (107). .....	70
Tableau 29 : Rôle de la vaccination dans la réduction de l'incidence des salmonelles dans les ovoproduits (159) .....	70
Tableau 30 : Efficacité des voies d'administration selon GAST <i>et al.</i> (57) .....	73
Tableau 31 : Vaccination dans les états européens. Source (119) .....	85
Tableau 32 : Récapitulatif des avantages et des inconvénients de la vaccination contre les salmonelles (V= vaccin vivant ; I= vaccin inerte) .....	90
Tableau 33 : pH habituels des segments du tube digestif du poulet. ....	95

Tableau 34 : Métabolites produits par la microflore d'après GABRIEL <i>et al.</i> (54).....	98
Tableau 35 : Effet des différentes préparations sur le nombre de salmonelles dans le contenu caecal des poussins à 10 jours (72).....	107
Tableau 36 : Utilisation de levures selon LINE <i>et al.</i> 1998 (94).....	108
Tableau 37 : Effet des différents traitements sur l'infection précoce des poussins avec <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	111
Tableau 38 : Effet des deux procédés sur la réinfection par <i>Salmonella</i> Enteritidis .....	111
Tableau 39 : Nombre (en log10 UFC/g) de salmonelles vaccinales dans les caeca en fonction de l'ordre des administrations. (101).....	121
Tableau 40 : Nombre (en log10 UFC/g) de salmonelles vaccinales dans les caeca avec challenge infectieux à 3 jours. (101) .....	121
Tableau 41 : Nombre (en log10 UFC/g) de salmonelles infectieuses dans les caeca en fonction des expériences. (101).....	122

Rapport-Gratuit.com

## **INDEX DES FIGURES**

Figure 1 : La structure antigénique des salmonelles .....	16
Figure 2 : Appareil reproducteur de la poule pondeuse (24). ....	21
Figure 3 : Le cycle des salmonelles (23). ....	23
Figure 4 : Cas de salmonelloses à Salmonella Enteritidis. (125).....	29
Figure 5 : Répartition géographique de la production (105) .....	33
Figure 6 : Le réseau de surveillance des salmonelles d'après BOUVET P. (23).....	42
Figure 7 : Pays participant au réseau Enter-Net. Source Eurosurveillance .....	43
Figure 8 : La souche pathogène (46).....	52
Figure 9 : Les organes lymphoïdes centraux de la Poule. LEMAHIEU (92) .....	58
Figure 10 : Les organes lymphoïdes centraux.....	58
Figure 11 : La muqueuse intestinale (25) .....	59
Figure 12 : Le GALT - Gut Associated Lymphoid Tissue (25) .....	60
Figure 13 : Tractus gastro-intestinal de la Poule .....	94
Figure 14 : La place des flores bactériennes dans le contrôle de la flore digestive. (54) ....	120

## **LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES**

- AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments
- AESA : Agence européenne de sécurité des aliments
- Ac : anticorps
- Ag : antigène
- AGV : acides gras volatiles
- AMM : autorisation de mise sur le marché
- ANMV : agence nationale du médicament vétérinaire
- CNR-Salm : Centre national de référence des salmonelles
- CVMP: Committee for Medicinal Products for Veterinary Use
- EFSA : European Food Safety Authority = AESA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
- FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations (organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture)
- GALT : Gut Associated Lymphoid Tissue (tissu lymphoïde associé au tube digestif)
- InVS : Institut national de veille sanitaire
- INRA : Institut national de la recherche agronomique
- INSERM : institut national de la santé et de la recherche médicale
- ITAVI : Institut technique de l'aviculture
- LPS : lipopolysaccharide
- OFIVAL : Office national interprofessionnel des viandes, de l'élevage et de l'aviculture
- OIE : Organisation mondiale de la santé animale
- OMP : outer membrane protein
- OMS : organisation mondiale de la santé
- PFGE : pulsed field gel electrophoresis = électrophorèse en champ pulsé
- SCEES : Service central des enquêtes et études statistiques
- SPF : specific pathogen-free = indemne de germe pathogène spécifique= axénique
- TIAC : toxi-infection alimentaire collective
- UFC : unité formant colonie



## INTRODUCTION

Les salmonelles ubiquistes sont un grave problème et pour la santé humaine et pour la filière avicole œuf de consommation.

La salmonellose est une zoonose majeure, en raison surtout de sa fréquence et de sa gravité médicale pour l'Homme. Dans un troupeau de pondeuses, si les pertes directes sont minimales, les conséquences économiques peuvent être lourdes non seulement pour l'élevage touché, mais aussi et surtout, pour toute la filière, en terme d'image auprès des consommateurs.

La maladie humaine se contracte par l'ingestion d'aliments contaminés et constitue la première cause répertoriée de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) en France.

1 656 TIAC ont été déclarées entre 2001 et 2003, impliquant 22 113 malades, 2 005 hospitalisations et 11 décès.

Les salmonelles sont à l'origine de 60 p. cent des foyers pour lesquels l'agent causal a été confirmé. 19 p. cent de ces foyers sont attribués à la consommation d'œufs et de produits à base d'œufs.

*Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium, sont les deux sérovars le plus souvent isolés lors de ces épisodes de gastro-entérite reliés aux œufs. *Salmonella* Enteritidis est le sérotype prédominant avec 31 p. cent des foyers avec étiologie confirmée.

Les mesures prises au plan national et international en élevage de poules pondeuses ciblent tout particulièrement ces deux sérovars le plus souvent isolés dans les œufs ou préparations d'œuf à l'origine d'une contamination humaine. La prophylaxie repose essentiellement sur une hygiène stricte et de bonnes pratiques d'élevage.

Mais les salmonelles sont des germes très difficiles à éradiquer du fait de leur ubiquité et de leur grande résistance dans le milieu extérieur, tant aux agents physiques que chimiques. Dans certains troupeaux ayant fait l'objet d'un assainissement, l'ensemble des mesures se révèle insuffisant et des rechutes sont observées. Leurs conséquences économiques sont difficilement supportables.

L'antibiothérapie et l'antibioprévention ont été utilisées pour réduire le portage asymptomatique. Avec le recul, elles se sont révélées être des voies dangereuses. L'apparition de multiples antibiorésistances est très préoccupante pour la santé humaine. L'infection à *Salmonella* Typhimurium DT 104 multirésistante est la plus alarmante et entraîne des taux d'hospitalisation deux fois plus élevés que dans le cas d'autres salmonelloses zoonotiques transmises par les aliments et un taux de létalité dix fois plus important. En outre, les problèmes de contamination de l'environnement par les antibiotiques ou leurs résidus sont *a priori* un argument supplémentaire en faveur de la mise en œuvre d'autres moyens médicaux.

La recherche de méthodes pour renforcer la résistance des poules pondeuses à l'infection, ou tout au moins pour diminuer l'excrétion des germes dans le milieu extérieur et le portage asymptomatique est donc très importante pour faire évoluer les ressources techniques parallèlement aux évolutions épidémiologiques et pour tendre vers le « zéro salmonelles ». Les chercheurs pensent bien sûr qu'il n'est ni réaliste ni possible d'éliminer complètement les salmonelles pathogènes dans les populations animales. En conséquence, l'objectif essentiel, sur toute la chaîne de production de la ferme au consommateur et à l'intérieur de chacun de ses maillons, est de définir la batterie optimale des mesures qui permettront de réduire le plus efficacement possible par rapport aux coûts, le risque pour la santé humaine.

La Grande-Bretagne s'est tournée vers la vaccination obligatoire des poules pondeuses et a vu une diminution de 35 p. cent des cas de toxi-infections alimentaires à *Salmonella* Enteritidis de 1997 à 1999.

L'administration de préparations bactériennes est une voie également ouverte dans la lutte contre les salmonelles.

Mais des incertitudes subsistent quant à l'efficacité réelle et à l'innocuité de certains de ces médicaments ou additifs.

L'objectif de ce travail est d'apporter un éclairage supplémentaire sur l'utilisation et l'intérêt de ces deux options prophylactiques.

Suite à l'étude des interactions des salmonelles avec leurs hôtes animaux et humains, la filière ponte et de son organisation professionnelle et réglementaire seront décrites de manière à éclairer les alternatives à la lutte contre ces bactéries. La vaccination et l'usage des probiotiques seront envisagés successivement au travers des essais expérimentaux ou de terrain, afin de dégager les résultats objectifs obtenus dans ces domaines, ainsi que les pistes pour l'avenir.

## **I. SALMONELLES ET SALMONELLOSES**

### **I.A. Les salmonelles**

La connaissance la plus complète possible du germe pathogène est l'étape première de l'organisation de la lutte pour la maîtrise de ce germe.

Même si les premières utilisations de vaccins ou de flores de barrières ont été réalisées de manière plus ou moins empirique, les nombreuses recherches fondamentales ont permis non seulement de valider des pratiques anciennes mais aussi de faire progresser ces méthodes. L'avenir est de les adapter aux évolutions constantes du germe et du milieu.

#### **I.A.1. Classification et nomenclature**

Les Salmonelles appartiennent :

- à la famille des Entérobactéries, bactéries du tube digestif, intracellulaires facultatives (notamment dans les macrophages). Ce sont des bacilles (forme de bâtonnet), mobiles grâce à une ciliature, à coloration de gram négative, aéro-anaérobies facultatifs, cultivant facilement sur milieu ordinaire.
- au genre : *Salmonella*,
- à l'espèce : *enterica* (ou *choleraesuis*)
- sous-espèce : *enterica* (ou *choleraesuis*)
- sérovar : par exemple Enteritidis, Typhimurium, Virchow, Choleraesuis (47).

On a identifié plus de 2300 sérotypes différents de Salmonelles (= sérovares) qui, sur le plan épidémiologique, sont classées en fonction de leur potentiel pathogène pour l'Homme ou l'animal :

- le groupe 1, par exemple *Salmonella* Typhi et *Salmonella* Paratyphi, provoque des fièvres entériques uniquement chez l'être humain et les primates supérieurs (typhoïdes et paratyphoïdes).
- le groupe 2 donne des maladies chez certains animaux, *Salmonella* Dublin chez les bovidés, *Salmonella* Gallinarum Pullorum adapté à l'espèce *Gallus gallus*, *Salmonella* Choleraesuis chez le porc, mais rarement chez l'homme. Toutefois lorsque l'affection touche l'être humain, elle peut prendre un caractère invasif et mettre la vie du sujet en danger.
- le groupe 3 comprend les souches qui n'ont pas de spécificité d'espèce et sont dites ubiquitaires. Celles-ci provoquent classiquement des gastro-entérites principalement d'origines alimentaires, souvent bénignes et guérissant spontanément, mais pouvant devenir graves chez les êtres jeunes, âgés ou souffrant d'une diminution de la résistance aux maladies infectieuses. On trouve dans ce groupe *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium, les deux principales souches impliquées dans les problèmes de santé publique.

#### **I.A.2. Virulence et pouvoir pathogène**

La virulence des salmonelles est une notion complexe, résultant de nombreux facteurs encore largement étudiés, tant au niveau biochimique que génétique. Les recherches effectuées *in vivo* permettent d'envisager la virulence des souches, alors que les recherches *in vitro* permettent d'éclairer certaines étapes de la pathogénie.

Les principaux facteurs de la virulence sont la mobilité (reposant sur les flagelles), l'adhésion par les *pili* et les *fimbriae* (phénomène actif de reconnaissance spécifique entre une adhésine bactérienne et un ligand présent à la surface d'une cellule hôte), l'invasion (par endocytose pour les entérocytes, par phagocytose pour les macrophages), la formation de phagosomes spacieux, et la fusion avec les lysosomes (formation de phagolysosomes) (60).

Les salmonelles *enterica* sont capables de produire de nombreuses structures de surface dont les flagelles, les *fimbriae*, les *curli fimbriae*, les longues *fimbriae* polaires et celles

codées par des plasmides. Beaucoup de ces structures sont nécessaires au processus infectieux, et notamment à la colonisation du tractus génital de la poule.

Les salmonelles sont des bactéries entéroinvasives et toxigènes : elles peuvent passer la barrière digestive et provoquer une invasion systémique. Dans certains cas, elles se limitent strictement à la sphère digestive. Elles peuvent également persister dans les organes internes pendant très longtemps (73).

*Salmonella* Enteritidis possède l'aptitude à coloniser les organes profonds, notamment le foie, la rate, les ovaires et l'oviducte en l'absence de signes de maladie (lysovars de type 4 en particulier).

*Salmonella* Typhimurium DT104 constitue la plus grande menace pour la santé humaine par les multirésistances aux antibiotiques acquises en quelques années : à l'ampicilline, au chloramphénicol, à la streptomycine, aux sulfamides et aux tétracyclines (résistances intégrées dans le matériel génétique). On a signalé depuis 1994 un nombre croissant d'isolats dotés d'une résistance supplémentaire au triméthoprim ou à l'acide nalidixique (la résistance à l'acide nalidixique est en plus associée à une sensibilité diminuée à la ciprofloxacine) (146).

L'activité des différentes toxines explique les symptômes observés, notamment chez les animaux jeunes :

- l'entérotoxine de nature protéique, thermolabile, augmente la sécrétion d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale induisant la diarrhée
- les cytotoxines de nature protéique présentent des activités hémolytiques ou inhibitrices des synthèses protéiques
- l'endotoxine de nature glucidoprotéique (ou LPS (-) voir I.A.3.2 Le sérotypage) est létale par son activité hémodynamique (hyperthermie, hypotension, coagulation intra vasculaire disséminée et collapsus)

La libération d'endotoxine dans la circulation sanguine, notamment à la suite d'une septicémie à bactéries à Gram négatif, peut conduire à un choc endotoxinique et à la mort.

Le taux de mortalité peut atteindre 50 p. cent.

Certains traitements antibiotiques peuvent ainsi conduire à une libération importante d'endotoxines. L'importance de cette libération est variable selon les molécules et, d'une manière générale, les antibiotiques peuvent être classés (en allant des molécules faisant libérer les quantités les plus importantes vers les molécules faisant libérer les quantités les plus faibles) de la manière suivante : céphalosporines, pénicillines, aminosides et quinolones (47).

Des études récentes ont montré que les flagelles, le LPS, les *fimbriae* de *Salmonella* Enteritidis jouent un rôle dans la persistance de l'infection (90).

L'étude du génome et du protéome des salmonelles est d'une importance capitale pour la mise en évidence des gènes et des protéines ayant un rôle dans la virulence et la pathogénicité des salmonelles. La compréhension de ces mécanismes complexes permettra d'améliorer les méthodes de lutte, notamment la vaccination (154).

### **I.A.3. Identification des souches**

Par les nombreuses méthodes de caractérisation des souches, on distingue les marqueurs phénotypiques exprimés par la bactérie, et les marqueurs génotypiques concernant le génome chromosomique ou plasmidique. Ces marqueurs sont des outils épidémiologiques. Trois méthodes principales constituent la base de l'identification des souches.

#### **I.A.3.1. Biotypage**

Le biotype est fondé sur une batterie de réactions biochimiques, caractéristiques du genre *Salmonella*. C'est la première étape dans l'identification de ces bactéries :

- fermentation du glucose avec (ou sans) production de gaz
- pas d'oxydase
- réduction des nitrates en nitrites

- uréase, catalase
- tryptophane désaminase
- etc.

### **I.A.3.2.Sérotypage**

La détermination du sérovar (ou sérotype), d'un intérêt épidémiologique capital pour la vaccination notamment, est basée sur la formule antigénique, définie comme l'association caractéristique de chacun des antigènes suivants :

- les antigènes O somatiques, qui sont des antigènes lipopolysaccharidiques (LPS) (paroi, soma), sensibles au formol mais pas à la chaleur ni à l'alcool. Ils sont identifiés par un chiffre arabe de 1 à 67. ils sont présents dans la membrane externe.

Les lipopolysaccharides sont constitués d'un lipide A et d'une partie polysaccharidique débordant la membrane externe. Le lipide A est doué de propriétés toxiques et il correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif qui n'est libérée, de manière massive, qu'après lyse de la bactérie. La fraction polysaccharidique constitue l'antigène O et elle est responsable de la spécificité antigénique O permettant de décrire les sérovars. Les facteurs O majeurs permettent de définir des groupes et selon la classification de KAUFFMANN, toutes les souches possédant en commun un facteur O majeur sont placées dans le même séro groupe A, B, C, etc.

Ainsi, toutes les souches :

- o possédant le facteur O:2 appartiennent au groupe A,
- o possédant le facteur O:4 appartiennent au groupe B : Typhimurium,
- o possédant le facteur O:9 au groupe D : Gallinarum/Pullorum, Enteritidis,
- o possédant le facteur O:3 au groupe E (47)

- les antigènes H correspondant aux flagelles de nature protéique, thermolabiles, sensibles à l'alcool mais résistants au formol. La flagelline présente une composition en acides aminés constante pour un type antigénique donné. Les salmonelles possèdent en général deux spécificités flagellaires différentes (deux phases H1 ou H2 ou deux formes antigéniques).

Pour une bactérie donnée, un seul des deux gènes s'exprime et les flagelles sont soit en phase 1 ou en phase 2. De façon aléatoire, toutes les 1000 à 10000 générations, le gène qui n'est pas exprimé, s'exprime et l'autre cesse de s'exprimer. Dans la plupart des cas, pour un sérovar donné, 50p. cent des bactéries sont en phase 1 et 50 p. cent sont en phase 2 (73).

*Salmonella* Enteritidis ne synthétise que des flagelles de phase1 (un seul gène) dont l'antigénicité est « g, m ».

*Salmonella* Typhimurium possède des flagelles dont l'antigénicité est « i » en phase 1 et « 1,2 » en phase 2. (Voir spécificité des réactions sérologiques : I.B.5.2)

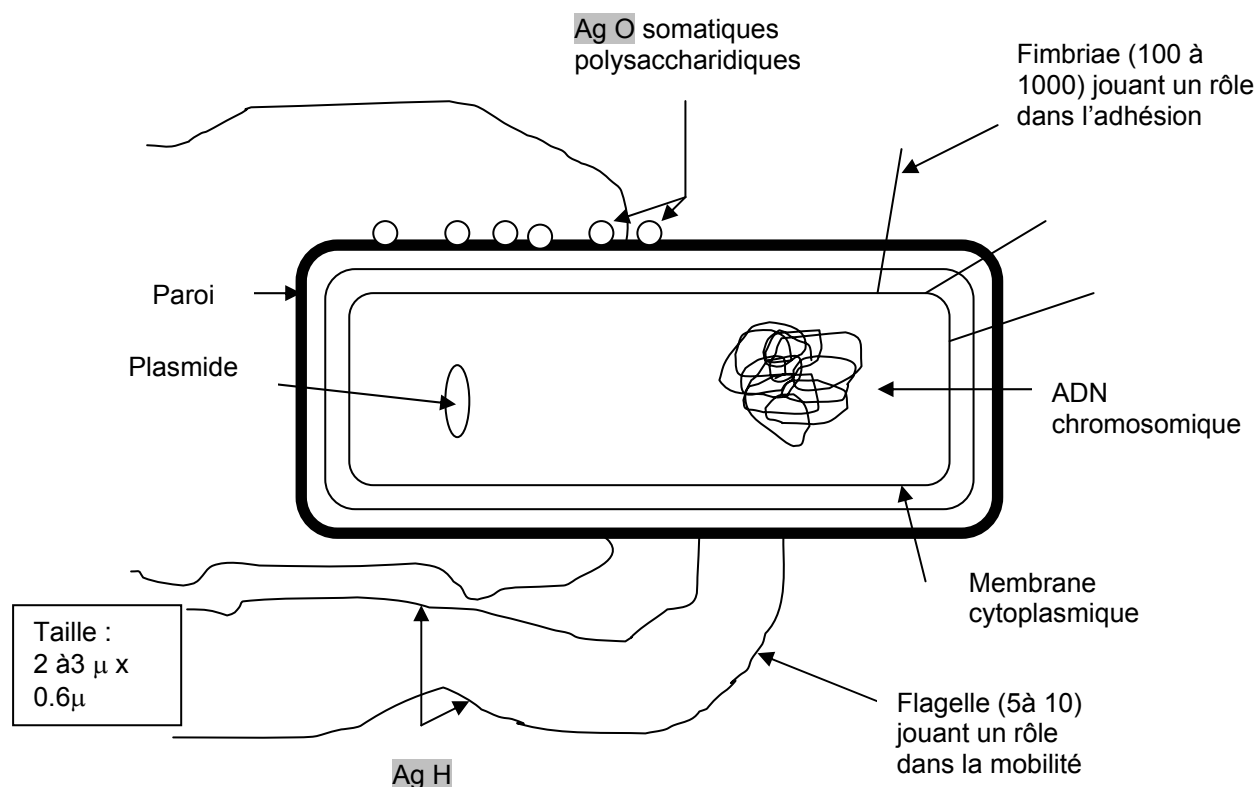
- des antigènes Vi de virulence pour quelques sérovars (Typhi essentiellement).

D'autres antigènes impliqués dans l'adhésion, l'invasion, la toxinogénèse sont encore méconnus. (Voir Figure 1)

### **I.A.3.3.Lysotypage**

C'est la deuxième méthode reconnue au niveau international, la plus utilisée pour la caractérisation des souches de salmonelles. Il s'agit de l'étude des souches par leur sensibilité ou leur résistance à une série de bactériophages. En ce qui concerne Enteritidis, 27 lysotypes ont été identifiés, le plus répandu étant le lysotype 4. (60)

Figure 1 : La structure antigénique des salmonelles



#### **I.A.3.4. Empreinte génétique par électrophorèse en champ pulsé**

La valeur des méthodes de typage phénotypique précédente comme outil de surveillance est bien établie, mais du fait de la prédominance de quelques sérotypes et lysotypes dans de nombreux pays, les empreintes génétiques sont souvent utiles en complément lors d'investigations d'épidémies. La PFGE (-) permet alors une discrimination entre les souches. Elle permet de classer les isolats bactériens en relation avec des situations épidémiques. C'est donc une méthode qui permet de prendre des décisions d'importance épidémiologique, au niveau international le cas échéant. (123)

#### **I.A.4. Résistance**

La température optimale de croissance se situe autour de 35-37°C et explique la recrudescence des toxi-infections alimentaires à salmonelles en période de temps chaud et par conséquent une variation saisonnière très marquée.

Cependant les Salmonelles peuvent se multiplier de 5°C à 45/47°C avec une croissance nettement retardée pour les températures inférieures à 10°C.

Elles sont sensibles à la chaleur. La pasteurisation à 72°C pendant 15 secondes assure leur destruction dans le lait (mais la contamination dans le lait demeure rare du fait de l'acidité).

Selon la nature des aliments, des variations peuvent s'observer. Il peut en aller de même pour les souches.

Elles résistent au froid. La réfrigération permet la survie des *Salmonella*, la congélation n'est pas de nature à provoquer leur disparition complète.

Elles supportent des pH allant de 4,5 à 9,0 avec un optimum de 6,5 à 7,5. La persistance des *Salmonella* dans des denrées fortement acides (pH 3, 2) a été signalée.

Elles peuvent résister jusqu'à 28 mois dans le milieu extérieur avec possibilité de s'y multiplier si les conditions sont optimales, tout particulièrement en anaérobiose (127).

Elles sont sensibles aux antiseptiques.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène largement répandu dans de nombreux pays européens, en particulier pour *Salmonella* Typhimurium. En 2000, 40 p. cent des isolats cliniques étaient résistants à au moins un antibiotique, 18 p. cent montraient une résistance multiple à 4 antibiotiques ou plus (115).

## **I.B. Les salmonelloses aviaires**

### **I.B.1. Introduction**

La Salmonellose des Poules ou anciennement paratyphose, définie comme les maladies causées par des salmonelles autres que les sérovars Gallinarum-Pullorum, est la plupart du temps une infection subclinique.

Les infections aviaires causées par les sérovars Pullorum, responsable de la pullorose, et Gallinarum, responsable de la typhose, sont des maladies graves, aujourd'hui rares en Europe, mais encore prédominantes dans les pays en voie de développement. Elles ne seront pas abordées dans ce travail.

S'il existe de nombreux sérovars de salmonelles ubiquistes connus chez la Poule (plus de 200 ont été identifiés chez les volailles), *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium sont prédominantes dans les problèmes de santé publique

Les pertes directes en élevage sont en général mineures alors que les conséquences hygiéniques pour l'alimentation humaine et les pertes indirectes liées aux limitations commerciales qui en découlent, par leur fréquence et leur gravité, en font une zoonose majeure.

Le développement de l'incidence des toxi-infections alimentaires collectives chez l'Homme causées par *Salmonella* Typhimurium et *Salmonella* Enteritidis, suite à la consommation d'oeufs et d'ovoproduits, a mis l'accent sur l'importance sanitaire de la contamination de la filière avicole par ces bactéries, et notamment de la filière ponte.

Pour ces raisons, ces deux infections sont entrées dans la liste des MLRC en 1995.

### **I.B.2. Pathogénie**

#### **I.B.2.1. Etapes de l'infection**

La contamination se fait généralement par voie orale. Les salmonelles résistent à l'acidité gastrique et arrivent dans l'intestin grêle où elles se multiplient.

La première étape de l'invasion par les salmonelles est une étape de colonisation intestinale : elles arrivent dans l'intestin grêle, où elles se multiplient. Adhérentes à l'épithélium, elles pénètrent par un phénomène d'endocytose dans les cellules épithéliales iléales et caecales, notamment les tissus lymphoïdes incluant les plaques de Peyer, les amygdales caecales et préférentiellement dans les cellules M.

Dans le cas des salmonelles provoquant des maladies systémiques, le site d'attachement préférentiel se situe au niveau des plaques de Peyer (60).

L'infection salmonellique initie par chimiotactisme une réponse inflammatoire intestinale avec l'afflux d'hétérophiles et de macrophages. Les salmonelles survivent et se multiplient dans les macrophages (67).

Les Salmonelles se multiplient à l'intérieur de vacuoles dans l'entérocyte et migrent ainsi vers la sous muqueuses où elles sont phagocytées par des macrophages, les monocytes et les polynucléaires neutrophiles. Les salmonelles peuvent survivre dans ces cellules en inhibant la fusion phagosome/lysosome.

Elles peuvent alors atteindre les nœuds lymphatiques mésentériques puis le sang (invasion systémique), sans doute à l'intérieur de ces cellules phagocytaires (macrophages, leucocytes hétérophiles) et s'installent dans le foie, la rate et la moelle osseuse.

Survient alors une phase de multiplication dont la vitesse dépend de la virulence de la souche et de la résistance de l'hôte.

La multiplication bactérienne peut aboutir à la mort de l'hôte, ou le nombre des bactéries peut atteindre un plateau avant de décliner (60) (162).

Il existe 3 cas de figure pour le déroulement de l'infection, le portage sain étant le plus fréquent chez les volailles.

- L'infection est strictement limitée à la sphère digestive et peut correspondre à un portage latent avec élimination épisodique des salmonelles dans les fécès. Les porteurs latents sont cliniquement et anatomiquement indécélables, ils peuvent excréter des salmonelles, de façon continue ou intermittente (144). C'est le cas le plus fréquemment rencontré. Dans ce cas de figure, les salmonelles sont retrouvées dans différentes portions de l'intestin par culture, alors que les écouvillons cloacaux révèlent qu'il n'y a plus d'excrétion dans l'environnement. Leur lieu d'élection et de multiplication, chez le poulet est le caecum. A ce stade de l'infection, les porteurs ne sont donc pas facilement détectables.

- La colonisation du tube digestif précède le passage de la barrière digestive avec invasion systémique et présence des bactéries dans les sécrétions et les excréments, ainsi que dans l'appareil génital.

- Seule l'infection systémique demeure avec le portage chronique.

La majorité des sérovars de salmonelles :

- sont responsables d'un cycle fécal/oral avec multiplication et excrétion fécale.

- se limite au tube digestif, avec seulement une transmission horizontale avec ré-excrétion intermittente ou permanente dans l'environnement.

- se caractérise par une adaptation à des hôtes variés et une répartition large dans l'environnement d'un poulailler : eau, sol, locaux, rongeurs, insectes, etc. (73)

- lors d'une contamination cloacale pratiquement inévitable, les salmonelles peuvent se retrouver à la surface des œufs : *Salmonella* Typhimurium, très ubiquiste, contamine environ 2 p. cent des œufs

- quelques sérovars invasifs sont capables de coloniser les ovaires et l'oviducte, entraînant la contamination interne de l'œuf : *Salmonella* Enteritidis contamine ainsi environ 1 p. cent des œufs.

Au final, même si un très petit nombre d'œufs se trouve contaminé, le volume des œufs consommés est tel qu'il s'agit d'un problème significatif (voir Tableau 15).

### **I.B.2.2.Symptômes et lésions**

Les rapports hôte/bactéries sont fonction :

- du sérovar et de la souche, de sa dose initiale

- de l'âge des animaux au moment de l'infection, de leur bagage génétique, de leur statut immunitaire (les symptômes sont observés essentiellement sur les poussins de moins de 15 jours et sont rares sur les poulets de plus de 4 semaines)

- de l'environnement de l'élevage (73).

Les symptômes ne sont pas spécifiques et sont similaires quel que soit le sérovar.

Dans quelques cas particuliers (hôtes à risques, ingestion d'une grande quantité de salmonelles, invasivité de certaines souches pour un même sérovar, particulièrement *Salmonella* Enteritidis qui possède un plasmide de virulence chez les Poules), une pathologie transitoire et frustre, essentiellement digestive avec diarrhée, est parfois accompagnée d'atteinte de l'état général.

Compte tenu de sa forte affinité pour le tractus génital, lorsque *Salmonella* Enteritidis passe la barrière digestive et envahit l'organisme de l'hôte (bactériémie), l'infection peut être transmise verticalement. Dans le cas des poules pondeuses, l'infection est ainsi transmise aux oeufs du fait de l'aptitude à coloniser l'ovaire et l'oviducte, et à la descendance dans le cas où il s'agit d'oeufs issus de reproducteurs (55).

En résumé, *Salmonella* Enteritidis pour la poule :

- passe la barrière digestive et est à l'origine d'une séroconversion
- infecte les organes profonds (foie, rate, ovaire) et est à l'origine d'une transmission verticale au sens strict, transovarienne,
- se caractérise par une adaptation à certains hôtes et est à l'origine d'une répartition plus limitée
- est à l'origine d'infection durable au niveau des troupeaux.

*Salmonella* Typhimurium, actuellement le type le plus rencontré dans les salmonelloses aviaires :

- provoque les formes cliniques les plus graves, surtout observées chez les jeunes animaux souvent d'allure septicémique, et notamment en période périnatale avec une mortalité brutale dans les jours qui suivent l'éclosion, de la prostration (poussins en boules, frileux), une diarrhée liquide blanchâtre et un ventre gonflé. On observe également de nombreuses mortalités en coquille. L'autopsie révèle une non-résorption du sac vitellin avec un contenu souvent liquide et grumeleux, un aspect cuit généralisé, une hépatomégalie avec des lésions dégénératives nodulaires, des lésions cæcales plus ou moins intenses avec présence fréquente d'un magma caséeux (parfois très discret), éventuellement de la péricardite et de l'aérosacculite.

Chez les poussins plus âgés et donc plus résistants, l'allure est davantage subaiguë. Les poussins atteints sont tristes, cyanosés, assoiffés, présentent une diarrhée aqueuse jaune verdâtre, parfois hémorragique

- est plus ubiquiste et dispose de réservoirs amplificateurs tels que les porcs et les bovins.

### **I.B.3. La contamination de l'œuf**

Plusieurs mécanismes aboutissent à la contamination interne ou externe de l'œuf aux différents étages de l'appareil génital (voir Figure 2).

#### **I.B.3.1. Contaminations de surface des œufs (transmission horizontale)**

La contamination de la coquille se produit lors du passage dans le cloaque au moment de la ponte, ou sur le matériel d'élevage contaminé. C'est le mode de contamination le plus souvent mis en cause.

Les Salmonelles survivent au cours du stockage mais n'ont aucune possibilité de multiplication à la surface de la coquille. La contamination des denrées alimentaires a lieu au cours de la préparation et l'intoxication a lieu à la faveur d'une rupture de la chaîne du froid avant la consommation (73).

#### **I.B.3.2. Contamination interne des œufs (lors de la contamination verticale)**

Les salmonelles peuvent contaminer le milieu interne de l'oeuf. La contamination interne se fait (75) :

- soit par transmission transovarienne avec contamination du jaune,
- soit par contamination dans l'oviducte (essentiellement dans la partie haute) à la faveur d'une remontée des bactéries du cloaque dans l'oviducte avec contamination du blanc d'œuf avant la formation de la coquille. Le blanc d'œuf n'est pas un milieu favorable à la multiplication des salmonelles (pauvre en fer notamment). Le blanc d'œuf possède une activité antibiotique naturelle grâce notamment à deux protéines, l'ovotransferrine et le lysozyme. Elles agissent respectivement en appauvrissant le milieu en fer, indispensable à la croissance bactérienne, et en détruisant les parois

de certaines bactéries. Ces deux protéines n'expliquent qu'une partie du potentiel antimicrobien. D'autres agents antibactériens présents dans le blanc d'œuf restent à identifier. Les sites de contamination les plus fréquents sont soit la partie externe de la membrane vitelline, soit l'albumen l'entourant.

- soit par passage des salmonelles au travers de la coquille à la faveur d'une solution de continuité (fêlure, lavage par exemple). La coquille assure la protection de l'œuf contre toute pénétration microbienne susceptible de le contaminer. L'intégrité de la coquille est donc déterminante pour le maintien de la qualité sanitaire de l'œuf. Ainsi, sur une production de 16 milliards, 1 milliard d'œufs est déclassé pour défaut de coquille (77).

L'émergence des Salmonelles en tant que cause principale de salmonellose humaine dans de nombreux pays est attribuée à cette capacité de coloniser le tissu ovarien des poules et d'être présent dans le contenu d'œufs en coquille intacts.

La contamination interne des œufs semble résulter essentiellement de la capacité des souches de salmonelles à coloniser les tissus reproducteurs (ovaire et partie haute de l'oviducte). Il s'agit essentiellement de Enteritidis, mais aussi de Heidelberg (58).

D'après COGAN *et al.* (31), il semble que la capacité à se multiplier à l'intérieur des œufs soit en rapport avec la possession de structures de surface, telles que les fimbriae, les curli fimbriae, les longues fimbriae polaires, les fimbriae codées par les plasmides, ainsi que les flagelles.

Les souches de *Salmonella* Enteritidis dépourvues de flagelles sont incapables de se multiplier dans l'œuf de poule. Celles dépourvues des curli fimbriae, dont celles du type phagique PT6, présentent une forte prolifération dans certains œufs, mais nettement moins que celles qui sont pourvues de ces fimbriae.

Il semble qu'avant la ponte, des facteurs internes à l'œuf puissent contrôler les salmonelles. En effet, si une moyenne de 30 p. cent des œufs en formation dans l'oviducte de poules infectées contient des salmonelles, ils ne sont plus que 0 à 0.6 p. cent juste après la ponte (84).

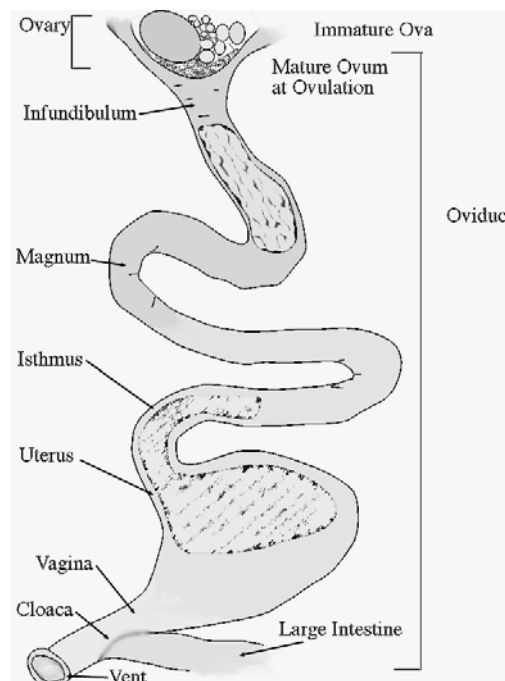
GAST *et al.* (57) ont étudié la fréquence, le niveau de contamination et la localisation des salmonelles dans les œufs de poules contaminées par voie orale, aéroportée par aérosol ou intraveineuse. Ils n'ont pas observé de différence significative entre les 3 voies d'inoculation pour ces trois critères. Dans les 3 cas, les salmonelles sont retrouvées plus souvent dans le jaune (à une fréquence entre 4 et 7 p. cent) que dans l'albumen (0 à 2 p. cent). Pour plus de 73 p. cent des œufs contaminés, il est retrouvé moins de 1 CFU/ml, et seulement 3 p. cent des œufs contaminés contiennent plus de 100 CFU/ml. Ces fortes contaminations concernent essentiellement les œufs de poules contaminées par voie intraveineuse.

Si la surface externe de la coquille n'offre aucune possibilité de multiplication bactérienne, après la ponte, le contenu de l'œuf semble être un milieu plus favorable à la multiplication des salmonelles.

Elles ne peuvent pas se multiplier dans le blanc d'œuf en raison du manque de nutriments. Leur diffusion dans l'œuf et leur multiplication se produit à la faveur de la diminution des moyens de défense de l'œuf (vieillesse avec diminution de la viscosité, affaiblissement de la membrane vitelline) ainsi que d'une température favorable (température ambiante). La membrane vitelline, qui sépare le blanc du jaune, est riche en collagène et entourée d'une couche de glycoprotéines. Le glucose du blanc d'œuf réagit avec ces protéines augmentant progressivement la perméabilité de cette membrane durant le stockage à température au dessus de 6°C. Ceci libère des constituants du jaune qui vont permettre l'invasion par la bactérie après environ 21 jours à 20°C, et permettre de fortes concentrations en germes (jusqu'à 10<sup>6</sup> UFC par ml d'œuf), ainsi que la contamination d'environ 7 p. cent des œufs à l'épilage. (31)

Dans ce cas de figure, l'intoxication alimentaire peut se produire, même en l'absence de toute faute de préparation et de stockage.

Figure 2 : Appareil reproducteur de la poule pondeuse (24).



#### I.B.4. Epidémiologie

##### I.B.4.1. Descriptive

La prévalence des deux souches est différente :

- *Salmonella* Enteritidis est plutôt sporadique, liée à des sites à risque, durablement contaminés (tels que des couvoirs). Le lysotype le plus fréquent est le lysotype 4, d'ailleurs utilisé dans les vaccins commerciaux.
- *Salmonella* Typhimurium est plus ubiquiste et peut avoir une extension plus rapide avec certainement le rôle de l'aliment et des autres animaux de rente (notamment les porcs et les bovins) (134).

Comme le montrent les Tableau 1 et Tableau 2, cette prévalence est faible et concerne essentiellement les troupeaux de production.

Tableau 1: Taux d'infection à *Salmonella* Enteritidis des troupeaux de la filière ponte en dépistage obligatoire. (38)

Etages	Périodes	p. 2000	cent	p. 2001	cent	p. 2002	cent	p. 2003	cent	Effectif 2003
sélection	élevage	0		0		0		0		0
	ponte	0		0		0		0		0
multiplication	élevage	0		0		0		0		0
	ponte	2.19		0.99		0		1.2		1
production	élevage	0.3		0.2		0.16		0.32		8
	ponte	2.31		2.32		2.35		3.22		95

Tableau 2 : Taux d'infection à *Salmonella* Typhimurium des troupeaux de la filière ponte en dépistage obligatoire. (38)

Etage	Périodes	p. cent 2000	p. cent 2001	p. cent 2002	p. cent 2003	Effectif 2003
sélection	élevage	0	0	0	0	0
	ponte	0	0	0	0	0
multiplication	élevage	0	0	0	2.2	1
	ponte	0	0	0	1.2	1
production	élevage	0.35	0.4	0.16	0.36	9
	ponte	-	-	-	-	[13]

#### **I.B.4.2. Analytique**

##### **I.B.4.2.1. Sources de l'infection**

Les sources de germes sont pratiquement illimitées. On distingue trois catégories de sources de salmonelles dans un troupeau de volailles de ponte :

- l'environnement de l'élevage avec les animaux eux-mêmes, les animaux familiers, les rongeurs, les insectes, les Hommes (chaussures, vêtements), les équipements (chariots, caisses), les autres animaux de rente, les oiseaux (sauvages)
- les poussins livrés
- les roues des camions de livraisons (aliments, poussins)
- l'aliment et l'eau de boisson

Les matières virulentes principales sont les fientes.

##### **I.B.4.2.2. Réceptivité et sensibilité**

La susceptibilité des poulets à l'infection salmonellique est très importante à l'âge d'un jour (quelques centaines de bactéries suffisent alors pour infecter le poussin) mais diminue rapidement. À l'âge de trois semaines, il faut un million de germes pour infecter un poulet.

Lorsque la poulette entre en production, cette sensibilité est à nouveau très importante, mais diminue jusqu'au pic de production, période à laquelle il est très difficile de l'infecter.

BAILEY *et al* (9) ont montré que seulement un à trois oeufs contaminés par des salmonelles parmi 200 oeufs suffisent pour contaminer 98 p. cent des poussins d'un lot en une semaine. Lorsque ces oiseaux contamineurs sont placés dans un lot d'oiseaux contacts non contaminés dans un enclos au sol à un ratio de 1/10, seulement 50 p. cent des animaux deviennent positifs.

50 p. cent des poussins d'une population peuvent être infectés si on utilise 10 UFC de *Salmonella* Typhimurium à un jour mais il faut 10<sup>6</sup>UFC pour coloniser seulement 10 p. cent de la population à l'âge de 14 jours. (132)

La mue forcée chez la poule pondeuse est une période sensible supplémentaire.

##### **I.B.4.2.3. Modes de transmission**

Compte tenu des formes très frustes prises par l'infection, la contamination est insidieuse.

La transmission horizontale directe ou indirecte, recouvre de nombreux vecteurs (voir Figure 3)

- Voies principales avec le personnel, l'équipement et les autres animaux de rentes et de compagnie

- Voies secondaires : oiseaux, rongeurs, insectes et autres nuisibles

- Autres voies : aliment, eau, air contenant des poussières, fécès, plumes.

La transmission horizontale peut être réduite de manière efficace par la mise en place de barrières sanitaires strictes et par le nettoyage et la désinfection de l'environnement.

Au sein du troupeau de ponte, la transmission horizontale se fait surtout par l'amplification au sein du troupeau par le mécanisme d'ingestion/multiplication/excrétion et le recyclage des germes (73)

Lorsque les salmonelles s'installent, le taux de colonisation en salmonelles reste souvent entre 0 et 40 p. cent dans un lot et varie selon les différents stress.

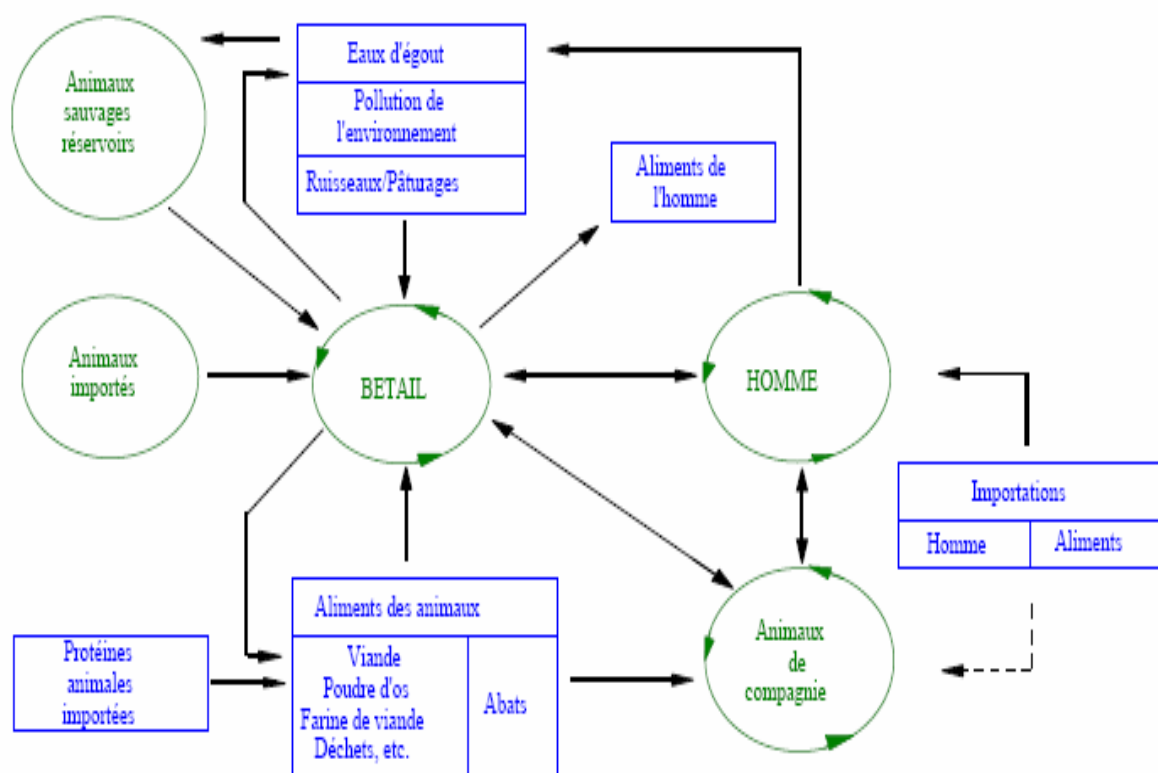
En effet, lorsque les volailles sont stressées, elles ont tendance à manger plus les fientes, ce qui contribue à une implantation accrue des salmonelles (22)

Epidémiologiquement, Enteritidis (et d'autres sérovars entéroinvasifs) apparaissent capables, de se transmettre verticalement suite à la contamination de l'ovaire ou pénétration de la coquille pendant le refroidissement de l'œuf à l'éclosoir. Dans ce cas, les signes qui doivent inquiéter, quel que soit le sérovar, sont :

- une forte contamination de l'environnement de l'élevage
- la détection des salmonelles au couvoir malgré le respect de procédures efficaces et qui ont fait leurs preuves, de désinfection des œufs, des salles, des matériels, etc.
- l'isolement de salmonelles dans les organes internes
- la présence d'anticorps détectables dans les cas où l'on dispose d'une technique sérologique appropriée.

La transmission verticale est considérée comme la voie principale de contamination par *Salmonella* et est la plus difficile à maîtriser (73).

Figure 3 : Le cycle des salmonelles (23).



### **I.B.4.3.Synthétique**

Quelle que soit la souche ou l'espèce cible, les salmonelloses ont de nombreuses caractéristiques communes :

- Portage asymptomatique fréquent et pouvant être de longue durée avec, par exemple, une excrétion de salmonelles dans les matières fécales jusqu'à 4 mois pour *Salmonella* Typhimurium, pendant plusieurs années pour *Salmonella* Dublin. Il ne faut pas non plus négliger une dormance possible des salmonelles dans les ganglions mésentériques (127). Les traitements antibiotiques réduisent ce portage, mais ne le suppriment pas.
- Une transmission très aisée du germe par voie orale et parfois par voie aérogène. Les matériaux organiques contaminants les plus souvent incriminés sont les matières fécales et les expectorations. En plus de la transmission directe entre congénères, les rongeurs et les insectes constituent une source importante de contamination. Le portage mécanique par le personnel circulant est courant.
- Des répercussions sur la santé publique, l'agriculteur et le vétérinaire étant particulièrement exposés.
- Une bonne sensibilité, fort heureusement, à la plupart des désinfectants.
- La probabilité de la présence d'un œuf contaminé par *Salmonella*, dépend de la prévalence parmi les troupeaux, de la prévalence au sein du troupeau et de la fréquence avec laquelle les poules infectées pondent des œufs contaminés. Les poules infectées ne produisent pas des œufs contaminés à une fréquence constante, cette occurrence est liée à l'hôte, à la souche bactérienne, à des facteurs environnementaux. On estime pourtant que la production d'œufs contaminés chez une poule pondeuse infectée naturellement par *Salmonella* est de l'ordre de 1,5 à 2 p.100. La prévalence parmi les troupeaux (c'est-à-dire la probabilité qu'un troupeau contienne une ou plusieurs poules infectées) dépend en outre des facteurs qui servent à introduire *Salmonella* dans les troupeaux (par exemple, les poulettes de remplacement, le transfert par l'environnement du fait de troupeaux infectés antérieurement, la contamination des aliments, etc.).

Les principaux facteurs de risque pour la diffusion et l'entretien des salmonelles dans l'environnement d'un élevage sont (41) :

- la race peut être un facteur
- la taille du troupeau : le stress favorise la colonisation
- les visites dans les bâtiments augmentent le risque
- les nettoyages et les désinfections du silo d'aliment diminuent le risque
- de même que les désinfections des abords de l'élevage
- la présence d'industries dans les environs, favorise les migrations de rongeurs, d'insectes
- la présence d'autres élevages à proximité immédiate est également un facteur de risque

### **I.B.5. Diagnostic expérimental**

La surveillance des salmonelles dans la filière ponte est basée sur des dépistages réguliers dans les élevages producteurs, afin de détecter les troupeaux contaminés, d'établir la prévalence nationale et les évolutions de la prévalence.

Le laboratoire d'analyses doit être accrédité.

Les méthodes de détection utilisées sont de deux types : (41)

#### **I.B.5.1.Diagnostic bactériologique**

C'est le plus fiable, il permet d'étayer une suspicion et de déterminer l'antibiogramme. C'est la méthode utilisée dans le cadre réglementaire du dépistage. Il permet de déterminer la prévalence des animaux excréteurs.

Il est fondé sur l'isolement, l'identification et le typage de la salmonelle, soit sur des prélèvements animaux soit sur des échantillons environnementaux (fientes caecales,

écouvillons cloacaux, échantillons de couvoir tels que duvets, méconium, poussins mort-nés, chiffonnettes, fond de boîte).

La recherche bactériologique est très sensible au début de l'infection lorsque l'excrétion est importante, elle est moins efficace lorsque seul un petit nombre d'animaux excrètent de façon intermittente. Elle est également moins efficace lorsque les animaux sont vaccinés et excrètent soit des souches vaccinales soit moins de germes (35).

### **I.B.5.2.Diagnostic sérologique**

L'infection salmonellique entraîne une réponse du système immunitaire avec une production d'anticorps et activation d'une réponse cellulaire. Les anticorps sont détectables dans le sérum des animaux infectés. La surveillance sérologique est basée sur les mêmes critères statistiques que la surveillance bactériologique. Elle permet de déterminer la prévalence des animaux sérologiquement positifs. Elle peut-être utilisée conjointement à la méthode bactériologique de manière à améliorer la sensibilité des résultats. En effet, les anticorps peuvent persister plusieurs mois durant, alors que l'excrétion bactérienne est devenue très faible. A l'inverse, au début de l'épisode infectieux, les anticorps sont à des taux encore très bas, et un cheptel infecté pourrait échapper à un dépistage sérologique.

Il faut noter que l'usage de la vaccination peut conduire à l'obtention de résultats sérologiques positifs en l'absence de méthode analytique discriminante pour les salmonelles vaccinales de même sérogroupe.

Les tests sérologiques sont très sensibles et moins coûteux que les recherches bactériologiques, mais tout résultat sérologique positif doit être confirmé par la bactériologie.

Les anticorps recherchés sont les Ac anti-LPS et les Ac-antiflagelles. Ils ne sont donc pas entièrement spécifiques de *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium.

Les différentes méthodes analytiques (voir Tableau 3) :

- Agglutination rapide par plaque (RPA) : basée sur un antigène pullorique. Avec l'agglutination rapide sur lame, il existe une réaction croisée entre les Ac-anti Enteritidis et l'Ag pullorique.
- Agglutination lente en tube
- ELISA indirecte basée sur antigène LPS (antigène de paroi) des deux sérotypes Enteritidis et Typhimurium (sérogroupe B et D)
- DAS-blocking ELISA basée sur les Ac monoclonaux d'un Ag spécifique d'épitope flagellaire (antigène gm de Enteritidis ou antigène i de Typhimurium) (41)

Tableau 3 : Sérologies salmonelles : spécificités (141).

<i>Salmonella</i>	RPA	LPS	gm-DAS	i-DAS
Pullorum	++	++	-	-
Gallinarum	+	++	-	-
Enteritidis	+	++	++	-
Typhimurium	-	++	-	++

Il est important de rappeler que la contamination par les salmonelles conduit à la production d'anticorps circulants si et seulement si la souche est invasive.

## **I.C. Les salmonelloses humaines**

### **I.C.1. Définition**

Les salmonelloses humaines se répartissent en deux catégories :

- les salmonelloses spécifiquement humaines, il s'agit du typhus et des paratyphoïdes A, B et C (*Salmonella* Typhi et Paratyphi qui n'ont pas de réservoirs animaux)
- les salmonelloses d'origine animale qui sont à proprement parler des zoonoses

### **I.C.2. Importance**

La Salmonellose est l'une des maladies infectieuses les plus fréquentes dans le monde. C'est la maladie la plus importante en terme d'impact sur la morbidité et la mortalité chez l'Homme.

La FAO a estimé l'incidence de la Salmonellose se situait entre 14 et 120 cas pour 100 000 personnes en 1997 (voir Tableau 4). Les salmonelles surviennent sous forme sporadiques ou de TIA mais elles peuvent aussi entraîner des épidémies régionales, voire internationales

Tableau 4 : Évaluation des risques liés à *Salmonella* dans les œufs et les poulets de chair (48)

PAYS	Nombre de cas/100 000 personnes en 1997
Australie	38
Allemagne	120
Japon	73
Pays-Bas	16
Etats-Unis	14

Aux USA, le nombre de cas annuel est estimé à environ 2 millions, dont l'issue est la mort dans 0.1 p. cent des cas (2000 morts) (43).

En 2001, 73006 cas ont été déclarés au niveau européen à Enter-Net (115).

En France, 12 883 souches de *Salmonella* d'origine humaine et 460 foyers de cas groupés de salmonelloses ont été répertoriés en 2000 (voir Tableau 5).

Tableau 5 : Répartition des foyers par type en 2000, 2001 et 2002 (30)

Années	Tous types	Nombre de foyers par type					
		Infections collectives	Foyers familiaux	Epidémies hospitalières	Colonies de vacances	Ecole	Crèche
2002	332	81	238	8	2	2	1
2001	391	54	319	5	1	7	5
2000	460	83	358	8	2	5	5

Mais on estime qu'une recherche de salmonelles n'est pratiquée que dans une proportion faible des infections : de 6 à 10 p. cent.

Selon l'Institut national de veille sanitaire, en France, l'exhaustivité du CNR-Salm pour l'identification des TIAC avec isolement de *Salmonella* a été estimée à 50 p. cent (IC 95 p. cent : 44 – 58) en 1995 (147).

Le coût pour la collectivité est important. Aux Etats-Unis, les dépenses engagées pour un cas hospitalisé sont évaluées à 18000 \$.

Ces aspects sanitaires et économiques font de la salmonellose un objectif prioritaire du Ministère de l'Agriculture.

L'incidence des salmonelloses est toutefois en baisse de 5.5 p. cent par rapport à 1999 et de 22 p. cent par rapport à 1998 pour les souches et de 41 p. cent par rapport à 1999 pour les cas groupés en France.

Depuis 1998, le nombre d'isolements humains de tous les sérotypes de *Salmonella* a diminué (voir Tableau 6)

Tableau 6 : nombre annuel d'isolements reçus ou signalés (30) 1997-1999

	1997	1998	1999	moyenne
Tous sérotypes	18854	16004	13453	16104

Il faut insister sur le caractère non exhaustif des cas déclarés et on estime, au niveau mondial, à 10 ou 100 fois plus le nombre de cas réels.

Cette tendance à la baisse des isolements est également observée dans d'autres pays européens.

La décroissance de l'incidence dans la Communauté Européenne et en France coïncide avec la mise en place de mesures de contrôle dans les élevages de volailles en 1998.

Dans les faits, la réduction de la prévalence parmi les troupeaux a entraîné une réduction directement proportionnelle du risque pour la santé humaine.

Par ailleurs, on estime que 96 p. cent du nombre total des cas de salmonelloses ont pour origine des aliments.

Les salmonelles sont responsables de 64 p. cent des TIAC dont l'agent pathogène est identifié, comme le montre les données du Tableau 7 :

Tableau 7 TIAC 1999 et 2000 (64)

TIAC 1999-2000	Nombre
Nombre de foyers	1267
Nombre total de malades	17378
Nombre de décès	10
Pourcentage de cas hospitalisés	8 p. cent
p. cent TIAC à agents inconnus	59 p. cent
p. cent TIAC à Salmonelles (sur les foyers à pathogène identifié)	<b>64</b> p. cent des 41 p. cent à pathogène identifié

### **I.C.3. Pathologies**

Les salmonelloses d'origine animales se répartissent en deux catégories :

#### **I.C.3.1. Toxi-infection alimentaire**

Elle n'est pas toujours une zoonose *sensu stricto*, la coquille d'œuf étant un vecteur passif, lorsque la salmonelle se trouve en surface.

C'est une anadémie lorsque la source de contamination est unique.

- C'est le nombre de bactéries ingurgitées (et donc de toxine et de catabolites) qui déclenche la pathologie.
- Elle est exclusivement d'origine alimentaire et survient le plus souvent à la suite de la consommation d'œufs en coquille ou de préparations à base d'œufs non ou peu cuites.
- Elle concerne soudainement et de manière simultanée les consommateurs d'un même aliment.
- La période d'incubation va de 8 à 72 heures, en général 12 à 36 heures après le repas contaminant. Les plus courtes périodes d'incubation sont toujours liées soit à de fortes doses de salmonelles soit à des personnes très sensibles. Les troubles se manifestent brutalement par une douleur abdominale souvent violente et des vomissements fréquents, douloureux et violents, accompagnés de diarrhée liquide, fétide habituellement glaireuse et parfois sanglante, de l'abattement, des céphalées, avec une fièvre de 38-39°C, des frissons. La maladie s'accompagne parfois de manifestations nerveuses (contractures musculaires, mouvements cloniques, somnolence), souvent d'oligurie.

- Le traitement, si l'état du malade le permet, est réduit à son strict minimum et ne fait pas appel aux antibiotiques.

### **I.C.3.2.Infection salmonellique**

- C'est la virulence de la bactérie (et donc la multiplication *in vivo*) qui est déterminante pour le développement de la pathologie.
- Les sources de contaminations sont variées (aliments, eau, animal, Homme, etc.)
- L'évolution dans une population est plus progressive, conditionnée par la réceptivité des sujets
- L'incubation est prolongée de 4 à 15 jours. Le développement est graduel avec un syndrome fébrile initial d'intensité variable, suivi de gastro-entérite et éventuellement d'hépatite, endocardite, méningite, arthrites, etc. L'évolution se fait sur 1 à 3 semaines.
- L'excrétion de salmonelles est très importante au début de l'infection puis décroît avec le temps. Certaines personnes deviennent des porteurs latents et peuvent excréter pendant plusieurs mois.

### **I.C.3.3.Pathogénie**

La pathogénicité des salmonelles est « sérovar-dépendante » et « hôte-dépendante » : les facteurs qui influencent cette pathogénicité ne sont pas tous connus.

Les études les plus avancées concernent la souris, et l'extrapolation aux autres espèces n'est pas toujours possible.

La multiplication des microorganismes dans les intestins, ainsi que la sécrétion de toxines, produisent des symptômes de gastro-entérite aiguë. L'irritation et l'inflammation des intestins sont provoquées par une infection profonde des muqueuses de l'iléon et du côlon. La multiplication dans la sous-muqueuse donne naissance à des foyers inflammatoires avec abcès et extension aux formations lymphoïdes du côlon. Après quelques jours, les germes disparaissent de la muqueuse mais pullulent dans les ganglions mésentériques ; ils peuvent être parfois isolés à partir du foie et de la rate mais jamais du sang.

Certaines salmonelles peuvent provoquer des troubles viscéraux divers : arthrite, septicémie, méningite, péricardite, endocardite, leucopénie (baisse du nombre des globules blancs), ostéomyélite, mais en général les bactéries restent localisées au niveau de l'intestin.

Les infections à *Salmonella* peuvent être de bénignes à graves, et sont parfois fatales. Les décès sont plus souvent observés dans les populations vulnérables, notamment les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées.

Il est recensé environ 2 cas de mortalité pour 1000 contaminations.

Un autre problème grave réside dans le développement d'antibiorésistances multiples, associées notamment à l'usage d'antimicrobiens dans l'alimentation animale. La pression sélective exercée sur les salmonelles peut être à l'origine du développement de résistances transférées à l'homme par le biais de ses aliments.

### **I.C.4. Epidémiologie**

#### **I.C.4.1.Sources**

Les aliments en cause pour les TIAC causées par *Salmonella* Enteritidis en France en 2003 sont essentiellement les œufs et les produits à base d'œuf pouvant contenir des bactéries viables : il s'agit le plus souvent d'œufs (ou de produits à base d'œuf) crus ou insuffisamment cuits, pâte à gâteaux, glaces confectionnée à la maison, mayonnaise, sauce de salade et sauce hollandaise, œufs frits ou pochés. Viennent ensuite les viandes de volailles insuffisamment cuites, le lait cru et les produits laitiers non pasteurisés, les jus de fruits non pasteurisés, etc (voir Tableau 8).

Tableau 8 : Agents identifiés ou suspectés et aliments responsables ou suspectés 2001-à 2003 (39)

Aliments	<i>Salmonella</i>				<i>Clostridium perfringens</i> <i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Autres agents (dont virus)	Agent indéterminé	Total
	Enteritidis	Typhimurium	Autres sérotypes	Sérotype inconnu					
Laits produits laitiers	2	5	11	3	5	34	12	7	79
Oufs et produits à base d'oeufs	162	53	4	64	6	25	3	17	334
Viandes	4	5	1	10	44	29	13	28	134
Produits de charcuterie	11	7	2	11	9	20	17	11	88
Volailles	3	1	4	15	19	13	19	11	85
Poissons et fruits de mer	3	1	0	6	5	9	76	13	113
Coquillages	8	2	0	2	7	2	89	11	121
Autres aliments	21	3	1	25	78	56	25	42	251
Eau boissons	0	0	0	1	1	3	4	12	21
Aliments non retrouvés	37	13	5	40	50	68	63	285	561
Total	251	90	28	177	224	259	321	437	1787

*Salmonella* est globalement plus souvent identifiée ou suspectée en restauration familiale qu'en restauration collective. Cependant, la proportion de TIAC à salmonelles, survenues en restauration collective reste globalement élevée.

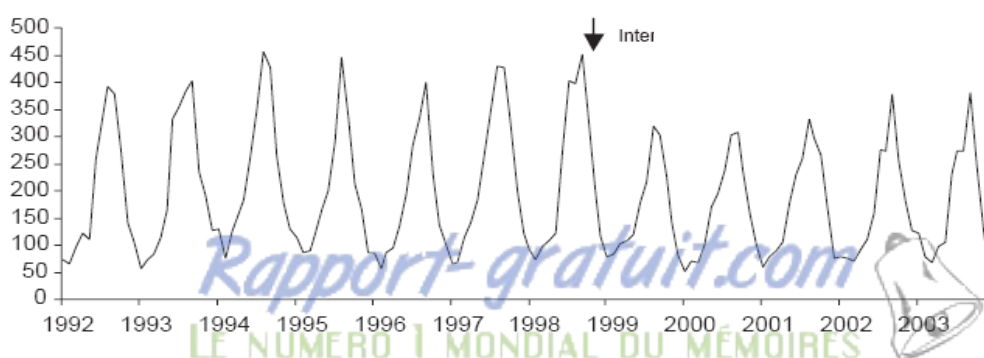
#### I.C.4.2. Dose infectieuse

La dose infectieuse varie énormément, en fonction du sérovar : moins d'un millier de cellules de *Salmonella* Typhi est suffisant pour déclencher la maladie, par contre les estimations réalisées dans le cadre d'autres sérovares non adaptés à l'Homme, indiquent clairement que des doses de  $10^5$  à  $10^7$  bactéries sont nécessaires. Dans certaines conditions, notamment en relation avec la composition de l'aliment, cette dose peut être beaucoup plus faible, par exemple lorsque ce dernier est riche en matière grasse ou en protéines, ces ingrédients ayant un effet de protection contre l'acidité gastrique pour la bactérie. (89)

#### I.C.4.3. Saisonnalité annuelle

Un des facteurs favorisant la multiplication bactérienne étant la température, la part la plus importante des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) à *Salmonelles* survient surtout pendant la période estivale de juin à septembre, avec des nombres de cas hivernaux assez bas (voir Figure 4).

Figure 4 : Cas de salmonelloses à *Salmonella* Enteritidis. (125)



#### I.C.4.4.Principales souches

Parmi les 6 sérovars les plus isolés, les sérotypes Enteritidis et Typhimurium représentent respectivement 37.9 p. cent et 33.9 p. cent des isollements comme le montre les Tableau 9 et Tableau 10.

Tableau 9 : Importance relative des souches les plus fréquemment isolées chez l'Homme en 2002 et 2001 (30).

Rang 2002	Sérotype	2002		Différence 2002-2001	Rang 2001
		Nombre	p. cent		
1	Enteritidis	4469	<b>37.9</b>	-430	1
2	Typhimurium	3998	<b>33.9</b>	<b>+225</b>	2
3	Hadar	282	2.4	-427	3
4	Infantis	178	1.5	-65	4
5	Virchow	174	1.5	-53	5
6	Derby	162	1.4	<b>+19</b>	9

Tableau 10 : Répartition des sérotypes de Salmonella isolés chez l'Homme en France en 2002 (30)

<i>Salmonella enterica</i>	Nombre de souches isolées	Nombre de sérotypes
15 principaux sérotypes (sous-espèce <i>enterica</i> )	10170 (86.4p. cent)	15
Autres sérotypes de la sous-espèce <i>enterica</i>	1356	196
Variants monophasique ou immobiles de la sous-espèce <i>enterica</i>	155	
Autres sous-espèces ( <i>salamae</i> , <i>arizonae</i> , <i>diarizonae</i> , <i>houtenae</i> )	53	20
Souches auto-agglutinables (rough)	41	
Nombre total de <i>Salmonella</i> d'origine humaine enregistrées au CNR en 2002	11775	232

Il est important de noter que le réseau Enter-Net a constaté, entre 1998 et 2003, une nette diminution du lysotype 4 de *Salmonella* Enteritidis, peu à peu « remplacé » par d'autres souches : phage type s 1, phage type 14b (voir Tableau 11)

Tableau 11: Evolution des souches Enteritidis humaines dans les pays européens entre 1998 et 2003. (51)

	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Lysotype 4 (nombre de cas)	61.8 p. cent (21630)	59.7 p. cent (17342)	52.8 p. cent (14857)	45.6 p. cent (14074)	41.2 p. cent (11725)	32.1 p. cent (8794)
Autres lysotypes (nombre de cas)	38.2 p. cent (13368)	40.3 p. cent (11733)	47.2 p. cent (13297)	54.4 p. cent (16783)	58.8p. cent (16743)	67.9 p. cent (18637)
Total des cas	34998	29075	28154	30857	28468	27431
Nombre de pays	12	14	15	15	15	15

#### **I.C.4.5. Circonstances de la survenue**

Dans la majorité des cas, une salmonellose, c'est une contamination initiale, suivie d'une erreur de préparation puis de stockage, entraînant une multiplication des bactéries (voir Tableau 12).

Les quelques *Salmonella* des œufs porteurs (+/- 0.1 p. cent des œufs dans les troupeaux infectés naturellement) dans un des milieux internes de l'œuf (blanc ou jaune), vont se multiplier d'autant plus rapidement que l'œuf sera placé à une température plus élevée et que la contamination initiale sera proche du jaune. La quantité de salmonelles atteinte au terme de la multiplication, dans ces cas, est alors suffisante pour provoquer une intoxication alimentaire, même en l'absence de faute d'hygiène, lorsque de tels œufs sont utilisés et consommés sans cuisson préalable (mayonnaise, pâtisseries, etc.).

Tableau 12 : Part des facteurs ayant contribué à l'incident (foyers où au moins un facteur a été identifié). TIAC déclarées en France entre 2001 et 2003. (39)

Facteurs	2001(p. cent)	2002 (p. cent)	2003 (p. cent)
Matière première contaminée	44	31	24
Contamination par l'environnement	50	48	52
Personnel	8	21	17
Equipement	44	44	47
Erreur dans le processus de préparation	34	31	34
Délai important entre préparation et consommation	25	20	26
Non respect des températures de conservation	38	33	42
Chaîne du chaud	15	11	20
Chaîne du froid	33	28	35

Total > 100 p. cent, plusieurs facteurs étant possibles pour une seule TIAC

La matière première contaminée représente environ 33 p. cent des facteurs en causes lors de TIAC. Le facteur humain et les températures de conservation des denrées interviennent pour une grande part dans le processus.



## II. LA PRODUCTION D'ŒUFS

Pour comprendre l'intérêt de l'utilisation des différents moyens de lutte contre les salmonelles, il convient de les replacer dans leur contexte technique, économique et juridique.

### II.A. La filière œufs de consommation

#### II.A.1. Organisation générale de la filière œufs de consommation

L'aviculture française est une aviculture structurée en filières de production que sont les filières chair (dinde, canard, pintade, oie, poulet), labels et œufs.

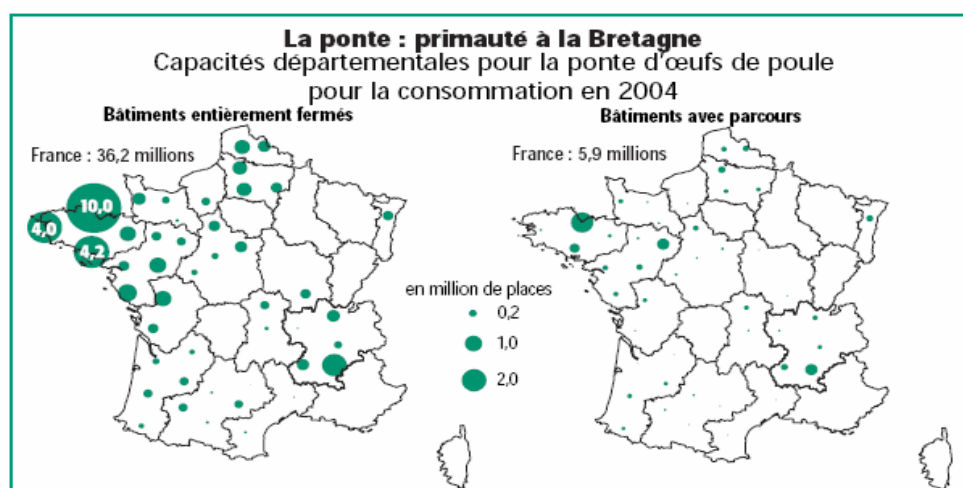
La filière œufs de consommation est cloisonnée en plusieurs étages (voir Tableau 13) de la sélection génétique des races à l'œuf de consommation, en passant par la multiplication, le troupeau de ponte et le centre de conditionnement. (85)

Tableau 13 : Elevages visés par le dépistage obligatoire en 2004 (18)

Type de troupeaux	Nombre total de troupeaux	Nombre total d'animaux
Troupeaux de sélection en période d'élevage	17	107590
Troupeaux de sélection en période de ponte	22	106509
Troupeaux de multiplication en période d'élevage	57	847377
Troupeaux de multiplication en période de ponte	83	921309
Troupeaux de production en période d'élevage	2576	48567635
Troupeaux de production en période de ponte	3359	46802430

La production est assez concentrée géographiquement (95 p. cent de la production est concentrée dans 50 départements, voir Figure 5), et contractuelle pour la majeure partie (environ 60 p. cent pour la filière œufs) (139).

Figure 5 : Répartition géographique de la production (105)



Source : Agreste - Enquête aviculture 2004

Tableau 14 : Evolution du nombre de cheptels de poules pondeuses d'œufs de consommation entre les recensements de 2000 et 2005 (105)

	2000	2005
Cheptels de poules pondeuses en élevage professionnel (millier)	133	77
Effectif des pondeuses	47365659	47397131
Total cheptels de poules pondeuses (millier)	229	131
Effectif total en poules pondeuses	48924603	48851200

Entre les recensements de 2000 et 2005, les cheptels français de poules pondeuses, en nombre d'exploitations et en effectif, a encore considérablement évolué dans le sens de toujours plus de concentration (voir Tableau 14).

## II.A.2. Etages de la filière

### II.A.2.1. Chaîne de production de l'œuf de consommation

La structure de production est pyramidale. Le nombre d'individus à l'étage de la sélection est relativement faible, et un seul arrière-grand-parent peut être à l'origine de plus de 250000 poulettes futures pondeuses. La contamination des arrières grands-parents peut donc avoir des conséquences sévères pour toute la filière (voir Tableau 15).

Tableau 15 : La pyramide de production de la filière œufs de consommation (119).

Etage	Utilisation	Etape	Produit	Nombre d'individus
Sélection	Lignée de base pure	1 <sup>ère</sup> génération	Œufs d'incubation et poussins	
	Lignée élargie	2 <sup>ème</sup> génération (arrière grands-parents)	Œufs d'incubation et poussins	1 → 40 à 50 individus
	Croisements	3 <sup>ème</sup> génération (grands-parents)	Œufs d'incubation et poussins	1 → 50 à 60
Multiplication	Troupeau reproducteur	4 <sup>ème</sup> génération (parents)	Œufs d'incubation commerciaux, et poussins	1 → 80 à 90
	couvairs	5 <sup>ème</sup> génération	Poussins commerciaux	160000 à 270000
Production	Démarrage	Poulette future pondeuse	Poulettes démarrées	id
	Troupeau de production	Poule pondeuse	œufs	4,16.10 <sup>7</sup> à 9.10 <sup>7</sup>

Le nombre des opérateurs à chaque étage est réduit :

- moins de 10 sélectionneurs au niveau mondial
- 170 couvoirs
- à peine 2576 élevages de poulettes démarrées
- environ 230000 troupeaux de production (de quelques poules à plusieurs milliers), mais seulement 3359 troupeaux faisant l'objet de dépistage salmonelles.
- des collecteurs et centres de collecte (enregistrés)
- environ 560 centres d'emballage (agrément sanitaire)
- auxquels s'ajoute un nombre relativement important d'éleveurs vendant directement une partie de leur production.
- environs 63 établissements producteurs d'ovoproduits (38)

En relation avec cette filière, différents acteurs participent plus ou moins directement à l'activité de production des œufs :

- industries de l'alimentation
- professionnels du transport
- industries du bâtiment
- industries du matériel d'élevage
- industries de la transformation et du commerce de détail
- laboratoires et organismes de recherche

La contamination par les salmonelles peut intervenir à de nombreux étages de la filière.

Tous les maillons sont des parties prenantes, directement ou indirectement, dans la lutte contre les salmonelles.

### **II.A.2.2.Sélection des races de poules pondeuses**

Les races sont créées par quelques sélectionneurs (voir Tableau 16) qui travaillent pour l'amélioration zootechnique de l'espèce, par la modification de son patrimoine génétique et l'adaptation aux tendances économiques, le but étant de produire un œuf de qualité au moindre coût, en accroissant le nombre des œufs par poule pondeuse, mais aussi en accroissant la résistance aux infections..

Tableau 16: Les sélectionneurs et les races de poules pondeuses (104)

*(L'ordre dans lequel apparaissent les noms des sélectionneurs dans la liste ci-après ne reflète pas la taille de leur entreprise ni leur part de marché.)*

Maison mère	Éleveur	Souches commerciales
Merial	ISA	ISA Brown
	Shaver	Starcross 566 (blanc) Shaver White Shaver 2000 Starcross 579/Shaver Brown
	Babcock	B300/ISA White B380 (brun)
	Hubbard	Golden Comet (brun)
Lohmann-Wesjohann Group	H&N	Nick Chick (blanc) Brown Nick (brun) Tint Nick
	Hy-Line	W-36 W-77 W-98 Hy-Line Brown Hy-Line Silver Brown H-Gray T
	Lohmann Tierzucht	Lohmann White-LSI Lohmann Brown Lohmann Silver Brown Lohmann Tinted
Toshoku	Dekalb	Dekalb XL (blanc) Dekalb Delta White Dekalb Beta (blanc) Dekalb Amber Dekalb Black Dekalb Gold
Nutreco	Euribrid	Hisex White Hisex Brown
Hendrix Poultry Éleveurs	Hendrix	Bovans White Bovans Brown Bovans Goldline Bovans Nera
Anak	Anak	Yaffa Colour Sex B Yarkon Tint T
Hungarian State-owned	Babolna	Tetra-SL Harco
Dominant Ltd.	Dominant	Dominant brown D- 102 Dominant white D-529 (également races de pondeuses pour système d'exploitation alternatif)

Les critères de sélection sont nombreux et variés. Outre les performances de croissance et de ponte, la solidité de la coquille, l'âge de la maturité sexuelle, l'efficacité alimentaire (indice de consommation) et la composition corporelle (rendement en muscles pectoraux,

adiposité) sont pris en compte en sélection. L'évolution du potentiel génétique des animaux est permanente et rapide.

La recherche sur la résistance des poules aux salmonelles existe et concerne surtout la résistance au portage de salmonelles afin de limiter les porteurs sains qui hébergent les bactéries pendant plusieurs semaines sans exprimer le moindre symptôme et que l'on ne distingue des congénères sains qu'au prix d'analyses approfondies. Une autre approche tournée vers la résistance aux maladies en général, vise à sélectionner les animaux sur la réponse en anticorps, la réponse cellulaire, les capacités de phagocytose, les capacités bactériostatiques de l'œuf, ou d'autres mécanismes généraux de résistance. (15)

Le rôle du sélectionneur consiste à maintenir des lignées pures, à élargir des lignées pures désignées et à créer des lignées croisées. Il se charge du développement des trois premières générations d'oiseaux et diffusent les produits de la multiplication de leurs lignées, par la vente d'œufs à couvrir ou de poulets d'un jour (production des trois premières générations de poulets de type ponte).

Une race est particulièrement représentée au niveau de la production française : il s'agit de l'ISA Brown de chez Merial produisant des œufs bruns.

La sélection sur les poules pondeuses expliquerait au moins la moitié des gains d'œufs obtenue entre 1960 et 1994, le nombre d'œufs pondus en 47,5 semaines étant passé de 194 à 284 (15)

#### **II.A.2.3. Etage de la multiplication**

Le rôle de l'éleveur multiplicateur est de multiplier les troupeaux parentaux (quatrième génération) qui produisent au final les œufs destinés à la constitution des troupeaux de ponte. Ils mettent sur le marché les produits de la 5<sup>ème</sup> génération.

Les oiseaux de ces troupeaux produisent des œufs d'incubation d'où éclosent les poussins qui deviendront les pondeuses commerciales. Les animaux souches sont importés sous forme d'œufs d'incubation ou de poussins commerciaux.

Au niveau des couvoirs, les accoueurs font éclore et élèvent ou font élever les poussins mâles ou femelles fournis par les multiplicateurs. La production des poussins de 1 jour se fait dans 6 couvoirs seulement (59).

#### **II.A.2.4. Etage de la production**

- Les éleveurs de poulettes mettent en élevage les poussins femelles fournis par les accoueurs et les livrent aux producteurs d'œufs un peu avant l'âge de la maturité sexuelle (vers 19 semaines).

- Les producteurs d'œufs de consommation gardent les poulettes durant toute la période de production (50 semaines environ) et livrent au commerce de gros ou aux détaillants des œufs en vrac ou emballés.

- Les centres de conditionnement des œufs trient (classent) et conditionnent les œufs.

#### **II.A.3. Systèmes d'élevage des poules pondeuses**

Les poules sont élevées en cage standard pour une grande majorité (87 p. cent), mais la réglementation sur la protection des poules pondeuses va faire évoluer ces chiffres rapidement.

La directive 1999/74/CE du Conseil, adoptée en 1999, s'applique aux élevages de plus de 350 poules et fait la distinction entre 3 systèmes d'élevage de poules pondeuses :

- les cages aménagées avec une surface minimale de 750 cm<sup>2</sup> par animal;
- les cages non aménagées avec une surface minimale de 550 cm<sup>2</sup> par animal; la construction ou la première mise en service de cages de ce type a été interdite à compter du 1er janvier 2003. Ce système d'élevage devra être intégralement interdit d'ici janvier 2012;

- les systèmes sans cages comportant des nids de ponte (un nid au moins pour 7 poules), et des perchoirs adéquats, dans lesquels la densité de peuplement ne peut excéder 9 poules pondeuses par m<sup>2</sup> de surface utilisable (au moins 250 cm<sup>2</sup> par poules).

Les poules élevées dans les systèmes de cages aménagées et dans les systèmes sans cage doivent disposer de nids de ponte, d'un espace de perchoir de 15 cm par poule, d'une litière permettant le piquage et le grattage et d'un accès illimité aux mangeoires, chaque animal devant disposer d'au moins 12 cm dans la cage pour se nourrir.

La cage standard sera donc progressivement remplacée par des cages aménagées, des volières à moyenne ou forte densité et les divers systèmes de production au sol avec accès ou non à un parcours extérieur.

En 2001, le nombre de poules pondeuses bénéficiant d'un parcours était de 5,3 millions dont :

- 1,4 million de poules bio, avec un parcours herbeux de 2,5 m<sup>2</sup> de terrain par poule, et une alimentation composée à 90 p. cent minimum de produits issus de l'agriculture biologique.
- 1,5 million de poules en libre parcours, dans un bâtiment avec une densité de 7 poules par m<sup>2</sup>, mais ouvert sur un parcours herbeux de 10 m<sup>2</sup> pour chaque pondeuse.
- 2,4 millions de poules en plein air disposent de 850 cm<sup>2</sup> par poule dans le bâtiment avec parcours herbeux de 2,5 m<sup>2</sup> pour chaque pondeuse (bande de plusieurs milliers).

Auxquels s'ajouteraient 600.000 poules élevées au sol en claustration, dans un bâtiment dont 1/3 du sol est couvert de litière, sans ouverture vers l'extérieur, à une densité de 7 poules / m<sup>2</sup>. Les poules sont en groupes de plusieurs milliers et disposent de 850 cm<sup>2</sup> par poule (1100 à partir de 2012). La surface accessible est disposée sur plusieurs étages. Actuellement moins de 1 p. cent des poules en France.

Pour l'ensemble de ces élevages « alternatifs », près de 6 millions de pondeuses (plus de 12 p. cent de l'effectif français de pondeuses) (95).

Le Tableau 17 illustre ces évolutions avec les chiffres pour l'année 2004.

Tableau 17 : Proportion des différents systèmes d'élevage 2004 (105)

	Systèmes d'élevage	Importance relative p. cent	Production œufs (millier)
Systèmes alternatifs	Non bio, en cage	82	9 516 827
	Non bio, au sol	5	597 790
	Non bio, en plein air	9	1 076 810
	Biologique	2	319 906
	Total		11 511 333

Selon les experts, le retour aux méthodes d'élevage en poulailler ou au sol pourrait être préjudiciable sur le plan sanitaire (voir Tableau 18), notamment en terme de salmonelloses (40).

Tableau 18 : Avantages (+) et inconvénients (-) des différents systèmes d'élevage (78)

	Batterie	Cage aménagée	Volière ou sol	Plein air
Stabilité du groupe	+++	++	-	-
Risques de cannibalisme	+++	++	+	-
Qualité du plumage	--	-	+	+
Liberté	-	+	++	+++
Conditions sanitaires	+++	++	-	-
Pollution	+++	+++	-	--
Conditions de travail	+++	++	--	--

## **II.A.4. Périodes à risques**

### **II.A.4.1. Les poussins et le couvoir**

Au couvoir, la production de poussins est conduite dans un environnement sanitaire qui ne permet pas la transmission de la flore digestive des adultes, alors que les poussins couvés naturellement sont probablement colonisés très rapidement par les micro-organismes de la mère.

La transmission horizontale des germes pathogènes entre poussins au couvoir peut se faire de manière très importante à plusieurs niveaux : dans la salle d'éclosion, dans la salle de tri, dans les caisses en plastique servant à la livraison, entre poussins, etc. Une salmonelle invasive telle que Enteritidis pourra essaimer largement, par l'intermédiaire du duvet par exemple (133).

Le système immunitaire adaptatif du poussin est immature et ne lui permet pas de se défendre activement contre la colonisation par les salmonelles. Le démarrage est un stress pour les poussins, la mise en œuvre d'un traitement préventif à base d'antibiotiques peut ralentir l'installation de la flore digestive normale.

Des équipes de recherches ont toutefois mis en évidence un mécanisme inné exploitable pour leur protection : la colonisation inhibition.

La colonisation intestinale par certaines souches bactériennes empêche en effet la surinfection par d'autres souches du même genre par un phénomène d'exclusion compétitive spécifique (151).

L'idéal serait de pouvoir vacciner dans l'œuf. Mais cette éventualité est encore lointaine et les bonnes pratiques hygiéniques restent la base de la lutte contre ces contaminations.

En conclusion, l'éclosoir est le l'endroit où doit absolument être maîtrisé le risque de contamination des poussins par les salmonelles, bien avant de songer à la prophylaxie vaccinale ou par les flores de barrière. Sans cette maîtrise à la base, tous les moyens de lutte resteraient peu efficaces.

### **II.A.4.2. L'élevage**

Comme cela a déjà été évoqué, les facteurs de contamination sont multiples.

Toute contamination résiduelle d'un bâtiment contamine les poussins à la mise en place, et il n'y a pas encore de possibilité d'immuniser des poussins avant leur arrivée dans un site potentiellement contaminé.

L'épandage des fumiers contaminés sur les pâtures contamine les parcelles utilisées pour les animaux et les cours d'eau. La liste des risques de contamination est longue et la mise en place de barrières sanitaires strictes est indispensable à la maîtrise de tous ces facteurs.

Par ailleurs, le système de conduite en bandes est fortement préconisé. Entre chaque bande, il n'y a en théorie pas de transmission de la flore digestive des adultes aux poussins mis en place.

#### **II.A.4.3. La mue**

Les poules adultes muent naturellement une fois par an durant les mois d'automne. La mue naturelle remplace les vieilles plumes par de nouvelles. La mue forcée accélère artificiellement le processus par la privation de nourriture, et de lumière. Cette pratique entraîne une perte importante de poids et de plumes.

La mue forcée est un procédé d'élevage permettant d'allonger la période de production d'un troupeau au delà de la durée habituelle.

L'induction de la mue est un système de management utilisé pour optimiser les effectifs de pondeuses et concerne 75 à 85 p. cent des effectifs aux USA et au Japon. Les méthodes pour induire la mue consistent en une restriction alimentaire jusqu'à l'obtention d'un certain pourcentage de perte de poids corporel.

La mue forcée constitue une période de vulnérabilité supplémentaire face à l'infection.

Cette technique déprime fortement l'immunité, rendant le troupeau mué très vulnérable aux infections, notamment salmonelliques (par altération des sous populations de lymphocytes T).

Dans des essais expérimentaux, les poules muées :

- excrètent plus de salmonelles
- présentent de nombreuses salmonelles dans leurs organes internes
- restent infectées sur de plus longues périodes
- expriment plus de symptômes intestinaux
- montrent plus de rechute d'infections antérieures.

La mue peut donc exacerber un problème de salmonelles en situation de ponte commerciale. (110)

#### **II.A.5. La production française d'œufs de consommation**

850 milliards d'œufs sont produits chaque année dans le monde principalement en Europe et en Asie (en moyenne 282 œufs par poules par an (132)).

Avec 55 millions de poules pondeuses produisant chaque année 16 milliards d'œufs, la France est le 8<sup>ème</sup> producteur au niveau mondial derrière la Chine, les USA, et le premier producteur européen d'œufs de consommation (voir Tableau 19).

Tableau 19 : La production d'œufs (1000 tonnes) (116)

	1999	2000	2001	2002	2003	<b>2004</b>
Production française	1053	1039	1029	999	996	<b>1027</b>
Œufs de consommation	969	957	949	922	920	<b>949</b>
Production Europe à 15	5479	5709	5749	5736	5507	<b>5750</b>
exportations	115	116	113	122	124	<b>120 (2/3 de produits à base d'œufs)</b>
Importation (tecoq)	89	98	102	123	129	<b>126 (2/3 d'œufs en coquille)</b>

#### **II.A.6. La consommation d'œufs**

La France est également le premier pays consommateur d'œufs en Europe avec environ 265 œufs par an par habitant (voir Tableau 20)

Tableau 20: La consommation d'œufs. (116)

	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Consommation (1000 tonnes)	939	935	935	920		
Consommation/habitant (kg/an)	15.6	15.5	15.4	15.1	15.1	15.3
Conso/hab. (nombre d'œufs par an)	/	255	253	248	/	/
Consommation UE à 15 (1000 tonnes)	4899	4976	5071	5185	/	/
Consommation/habitant (kg/an, UE à 15)	13	13.2	13.4	13.7	13.3	13.7

10 p. cent est consommé en autoconsommation par les petits producteurs

20 p. cent est utilisé par les établissements de restauration

30 p. cent de la production est utilisée par les industries agroalimentaires soit environ 250.000 tonnes, plus du quart de la production d'œufs. (95)

40 p. cent est acheté par les ménages.

On classe les ovoproduits souvent mis en cause lors de toxi-infection alimentaire en 3 groupes :

- Les ovoproduits intermédiaires : destinés aux industries agroalimentaires.

L'œuf entier, le jaune ou le blanc sont utilisés comme ingrédients rentrant dans la fabrication des sauces, des pâtes, des pâtisseries, etc.

Ils sont vendus sous forme liquide, concentrée, congelée ou en poudre (lyophilisée).

- Les ovoproduits prêts à l'emploi : le plus souvent destinés à la restauration hors domicile.

L'œuf entier, le jaune ou le blanc sont vendus déjà transformés : œufs durs écalés ou reconstitués en rouleaux, œufs pochés, omelettes précuites ou déshydratées, blancs en neige, etc.

- Les constituants du blanc ou du jaune : destinés à l'industrie agroalimentaire et non alimentaire.

Ils sont obtenus par fractionnement des composés ou extraction de molécules et entrent dans la composition de produits très variés. Par exemple, le lysozyme, extrait du blanc d'œuf, est utilisé dans la fabrication de fromages à pâte pressée cuite, comme conservateur naturel dans un grand nombre de préparations alimentaires, ou encore, comme principe actif de traitements contre les maux de gorge.

Même si très peu d'œufs contaminés sont produits dans quelques rares élevages atteints, le très grand nombre d'œufs consommés et la virulence de certains sérovars aboutissent à un nombre significatif d'infections humaines.

L'œuf constitue une matière première à risque pour les industriels et l'évolution se fait vers la traçabilité complète de la filière, du producteur aux consommateurs avec notamment la mise en place de la traçabilité des troupeaux et des produits depuis le 05/06/2000 et du marquage obligatoire des œufs depuis le 01/01/2004. Ce dispositif de marquage doit permettre de retrouver facilement l'élevage source de contamination en cas de survenue de toxi-infection alimentaire collective et de prendre les mesures correctives dans un délai très bref.

## **II.B. L'organisation de la lutte contre les salmonelles**

La réduction de la prévalence des salmonelles chez les volailles constitue le moyen le plus efficace pour réduire la contamination des denrées alimentaires incriminées et le nombre de cas humains de salmonellose.

La lutte contre les salmonelles vise donc en premier lieu à réduire cette prévalence.

La prévalence est une notion statistique représentant le nombre de cas recensés dans une population sans distinction entre les cas nouveaux et les cas anciens, c'est le nombre de cas à une date donnée divisé par le nombre total d'individus soumis au contrôle.

Les stratégies de maîtrise peuvent être différentes d'un pays à l'autre : l'Union Européenne se focalise sur les conditions de production et l'environnement alors que les Etats Unis se concentrent sur les produits transformés. D'autres combinent les deux types d'actions.

### **II.B.1. Défis de la lutte contre les salmonelles**

Les principales difficultés résident dans

- La mondialisation des approvisionnements en nourriture et la distribution internationale des aliments contaminants
- La traçabilité incertaine de ces aliments ne permettant pas de remonter facilement à l'aliment source de contamination
- La modification des micro-organismes et le développement des résistances aux antibiotiques : en 2000, 40 p. cent des isolats cliniques de *Salmonella* analysés étaient résistants à au moins un antibiotique, 18 p. cent montraient une résistance multiple à quatre antibiotiques ou plus (115).
- La nécessité du développement de compétences pour le typage en routine des souches par des méthodes moléculaires : l'application en pratique serait que les pathogènes responsables d'épidémies d'origine alimentaire dans les différents pays de l'UE puissent être identifiés d'après leurs empreintes génétiques, combinées à d'autres données de typage et aux éléments épidémiologiques. L'ensemble fournirait la base solide de stratégies d'intervention adaptées.

Les stratégies pour la maîtrise doivent tenir compte des variations épidémiologiques de cette zoonose et se fonder sur une analyse quantitative des risques pour que les programmes de lutte mis en place présentent le meilleur rapport coût/efficacité.

### **II.B.2. Les différents axes de la lutte contre les Salmonelles**

Dans la lutte contre les épidémies à salmonelles associées aux œufs, il existe de nombreux angles d'attaque possibles, qui sont associées dans le schéma français de contrôle des zoonoses. Les points d'entrée des salmonelles sont nombreux dans la filière œufs du producteur au consommateur. Il convient donc de mener les actions à plusieurs niveaux : aux différents étages de la filière, aux différentes phases de l'élevage jusqu'à la production de l'œuf, de sa transformation, de son transport et de sa manipulation en magasin et par le consommateur.

D'une part, il faut repérer et agir sur les troupeaux infectés, les éliminer ou les traiter afin de les rendre sains : l'épidémiosurveillance, l'assainissement et les traitements sont les outils de la lutte contre les salmonelles.

D'autre part, pour maîtriser la prévalence de l'infection salmonellique, il faut bien sûr empêcher les troupeaux sains de devenir infectés. La biosécurité, la prophylaxie sanitaire, la prophylaxie médicale, la sélection génétique sont des outils complémentaires et indispensables

L'information et l'éducation des consommateurs ne doit pas être négligé.

Pour une prévention efficace, les actions doivent être menées à tous les maillons de la chaîne alimentaire, de la ferme à l'assiette du consommateur.

#### **II.B.2.1.Epidémiosurveillance**

Elle est basée sur plusieurs organisations (voir Figure 6) :

- Le Centre national de référence des Salmonelles à l'Institut Pasteur de Paris (CNR-Salm)
- Les déclarations obligatoires des toxi-infections alimentaires
- Les laboratoires d'analyses de biologie médicale
- l'Institut national de veille sanitaire (InVS)

- L'agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA)
- Les laboratoires d'analyses vétérinaires
- Les directions générales de la santé (DGS), de l'alimentation (DGAL) et de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF)
- Enter-Net, réseau européen de surveillance (après Salm-surv) (voir Figure 7)
- Salm-surv, réseau international de surveillance (<http://www.who.int/salmsurv/en/>)

Depuis les années 70, le CNR-Salm reçoit pour sérotypage, les souches isolées par les laboratoires d'analyses de biologie médicale privés et hospitaliers ainsi que les comptes-rendus de sérotypage réalisés localement par les laboratoires (voir Tableau 21). Cette surveillance est complétée par celle de l'AFSSA qui a en charge la surveillance des salmonelles dans l'environnement, les élevages, et la filière agro-alimentaire. Elle reçoit les souches isolées par les laboratoires d'analyses vétérinaires, ainsi que les comptes-rendus de sérotypages. (125)

Figure 6 : Le réseau de surveillance des salmonelles d'après BOUVET P. (23)

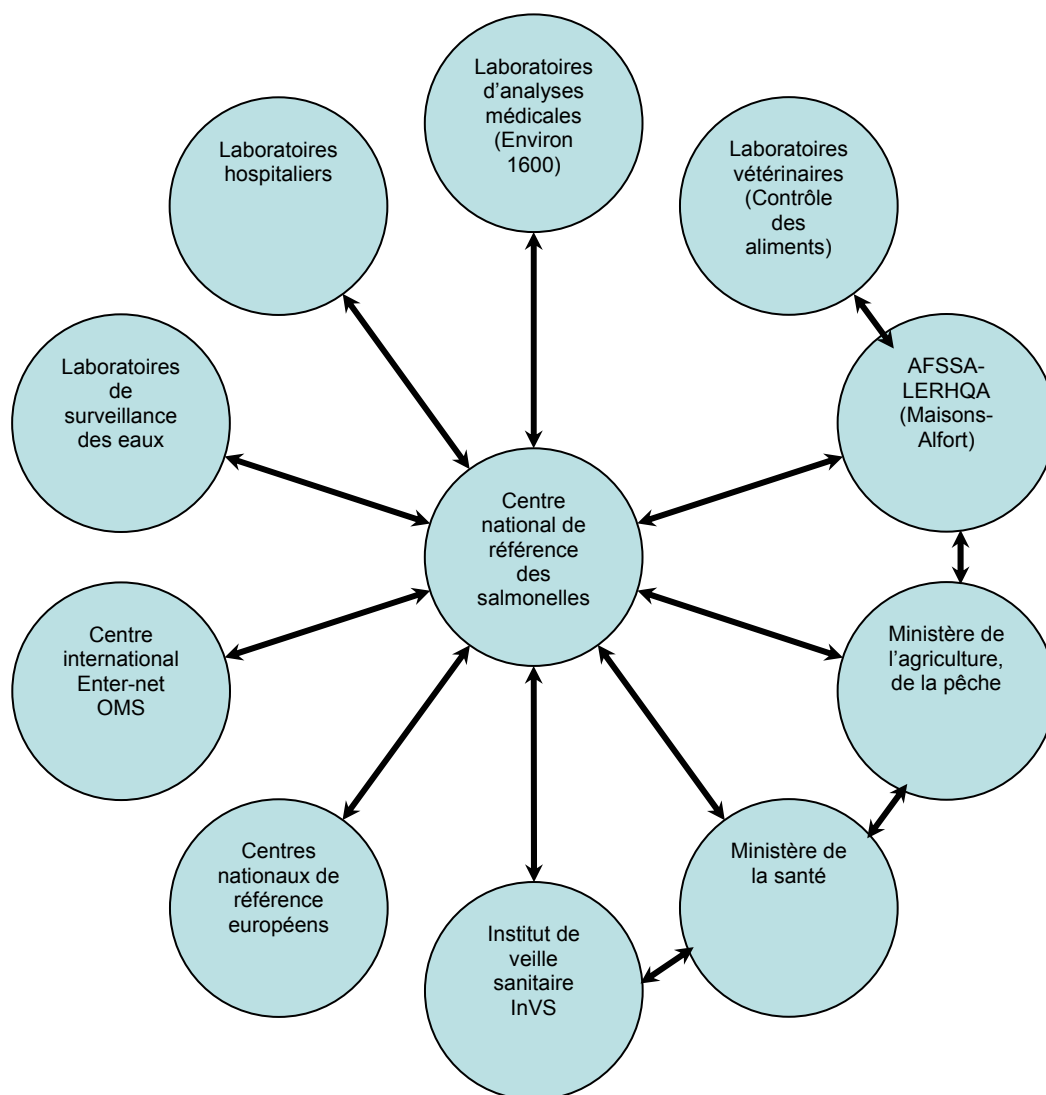


Tableau 21: Nombre de souches de salmonelles enregistrées au CNR-Salm en 1999 et 2003 en France (155)).

	1999	2000	2001	2002	2003
Nombre souches isolées d'origine humaine	13668	12883	12601	11775	10472
Nombre souches isolées d'autres origines (aliments, animaux, environnement)	21523	20308	757	15963	14870
Total des souches	35191	33191	13358	27738	25354

Figure 7 : Pays participant au réseau Enter-Net. Source Eurosurveillance



Les objectifs de cette surveillance sont :

- documenter les tendances spatiales et temporelles des différents sérotypes de salmonelles
- détecter les épidémies locales, régionales, nationales ou internationales
- adapter les actions préventives
- évaluer l'impact des mesures de prévention
- pister les antibiorésistances (23)

En hygiène des aliments, l'objectif est :

- identifier les causes d'une TIAC
- améliorer la sécurité du produit « œuf de consommation »
- prévoir les risques liés à cet aliment

- et vérifier le cas échéant la qualité de ce produit (par des plans de contrôle par exemple)

### **II.B.2.2.Limitation et assainissement (police sanitaire)**

En présence d'un foyer, il convient de limiter la diffusion des germes, enquêter en amont et en aval.

Les mesures suivantes sont en général efficaces et suffisantes pour obtenir l'assainissement :

- l'abattage des troupeaux infectés (notamment les troupeaux reproducteurs) et la destruction des œufs (ou traitement thermique)
- le nettoyage et la désinfection approfondis des locaux suivis d'un contrôle;
- les mesures de lutte contre les rongeurs et les insectes;
- les adaptations touchant la construction des locaux.

Les points clefs, très importants à considérer lors de la désinfection sont :

- Les modes de transmission par le personnel, l'aménagement des bâtiments ou le matériel
- Les contaminations croisées entre bâtiments
- La lutte contre les rongeurs, les insectes
- La condamnation des sites à risque
- Le remplacement du matériel non désinfectable (nids en bois, caillebotis)
- Les abords des élevages
- Le bétonnage de certaines zones sans que cela soit indispensable
- Les équipements fixes (circuits d'alimentation, circuits d'air) très difficiles à désinfecter
- Les effluents : ils doivent être stockés pendant 90 jours en hiver, 60 jours en été (sans nouvel apport) puis un délai de 30 jours entre épandage et pâturage doit être respecté pour prévenir la majorité des risques de re-circulation des germes (73))
- Le traitement thermique des aliments, très souhaitable
- La multiplication des contrôles pour valider la décontamination.

Le repeuplement se fait avec un cheptel lui-même contrôlé négatif.

Dans le cas d'un bâtiment de ponte à risque, il y a impossibilité de savoir si le site est complètement décontaminé : il y a en effet persistance possible d'une faible contamination.

### **II.B.2.3.Biosécurité**

La biosécurité est un ensemble de mesures visant à protéger une population de l'introduction d'agents infectieux transmissibles. Le programme de biosécurité englobe toutes les mesures qui doivent ou peuvent être prises pour prévenir l'entrée de cet agent et la mise en danger du statut sanitaire de la population.

Dans les filières avicoles, les mesures de biosécurité sont mises en œuvre à des degrés divers pour minimiser les risques d'introduction des salmonelles dans les élevages.

Le niveau maximum de biosécurité est très coûteux et n'est appliqué que dans les premiers étages de la pyramide de production :

- installation des unités dans des zones à faible concentration d'élevage.
- barrières sanitaires rigoureuses intégrant les aspects de conception des aménagements et des équipements, de protection, de nettoyage et de désinfection avec chaussures et vêtements dédiés pour chaque salle, protocoles de lavage des mains, séparation des secteurs propres/sales, traitement des aliments par la chaleur, analyse des aliments, contrôle sur le personnel et les visiteurs
- contrôle des vermines : insectes, rongeurs, oiseaux et autres animaux sauvages
- conduite en bande quand cela est possible (à l'étage parental)

### **II.B.2.4.Prophylaxie sanitaire**

Les salmonelles constituent un problème environnemental complexe et la suppression des additifs antibiotiques suppose des stratégies alternatives.

La voie de la prophylaxie sanitaire vise à garder les volailles exemptes de salmonelles grâce :

- à la formation des éleveurs à l'hygiène
- à la mise en place de barrières sanitaires dans les élevages par des mesures d'hygiène générale
- au dépistage périodique dans les élevages

En luttant contre *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium, la filière lutte contre toutes les salmonelles.

La mise en œuvre de chartes de qualité sanitaire s'appuie sur la notion capitale de la chaîne ininterrompue de l'hygiène et repose sur le principe de « barrière sanitaire » à toute entrée de salmonelles :

- conception des locaux :
  - o Marche en avant
  - o Séparation des zones
  - o Qualité des surfaces
  - o Maîtrise de la ventilation
  - o Potabilité de l'eau
- protection et hygiène :
  - o Contrôle sanitaire des élevages fournisseurs
  - o Lavage des camions
- nettoyage et désinfection
  - o Connaissance des produits
  - o Plan de Nettoyage - désinfection
  - o Contrôle des dosages
- hygiène du personnel
  - o Tenue
  - o Vestiaires
  - o Formation
  - o Equipements
- processus de fabrication
  - o Identification et traçabilité
  - o Gestion des flux suspects
  - o Maîtrise des achats

#### **II.B.2.5. Recherche et la sélection génétique**

La sélection de souches de volailles génétiquement plus résistantes, soit aux maladies infectieuses en général, soit au portage sain des salmonelles, sont des voies de recherche explorées (cf. supra II.A.2.2)

- Sélection sur la résistance au portage des salmonelles
- Sélection sur la précocité de la réponse humorale, la réponse cellulaire et les capacités de phagocytose
- Sélection sur les capacités bactériostatiques de l'œuf (15)
- Améliorer la solidité de la coquille pour limiter la pénétration microbienne et, par conséquent, les risques sanitaires d'un produit animal pouvant être consommé cru

#### **II.B.2.6. Méthodes complémentaires ou alternatives**

Ces méthodes peuvent être utilisées comme méthodes complémentaires.

1) Antibio-prévention associée ou non aux flores de barrières : réglementairement le traitement antibiotique n'est pas envisageable lors d'infection à *Salmonella* Enteritidis ou Typhimurium chez la poule pondeuse.

2) Vaccination.

3) Trempage des œufs (mesure alternative à l'abattage des troupeaux reproducteurs). On peut faire pénétrer certains composés dans les œufs : chlore, eau oxygénée, aldéhydes, phénols, ammoniums quaternaires, composés iodés, et antibiotiques (amoxicilline, enrofloxacin, gentamicine). Mais la perméabilité des coquilles ne permet pas la même diffusion dans tous les œufs, les doses reçues sont hétérogènes voire insuffisantes, avec une possible incidence sur l'augmentation des antibiorésistances.

4) Flores de barrière et probiotiques.

5) Acides organiques et sels dans les aliments.

### **II.B.2.7. Information des consommateurs**

A l'autre bout de la chaîne, des recommandations à destination des consommateurs préconisent la promotion de l'hygiène dans tous les lieux de vie (familiaux et collectifs) :

Pour la prévention en restauration collective, les points à respecter sont :

- respect des bonnes pratiques de transport, de stockage et de préparation des repas
- utilisation d'œufs provenant uniquement de centres d'emballage immatriculés.
- stockage des œufs en chambre froide; la coquille des œufs doit être propre et intacte.
- le lavage des œufs avant stockage est une mesure nuisible à leur bonne conservation.
- les mayonnaises industrielles, les coules d'œufs et les poudres d'œufs pasteurisées doivent être utilisées préférentiellement.
- les préparations à base d'œufs sans cuisson (mayonnaises, crèmes, etc.) doivent être fabriquées le plus près possible du moment de la consommation et maintenues au froid.
- tous les restes doivent être éliminés.
- les préparations qui supportent mal l'ébullition doivent être maintenues à une température d'au moins 70°C.

Pour la prévention en restauration familiale :

- promouvoir le lavage des mains, en particuliers après la manipulation et nettoyer les ustensiles de cuisine qui ont été en contact avec ces aliments
- pour les personnes les plus vulnérables (les personnes âgées, les malades, les bébés et les femmes enceintes), il est recommandé de ne pas consommer d'œufs crus ou peu cuits.
- les préparations à base d'œufs sans cuisson (mayonnaises, crèmes, mousse au chocolat, pâtisseries) doivent être fabriquées le plus près possible du moment de la consommation et maintenues au froid. Pour ces préparations, éviter de casser les œufs en bordure du récipient utilisé pour faire la préparation.
- respecter la chaîne du froid après la fabrication
- prévenir la contamination croisée en conservant les aliments crus séparément des aliments cuits ou prêts à être consommés,
- conserver les œufs au réfrigérateur (+4°C) et respecter la date limite de consommation
- nettoyer régulièrement le réfrigérateur avec de l'eau javellisée.

### **II.B.3. Programme de contrôle européen**

L'ancienne directive zoonose 92/117/CEE modifiée par la directive 97/22/CEE prévoyait que chaque état membre définisse un plan d'éradication des salmonelles pour sa filière avicole. Les moyens pour obtenir cette éradication étaient laissés au libre choix de chaque état et il pouvait s'agir aussi bien d'abattage que d'autres moyens alternatifs, comme les traitements antibiotiques, les flores d'exclusion compétitive ou les vaccins

Le réseau d'épidémiosurveillance international Enter-net des infections gastro-intestinales humaines est chargé de contrôler les salmonelles et leurs résistances aux antibiotiques. Il est financé par la Commission européenne. C'est le prolongement du réseau Salm-net qui était chargé de centraliser les données internationales sur les souches de Salmonelles (sérotypes, lysotypes, empreintes génétiques, etc.)

Malgré la baisse significative du nombre de cas de salmonellose depuis la mise en place des mesures de 1992, le nombre reste élevé, avec notamment une épidémie à *Salmonella* Typhimurium importante en 2002 et une légère augmentation du nombre de cas à Enteritidis pour les étés 2002 et 2003. Un renforcement des mesures de lutte est donc envisagé, notamment au niveau européen.

Les actes législatifs visant à lutter contre les maladies d'origine alimentaire, notamment la salmonellose sont :

**-Directive 92/117/CEE** du Conseil du 17 décembre 1992 (97/22/CE) modifiée concernant les mesures de protection contre certaines zoonoses et certains agents zoonotiques chez les animaux et dans les produits d'origine animale, en vue de prévenir les foyers d'infection et d'intoxication dus à des denrées alimentaires. (Abrogé)

**-Décision n°2000/629/CE** de la Commission du 9 octobre 2000 approuvant le plan de surveillance et de contrôle des salmonelles dans les volailles présenté par la France.

**-Décision N°2002/677/CE** de La Commission du 22 août 2002 établissant les prescriptions communes applicables aux rapports concernant les programmes d'éradication et de surveillance des maladies animales cofinancés par la Communauté et abrogeant la décision 2000/322/CE.

**-Décision n°2003/394/CE** de la Commission du 23 mai 2003 modifiant la décision 2002/677/CE en ce qui concerne les programmes de lutte contre les salmonelles zoonotiques.

**-Règlement (CE) n°2160/2003** du Parlement européen et du conseil du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire. (Règlement « zoonoses »)

**-Directive zoonoses 2003/99/CE** (VII.B) du Parlement européen et du conseil du 17 novembre 2003 sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques, modifiant la décision 90/424/CEE du Conseil et abrogeant la directive 92/117/CEE du Conseil

**-Décision n°2003/849/CE** de la Commission du 28 novembre 2003 portant approbation des programmes d'éradication et de surveillance de certaines maladies animales et des programmes de prévention des zoonoses présentés par les États membres pour l'année 2004 et fixant le montant du concours communautaire.

**-Décision n°2004/695/CE** de la Commission du 14 octobre 2004 relative à la liste des programmes d'éradication et de surveillance des maladies animales et à la liste des programmes de contrôles visant à la prévention des zoonoses pouvant bénéficier d'une participation financière de la Communauté en 2005.

-**Décision n°2004/840/CE** de la Commission du 30 novembre 2004 portant approbation des programmes d'éradication et de surveillance de certaines maladies animales et des contrôles visant à la prévention des zoonoses présentés par les États membres pour l'année 2005 et fixant le montant du concours communautaire.

-**Règlement (CE) n°1003/2005** de la Commission du 30 juin 2005 portant application du règlement (CE) n°2160/2003 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne la fixation d'un objectif communautaire de réduction de la prévalence de certains sérotypes de salmonelles dans les cheptels reproducteurs de *Gallus gallus* et portant modification du règlement (CE) n° 2160 /2003.

-**Règlement hygiène (CE) n°178/2002** du 28/01/2002 abrogeant le règlement 93/43CEE établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l' Autorité Européenne de Sécurité des Aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires

-**Règlement (CE) n° 853/2004** du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale.

-**Règlement (CE) n° 1168/2006** de la Commission du 31 juillet 2006 portant application du règlement (CE) du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne la fixation d'un objectif communautaire de réduction de la prévalence de certains sérotypes de salmonelles chez les poules pondeuses *Gallus gallus* et portant modification du règlement (CE) n° 1003/2005

-**Règlement (CE) n°1177/2206** de la Commission du 1<sup>er</sup> août 2006 mettant en œuvre le règlement (CE) n°2160/2003 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les exigences relatives à l'utilisation de méthodes de contrôle spécifiques dans le cadre des programmes nationaux de contrôle des salmonelles

#### **II.B.4. Programme national de maîtrise**

En France, compte tenu du faible taux d'infection établi en 1998, l'abattage des troupeaux infectés a été retenu comme seul moyen d'éradication.

La lutte contre les Salmonelles responsables de zoonoses est aujourd'hui organisée à tous les niveaux de la filière de production (élevage, alimentation et transformation).

Historiquement, elle a d'abord concerné *Salmonella* au début des années 1990 avec le « contrôle officiel hygiénique et sanitaire » (ou COHS) d'application facultative. Ce contrôle mettait en place des mesures très proches de celles prises par les décrets de 1998, mais ces mesures ne concernaient que la filière œufs et n'aboutissaient pas à l'abattage des troupeaux en cas de contrôles positifs.

Le système de dépistage périodique (dans les élevages comptant plus de 250 animaux et/ou ceux dont une partie de la production passe par un centre de conditionnement) est devenu obligatoire avec les 2 arrêtés du 26 octobre 1998 (VII.A) relatifs à la lutte contre les infections à *Salmonella* Enteritidis ou *Salmonella* Typhimurium dans les troupeaux de l'espèce *Gallus gallus* en filière ponte d'œufs de consommation et aux modalités de la participation financière de l'état. La recherche systématique concerne *Salmonella* Enteritidis en élevage de reproducteurs, de futures pondeuses et de pondeuses. Elle n'est imposée pour *Salmonella* Typhimurium que dans les élevages de reproducteurs et de futures pondeuses (voir Tableau 22)

Tableau 22: Prélèvements réglementaires. Annexe I de l'arrêté du 26 octobre 1998 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* Enteritidis ou Typhimurium dans les troupeaux de l'espèce *Gallus gallus* en filière ponte d'œufs de consommation.

Troupeau reproducteur	Couvoir	Période d'élevage des poulettes	Période de ponte des œufs de consommation
A 1 jour, 5 garnitures de fonds de boîtes	Toutes les 2 semaines, - soit 1 chiffonnette - soit les méconiums de 250 poussins	A 1 jour, 5 garnitures de fonds de boîtes	
A 4 semaines, 1 pot de 60 fientes et 1 chiffonnette		A 4 semaines, 1 pot de 60 fientes et 1 chiffonnette	
2 semaines avant l'entrée en ponte, 1 pot de 60 fientes et 1 chiffonnette		4 semaines avant l'entrée en ponte, 1 pot de 60 fientes et 1 chiffonnette	
Toutes les 8 semaines, un prélèvement au couvoir est remplacé par un prélèvement sur le troupeau reproducteur 1 chiffonnette			4 sem après la mise en place et avant la 24 <sup>ème</sup> sem d'âge, 1 pot de 60 fientes et 1 chiffonnette, refaire à 40 et 55 semaines

Le dispositif comprend également la désignation d'un vétérinaire sanitaire, la tenue d'un registre d'élevage, les déclarations de mise en place des nouvelles bandes et les déclarations obligatoires des suspicions d'infections. Les modifications introduites par les arrêtés du 09 août 2001 ont complété les dispositions existantes, en précisant notamment la possibilité du recours aux seuls vaccins inactivés.

La charte sanitaire d'application facultative vient en complément des mesures réglementaires et donne droit à des aides financières de l'Etat.

La signature de la charte engage l'éleveur à respecter des prescriptions d'aménagement et de fonctionnement, notamment les mesures réglementaires obligatoires, ainsi que les bonnes pratiques d'élevage. En 2002, 63 p. cent des bâtiments de pondeuses répondaient aux standards élevés de la charte sanitaire (87). En 2003, ce sont 74p. cent des bâtiments qui adhéraient à la charte (voir Tableau 23).

Tableau 23 : Taux d'adhésion à la charte sanitaire en filière ponte. (38)

étages	périodes	p. cent2000	p. cent2001	p. cent2002	p. cent2003
Sélection	élevage	100	100	100	100
	ponte	100	100	100	100
Multiplication	élevage	89	93	93	93
	ponte	97	96	94	92
Production	élevage	91	92	91	94
	ponte	52	57	63	74

L'obligation depuis le 01 janvier 2004 du marquage des œufs doit permettre de retrouver facilement et rapidement l'élevage d'origine en cas de toxi-infection alimentaire collective. L'abattage des troupeaux et le traitement thermique des œufs sont imposés en cas de contrôle positif avec obligation de procéder au nettoyage et à la désinfection de l'élevage suivi d'un vide sanitaire.

L'application de l'ensemble de ces mesures a permis une décroissance importante du nombre de souches de salmonelles enregistrées par le CNR-Salm. : le nombre de souches approchait les 20 000 en 1994 et 1997 ; en 2001 et 2002, ces chiffres étaient respectivement de 12602 et 11700, soit une réduction d'environ 38 p. cent.

Cette diminution coïncide avec la diminution du nombre annuel de TIAC à salmonelles dues aux œufs et aux produits à base d'œufs. Ces tendances sont également observées dans d'autres pays européens. (125)

#### **II.B.5. Vaccination dans le programme de contrôle**

La baisse du nombre de cas de salmonelloses coïncide avec la mise en place en 1998 dans les élevages de volailles des mesures de lutte obligatoires.

L'abattage des troupeaux infectés est une étape indispensable mais contraignante et lourde d'un point de vue économique, et les échecs, en terme de rechute, existent.

En raison du cycle oral fécal de contamination, de la grande résistance et de la persistance dans l'environnement, du grand nombre de porteurs chroniques, notamment pour *Typhimurium* très ubiquiste, il est apparu très difficile de privilégier l'abattage par rapport aux méthodes alternatives.

Dans ces situations complexes, la prophylaxie vaccinale peut constituer une assurance supplémentaire, spécialement pour les élevages à risques ayant connu un épisode d'infection par exemple ou également dans les élevages de production d'œufs à forte valeur ajoutée (production biologique par exemple) (135)

Il est donc fait usage de la vaccination de la manière la plus restrictive possible et en seconde intention.

Elle n'est pratiquée que :

- si le nettoyage, la désinfection et la lutte contre les rongeurs et les insectes ont été réalisés de manière rigoureuse
- si des adaptations touchant la construction des locaux n'ont pas permis d'empêcher une nouvelle infection

#### **II.B.6. Flores de barrière et probiotiques dans le programme de contrôle**

L'utilisation des flores de barrière ou des probiotiques relève de la prophylaxie médicale au même titre que l'utilisation des antibiotiques, les acides organiques et les sels, les vaccins.

Il est important de différencier les flores de barrière des probiotiques. Les flores de barrière ont la possibilité de s'implanter et de se multiplier in situ, alors que les probiotiques, à visée essentiellement zootechnique, n'ont pas cette capacité et doivent être administrés en continu.

Dans certains pays, l'utilisation de flores de barrière fait partie intégrante du programme de contrôle des salmonelles en élevage avicole.

L'utilisation de flore indéfinie (dont la composition exacte n'est pas connue) peut toutefois poser des problèmes liés aux procédures d'autorisation de mise sur le marché.

### **III. LA VACCINATION**

La vaccination est un moyen de défense unanimement reconnu et largement utilisé en médecine vétérinaire comme humaine. Qu'en est-il en ce qui concerne spécifiquement les salmonelles ubiquistes ?

#### **III.A. Les objectifs de la vaccination**

« Les maladies animales infectieuses et les zoonoses posent des problèmes éthiques, techniques, écologiques et économiques considérables lorsqu'elles entraînent des abattages massifs, comme nous les avons connus en 2001 en Europe avec la fièvre aphteuse et depuis 2004 en Asie avec la grippe aviaire. Il est donc important que les recherches progressent dans le domaine des méthodes de prophylaxie telles que la vaccination, de manière à préserver les ressources alimentaires et à faciliter les échanges internationaux" (148)

L'objectif de la vaccination est donc clairement de préserver la santé humaine, mais aussi et surtout les ressources alimentaires.

Le principe de la vaccination des poules pondeuses contre les salmonelloses consiste à administrer un produit capable d'induire une immunité dirigée spécifiquement contre les salmonelles, et conférer une mémoire immunitaire permettant une activation rapide (temps de latence beaucoup plus court) des défenses en cas de contamination.

Dans sa mission première, le vaccin vétérinaire en général, le vaccin contre les salmonelles ubiquistes en particulier, apparaît comme un des éléments d'un ensemble de mesures complémentaires constituant un programme mis en oeuvre pendant une période donnée pour lutter contre une maladie.

L'utilisation de la vaccination contre les salmonelles fait partie des moyens médicaux complémentaires en vue d'éradiquer, ou de réduire à un niveau acceptable ces agents pathogènes dans le cadre du programme de maîtrise, où la prophylaxie sanitaire reste le pilier central.

Le coût ou l'impraticabilité des mesures d'hygiène ou de prévention, l'augmentation des résistances aux antibiotiques contribuent à rendre la pratique de la vaccination plus attractive, même si le vaccin n'a pas une efficacité à 100 p. cent.

Lors d'infection, il faut soit éliminer les troupeaux infectés, soit traiter les troupeaux afin de les rendre sains.

Dans certaines unités de production d'œufs de consommation ayant fait l'objet d'un abattage total, les échecs existent, avec des « rechutes infectieuses ».

Dans ce cadre précis, ou encore dans les élevages de production d'œufs à forte valeur ajoutée comme la production en agriculture biologique par exemple, la prophylaxie médicale constitue une assurance supplémentaire (135).

Compte tenu des éléments détaillés dans les chapitres précédents, les caractéristiques souhaitables d'un vaccin destiné aux poules pondeuses sont :

- un degré élevé de protection contre l'infection systémique et intestinale
- une atténuation adéquate pour les animaux et l'Homme, si les souches entrent dans la chaîne alimentaire humaine.
- la croissance de l'animal ne doit pas être affectée par la vaccination
- la protection doit être polyvalente, contre différents sérovars impliqués dans les problèmes de santé publique
- les souches vaccinales ne devraient pas être antibiorésistantes
- le vaccin doit avoir des marqueurs pour faciliter son traçage et son identification

- la souche vaccinale doit être différentiable des souches sauvages
- la souche ne doit pas être ré excrétée et diffusée dans le milieu extérieur
- il ne doit pas y avoir d'interférence avec les moyens de maîtrise du programme de contrôle (119).

### **III.B. Les bases de la vaccination**

Un certain nombre de problèmes techniques et scientifiques se posent pour la mise en œuvre actuelle ou future de la vaccination contre les salmonelles. Ces difficultés sont de l'ordre du vaccin lui-même, mais aussi de l'animal et de son environnement. La connaissance de ces facteurs est gage de réussite.

#### **III.B.1. Différents types vaccins**

##### **III.B.1.1. Classification des différents types de vaccins**

Les immunogènes des salmonelles, notamment les immunogènes connus, sont soit des polysaccharides de la paroi (ce sont des bactéries Gram-), soit des protéines de flagelles (antigènes H), soit encore des exotoxines. A partir de cette approche, les différents types de vaccins peuvent se décliner soit en vaccins atténués (vivants), soit en vaccins inertes en fonction du mode de présentation de ces immunogènes au système immunitaire de la poule (voir Figure 8 et Tableau 24).

Le panel scientifique de l'AESA a toutefois mis l'accent sur l'insuffisance de connaissance des immunogènes salmonelliques et recommande des recherches dans ce domaine.

Les recherches relatives à l'expression in vivo du génome et du protéome (ensemble des protéines codées par un génome) permettraient d'identifier des immunogènes importants qui pourraient être incorporés aux vaccins du futur (sous unité ou antibactériens). Il est possible qu'aucun des immunogènes « majeurs » identifiés jusqu'à maintenant (par western blot en particulier) ne soit corrélé avec la protection et en fait, une grande partie de la réponse immune à l'infection peut être sans rapport avec la protection effective.

Figure 8 : La souche pathogène (46)

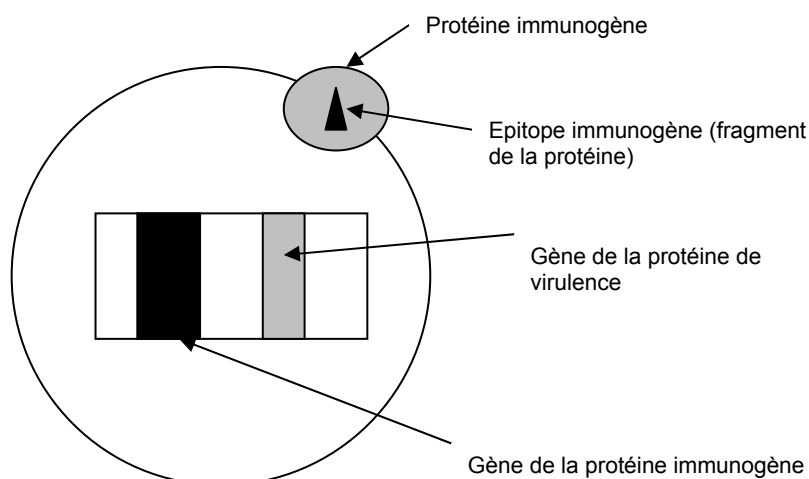


Tableau 24: Les différents types de vaccins (46)

<b>Vaccins vivants</b>	<b>Vaccins intermédiaires</b>	<b>Vaccins inertes</b>
Vaccins atténués conventionnels, obtenus de manière aveugle	Vaccin vectorisé non réplicatif (insertion du gène d'une protéine immunogène dans un microorganisme incapable de se multiplier)	Vaccin inactivé (microorganisme inactivé par des procédés physiques ou chimiques)
Vaccins atténués par sélection contre le produit d'un gène (sélection de mutants n'exprimant pas un gène de virulence)	Vaccin génétique (le gène de la protéine immunogène, intégré dans un plasmide par exemple, est directement administré à l'animal)	Vaccin sub-unitaire ou sous unités (fractionnement du microorganisme avec conservation des fractions immunogènes ou production in vitro d'une protéine immunogène par des procédés biotechnologiques)
Vaccin atténué par mutagenèse dirigée (délétion sélective du gène de virulence par des techniques de recombinaison génétique)		Vaccins peptidique (obtenus par synthèse chimique d'un épitope sélectionné d'une protéine immunogène)
Vaccin vectorisé réplicatif (insertion du gène d'une protéine immunogène dans un microorganisme capable de se multiplier)		

### **III.B.1.2. Vaccins vivants**

Dans ce type de vaccin, les antigènes immunogènes sont des microorganismes capables de se répliquer (vecteurs) et qui seront administrés à l'animal : en l'occurrence les salmonelles elles-mêmes.

La difficulté pour ce genre de vaccin consiste à trouver un équilibre entre :

- 1) le degré d'atténuation de la souche vaccinale pour obtenir l'innocuité : il faut obtenir une infection inapparente,
- 2) la capacité à coloniser la muqueuse de l'hôte
- 3) tout en maintenant une immunogénicité suffisante : c'est-à-dire préservation des ses antigènes de structure.

L'avantage de ces vaccins réside

- dans leur capacité d'imiter l'infection naturelle et *a priori* une plus grande efficacité (OIE)
- la possibilité de les administrer en masse dans l'eau de boisson ou sous forme de spray
- Les vaccins vivants confèrent une immunité plus forte, plus rapidement installée et plus durable que les vaccins inertes (dans le modèle murin).

Mais les vaccins vivants d'une manière générale sont fragiles et nécessitent des conditions de conservation telles que le froid, la lyophilisation, qui compliquent leur utilisation sur le terrain.

Pour la distribution dans l'eau de boisson par exemple, il faut s'assurer que les animaux reçoivent la dose recommandée de la souche vaccinale et donc doivent être spécialement surveillés :

- la quantité d'eau ingurgitée (dans le cas des poussins tout particulièrement)
- la concentration de la souche vaccinale dans l'eau
- le survie de la souche dans cette eau et corrélativement le délai de prise
- la qualité de l'eau (sans chlore)

De surcroît, les inconvénients liés à ce type de vaccin et pour des bactéries telles que les salmonelles sont avérés (69) :

- Risque de transmission verticale de certaines souches vaccinales et de diffusion de ces souches dans l'environnement et à d'autres volailles ;
- Multiplication de certaines souches vaccinales dans les œufs de consommation avec une probabilité d'atteindre des doses de salmonelles importantes au moment de la consommation.

Il peut également exister un pouvoir pathogène résiduel pour les volailles

Enfin, il existe aussi un risque théorique de restauration du pouvoir pathogène de la souche vaccinale par réversion de la mutation initiale (13).

Compte tenu de tous ces risques, l'utilisation de souches de salmonelles vivantes dans le cadre de la production des œufs de consommation n'est pas autorisé.

Il existe trois types de vaccins vivants :

- Les vaccins atténués dits conventionnels
- Les vaccins atténués par mutagenèse dirigée
- Les vaccins vectorisés réplicatifs

#### **III.B.1.2.1. Vaccins atténués dits conventionnels**

Ces vaccins contiennent une souche de salmonelle possédant un pouvoir pathogène faible ou nul pour les volailles ; ils sont obtenus de manière aveugle.

- Il s'agit de souches spontanément avirulentes pour les volailles
- Ou de souches auxotrophiques obtenues par culture *in vitro* prolongée dans des milieux appauvris en certains nutriments ou sur des espèces animales différentes, ou dans des conditions (de température par exemple) telles qu'elles perdent certains de leurs caractères de virulence.

Les mutations génomiques ainsi obtenues sont indéfinies et il est impossible de prévoir la stabilité de l'atténuation et les risques de recombinaison avec les souches sauvages : la modification d'une seule base ou la délétion d'un gène entier peuvent en effet donner un même phénotype, alors que la stabilité génétique n'est évidemment pas la même. Et dans certains cas, pour des raisons inconnues, les mutants obtenus reviennent au type sauvage. Seule l'utilisation sur le terrain à large échelle permet à posteriori de confirmer l'innocuité de ces souches.

Malgré ces inconvénients, cette méthodologie conventionnelle et empirique a prouvé son efficacité et la quasi-totalité des souches de salmonelles vivantes utilisées actuellement en dérivent.

#### **III.B.1.2.2. Vaccins atténués par mutagenèse dirigée (vaccins délétés)**

Il s'agit là d'un type de vaccin recombinant par l'introduction de mutations parfaitement définies dans le génome des salmonelles et dont la réversion vers la virulence est impossible.

La possibilité de faire produire des antigènes hétérologues par ces pathogènes atténués permet, en outre, d'induire une immunité contre plusieurs agents infectieux simultanément.

En pratique, la souche est atténuée par délétion de gènes impliqués dans la virulence (mutagenèse dirigée par des techniques de recombinaison génétique) et n'a plus d'effet secondaire significatif, bien qu'elle soit encore capable d'induire une solide immunité après une seule administration orale (à des rongeurs de laboratoire).

L'avantage de ces vaccins est la possible différenciation des animaux vaccinés des animaux infectés naturellement, puisque la mise en évidence d'anticorps dirigés contre la protéine absente chez la souche vaccinale indique qu'il y a eu infection naturelle.

Néanmoins, de telles mutations par délétion d'antigènes peuvent également affecter l'induction de premières réponses innées et adaptatives.

Ce type de vaccin est pour l'instant développé en laboratoire sur des rongeurs et doit faire l'objet de recherches complémentaires sur d'autres espèces.

En ce qui concerne cette approche, la souche vaccinale est susceptible de se propager dans l'intestin de l'animal vacciné et de conduire ainsi à une infection bénigne mais suffisante pour induire une immunité locale solide du même type que celle induite par l'infection naturelle. Dans ces conditions, la dose à administrer est beaucoup plus faible que pour un vaccin inerte et le vaccin ne requiert en principe pas d'adjuvant.

### **III.B.1.2.3.Vaccins vectorisés réplicatifs**

Un microorganisme capable de se multiplier (bactérie ou virus) joue le rôle de transporteur d'une fraction de gène codant pour une protéine (ou une fraction de protéine) induisant la réaction immunitaire de l'hôte

Les gènes codants pour ces molécules étrangères sont introduits dans les micro-organismes " vecteurs ", qui les exprimeront ensuite à leur surface, ou les sécréteront dans le milieu extérieur. Ces vaccins vivants recombinants sont des vaccins mixtes qui permettent de vacciner à la fois contre le vecteur et contre le virus ou la bactérie dont ils présentent les antigènes au système immunitaire. En théorie, les vecteurs peuvent porter des antigènes provenant de plusieurs agents pathogènes différents et on obtient ainsi des vaccins multivalents.

En fait, la capacité des salmonelles à transférer des plasmides est également une voie pour présenter des antigènes aux cellules spécifiques, permettant ainsi une délivrance ciblée d'ADN à ces cellules : ces potentialités sont utilisées essentiellement pour le développement de vaccins contre d'autres infections entériques (vaccins ADN) (96). Ces systèmes limitent les antigènes utilisés à un petit nombre, ce qui peut être limitant pour des agents pathogènes complexes comme les salmonelles (46).

### **III.B.1.3.Vaccins inertes**

Les antigènes de ces vaccins sont des antigènes purifiés ou produits *in vitro*.

La difficulté pour développer ces vaccins réside dans la nécessité de développer des systèmes appropriés pour assurer :

- la stabilité de l'antigène jusqu'au site de la réaction immunitaire et
- la présentation optimale des antigènes vaccinaux.

La présence d'adjuvants visant à exacerber leur pouvoir immunogène et/ou à moduler la réponse immunitaire induite (immunostimulant et/ou « véhicule », adjuvant muqueux pour les administrations par voie orale) est en effet indispensable (153).

L'efficacité d'un vaccin adjuvé dépend du profil cytokinique généré, puisque ce profil détermine l'orientation prise par la réponse immune.

La mise au point du vaccin doit alors tenir compte de contraintes telles que les coûts et les limites de résidus de ces produits adjuvants.

Pour ces raisons, le coût de production des vaccins inertes est beaucoup plus élevé que celui des vaccins à souche vivante.

Enfin, cette approche requiert de grandes quantités d'antigènes de manière répétée par voie parentérale le plus souvent, pour l'obtention d'une réponse immunitaire suffisante. Le stress post-vaccinal peut être assez important en raison de l'irritation au point d'injection.

Il en existe deux types :

- Les vaccins inactivés (ou tués) (ou vaccins antibactériens ou bactérines)
- Les fractions antigéniques ou vaccins sous-unités

#### **III.B.1.3.1.Vaccins inactivés**

Ils sont obtenus par exposition de la salmonelle à un inactivant physique (chaleur) ou chimique (formol, bétapropiolactone, acétone, éthylène imine, etc.) entraînant une perte totale de l'infectivité sans modifier l'immunogénicité.

#### **III.B.1.3.2.Fractions antigéniques ou vaccins sous-unités**

Ces fractions antigéniques immunogènes sont les molécules protéiques cibles majeures du système immunitaire de l'hôte. Il en existe trois types :

- Il s'agit d'antigènes purifiés ou partiellement purifiés, par exemple cytotoxine formolées ou carbonatées ayant perdu leur pouvoir toxique mais encore immunogène
- Ou de protéines produites par génie génétique
- Ou encore de peptides de synthèse correspondants aux épitopes des Salmonelles (petits fragments immunogènes des protéines immunogènes)

Ces composants ne peuvent imiter une infection naturelle, même s'ils contiennent les épitopes protecteurs adéquats. L'agent adjuvant permet d'orienter la réponse immune sans être lui-même la cible.

Lorsque les fragments antigéniques sont de courte taille ou sont formés par des sucres, il est nécessaire de les coupler chimiquement à une protéine porteuse ou à une autre structure, pour les rendre immunogènes : on parle alors de vaccins conjugués.

#### **III.B.1.4.Vaccins intermédiaires**

Les vaccins de nature intermédiaire sont constitués par les gènes des protéines immunogènes, qui sont délivrés à l'animal :

- soit par l'intermédiaire de vecteurs viraux incapables de se multiplier (systèmes de délivrance d'antigène)
- soit sous forme d'ADN nu ou d'ARN nu :

Il en existe donc deux types :

- Les systèmes de délivrance d'antigènes
- Les vaccins à ADN ou ARN nu

##### **III.B.1.4.1.Systèmes de délivrance d'antigènes**

Ces vecteurs ne se répliquent pas chez l'hôte, ils sont non réplicatifs, et pour cette raison présentent un avantage en terme de sécurité. Ils viennent se greffer dans les noyaux de cellules de l'hôte qui ne se multiplient pas, pour lui permettre de synthétiser des antigènes vaccinaux qui sont ainsi présentés au système immunitaire. Des expériences réussies d'immunisation par voie intranasale avec ce type de vaccin, laissent de plus espérer un avenir de ces particules pour ce mode intéressant d'administration chez les volailles (79).

##### **III.B.1.4.2.Vaccins à ADN ou ARN nu**

On administre le gène codant pour l'antigène vaccinal. La cellule de l'hôte (cellule musculaire par exemple) va synthétiser elle-même l'antigène vaccinal : le vaccin est donc produit localement, par l'organisme de l'individu à immuniser.

Les avantages de ce type de vaccin sont :

- peu coûteux et facile à produire en grande quantité, stable à température ambiante et ne nécessitant pas de chaîne du froid
- l'antigène est en tout point similaire à celui produit lors d'une infection
- l'antigène est produit de manière durable par l'organisme

- Il est possible de moduler à façon la réponse immune par la co-expression de cytokines ou d'autres molécules immuno-modulatrices.
- aucun risque d'infection post-vaccinale

Les risques potentiels des vaccins à ADN sont :

- intégration de la portion d'ADN étranger dans un des chromosomes du sujet vacciné, risque qui n'existe pas pour les vaccins ARN.
- une éventuelle recombinaison entre portions homologues,
- la production d'anticorps anti-ADN comme dans certaines maladies auto-immunes
- ou l'induction d'une tolérance immunitaire

Ces vaccins en sont au stade de la recherche.

### **III.B.2. Immunologie**

#### **III.B.2.1. Système immunitaire de la Poule**

Le système immunitaire comprend des effecteurs non spécifiques et spécifiques, cellulaires et humoraux.

Les défenses non spécifiques sont d'action immédiate et innée, et comprennent outre la barrière muqueuse, la fièvre, l'inflammation, et la phagocytose.

L'immunité spécifique se développe en quelques jours et dépend de la reconnaissance spécifique par le système lymphoïde de la substance étrangère, prélude à sa destruction et garde le souvenir de sa rencontre.

Le système lymphoïde est composé d'organes lymphoïdes centraux et d'organes et de tissus lymphoïdes secondaires, eux-mêmes constitués de lymphocytes, de macrophages et de cellules spécialisées dans la présentation des antigènes.

La théorie immunologique pose la prééminence du vaccin vivant sur le vaccin inerte, parce qu'il stimule simultanément les deux types de réponse, cellulaire et humorale, et que la réponse générée est globalement plus à médiation cellulaire (LTh1) qu'à médiation humorale (LTh2). (119)

Alors que la voie parentérale induit principalement une forte immunité cellulaire et humorale, et ceci au niveau systémique seulement, il apparaît de plus en plus que la voie muqueuse est plus apte à stimuler une immunité muqueuse efficace contre les salmonelles, accompagnée de surcroît d'une forte immunité systémique dans certains cas.

##### **III.B.2.1.1. Organes lymphoïdes**

Voir Figure 9 et Figure 10

###### **- Les organes lymphoïdes centraux**

Les organes lymphoïdes centraux sont les organes de maturation et le site majeur de la lymphopoïèse.

À partir de cellules lymphoïdes issues de la moelle osseuse :

- le thymus produit les lymphocytes T
- la bourse de Fabricius produit les lymphocytes B et semble jouer un rôle important dans l'infection à salmonelles. La bursectomie néonatale entraîne l'incapacité de fabriquer des anticorps. Les oiseaux bursectomisés *in ovo* sont dépourvus d'immunoglobulines circulantes. Chez les Vertébrés, l'équivalent de la bourse de Fabricius est la moelle osseuse elle-même.

Au cours de leur développement dans les organes lymphoïdes centraux, les lymphocytes se différencient et vont acquérir leur compétence. C'est là que seront sélectionnées les cellules utiles : celles qui possèdent la capacité de reconnaître les antigènes étrangers à l'organisme.

A l'issue de leur maturation, les lymphocytes sélectionnés sont libérés dans la circulation sanguine.

- Les organes et tissus lymphoïdes périphériques (= secondaire)

Ils comprennent des organes encapsulés, que sont les ganglions lymphatiques et la rate, et des accumulations de tissu lymphoïde distribué principalement au niveau des muqueuses, appelé le système immunitaire commun aux muqueuses.

Ces organes et tissus sont colonisés par les lymphocytes immunocompétents produits dans les organes centraux. Leur organisation permet les interactions de l'antigène avec les cellules.

Les organes lymphoïdes secondaires assurent une partie du renouvellement des lymphocytes au cours des divisions cellulaires qui sont déclenchées par la reconnaissance de l'antigène et ont pour but d'amplifier la réponse immunitaire une fois qu'elle a été initiée.

La rate est le principal organe de la réponse humorale contre les antigènes dépendant des cellules T.

Figure 9 : Les organes lymphoïdes centraux de la Poule. LEMAHIEU (92)

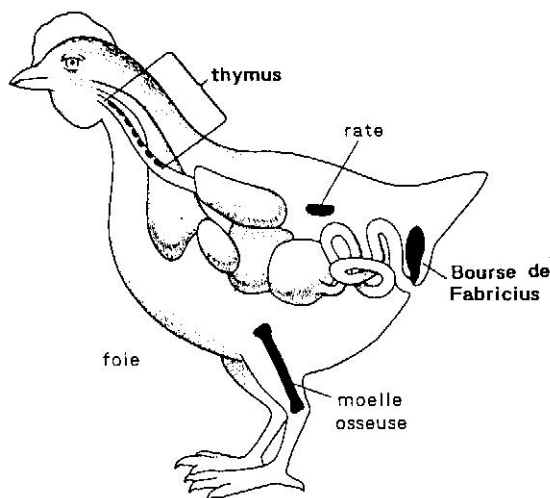
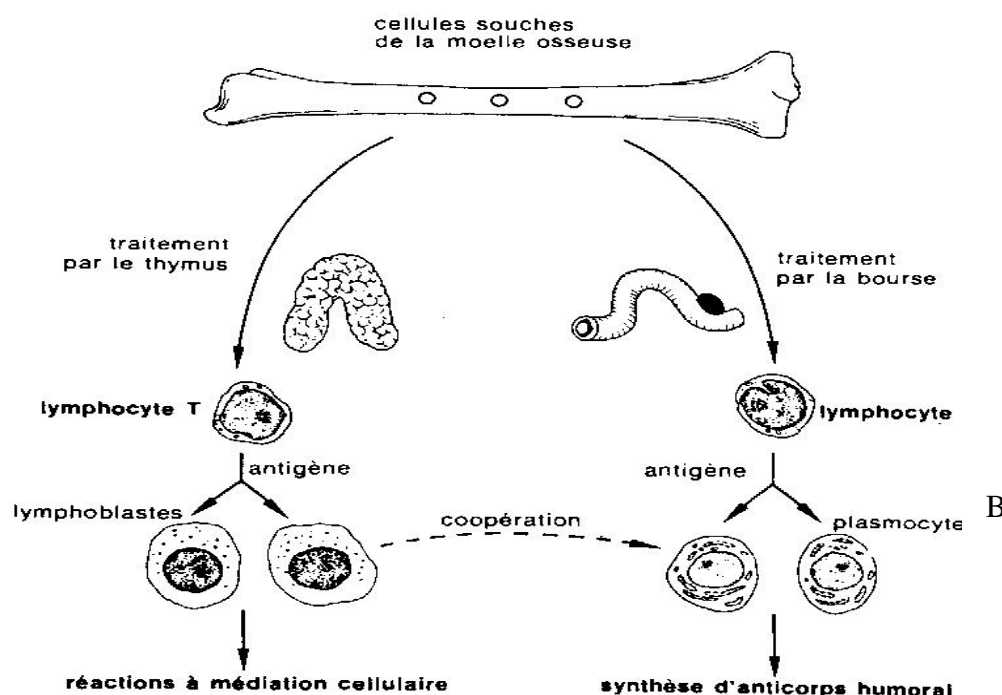


Figure 10 : Les organes lymphoïdes centraux

Organes de maturation et site majeur de la lymphopoïèse. LEMAHIEU (92)



### III.B.2.1.2. Système immunitaire muqueux associé au tube digestif

Le tissu lymphoïde associé au tube digestif (Gut Associated Lymphoid Tissue ou GALT) comporte des cellules lymphoïdes dispersées, des follicules lymphoïdes, les amygdales caecales et les Plaques de Peyer (voir Figure 11 et Figure 12).

La paroi du tube digestif est le siège d'une population de cellules immunitaires comprenant des lymphocytes, des plasmocytes, des granulocytes (hétérophiles) et des monocytes macrophages, répartis dans l'épithélium et dans le tissu conjonctif du chorio de la muqueuse et de la sous-muqueuse, où prédominent largement les lymphocytes B et les plasmocytes sécréteurs d'IgA.

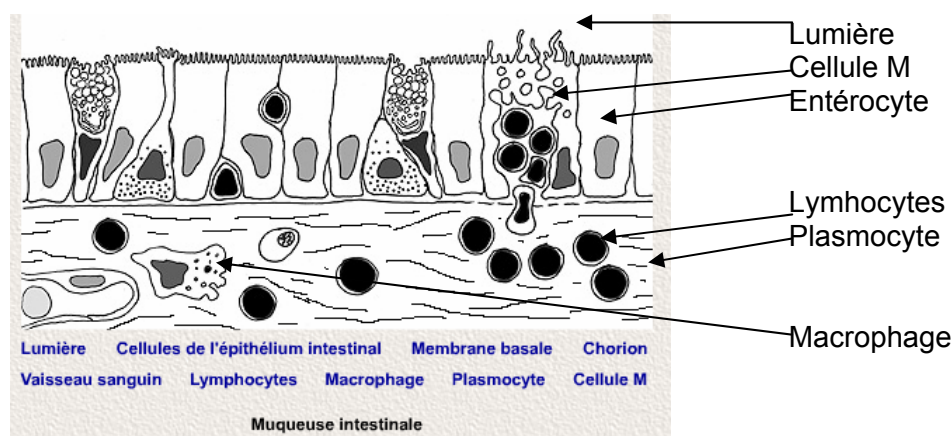
Ces tissus sont peu à peu colonisés par des lymphocytes immunocompétents produits dans les organes centraux. Ils assurent une partie du renouvellement des lymphocytes au cours des divisions cellulaires qui sont déclenchées par la reconnaissance de l'antigène et qui ont pour but d'amplifier la réponse immunitaire une fois qu'elle a été initiée.

On y remarque une prépondérance de la réponse humorale sur la réponse cellulaire avec une production considérable d'anticorps appartenant au groupe des IgA. Ces anticorps sont capables de traverser les muqueuses et d'en assurer la protection.

Les plaques de Peyer, particulièrement importante dans les infections à salmonelles, sont de volumineux agrégats de follicules lymphoïdes primaires et secondaires siégeant dans le chorio de la muqueuse de la partie terminale de l'iléon. et comportent trois zones :

- l'épithélium de surface renferme des cellules particulières, les cellules M, intercalées entre les entérocytes et spécialisées dans le transport des antigènes.
- des follicules lymphoïdes dont la morphologie est identique à celle des ganglions.
- au dessus des follicules, le dôme contient des lymphocytes B, T helpers2 (les lymphocytes Th2 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation humorale) et des macrophages (92).

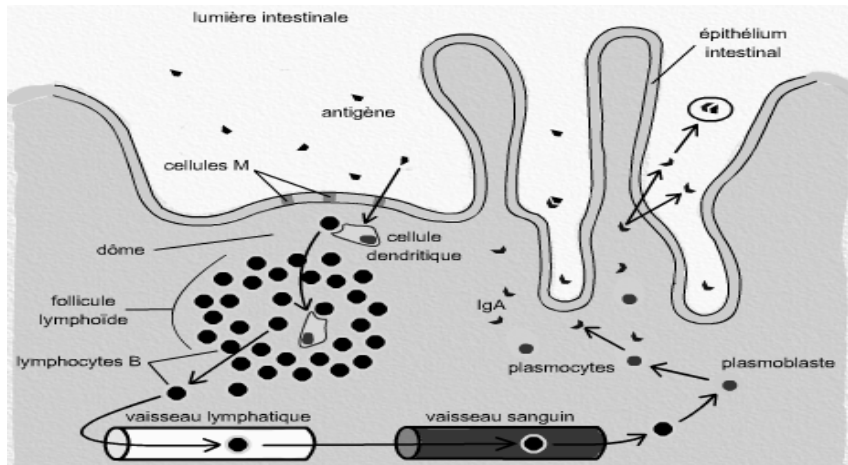
Figure 11 : La muqueuse intestinale (25)



Le système immunitaire intestinal subit des changements complexes de l'éclosion à l'âge de 6 à 9 semaines. Les plus grosses modifications n'interviennent pas avant les 7 à 10 premiers jours avec le développement des tonsilles caecales, des plaques de Peyer, de la lamina propria. Au cours de cette maturation, la résistance aux salmonelles évolue d'une

défense innée non spécifique à une réaction immunitaire pleinement spécifique et fonctionnelle. Avant l'âge de 2 semaines, le GALT est donc très peu développé (67)

Figure 12 : Le GALT - Gut Associated Lymphoid Tissue (25)



### III.B.2.1.3. Immunité humorale

Le système humoral repose sur les cytokines non spécifiques et les immunoglobulines.

Les cytokines sont des médiateurs solubles d'origine cellulaire et qui modulent la réponse immunitaire par le biais de cellules cibles.

On distingue :

- les lymphokines produites par les lymphocytes
- les monokines (ou interleukines) produites par les monocytes et les macrophages

Les cytokines sont les hormones du système immunitaire puisqu'elles interviennent dans le dialogue entre lymphocytes, macrophages et autres cellules intervenant au cours de la réaction inflammatoire et des réponses immunitaires.

Elles exercent leurs effets sur les cellules qui les ont produites, sur d'autres cellules, ou encore agissent à distance sur des organes ou tissus (effet endocrine).

Les immunoglobulines ou anticorps, sont produites par les lymphocytes B dont la maturation dépend de la bourse de Fabricius.

La transformation (activation) des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant les Ac se fait sous l'influence exclusive de lymphocytes auxiliaires (helpers) et de l'antigène.

Les trois classes essentielles d'anticorps sont les IgM, les IgG, les IgA (voir Tableau 25).

Les immunoglobulines s'attachent spécifiquement sur les récepteurs des micro-organismes, bloquant le système d'attachement aux cellules cibles et facilitent ainsi leur destruction par les macrophages.

La première réaction de l'organisme à l'arrivée des salmonelles dans l'intestin est une réponse immunitaire locale humorale à partir des plaques de Peyer et des autres tissus lymphoïdes avec production d'IgA et de cytokines (28).

On peut distinguer deux types d'Ig A, tous deux produits par les lymphocytes B :

- Les IgA sériques
- Les IgA exocrines : elles acquièrent en plus une pièce sécrétoire pendant leur transfert à travers les cellules épithéliales. Les IgA sécrétoires ne passent pas par le sang : elles sont synthétisées directement par les plasmocytes des muqueuses (systèmes digestif,

respiratoire, génital). Elles constituent la première ligne de défense spécifique humorale. Elles neutralisent les microorganismes envahisseurs et régularisent les flores commensales.

Tableau 25 : Les immunoglobulines de la Poule.

Classe	Délai d'apparition	Dynamique (162)	Observations
IgM	2 à 3 jours	Disparition en 10 à 12 jours	Ces Ig n'apparaissent pas en cas d'inoculation vaccinale orale
IgG	5 jours	Pic à 3,5 semaines 4 semaines puis diminution lente jusqu'à 9 mois post-infection	Ce sont les Ig recherchées en dépistage. Elles traversent facilement l'épithélium de l'oviducte pour s'accumuler dans le vitellus
IgA	5 jours	Pic à 5 semaines et disparition vers 9 semaines post-infection	On les trouve dans les sécrétions muqueuses

#### III.B.2.1.4. Immunité cellulaire

La réponse cellulaire est déclenchée par l'invasion de l'organisme. Dans le cadre vaccinal, elle n'intervient qu'avec des vaccins vivants.

Elle repose sur la collaboration entre les différents leucocytes (environ 23 000+/-5000 par mm<sup>3</sup> chez la poule) d'origine médullaire (voir Tableau 26) :

- Les hétérophiles sont des **leucocytes polynucléaires neutrophiles** d'origine médullaire (= neutrophiles). Ils sont présents en grand nombre dans le sang périphérique des poussins, mais ils ne sont complètement fonctionnels qu'au 4<sup>ème</sup> jours post-éclosion. Ils arrivent les premiers sur le site de l'infection, phagocytent les bactéries et présentent les antigènes aux lymphocytes B. Ils activent aussi les lymphocytes T par les antigènes qu'ils leur présentent. Ils agissent en liaison avec le complément.
- Les cellules dendritiques sont des leucocytes **macrophages mononucléaires** d'origine médullaire (monocytes) agissant sous l'effet des premiers signaux inflammatoires. Ils sont fonctionnels dès la naissance. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T. Elles sont des effecteurs de l'immunité innée, elles interviennent avant l'installation de la réponse spécifique. Elles ont une double action de cytotoxicité et de phagocytose. Ce sont :
  - 1) soit des macrophages activés qui phagocytent les éléments opsonisés par les anticorps et le complément
  - 2) soit des macrophages poubelles sans spécificité qui ingèrent tout ce qui est non soi (non opsonisé)
- Les lymphocytes T (TCD3 dont la maturation est sous la dépendance du thymus). Ce sont des cellules qui réagissent aux antigènes (67).
- Les lymphocytes nuls ni B ni T (cellules natural killer et cellules effectrices à cytotoxicité dépendante des anticorps). Les cellules dénommées cellules NK (pour Natural Killer) ont été qualifiées de cellules tueuses naturelles parce qu'elles exercent un effet cytotoxique direct sur les cellules anormales : cellules infectées par des virus ou cellules cancéreuses. Un récepteur membranaire détecte l'absence de molécules CMH de classe I à la surface des cellules cibles. Elles expriment

également des récepteurs pour le fragment Fc des IgG : des anticorps reconnaissent un antigène fixé sur la cellule cible, permettant la fixation de la cellule NK et son activité cytotoxique : c'est la cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante

Tableau 26: formule leucocytaire du poulet. D'après A. CONSTANTIN (32).

Nombre de leucocytes en milliers/mm <sup>3</sup>	Répartition en p. cent				
	lymphocytes	monocytes	hétérophiles	éosinophiles	basophiles
Environ 20.0	59.0	10.2	27.2	2.0	1.7

Les cellules T se décomposent en plusieurs sous populations aux caractéristiques différentes :

- les lymphocytes libérant des substances médiatrices appelées lymphokines. Plus de 90 lymphokines différentes ont été identifiées, elles permettent aux différentes cellules de l'immunité de communiquer entre elles
- les lymphocytes killers, cytotoxiques (CD8) allant au contact des cellules étrangères pour les détruire (LTc). Ils reconnaissent l'antigène présenté par une molécule CMH de classe I. Les antigènes présentés sont des antigènes endogènes, produits par la cellule. La reconnaissance est le premier signal d'activation. Un second signal permet l'expression du pouvoir cytotoxique du lymphocyte Tc.
- les lymphocytes helpers ou auxiliaires (CD4) reconnaissent l'antigène si celui-ci leur est présenté par une molécule CMH de classe II. Les antigènes présentés sont des antigènes exogènes qui ont été endocytés par certaines cellules : les cellules présentatrices d'antigènes. Ils ont pour rôle d'activer des cellules de la réaction immunitaire : les macrophages, les lymphocytes B mais aussi les lymphocytes Tc. Selon l'environnement dans lequel ils se trouvent, les lymphocytes Th se différencient soit en lymphocytes Th1 soit en lymphocytes Th2 : les lymphocytes Th1 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation cellulaire (lymphocytes Tc), les lymphocytes Th2 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation humorale (production d'anticorps).
- les lymphocytes suppresseurs qui diminuent ou bloquent l'activité des lymphocytes B
- les lymphocytes mémoires

### **III.B.2.2.Réponse immunitaire et ses variations**

La réponse immunitaire, naturelle ou vaccinale, est fortement tributaire de l'environnement de l'animal au sens large :

- le climat (le froid, la chaleur, taux CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>)
- la nutrition (les apports en vitamine E, sélénium, zinc de la ration peuvent être bénéfiques)
- l'abreuvement (la restriction d'eau entraîne une diminution de la réponse)
- les polluants (aflatoxines, métaux lourds)
- le logement et l'environnement social (bruit, surpopulation)
- l'hygiène : elle est indispensable pour la réussite d'un programme vaccinal quel qu'il soit.

D'autres facteurs propres aux animaux eux-mêmes peuvent entrer en jeu :

- déficiences génétiques
- race (races de ponte présentent une production d'Ig G plus importante (race à viande plutôt IgM) et une plus forte réaction cellulaire que les races à viande)
- déséquilibres endocriniens

- pathologies intercurrentes, notamment maladie de Marek et maladie de Gumboro entraînant la destruction de la Bourse de Fabricius sur les jeunes animaux de moins de 10 semaines, entraînant l'incapacité de produire des anticorps
- déséquilibres métaboliques (parasitisme par exemple)
- présence d'anticorps maternels dans le jaune d'œuf : les anticorps maternels peuvent neutraliser la souche vaccinale chez le poussin (théorique car la vaccination des poussins n'est pas mise en œuvre)
- statut sanitaire : la vaccination sera moins efficace sur les animaux déjà porteurs de salmonelles sauvages, ou immunodéprimés ou en cas de présence de mycotoxine dans les aliments
- stress en général :
  - o vaccinal lors d'injection, granulome au point d'injection avec les vaccins adjuvés
  - o vaccination réalisée au moment des périodes sensibles (transport, changement de bâtiment)

Les conditions de conservation et d'administration du vaccin sont des points clés à ne pas négliger

- variations brutales de température, luminosité forte lors de la conservation,
- qualité de l'eau (sans antiseptique tel que le chlore) pour les vaccins atténués administrables par voie orale
- propreté du matériel (abreuvoirs, aiguilles)

Enfin le schéma vaccinal lui-même :

- vaccin vivant ou vaccin inerte
- voie d'administration
- dose
- âge des oiseaux

### **III.B.2.3.Immunité spécifique antisalmonellique**

#### **III.B.2.3.1.Chez l'adulte**

Le poulet est considéré comme immunocompétent à l'âge de six semaines (101).

L'infection salmonellique déclenche des réactions rapides au niveau de la muqueuse intestinale et des réactions systémiques plus tardives.

Les stratégies de défenses de l'organisme contre ces germes capables de survivre et de se multiplier dans les macrophages sont encore largement inconnues.

Les rôles relatifs de la réponse immunitaire cellulaire et humorale dans leur élimination ne sont pas complètement élucidés et sont fonction :

- non seulement du nombre de germes (un grand nombre de germes a toutes les chances de pénétrer le système réticulo-endothélial alors qu'un petit nombre sera éliminé au niveau de la lumière intestinale)
- mais aussi de leur caractère plus (*Salmonella* Enteritidis et Typhimurium) ou moins invasif (162).

En réponse aux endotoxines, les monocytes, les macrophages et les cellules endothéliales produisent des cytokines dont l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNFalpha (non élaboré par les cellules endothéliales). De plus, ces cellules produisent des dérivés oxygénés ainsi que des métabolites de l'acide arachidonique (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes) et du PAF (Platelet Activating Factor) (47).

Les lymphocytes T et B permettent l'élimination (les auteurs anglo-saxons parlent de « clearance ») des bactéries et l'établissement d'une immunité durable (96) (8).

L'augmentation de la résistance à la réinfection est liée aux cytokines telles que IFN $\gamma$  (gamma), TNF $\alpha$  (alpha), IL12 et aux anticorps opsonisants. On ne sait pas quel est le rôle joué par la séroconversion et les cellules T mémoires (96).

OKAMURA *et al.* (117) ont montré que la réponse à médiation cellulaire était transitoire (environ deux semaines) et plus particulièrement dirigée contre les antigènes flagellaires, suggérant que ces antigènes seraient peut-être au centre de la réaction immunitaire cellulaire.

Avec d'autres, il fait l'hypothèse que la chronicité des infections (portage) à salmonelles serait liée à l'absence de la réponse anamnétique de type cellulaire, conduisant au portage chronique : en effet, chez le poulet contaminé, il est observé une déplétion transitoire des lymphocytes des organes lymphoïdes.

BABU *et al.* (8) ont démontré l'importance de l'immunité à médiation cellulaire dans l'élimination des salmonelles avec notamment l'augmentation des lymphocytes spléniques TCD3 lors d'infection ou d'immunisation. Cette augmentation ne peut toutefois être associée directement avec la clairance des salmonelles car il n'y a aucune modification dans les populations CD4 et CD8 (killers) corrélée à cette augmentation. Il a également mis en évidence une déplétion des lymphocytes B au niveau de la bourse de Fabricius suite à une infection ou une immunisation, comme cela a déjà été établi chez le veau et l'enfant, suggérant que cette déplétion serait liée au portage des salmonelles. Dans son étude les oiseaux immunisés ont toujours montré une réaction immunitaire plus faible que les oiseaux infectés. Comme l'effet protecteur produit par la souche vaccinale est considérablement plus faible que celui induit par une souche sauvage, il existe une corrélation positive entre les paramètres de l'immunité cellulaire et le niveau de protection.

En 1991 ALDERTON *et al.* (2) ont montré, en utilisant un vaccin à souche de *Salmonella* Typhimurium mutante avirulente (dépendante des vitamines aromatiques) que la réaction immunitaire humorale s'installe avec l'apparition tout d'abord d'IgM puis d'IgG et d'IgA. Seules les IgG et les IgA apparaissent en cas d'inoculation par la voie orale.

En 2002, KAISER *et al.* (82) ont montré que plus forte est la réponse en anticorps, moindre est la charge bactérienne dans le contenu du caecum. La corrélation négative entre ces deux critères, suggère que le taux d'anticorps est déterminant pour l'élimination des salmonelles. Mais il existe une controverse à ce sujet puisque certaines études rapportent l'absence de relation entre le taux d'anticorps et l'élimination des salmonelles. BABU *et al.* (8), par exemple rapportent que le taux d'anticorps induit par un vaccin inactivé à *Salmonella* Enteritidis ne protège pas les poulets contre l'infection par cette salmonelle.

WOODWARD *et al.* (158) ont montré que dans le cas d'une contamination expérimentale intraveineuse, les salmonelles sont éliminées dans les fèces, suggérant qu'une probable voie d'élimination des salmonelles serait la vésicule biliaire. Mais d'autres voies d'élimination coexistent peut-être.

En l'état actuel des connaissances, la résistance de l'hôte aux salmonelles dépend initialement des cytokines inflammatoires (IFNgamma, TNFalpha, IL12, etc.), conduisant à l'infiltration tissulaire par des cellules inflammatoires activées. Les lymphocytes B et T se développent ensuite permettant l'élimination des bactéries (importance des anticorps opsonisant) et l'installation d'une immunité à la réinfection. Pourtant, dans le cas des salmonelles, de manière encore inexpliquée, la séroconversion et la présence de cellule T mémoire ne sont pas strictement corrélées au développement de la résistance à l'infection (96).

### **III.B.2.3.2.Chez le poussin**

Quelques caractéristiques du poussin doivent être prises en compte pour la mise en œuvre d'une vaccination à cet étage de la filière.

▪ **L'immaturité du système de défense pendant les premières semaines de vie.**

L'extrême susceptibilité du poussin à l'infection salmonellique est un point important à considérer dans le programme de lutte : à un jour, une administration orale de 10 salmonelles suffisent à infecter durablement 50 p. cent des animaux, alors qu'à l'âge de 14 jours une dose de 1 million de cellules n'infecte que 10 p. cent des poussins (97).

En 1999, HOLT *et al.* (70) ont décrit l'immaturité immunitaire des poussins nouveau-nés face à une contamination expérimentale par *Salmonella* Enteritidis (à dose sub-létale). 50p. cent des oiseaux sont restés porteurs pendant au moins 23 semaines. Les IgA produites ne sont alors pas capables d'éliminer les germes. De plus, les oiseaux ont montré par la suite une réponse moindre à la vaccination homologue ou hétérologue. Ces résultats ont démontré que l'exposition précoce de poussins aux salmonelles (sauvages ou vaccinales) peut interférer fortement avec leur capacité à répondre aux *stimuli* antigéniques ultérieurs, ceci pendant au moins 23 semaines.

Des oiseaux infectés à 3 ou 6 semaines d'âge produisent une réponse en anticorps plus rapide et plus intense que ceux infectés à l'âge de 1 semaine (14), mais dans ces trois cas, l'infection persiste jusqu'à la 13<sup>ème</sup> semaine d'âge en dépit de la présence des anticorps en concentration importante. Les oiseaux infectés à 3 ou 6 semaines éliminent donc plus rapidement les salmonelles, présentent une réponse cellulaire plus importante et une réponse humorale plus rapide (20 jours post-infection au lieu de 26 jours pour le groupe contaminé à une semaine d'âge) : la vitesse d'élimination des salmonelles de l'intestin est âge-dépendante, sans doute en rapport avec l'acquisition de l'immunocompétence des cellules T de l'intestin.

Lors d'inoculation de salmonelles virulentes ou vaccinales à des poussins d'un jour, BERNDT et METHNER (19) ont mis en évidence l'activation du système immunitaire avec :

- migration plus rapide des jeunes lymphocytes B IgM+
- maturation plus rapide en lymphocytes B IgM sécrétant
- production d'IgM et d'IgA plus importante lors d'infection
- macrophages en nombre plus élevé dans les caeca lors d'infection entre 4 et 12 jours avec un pic à 5 jours
- déplétion en lymphocytes B IgM sécrétants et en macrophages dans la Bourse de Fabricius et la rate.

▪ **La colonisation inhibition**

VAN IMMERSEEL *et al.* (151), en 2002, ont étudié la dynamique des sous populations leucocytaires lors de la vaccination de poussins nouveau-nés par des salmonelles atténuées ou lors d'infection naturelle : la souche atténuée peut facilement coloniser le tractus gastro-intestinal en raison de l'absence de microflore normale chez ces jeunes animaux et cette colonisation prévient l'invasion par certaines souches virulentes inoculées dès le lendemain et ce pendant les 6 premiers jours. Ce processus est appelé colonisation inhibition. Les mécanismes de ce phénomène sont encore inconnus mais semblent reposer autant sur des caractéristiques liées aux bactéries elles-mêmes (compétition pour les sources de carbones) que sur des réactions de l'animal infecté. Ce serait un effet protecteur additionnel par rapport à l'immunité adaptative.

La réponse précoce repose sur l'infiltration de la lamina propria de l'intestin par les hétérophiles (granulocytes polynucléaires) dès la 12<sup>ème</sup> heure. Dès la 20<sup>ème</sup> heure, les macrophages et les lymphocytes T sont sur les lieux, alors que les lymphocytes B apparaissent vers la 24<sup>ème</sup> heure. Les taux de lymphocytes B et les hétérophiles vont se maintenir pendant que les lymphocytes T et les macrophages voient leurs nombres diminuer en une dizaine de jours.

La maturation structurelle des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses est induite par les antigènes : les lymphocytes T développent graduellement leur réactivité et atteignent

leur potentiel après une semaine, il en va de même pour les macrophages. Quant aux lymphocytes B, ils ne s'organisent en structures folliculaires qu'à partir du 5<sup>ème</sup> jour après l'éclosion. Les premiers Ac-anti LPS (anti-O) apparaissent vers le 18<sup>ème</sup> jours.

En ce qui concerne la colonisation inhibition, il est donc peu probable que les cellules immatures interviennent dans ce mécanisme. Les hétérophiles semblent par contre aptes à infiltrer la paroi caecale, et à tuer les salmonelles chez les poussins d'un jour. De plus leur déplétion indique nettement leur rôle décisif dans ce type de protection précoce contre les salmonelles.

Eu égard à ce besoin de moyens de prévention des salmonelles chez les poussins, METHNER *et al.* (99) ont effectué des tests comparatifs entre différents types de souches de salmonelles, y compris deux souches vaccinales utilisées en Allemagne, pour mesurer ce potentiel de protection. Les résultats sont variables de forts à très faibles mais la protection n'est vraiment efficace qu'entre souches isogéniques.

La protection résulte d'un effet inhibiteur sur la souche de challenge utilisée (Typhimurium 421, Enteritidis 6403, et Typhimurium 415 qui est la souche parentale des deux vaccins testés), avec une diminution du nombre de ces bactéries d'épreuve dans les caeca notamment et le foie. Le mécanisme de cette inhibition est encore inexpliqué.

Les souches vaccinales testées sont très peu inhibitrices contre les autres souches ainsi que contre leur propre souche parentale, peut être en raison de la mutation responsable de leur atténuation. Celle-ci affecterait alors l'activité inhibitrice des souches en dérivant. METHNER *et al.* pensent qu'il serait très utile de chercher une souche avec un large spectre inhibiteur, soit de manière empirique soit en élucidant le mécanisme qui sous-tend cette inhibition.

La protection par inhibition obtenue avec les souches isogéniques est comparable à celle obtenue avec la préparation Broilact.

Au final, les auteurs suggèrent que les candidats vaccinaux potentiels soient testés pour leur capacité à prévenir la colonisation intestinale des poussins (voir Tableau 27).

Tableau 27 : Pouvoir inhibiteur de différentes souches ou préparation vis-à-vis des salmonelles (99)

Souches testées	Sérovar	Pouvoir inhibiteur
Zoosaloral H ®	Typhimurium 415	+
Salmonella vac T®	Typhimurium 415	+
S. Enteritidis aroA	Enteritidis PT4	++
S. Typhimurium aroA	Typhimurium 5235	++
S. Enteritidis sauvage	Enteritidis 6403	+++
S. Typhimurium sauvage	Typhimurium 421	++++
Flore d'exclusion compétitive (Broilact)	Flore caecale indéfinie	+++++

#### ▪ Le passage des anticorps maternels

La vaccination des poules permet le passage des anticorps maternels chez les poussins pendant plus de 30 semaines après la vaccination : IgA, IgG. On peut les détecter aussi bien dans l'intestin que dans le sérum de poussins issus de parents vaccinés. Ces anticorps sont à l'origine d'une protection des poussins contre la colonisation par des salmonelles virulentes isogéniques pendant environ 6 semaines. La combinaison de la vaccination des adultes avec l'utilisation des effets de cette vaccination sur leur progéniture pourrait en principe contribuer à améliorer le contrôle des infections à salmonelles dans la filière (65).

En pratique, il n'en est rien, puisque cette vaccination est interdite à l'étage reproduction et multiplication.

Ces anticorps maternels peuvent en outre affecter la mise en place d'une immunisation active par des vaccins vivants : les bactéries vaccinales voient en effet leur développement freiné (diminution de la population vaccinale de 0.5 à 1.5 log10 par rapport à des poussins sans Ac maternels) (102).

HASSAN *et al.* (65) ont obtenu des résultats similaires : la vaccination des poussins issus de poules vaccinées est plus efficace si elle est pratiquée à 2 et 4 semaines plutôt qu'à 1 et 3 semaines, en raison tout d'abord de la présence des anticorps maternels, mais aussi du développement de l'immunocompétence.

La présence des anticorps maternels chez le poussin vacciné peut déstabiliser l'installation de la flore vaccinale normale en interférant avec les phénomènes d'exclusion compétitive, fragilisant ainsi ce mécanisme de défense non spécifique.

### **III.C. Efficacité : résultats des essais de laboratoire ou de terrain**

S'il est facile de démontrer l'efficacité de la vaccination contre les salmonelles typiques induisant des maladies systémiques, cela est beaucoup plus délicat pour les infections provoquées par les salmonelles ubiquistes à l'origine d'infection aviaires bénignes la plupart du temps.

On l'a vu avant, les facteurs de variations de la réponse immunitaire sont multiples et mal connus. Leurs effets sont donc difficiles à estimer et la vaccination en est toujours à un stade relativement empirique.

Les essais expérimentaux complétés par des essais de terrain permettent d'évaluer l'efficacité d'un vaccin. Il est par contre très difficile de comparer les vaccins entre eux pour leur niveau et leur durée de protection ainsi que pour leur sécurité.

En ce qui concerne les essais de terrain, il est assez difficile de prouver la diminution de la contamination des œufs consécutive à la vaccination, car ce taux est en tout état de cause, faible et variable et qu'il est difficile de trouver des troupeaux témoins non vaccinés (35).

L'intérêt réside en fait dans la protection de la santé publique et l'objectif est clairement de réduire la contamination des œufs, ce qui revient à :

- prévenir et réduire la colonisation intestinale
- réduire l'excrétion fécale à défaut de supprimer le portage
- prévenir les infections systémiques et la localisation dans l'appareil reproducteur

Le rapport coût/bénéfice est également important dans l'évaluation de cette efficacité pour une maladie qui ne pose pas de problème direct à l'industrie avicole.

Idéalement, les vaccins devraient être utilisables *per os*, en une seule dose, non pathogènes, à spectre large pour induire une protection croisée, dirigés notamment contre les salmonelles virulentes et invasives, et enfin ne doivent pas induire de réaction croisée avec les tests sérologiques utilisés pour le dépistage.

Selon un rapport de la FAO, la vaccination contre *Salmonella* a été largement étudiée en milieu expérimental, mais beaucoup moins dans les essais de terrain. Plusieurs vaccins ont été évalués de manière expérimentale : salmonelles tuées de différentes souches, salmonelles vivantes de souches atténuées et extraits d'antigène de surface de différentes souches.

Les injections de salmonelles tuées semblent avoir une efficacité limitée contre la colonisation intestinale des poules par *Salmonella*, bien que ces bactérines soient à même de réduire l'infection d'organes internes (y compris les ovaires) par stimulation d'anticorps humoraux.

Les salmonelles vivantes pourraient être plus efficaces pour moduler la colonisation intestinale par *Salmonella* parce que ces produits peuvent susciter l'immunoréaction à médiation cellulaire nécessaire pour résister à la colonisation.

De manière générale, il semble qu'une forte immunité exprimée à la porte d'entrée même de l'agent infectieux semble être la plus appropriée pour prévenir une infection salmonellique, ceci dans le but de contrôler efficacement le portage asymptomatique.

Les réponses immunitaires systémique et muqueuse étant induites et contrôlées par des mécanismes partiellement indépendants, la stratégie permettant d'induire une réponse immunitaire protectrice au niveau muqueux est un aspect critique du développement de nouveaux vaccins contre les salmonelles. Alors que la voie parentérale induit principalement une forte immunité cellulaire et humorale, et ceci au niveau systémique seulement, il apparaît de plus en plus que la voie muqueuse est plus apte à stimuler une immunité muqueuse efficace, et même accompagnée d'une forte immunité systémique dans certains cas (17).

Il est difficile d'établir des comparaisons entre les résultats expérimentaux obtenus avec les différents vaccins candidats. Il ressort que les résultats obtenus et leurs variations sont fonctions de multiples facteurs : la souche utilisée pour les contaminations expérimentales (souche challenge), les voies d'inoculation, les doses, l'âge des oiseaux lors de la vaccination et lors de la contamination par les souches virulentes, l'analyse statistique des données, etc (43).

De plus, il est essentiel de rappeler ici que le taux d'anticorps n'est qu'une mesure indirecte de l'efficacité d'un vaccin et ne constitue pas la preuve absolue d'une réelle protection sur le terrain.

Dans les différentes études, les critères jugés positifs pour la protection des oiseaux sont :

- diminution de l'excrétion fécale de la souche infectieuse
- diminution de la colonisation intestinale (caecum) et des organes par les salmonelles d'épreuve (ovaire, rate, vésicule, etc.) et cultures négatives à partir de ces organes signifiant une réduction de l'infection systémique
- diminution de la contamination des œufs, interne ou externe, même si ce critère est difficile à évaluer sur le terrain, compte tenu du faible nombre d'œufs contaminés et de la difficulté de disposer de troupeau de contrôle non vaccinés (119) (35)
- diminution de la morbidité et de la mortalité sur les jeunes animaux
- diminution des signes cliniques (diarrhée, faiblesse, etc.) chez les jeunes animaux
- diminution de la durée de l'état infectieux
- phénomène de colonisation inhibition chez les poussins

Enfin, il ne faut pas perdre de vue que les conditions des essais expérimentaux sont bien différentes des conditions du terrain où les oiseaux sont confrontés à des pathogènes divers, seuls ou associés, en nombre indéterminé, de manière répétée et aléatoire. (43)

Afin de pouvoir établir des comparaisons et de pouvoir ainsi évaluer plus facilement de l'efficacité d'un vaccin, ZHANG-BARBER *et al.* en 1999 (162) ont d'ailleurs proposé les inoculations d'épreuve (challenge) sur un petit nombre d'oiseaux à l'intérieur des troupeaux testés (technique des oiseaux contamineurs) ou l'incorporation de petites quantités de salmonelles dans l'aliment.

La technique des oiseaux contamineurs est parfois utilisée. Ces oiseaux sont obtenus de diverses façons : soit par injection de salmonelles dans l'embryon, soit par gavage de poussins à haute concentration, mais ces méthodes ne reproduisent pas les processus naturels de contamination. Actuellement les chercheurs ont plutôt recours à un petit pourcentage d'œufs contaminés avant l'incubation (9).

En préalable, il est donc important de rappeler la difficulté de comparer l'efficacité des médicaments, notamment des vaccins disponibles. La protection conférée par un vaccin résulte d'une combinaison complexe de plusieurs mécanismes immunologiques. Répondre à priori à la question de son efficacité en termes qualitatifs généraux sur les différents types de vaccins existants est impossible. La seule comparaison possible est celle qui porte sur des produits finis, mais elle est coûteuse et n'apporte d'information que sur les produits étudiés (46).

### **III.C.1. Essais vaccinaux à vaccins inertes**

Les premiers essais de vaccination avec des suspensions de bactéries tuées ou des antigènes bruts ont rapidement mis en évidence la nécessité d'améliorer des résultats peu convaincants. A l'état brut, ces vaccins sont uniquement capables d'induire une réponse en anticorps.

Au début des années 1990, GAST *et al.* (56) ont testé deux bactérines et ont constaté un effet positif mais partiel sur la diminution de la colonisation intestinale et de l'excrétion des salmonelles dans les fèces, avec environ 50 p. cent des poules vaccinées excréant un nombre important de salmonelles.

### **III.C.1.1.Importance des adjuvants, de la voie, de l'âge et de la dose**

L'importance des adjuvants et ainsi que de l'injection de rappel pour l'efficacité des vaccins inertes ont ensuite été démontrés lors de plusieurs expérimentations.

En 1993, BARBOUR *et al.* (11) ont testé 6 adjuvants différents et montré l'amélioration de la réponse humorale à différents types de vaccins à base de salmonelles tuées. En l'occurrence, la bactérine (vaccin antibactérien) la plus efficace était une souche adjuvée avec l'adjuvant incomplet de Freund (une émulsion eau dans huile fortement inflammatoire) et inactivée par de l'acétone à 20 p. cent, avec une forte réponse en IgG (qui confèrent une longue protection).

En 1994, CHARLES *et al.* (27) ont testé des liposomes, des complexes immunostimulants (structures vésiculaires à base de saponines) et des adjuvants huileux et ont comparé l'efficacité des vaccins OMP (outer membrane proteins) adjuvés à celle de vaccins non adjuvés (corps cellulaires bactériens ou protéines seules). Les plus fortes réponses en anticorps ont été observées avec le vaccin adjuvé par des liposomes chargés positivement et après une injection de rappel. Avec ces vaccins, les cultures à partir d'organes de 90 p. cent des oiseaux ayant reçu une injection de rappel ont présentées des cultures négatives.

MUIR *et al.* (109), en 1998, ont testé la voie intrapéritonéale avec une bactérine, suivie d'un rappel par voie orale. Il a pu observer une réponse en IgA au niveau intestinal et il a ensuite évalué la protection conférée par ce protocole d'immunisation. Le taux d'anticorps anti-*Salmonella* Typhimurium dans la bile et l'intestin était significativement plus élevé chez les oiseaux vaccinés que chez les oiseaux de contrôle, ceci 15 jours après l'épreuve de challenge. Cette étude illustre la possibilité d'obtenir une réponse mucosale avec une immunisation parentérale.

En 1999, MEENAKSHI M *et al.* (98) ont comparé les résultats obtenus avec deux types de vaccins tués (OMP ou SE=sonicated extract= suspension de salmonelles soumis à l'effet de sons hautes fréquences), adjuvés ou non, par voie orale ou parentérale (sous-cutanée), à dose de 1 ou 0,5 mg. Ils ont ainsi montré la supériorité du vaccin OMP, de la voie parentérale, de la dose de 1mg et des vaccins adjuvés, avec des taux d'anticorps plus élevés et moins d'excrétion fécale.

En 2001, FUKUTOME *et al.* (53) ont pratiqué des essais de vaccination par la voie intraoculaire avec un antigène (extrait cellulaire complet) associé à des liposomes (adjuvant vésiculaire en bicouche lipidique permettant de présenter l'antigène de manière adéquate). Cette immunisation intraoculaire a induit l'apparition de lymphocytes produisant des anticorps sériques spécifiques dans la rate et la lamina propria du tractus intestinal (IgA, IgG, IgM). Des lymphocytes B activés sont détectés dans la rate et dans la lamina propria. Les IgA et les IgG extraites de l'intestin sont capables d'inhiber l'adhérence de *Salmonella* sur les cellules épithéliales intestinales, supprimant ainsi la colonisation de l'hôte par les bactéries. L'immunisation avec un antigène sans liposome n'a permis de détecter que des IgG dans l'intestin).

### **III.C.1.2.Vaccins tués (bactérines)**

DAVISON *et al.* (37) ont montré sur 11 troupeaux commerciaux, qu'en dépit de la vaccination à vaccin tué (autovaccin ou vaccin autorisé), 63,6 p. cent des salles ont un environnement contaminé par les salmonelles (y compris les rongeurs), 100 p. cent des troupeaux sont positifs sur les cultures d'organes (ovaire, oviducte) ainsi que sur les oeufs.

Le niveau de positivité des cultures sur l'environnement se situe entre 0 p. cent et 45,5 p. cent pour les troupeaux vaccinés. Le niveau de positivité des cultures sur les organes des oiseaux vaccinés se situe entre 10 p. cent et 40 p. cent. Globalement les résultats sont comparables pour les animaux vaccinés et les animaux non vaccinés, qu'ils soient logés dans le même bâtiment ou dans des bâtiments différents.

En 1999, MIYAMOTO *et al.* (107) ont étudié l'efficacité d'un vaccin commercial tué à base de *Salmonella* Enteritidis. Les poules ont été vaccinées à l'âge de 38 semaines puis ont subi une injection de rappel à 42 semaines. Deux semaines après, elles ont été contaminées par voie intra vaginale : ce modèle de contamination expérimentale donne habituellement un fort taux de contamination des œufs.

Les résultats démontrent significativement une réduction de la contamination des œufs (voir Tableau 28).

Tableau 28 : Nombre de salmonelles dans différents prélèvements (107)

	Poules vaccinées	Poules non vaccinées
Œufs contaminés (p. cent)	19	37
Ecouvillons cloacaux (+/-)	+	++
Ecouvillons vaginaux (+/-)	+	++
Culture sur rate	+	++
Culture sur ovaire	+	++
Culture positive sur œufs en formation dans l'oviducte	0/17	2/15
Ac sériques	++	+
Ig G dans l'oviducte	++	+

En 2000, YAMANE *et al.* (159), dans une étude de terrain, ont examiné l'effet d'un vaccin tué à base de *Salmonella* Enteritidis (Layermune SE®) sur l'incidence dans les échantillons d'œufs liquides de trois fermes ayant connu un épisode infectieux confirmé. A la suite de deux expériences, les résultats ont permis de conclure au rôle important du vaccin tué dans la réduction de l'incidence des salmonelles dans les œufs produits par les trois troupeaux (voir Tableau 29).

Tableau 29 : Rôle de la vaccination dans la réduction de l'incidence des salmonelles dans les ovoproduits (159)

	Nombre de salmonelles par échantillon de 100ml	
	Animaux vaccinés	Animaux non vaccinés
Ferme 1	0	<2
Ferme 2	<2	>1600
Ferme 3	0	>1600

En 2002, CLIFTON *et al.* (29) ont testé un vaccin commercial inactivé (cultivé sur un milieu appauvri en fer) bivalent de *Salmonella* Typhimurium et Enteritidis, sur des poussins en les vaccinant à un jour et à 4 semaines (plus un groupe de contrôle non vacciné). La contamination expérimentale par *Salmonella* Typhimurium a ensuite été réalisée soit par voie orale (selon deux protocoles : haute dose et faible dose) soit par la technique des oiseaux contamineurs. La vaccination a démontré une certaine efficacité, avec une colonisation des organes internes moindre, dans le protocole ayant eu recours aux oiseaux contamineurs. Le protocole de contamination par voie orale à haute ou faible dose n'a pas permis de mettre en évidence un effet positif de la vaccination.

### **III.C.1.3.Vaccins sub-unitaires**

#### **III.C.1.3.1.Anatoxines**

L'endotoxine des bactéries à coloration gram négative (lipopolysaccharides = LPS) possède des effets toxiques marqués qui en limite l'usage aux études des mécanismes immunitaires in vitro. Elle est surtout utilisée en tant qu'adjuvant.

Le LPS est très résistant à de nombreux agents physiques ou chimiques.

Il ne peut pas être détoxifié par l'action conjointe du formol, du vieillissement et de la chaleur et il n'est donc pas transformable en anatoxine contrairement à ce qui est observé pour certaines toxines protéiques. Produit en quantité modérée, le LPS (-) a un effet bénéfique mais une production excessive aboutit à des altérations tissulaires, une hypotension, une coagulation intra vasculaire et une hyperthermie élevée.

Les endotoxines ont à la fois un effet adjuvant et un effet immunostimulant. (47)

Le monophosphoryl lipide, obtenu par traitement du LPS par l'acide chlorhydrique, est un composant beaucoup moins toxique et qui conserve son efficacité en tant qu'adjuvant, stimulant préférentiellement la réponse immunitaire cellulaire. (153)

Administrer ce composant revient à mimer les signaux pro inflammatoires reçus par le système immunitaire lors d'une l'infection bactérienne naturelle. Le mode d'action repose sur une interaction avec les Toll-like receptors (TLR)

En 2001, MISHRA et SHARMA (106) ont testé des vaccins à base d'anatoxine de *Salmonella* Gallinarum et Weltevreden. La mortalité a été nulle avec l'anatoxine Weltevreden adjuvée avec adjuvant de Freund complet. Avec les autres anatoxines, le niveau de protection a été de 50 à 80 p. cent en fonction du procédé d'inactivation et de l'adjuvant. Il a été conclu que ce type de vaccin est puissant et sûr.

#### **III.C.1.3.2.Antigènes candidats**

En 2002, OKAMURA *et al.* (117) ont comparé les réactions immunitaires cellulaires pour trois types de vaccins inerts contre *Salmonella* :

- un vaccin commercial tué (Poultvac)
- un vaccin expérimental sub-unitaire à base d'extrait protéique non purifié (crude protein= CP)
- un vaccin expérimental sub-unitaire à base de protéines membranaires (= outer membrane protein= OMP)

Dans les trois cas, il a noté une augmentation significative une semaine après l'immunisation de la prolifération des lymphocytes dirigés spécifiquement contre les flagelles : la plus forte réponse est obtenue avec le vaccin commercial tué, entre une et deux semaines après l'immunisation.

Il est également observé une augmentation des interleukines 2 et 6, une semaine après l'immunisation mais sans différence entre les trois vaccins. Les taux d'interleukines diminuant après deux semaines.

Avec des vaccins tués ou sub-unitaires, l'immunité cellulaire est donc transitoire et dirigée principalement contre les protéines flagellaires. Dans les trois cas, la réponse à médiation cellulaire a été de courte durée et n'a pas été relancée après la vaccination de rappel. Ces résultats ont permis d'orienter une nouvelle étude vers les antigènes flagellaires.

En 2003, KHAN *et al.* (83) ont testé l'utilisation de protéines de la membrane externe de *Salmonella* (de poids spécifique 75.6 à 82.3 kDalton) pour tenter d'inhiber ou réduire la colonisation de la muqueuse intestinale de l'intestin grêle et des caeca et a observé une diminution significative de cette colonisation sur les oiseaux vaccinés par rapport aux oiseaux témoins : les protéines de la membranes externes sont donc potentiellement utilisables pour la fabrication de vaccins inerts.

#### **III.C.1.4.Limites actuelles**

A l'état brut, les vaccins inertes sans adjuvant sont uniquement capables d'induire une réponse en anticorps systémiques (46).

Ils génèrent des quantités substantielles en IgG et confèrent ainsi une protection efficace contre l'invasion systémique par *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium mais ils ne peuvent empêcher la colonisation intestinale (14).

Ils n'induisent en effet pas d'immunité muqueuse significative, même lorsqu'ils sont administrés par une telle voie. Ils n'offrent pas de protection croisée pour différents sérovars de salmonelles.

Le stress de l'injection peut représenter un inconvénient :

Les recherches actuelles visent à découvrir des épitopes conférant une protection adéquate.

Leur avantage majeur est leur innocuité.

Paradoxalement, l'expérience prouve que ce type de vaccin peut être aussi efficace que les vaccins vivants. Ceci s'explique en partie par le rôle des anticorps dans la neutralisation des bactéries lorsqu'elles sont en position extracellulaire à un moment ou à un autre de leur cycle. En outre les adjuvants modifient de manière importante la réponse contre un antigène inactivé. (46)

Les résultats obtenus avec les vaccins inertes démontrent que la nature complexe de la réponse immunitaire vis à vis des salmonelles reste encore à préciser tant au niveau des mécanismes de la présentation des antigènes qu'à celui des différents antigènes induisant l'effet protecteur.

#### **III.C.2. Essais vaccinaux à vaccins vivants**

Les études effectuées sur les vaccins anti-salmonelles vivants trouvent leur justification scientifique dans le modèle de la réponse immunitaire murine qui associe la réponse humorale à la réponse cellulaire pour l'acquisition de l'immunité protectrice.

Or WALLIS (154), en 2001, avance que l'extrapolation des résultats obtenus avec des souris de laboratoire de souches consanguines très sensibles n'est pas prudente et ne permet de conclure à la suprématie des vaccins vivants sur les vaccins tués.

L'avantage conféré par l'administration orale de ce type de vaccin réside dans une réponse muqueuse forte, très importante dans les infections intestinales naturelles.

Un inconvénient majeur est l'apparition d'effets secondaires, tels que la diarrhée, l'abattement ou l'excrétion fécale de la souche vaccinale, dus à un pouvoir pathogène résiduel.

La recherche s'oriente donc vers l'étude des facteurs de virulence induisant les symptômes entériques ou systémiques de manière à les muter sélectivement, permettant ainsi de supprimer la diarrhée et consécutivement, réduire l'excrétion fécale des souches vaccinales. Toutefois les organismes génétiquement modifiés sont très mal acceptés par les opinions publiques et les recherches dans ces domaines en sont d'autant freinées.

Un autre facteur défavorisant pour ce type de vaccin est le temps nécessaire pour leur développement industriel qui peut être supérieur à la période de prépondérance d'un sérovar (entre son émergence et son déclin)

##### **III.C.2.1.Importance de la voie d'administration**

Les différentes voies d'inoculation étudiées montrent des résultats variables pour un même sérovar.

L'inoculation orale conduit à un fort taux d'excrétion fécale des salmonelles.

La voie intraveineuse produit un fort taux d'anticorps.

La contamination par aérosol est une voie intermédiaire pour l'excrétion fécale et la production d'anticorps (voir Tableau 30).

Tableau 30 : Efficacité des voies d'administration selon GAST *et al.* (57)

Voie d'inoculation	Excrétion fécale p. cent	Séropositivité	Jaunes contaminés	Albumens contaminés	Nombre moyen de CFU/ml de jaune
orale	81.3	65.4	7.2	2.4	3.32
aérosol	56.7	50	4.1	1	0.97
intraveineuse	30	100	6.3	0	34.81

L'inoculation d'*Enteritidis* par la voie conjonctivale aboutit à l'infection systémique, la colonisation du tractus génital, à l'élimination fécale, ainsi qu'à un fort taux d'œufs contaminés. (76)

Les voies vaginale ou cloacale donnent un fort taux d'œufs contaminés, mais moins que la voie intraveineuse. (107)

### III.C.2.2. Souches vaccinales atténuées

Plusieurs pistes ont été utilisées pour le développement de vaccins vivants, incluant les :

- Souches à mutations indéfinies : souches thermosensibles par exemple (multiplication à température inférieure à 37°C permettant d'obtenir ces souches incapables de se multiplier à une température corporelle normale), souches obtenues après passages répétés sur hétérophile (macrophage polynucléaire neutrophile) de poulet (88).

- Souches à mutations définies touchant par exemple :

La biosynthèse des vitamines aromatiques et des acides aminés : souches *aroA*

La biosynthèse et le transport de la glutamine

Le métabolisme des sources de carbones : souches *cya-cr*

La synthèse des protéines et notamment la production des adhésines : souches *Dam*

L'expression des gènes de virulence plasmidique : souches *rpoS*

La régulation transcriptionnelle : souches *cya*, *crp*, *ompR*, *phoP*, etc.

L'enroulement de l'ADN

La résistance à l'environnement intracellulaire etc.

Mutations sur l'îlot de pathogénicité 1 (*SPI-1*)

Les mutations antigéniques qui permettent d'obtenir des souches vaccinales, touchent les systèmes enzymatiques essentiels pour le métabolisme bactérien, et par suite, le dysfonctionnement métabolique conduit à des temps de génération prolongés et donc à la réduction correspondante de la virulence.

#### ▪ Souches à mutations indéfinies

En 2000, CERQUETTI et GHERARDI (26) ont testé l'immunisation de poussins avec une souche vaccinale mutante thermosensible de *Salmonella* Enteritidis.1/3 par voie orale à 1, 2, 3, et 7 jours et contamination orale par *Salmonelles* de différents sérovars à 7 et 14 jours après l'immunisation. La souche vaccinale est éliminée pendant au moins deux semaines après la dernière inoculation et la colonisation des organes internes est limitée. Après contamination par des souches virulentes, ces oiseaux immunisés ont montré une diminution de l'invasion viscérale (rate, foie) et intestinale (caecum) et l'excrétion fécale s'en est trouvé diminuée. Cette immunisation a également réduit la colonisation par une souche hétérologue virulente de Typhimurium.

En 2001 FEBERWEE *et al.* (50) ont testé une souche vivante atténuée de *Salmonella* Gallinarum 9R (NOBILIS SG9R), en 2 injections sous-cutané à 6 semaines et à 14-18 semaines d'âge comme protection contre *Salmonella* sur 80 troupeaux de poules pondeuses en production et 66 parquets en élevage (2 278 725 animaux vaccinés). Il a conclu à une réduction des infections par *Salmonella* dans les troupeaux vaccinés. De plus il n'y a pas d'interférence avec les tests de dépistage officiels réalisés par sérologie. Tests bactériologiques à 4 semaines (diassalm) et sérologies à 10, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, et

72 semaines. Dans tous les cas, l'effet de la vaccination est maximal quand l'hygiène et la gestion de l'élevage sont optimales.

En général, ces souches vaccinales ne sont pas utilisables pour les poussins d'un jour, car elles ne sont pas capables d'induire le phénomène de colonisation inhibition, inhibant la colonisation par des salmonelles de surinfection

BARBEZANGE *et al.* (13) l'ont démontré pour deux vaccins commerciaux à mutation indéfinie (Zoosaloral® mutant auxotrophique pour l'histidine et l'adénine et VacT® mutant auxotrophique pour l'histidine et la purine) en utilisant pourtant des souches de challenge isogéniques.

- **Souches aroA**

La mutation du gène aroA entraîne l'incapacité de synthétiser certaines vitamines et certains acides aminés aromatiques essentiels. La croissance bactérienne nécessite alors des milieux supplémentés avec ces vitamines et ces acides aminés. Les souches vaccinales présentant cette mutation sont beaucoup moins virulentes que les souches sauvages.

Les souches aroA colonisent efficacement les organes internes (rate > foie) induisant séroconversion et immunité cellulaire.

En 1991, ALDERTON *et al.* (2) ont utilisé une souche aroA de *Salmonella* Typhimurium, pour vacciner des poulets par la voie orale ou la voie sous-cutanée. Il les a ensuite contaminés expérimentalement avec une souche de challenge virulente. Il a été constaté une réaction sérologique, une diminution de l'excrétion fécale des bactéries de challenge et l'absence de pouvoir pathogène résiduel (gain de poids par rapport à un lot témoin).

Des souches aroA de *Salmonella* Gallinarum ont également été testées et utilisées à grande échelle dans le programme de contrôle néerlandais. Ce sérotype ne possédant pas de flagelle, un dépistage sérologique basé sur les Ac anti-flagelle permet de faire la différence entre les troupeaux vaccinés et les troupeaux infectés : les animaux positifs correspondent alors à des animaux infectés naturellement par des souches sauvages (49).

PARKER *et al.* (120), en 2001, ont étudié un vaccin mutant aroA de *Salmonella* Typhimurium, développé pour diminuer la contamination interne des œufs par *Salmonella*. Les résultats obtenus n'ont pas été significatifs : il a utilisé pour les inoculations d'épreuve des souches de *Salmonella* Enteritidis dont les caractéristiques d'invasivité et de contamination des œufs sont connues au préalable. Les résultats pour les oiseaux vaccinés ont été les suivants :

- contamination des ovaires et oviductes : moins de positifs mais non significatifs
- UFC/ g de contenu caecal : plus bas mais non significatif
- contamination des duodénum, jéjunum, et iléon : équivalent
- contamination des rate, reins et foie : équivalent
- diminution de la contamination des œufs : non significatif

En 2002, VAN IMMERSEEL *et al.* (150) ont testé ce type de souche sur des poussins et ont constaté non seulement les mêmes effets positifs sur l'immunité adaptative, mais aussi un potentiel inhibiteur très précoce bien que partiel sur les souches virulentes de challenge.

- **Souches cya-crp**

La délétion des gènes codant pour l'adénylate-cyclase (cya)(enzyme membranaire catalysant la formation de l'AMP cyclique et du pyrophosphate à partir de l'ATP) et pour la protéine récepteur de l'AMPc (crp) entrave plusieurs voies métaboliques (glycolyse, lipolyse,...) notamment par l'impossibilité de la phosphorylation des enzymes de ces voies. Les souches délétées pour ces gènes sont donc atténuées.

La souche X3985 utilisée par exemple dans le vaccin Foodsafe 1® (Megan Animal Health), disponible aux Etats-Unis, est un mutant cya-crp de *Salmonella* Typhimurium.

La vaccination avec des souches mutantes de *Salmonella* Typhimurium  $\Delta$ cya  $\Delta$ crp confère une protection contre l'invasion intestinale et viscérale vis-à-vis des sérovars homologues et hétérologues. De plus la protection est efficace pendant 11 mois après la vaccination et cela sans aucun effet sur la production d'œufs (66).

En 2003 HOLT *et al.* (71) ont montré une protection croisée pour *Salmonella* avec un vaccin commercial vivant atténué (Megan Vac 1 ®) à *Salmonella* Typhimurium sur des poules pondeuses en mue. La vaccination a réduit la transmission horizontale et les poules vaccinées éliminent significativement moins de *Salmonella* dans le milieu extérieur. De même, la présence des salmonelles dans les organes (ovaires, foie, rate, caecums) est bien moindre chez les poules vaccinées contre *Salmonella* Typhimurium.

- **Souches Dam-**

DUEGER *et al.* (43) en 2001 ont expérimenté la vaccination orale avec une souche mutante de *Salmonella* Typhimurium adénine méthyl-transférase – (Dam-) sur des poussins d'un jour. L'adénine méthyl-transférase est une enzyme intervenant dans la virulence des salmonelles, notamment en tant que régulateur global de l'expression de nombreux gènes (méthylation de l'ADN). Elle est tout particulièrement impliquée dans la production d'adhésines. La virulence fortement atténuée de ces souches en fait de bons candidats vaccinaux pour les poules, d'autant plus que la protection induite est une protection croisée avec d'autres sérovars homologues et hétérologues, notamment Enteritidis. La protection contre les contaminations a été de 5 semaines dans cette étude expérimentale. L'altération de la fonction de l'adénine méthyl-transférase est en fait une piste intéressante en terme de pathogénie bactérienne pour beaucoup d'espèces pathogènes (*Yersinia*, *Vibrio*, *Brucella*, *Escherichia*, etc.).

- **Souches à délétion sur les gènes phoP-phoQ**

Une délétion de ces gènes induit une atténuation de l'infection systémique par ses effets sur l'expression des gènes du locus SPI2. Ces gènes interviennent dans la régulation de l'expression des gènes de virulence de l'îlot de pathogénicité 2 et semblent impliqués dans la résistance des salmonelles à la bile, aux acides, aux défensines (les granulocytes neutrophiles possèdent un mélange de protéines ayant les caractéristiques des antibiotiques appelées les défensines). Ces souches ont une virulence atténuée pour les souris mais aussi pour les volailles. Ce type de délétion entraîne une nette atténuation sans handicaper la colonisation et le phénomène d'inhibition chez le poussin (103).

- **Souches rpoS**

Le gène rpoS code pour un facteur sigma, qui est un régulateur clé pour la survie bactérienne en phase stationnaire de croissance et la résistance généralisée au stress. La survie de ces mutants hors de leur hôte, dans des conditions où l'accès aux nutriments est beaucoup plus difficile, est très diminuée. Ce peut être considéré comme un effet additionnel intéressant lorsque les mutants sont excrétés dans l'environnement. Le gène rpoS joue un rôle majeur dans la virulence de *Salmonella* dans le modèle murin. Deux éléments contribuent à l'avirulence d'un mutant rpoS de *S. Typhimurium*. Premièrement, une diminution de l'expression des gènes de virulence plasmidiques est responsable en grande partie, de l'incapacité d'un mutant rpoS à se multiplier efficacement dans la rate et le foie des animaux infectés. Deuxièmement, rpoS contrôle l'expression de gènes chromosomiques, non encore identifiés, impliqués dans la colonisation des plaques de Peyer et dans la persistance de *Salmonella* dans la rate. Par ailleurs, une mutation rpoS renforce l'atténuation des souches vaccinales aroA de *S. Typhimurium* chez la souris. Les mutants rpoS aroA conservent néanmoins un potentiel vaccinal important chez la souris vaccinée par voie orale ou intra péritonéale. Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'une mutation rpoS dans la conception d'un vaccin *Salmonella* vivant, à usage vétérinaire, mérite d'être envisagée (114). Chez les volailles, ces souches sont virulentes, même avec une

délétion supplémentaire sur le gène ompC. L'association avec la délétion sur le gène phoP a été également testée pour son intérêt environnemental (103).

- **Souches ompC**

Le gène ompC code pour une protéine de la membrane externe, appelée porine. Cette protéine joue un rôle dans la reconnaissance des salmonelles par les macrophages aboutissant à leur phagocytose. Une délétion de ompC peut servir de marqueur sérologique par défaut (par absence d'Ac anti-porine) pour identifier les élevages vaccinés, même si elle diminue un peu la capacité de colonisation inhibition (103).

### **III.C.2.3.Limites actuelles**

Les vaccins vivants composés de souches atténuées représentent le système vaccinal le plus simple. A la fois par leur composition (tous les antigènes majeurs et mineurs sont présents) et par leur multiplication chez l'hôte, ils sont les plus susceptibles d'induire une réponse proche de celle de l'infection naturelle. Ils sont en particuliers, capables d'induire simultanément les deux types de réponses, cellulaire cytotoxique et humorale systémique. Ceci doit néanmoins être relativisé :

- L'atténuation peut conduire à une souche ayant un très faible pouvoir de réplication chez l'hôte. Si cette caractéristique est intéressante en terme de sécurité, elle est néfaste pour la réponse immune. La persistance dans l'organisme doit être suffisamment longue pour permettre à l'immunité de s'installer. Le temps nécessaire varie d'une souche à l'autre.
- Le vaccin atténué doit être administré par la voie normale de l'infection, généralement muqueuse. En effet, le choix d'une autre voie peut compromettre l'induction d'une immunité muqueuse solide, sauf si la souche présente un pouvoir invasif élevé, ce qui, à priori, n'est pas souhaitable. Et en ce qui concerne les salmonelles, elles possèdent un potentiel démontré pour une administration oronasale avec une induction immunitaire muqueuse forte. (46)
- Il est très difficile de démontrer la stabilité génétique des atténuations non définies, correspondant à la majorité des vaccins sur le marché actuellement. Seule l'utilisation à grande échelle sur le terrain permet à terme d'affirmer la sûreté de telles souches.
- Les différentes délétions de gènes peuvent conduire au même degré d'atténuation. Pourtant leurs effets sur le déroulement de l'infection peuvent varier, conduisant à des réponses immunes très différentes, notamment au niveau du répertoire des cytokines pro inflammatoires mobilisées. En conséquence, les différentes mutations (délétions) portant sur les différents facteurs de virulence permettraient de moduler spécifiquement les réponses immunes en fonction des résultats recherchés (131).

Comparés à des essais de vaccination avec des salmonelles sauvages, un certain nombre de vaccins vivants ont révélé un niveau de protection élevé, mais toujours inférieur à celui conféré par la souche sauvage :

- Les animaux vaccinés avec une souche homologue montrent non seulement une réduction de l'invasion systémique, mais aussi une diminution nette de la colonisation intestinale.
- Certaines souches (Typhimurium) (66) confèrent une protection croisée avec des souches hétérologues pendant 11 mois.

L'avantage des vaccins vivants par rapport aux vaccins tués est la nette diminution de l'excrétion fécale des bactéries de challenge ainsi qu'une élimination importante (clairance) des salmonelles. Au regard des résultats obtenus avec des vaccins vivants, il semble que les réactions immunitaires cellulaires au niveau de la rate soient significativement plus faibles pour les vaccins inactivés : BABU *et al.* (8) parlent même d'immunosuppression dans le cas des vaccins tués

En plus de l'induction d'une réaction immunitaire forte, l'administration par voie orale de bactéries vivantes à de jeunes oiseaux entraîne une colonisation intestinale étendue qui confère des effets protecteurs additionnels. Il s'agit du phénomène de colonisation inhibition, semblable à l'effet d'exclusion compétitive produit par des préparations de flores de barrière.

Pourtant, il semble que les souches atténuées disponibles actuellement ne possèdent pas toutes ce potentiel. Malgré ce défaut, la présence dans l'intestin d'un grand nombre de salmonelles vivantes vaccinales induit l'infiltration de la muqueuse et la sous-muqueuse par des granulocytes, ce qui confère une certaine résistance à l'invasion systémique par des salmonelles virulentes par le biais du système de défense inné non spécifique (119).

Les récents progrès dans la connaissance du génome des salmonelles ainsi que les méthodes de recombinaison génétique débouchant sur l'introduction des mutations définies et irréversibles ont permis le développement de souches dépourvues d'effets secondaires. Néanmoins la grande majorité des études n'a été menée que sur des rongeurs de laboratoire. Des recherches complémentaires doivent donc être conduites sur les autres espèces animales (96).

Les vaccins vivants atténués par mutagenèse dirigée sont bien souvent caractérisés par un marqueur d'enveloppe, correspondant à au moins un gène muté pour la résistance antibiotique, ce qui n'est pas souhaitable.

Les souches vaccinales développées empiriquement et utilisées actuellement possèdent aussi en général un marqueur de résistance, notamment à la rifampicine, indésirable. Ce facteur (intégron) peut facilement être transféré par un mécanisme de transduction par des bactériophages.

L'absence de caractérisation moléculaire des mutations obtenues de manière aveugle constitue une difficulté pour la procédure d'autorisation (119).

Enfin, il semble que dans le cas de l'utilisation de souches atténuées de salmonelles, et après leur élimination complète, il subsiste une protection croisée contre d'autres sérotypes (162).

### **III.C.3. Etudes comparatives vaccins vivants/vaccins inertes**

Le panel scientifique de l'AESA observe que le schéma de vaccination contre les salmonelles de quelques pays utilise une combinaison de vaccins vivant et inactivé. Le vaccin vivant est administré oralement par l'intermédiaire de l'eau potable aux poussins très jeunes, pendant la période d'élevage, suivi de l'injection parentérale du vaccin inactivé avant le commencement et pendant la période de ponte.

En 1994, NASSAR *et al.* (112) ont démontré l'intérêt d'un schéma vaccinal combinant successivement un vaccin vivant et un vaccin tué. Les différentes stratégies vaccinales n'ont par contre pas montré d'influence significative sur l'excrétion des germes pathogènes au niveau cloacal ou des œufs eux-mêmes ainsi que sur les taux d'anticorps sériques.

En 2003 BABU (7) a comparé les résultats obtenus avec des vaccins vivants ou des vaccins tués sur les cellules de l'immunité sur des poulets âgés de 18 à 32 semaines (prolifération des lymphocytes spléniques, expression de l'interleukine 2, étude des sous populations cellulaires). Il a montré que les vaccins vivants étaient plus efficaces pour stimuler la réaction immunitaire à médiation cellulaire, avec une multiplication plus importante et sur une plus longue période des lymphocytes T. BERNDT et METHNER (19) en 2001 étaient arrivés aux mêmes conclusions en comparant l'évolution des sous populations leucocytaires avec des souches atténuées ou non atténuées.

Toutefois, il ressort d'une étude menée sur différents types de vaccins contre les fièvres typhoïdes humaines que les vaccins tués sont plus efficaces que les vaccins atténués et

certain auteurs recommandent la prudence quant à la supériorité supposée des vaccins vivants (154) (46).

#### **III.C.4. Différents sérovars et la protection croisée**

Les vaccins monovalents présents sur le marché, n'assurent pas de protection croisée contre plusieurs sous espèces, et ne visent que les souches Enteritidis ou Typhimurium les plus fréquemment isolées.

L'utilisation de la vaccination comme unique moyen de contrôle des salmonelles pourrait donc être problématique si elle devait induire l'émergence d'autres sérovars.

En effet, l'obtention de quantités suffisantes d'antigènes immunogènes dans des conditions économiquement acceptables peut limiter ou rendre impossible le développement de nouveaux vaccins. L'utilisation simultanée de deux vaccins différents paraît difficilement envisageable pour les mêmes raisons.

Les souches atténuées de *Salmonella Gallinarum* (9R) protègent contre l'infection systémique et intestinale de Enteritidis (12).

En 1997, HASSAN et CURTISS (66) ont testé une souche vivante avirulente delta cya delta crp de *Salmonella* Typhimurium chi 3985, démontrant une protection croisée de longue durée de plus de 11 mois après la vaccination orale, pour les deux sérovars impliqués dans les problèmes de santé publique.

En 2001, PARKER *et al.* (120) ont obtenu les mêmes résultats avec une souche vaccinale vivante de *Salmonella* sérovar Typhimurium aroA.

En 2001, DUEGER *et al.* (43) l'ont montré pour des vaccins atténués à base de souches de salmonelles Dam (DNA adénine méthylase -).

Il semble que dans le cas de l'utilisation de souches atténuées de salmonelles, et après leur élimination complète, il subsiste une protection croisée contre d'autres sérotypes (162).

Des essais portant sur un vaccin bivalent vivant à *Salmonella* Typhimurium aroA et à *Salmonella* Enteritidis aroA suggèrent que les deux souches vaccinales interfèrent l'une avec l'autre, réduisant l'efficacité comparée à celle des deux vaccins monovalents. Il en résulte que seule la connaissance des facteurs de virulence communs aux sérotypes aviaires pourrait permettre le développement de vaccins multivalents pour les salmonelles (154).

#### **III.C.5. Durée de la protection**

Peu d'études font état de la durée de la protection. En pratique, cette protection doit couvrir la période de production d'une poule pondeuse, c'est-à-dire environ 55 à 60 semaines.

L'injection d'une souche avirulente X3985 de *Salmonella* Typhimurium à des poules induit un transfert des anticorps à l'œuf pendant les 30 premières semaines de production (65). La protection des poules s'étend sur 11 mois (66).

#### **III.D. Usage de la vaccination**

##### **III.D.1. Enjeux**

Les principaux enjeux de la vaccination des poules pondeuses sont :

- la santé publique
- la santé et le bien-être des animaux
- le dépistage bactériologique
- le dépistage sérologique
- les autres moyens complémentaires (exclusion compétitive, prébiotiques, probiotiques)

- les bonnes pratiques d'élevage et d'hygiène  
(Voir Tableau 32)

Le vaccin idéal doit être inoffensif pour les volailles, les autres espèces (l'Homme notamment) et l'environnement. Il doit bien sûr être efficace et permettre non seulement de réduire l'excrétion des souches sauvages, mais aussi permettre une stérilisation rapide de l'hôte (c'est-à-dire supprimer le portage inapparent).

### **III.D.1.1.Interférences**

Les vaccins doivent être compatibles avec le système de dépistage réglementaire en vigueur.

La vaccination doit également être compatible avec les autres mesures de contrôle, et notamment l'utilisation des flores de barrière, c'est-à-dire avec le mécanisme d'exclusion compétitive.

Enfin dernier point non négligeable, la surveillance des antibiorésistances peut être entravée par les marqueurs des souches vaccinales.

#### **III.D.1.1.1.Avec le diagnostic bactériologique**

La vaccination peut interférer avec le diagnostic bactériologique : en effet, elle limite la multiplication intestinale sans pour autant supprimer complètement le portage et de ce fait, entraîne le maintien de troupeaux apparemment négatifs qui se révéleraient être des sources de recontamination. Dans un cheptel vacciné, le dépistage bactériologique (sur culture) est donc plus difficile car les salmonelles sont éliminées en petit nombre et de manière intermittente dans les fèces. Toutefois, l'excrétion fécale peut augmenter pendant les périodes de restriction alimentaire (induction de la mue), de forte chaleur, ou sous l'influence d'autres stress (119).

Pour la surveillance des bandes vaccinées, cette diminution de l'excrétion devrait être prise en compte par une augmentation du nombre d'échantillons afin d'obtenir un niveau de détection approprié.

Les souches vaccinales excrétées dans l'environnement peuvent masquer la détection de souches sauvages dans leur période d'excrétion suivant l'inoculation. Elles doivent donc être différenciables des souches sauvages : leur reconnaissance est basée sur les marqueurs épidémiologiques : auxotrophie (biotype), résistance à certains antibiotiques (antibiotype), structure défectueuse du LPS (sérotipe). Une période d'attente pourrait également être envisagée après l'administration du vaccin vivant.

De nouvelles méthodes, telle que la PCR (polymerase chain reaction = amplification en chaîne par polymérase) pourraient dans le futur être utilisées pour distinguer facilement les souches vaccinales.

Les vaccins inertes, quant à eux, n'interfèrent pas avec les méthodes culturales de détection des salmonelles.

#### **III.D.1.1.2.Avec le diagnostic sérologique**

L'administration de vaccins vivants ou inertes peut interférer avec le diagnostic sérologique. La présence d'anticorps dus à la vaccination peut rendre plus difficile un diagnostic sérologique ultérieur, si ces anticorps ne sont pas différents de ceux produits lors d'une infection naturelle en cours. Il est donc souhaitable d'inclure des marqueurs vaccinaux à l'origine d'une réponse sérologique spécifique et facilement différenciable des anticorps produits lors d'une infection. En ce qui concerne les vaccins délévés, la solution est plus simple puisque la mise en évidence d'anticorps dirigés contre la protéine absente chez la souche vaccinale indique qu'il y a eu infection naturelle.

La plupart des vaccins inertes administrés par la voie parentérale induisent effectivement la production d'anticorps circulants (IgG) qui interfèrent avec les méthodes sérologiques utilisées, mais en quantité moindre. Il n'existe pas pour l'instant de méthode qui permette de faire la différence entre les anticorps induits par une infection ou par les vaccins inactivés. Mais en définissant un seuil de positivité, il serait possible de différencier les troupeaux vaccinés : une telle méthode n'est pas commercialisée pour l'instant.

En cas de vaccination d'un troupeau, l'obtention d'un résultat sérologique positif est problématique. Doit-on l'interpréter comme une infection ?

Cela est particulièrement important pour la réaction d'agglutination sur plaque qui détecte sans les différencier les anticorps anti-Gallinarum/Pullorum que les anticorps anti-Enteritidis.

#### **III.D.1.1.3. Avec les autres méthodes de contrôle**

Il peut y avoir des problèmes de compatibilité avec les traitements antibiotiques, les flores d'exclusion compétitive, et les additifs alimentaires.

Pour les vaccins inertes, aucune interaction avec les antibiotiques n'est à redouter. Par contre, les antibiotiques peuvent affecter la viabilité des souches vaccinales et donc en diminuer l'efficacité.

L'utilisation des flores compétitives n'entraîne pas de conséquence pour les vaccins inactivés. En cas d'utilisation d'un vaccin vivant, celui-ci doit être administré soit avant, soit simultanément à la flore. En effet la flore distribuée avant la souche vaccinale, occupe le terrain et empêche la colonisation par la souche vaccinale.

Les additifs alimentaires tels que les prébiotiques, probiotiques et acide gras, qui agissent en bloquant l'adhésion ou directement sur les salmonelles peuvent avoir un effet néfaste sur les souches vaccinales vivantes.

#### **III.D.1.1.4. Avec les résistances aux antimicrobiens**

Les marqueurs vaccinaux sont des gènes qui servent en principe à identifier, différencier ou pister les souches vaccinales. Toutefois l'utilisation de gènes de résistance aux antibiotiques (résistance à la rifampicine par exemple, antibiotique réservé à l'usage humain) peut présenter un risque pour la santé humaine compte tenu de l'augmentation des antibiorésistances et des difficultés de la mise au point de nouvelles molécules.

#### **III.D.1.2. Santé publique**

La vaccination ne permet pas de prévenir à coup sûr l'infection de l'homme par des œufs contaminés, car elle ne supprime pas le portage inapparent des bactéries.

Toutefois la mise en place du programme de contrôle en 1998 visant à diminuer la prévalence des salmonelles en élevage de poules pondeuses a vu la diminution significative des cas de salmonellose humaine en France.

Aspect non négligeable dans le cas des salmonelles, la vaccination apparaît comme une alternative de choix à l'emploi des antibiotiques (6). Toutefois, il est à noter que les marqueurs de résistance aux antimicrobiens des vaccins interfèrent avec la surveillance des antibiorésistances « naturelles » et suscitent quelques inquiétudes.

Les études sur la sécurité des vaccins et les risques pouvant se présenter avec l'utilisation de produits immunologiques vétérinaires, font obligatoirement partie de la procédure d'autorisation, incluant l'étude de la dissémination du produit dans l'environnement.

Le programme de vaccination doit garantir que les oeufs ne contiennent ni souche vaccinale vivante, ni résidu de vaccin inerte. Un temps d'attente approprié doit donc être déterminé.

Pour cette raison, l'usage des vaccins vivants est limité à la période d'élevage et l'utilisation préférentielle de vaccins inertes est recommandée dans la filière œufs de consommation.

Dans une étude de terrain réalisée sur 80 troupeaux commerciaux en 2000, par FEBERWEE *et al* (49) sur le vaccin vivant atténué à base de *Salmonella* Gallinarum 9R (Nobilis SG 9R Intervet) utilisé dans le programme de contrôle des Pays-Bas, aucune contamination des œufs par la souche vaccinale n'a pu être mise en évidence.

Certaines souches vivantes à mutation indéfinie sont en théorie susceptibles de muter et retrouver leur caractère pathogène.

Depuis 1994, en Allemagne, la vaccination obligatoire des poules pondeuses pendant la période d'élevage, avec des vaccins vivants (Zoosaloral, TAD Salmonella vacT, TAD Salmonella vacE, Salmovac SE), n'a jamais permis de mettre en évidence ni réversion de la virulence, ni présence de salmonelles vivantes sur les œufs. De plus, depuis la mise en place en 2000, d'un système de surveillance des souches isolées chez l'Homme (lysotypage et marqueurs vaccinaux), aucune souche vaccinale n'a jamais été mise en cause dans les infections humaines. (128)

La question se pose de savoir si l'éradication d'un sérovar ne fera pas la niche d'autres sérovars. Il est en effet plus que probable que l'élimination des sérovars Gallinarum et Pullorum dans nos pays industrialisés ait laissé le terrain libre pour des sérovars tel que Enteritidis. Les vaccins disponibles actuellement ciblent les deux sérovars les plus fréquemment isolés en Europe, appartenant aux sérogroupe B (Typhimurium) et D (Enteritidis). Ces vaccins offrent sans doute une protection croisée pour d'autres sérotypes des mêmes sérogroupe, mais beaucoup d'autres sérovars peuvent être présents et avoir le champ libre (119).

Le développement de la résistance des souches de salmonelles serait lié à la pression de sélection exercée non seulement par les traitements antibiotiques mais aussi par la vaccination (en sélectionnant ainsi des souches capables d'éviter la protection induite par la vaccination) dans les élevages avicoles (152). La pression de sélection exercée sur la population par la vaccination peut faire émerger des souches qui évitent les défenses immunologiques induites par l'acte vaccinal. Les Entérobactéries disposent en effet d'un arsenal varié de mécanismes génétiques de « maquillage » : autoréplication des plasmides, prophages (bactériophage tempéré intégré ou non au chromosome bactérien), transposons (gènes sauteurs, ne nécessitant pas de zone d'homologie), intégrons (gènes de résistances aux antibiotiques associés à des séquences génétiques facilitant la recombinaison), îlots de pathogénicité (bloc génétique d'origine inconnue, impliqués dans la pathogénicité, notamment pour *Salmonella* Typhimurium, SP1, SP2 ),etc. (119)

Un avantage théorique avait été avancé selon lequel les anticorps maternels de la poule pondeuse passant dans l'œuf, pourraient entraver le développement des salmonelles dans celui-ci. Toutefois une étude réalisée en 1999 par TAKASE *et al.* (142), suggère que les anticorps contenus dans le jaune d'œuf n'ont pas d'influence sur le taux de croissance des germes dans ce jaune, même pour des œufs de poules fortement immunisées.

### **III.D.1.3.Santé et bien-être animal**

L'amélioration de la santé et du bien-être des poules n'est pas un objectif majeur en ce qui concerne la vaccination contre les salmonelles non typhiques. Pour les jeunes animaux, la vaccination représente toutefois un outil intéressant, notamment si un effet inhibiteur peut être obtenu.

*A contrario*, la vaccination ne doit pas détériorer ni la santé ni le bien-être. Réglementairement, les études relatives à la sécurité doivent être réalisées sur les espèces et les classes d'âge cibles, les voies et les doses recommandées, mais aussi sur les conséquences des surdosages, des administrations répétées. Les performances de la reproduction et des fonctions immunologiques doivent également être examinées.

Le risque théorique de transfert de facteurs virulents de salmonelles sauvages à des souches vaccinales produites par délétion de gènes, en principe irréversible, ne peut aboutir qu'à une souche encore atténuée (de par la délétion initiale). Cette nouvelle souche ne serait probablement pas plus virulente que la salmonelle atténuée première (119).

Malgré les études réalisées sur le niveau d'excrétion fécale et d'invasion systémique des oiseaux vaccinés, les informations sur le niveau de protection et sa durée sont encore insuffisantes.

En élevage de poules pondeuses, la vaccination contre *Salmonella* Enteritidis doit être raisonnée avec le vétérinaire sanitaire de l'élevage et mis en œuvre dans un environnement le plus sain possible. En effet, le coût total de la vaccination et de l'intervention (environ 0.23€ par volaille) reste élevé par rapport aux marges de la plupart des producteurs d'œufs de consommation.

Elle n'a d'intérêt qu'en respectant les recommandations d'utilisation des fabricants et les bonnes pratiques sanitaires.

Elle doit couvrir la période de production de la poule.

Idéalement, le vaccin devrait être administrable par voie orale dans l'eau de boisson car la manipulation des oiseaux est source de stress et la voie parentérale peut être source de douleur.

### **III.D.1.4. Environnement**

Se pose la question de la dispersion de souches vaccinales dans l'environnement.

L'hypothèse d'une transmission des souches vaccinales à d'autres espèces animales domestiques ou sauvages proches des élevages vaccinés ne peut pas être exclue complètement. Pour autant, le risque peut être considérablement réduit par la mise en œuvre des bonnes pratiques d'hygiène et d'élevage. De plus, la souche vaccinale ne colonise les oiseaux que pendant un délai très court, même lorsqu'elle est donnée à forte dose : on pense donc qu'une contamination accidentelle (à faible dose) ne devrait pas conduire à une colonisation sur le long terme d'autres espèces non cibles.

Dans les études conduites sur le long terme, il n'a jamais été observé de développement de souches vaccinales autorisées sur des espèces non cibles (119).

En ce qui concerne les vaccins inertes, le risque biologique est nul, mais pour autant, aucun résidu ne doit contaminer l'environnement.

En 2001, FEBERWEE *et al.* (50) ont étudié le risque d'extension à des troupeaux non vaccinés d'une souche vaccinale vivante atténuée de *Salmonella* Gallinarum 9R utilisée au Pays-Bas (Nobilis SG 9R Intervet) pour le contrôle de *Salmonella* dans les troupeaux de ponte commerciaux. L'extension de la souche vaccinale vivante par excrétion fécale des troupeaux vaccinés aux troupeaux non vaccinés n'a pas pu être mise en évidence.

En 2000, BARBEZANGE *et al.* (13) ont étudié trois vaccins commerciaux vivants (vacT, Zoosaloral et X3985) du point de vue de leur persistance chez l'oiseau, mais aussi à l'intérieur d'un troupeau et dans l'environnement. Un seul de ces vaccins (VacT) est éliminé rapidement, en moins de 5 semaines, non seulement de l'organisme mais aussi de l'environnement. En tout, 10 semaines sont nécessaires pour l'élimination complète des deux autres souches vaccinales.

### **III.D.2. Autorisation des vaccins**

#### **III.D.2.1. Procédures**

Les vaccins anti-salmonelles actuellement autorisés dans les Etats membres ont été autorisés sur la base d'une procédure d'autorisation nationale ou d'une procédure de reconnaissance mutuelle entre les états membres. Dans d'autres pays du monde, ils sont autorisés sur la base de procédures nationales.

A l'échelle européenne, la directive CE 2001/82 du Parlement européen, et du Conseil de 6 novembre 2001 sur le Code de la Communauté concernant les produits pharmaceutiques vétérinaires s'applique.

Trois procédures d'enregistrement des médicaments co-existent dans l'Union Européenne :

- La procédure nationale qui permet d'obtenir une autorisation de mise sur le marché (AMM) valable pour un seul Etat Membre.

- La procédure de reconnaissance mutuelle qui permet d'obtenir des AMM identiques dans plusieurs Etats Membres à partir d'une première AMM obtenue dans un Etat Membre (qui devient Etat Membre de Référence). Les vaccins vivants antisalmonelles qui ont été produits par mutagénèse chimique (mutants auxotrophes) ou mutation métabolique de dérive, ont été autorisés dans un certain nombre d'Etats membres sur la base de cette procédure de reconnaissance mutuelle.
- La procédure centralisée qui permet d'obtenir une seule AMM valable dans tous les Etats Membres de l'Union Européenne. Elle est obligatoire pour les médicaments biotechnologiques et optionnelle pour les médicaments innovants. Les vaccins à base de souches bactériennes développées au moyen de technologie de recombinaison de l'ADN, délétion ou insertion, sont concernés par cette procédure.

La constitution d'un dossier de demande d'AMM représente la première étape vers l'enregistrement du médicament. Ce dossier rassemble l'ensemble des données expérimentales et analytiques prouvant la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament proposé.

Le dossier de demande d'AMM se compose de quatre parties :

- La partie I, " résumé du dossier ", comprend les renseignements administratifs, le résumé des caractéristiques du produit, l'étiquetage et les rapports d'experts.
- La partie II, " qualité pharmaceutique ", fournit les informations sur la composition, la méthode de préparation, le contrôle des matières premières, le contrôle des produits intermédiaires, le contrôle du produit fini et la stabilité.
- La partie III, " sécurité ", rassemble les données toxicologiques et présente la pharmacocinétique des résidus et leurs méthodes d'analyse.
- La partie IV, " efficacité ", expose les essais pré cliniques (pharmacodynamie, pharmacocinétique, tolérance, résistance) réalisés en laboratoire, et cliniques, réalisés le cas échéant en station expérimentale, puis sur le terrain.

Les expérimentations doivent être conduites en conformité avec des codes de bonnes pratiques

La seconde étape est l'évaluation du dossier qui est déposé auprès de l'ANMV (agence nationale du médicament vétérinaire). Le dossier est soumis à l'expertise scientifique des différents spécialistes de l'Agence. Les dossiers de médicaments immunologiques sont également visés par les laboratoires de l'AFSSA.

A l'issue de l'évaluation, un rapport d'évaluation conjoint est présenté à la Commission par un rapporteur de l'ANMV. La Commission rend alors un avis : octroi de l'AMM, projet de refus ou liste de questions (demande d'informations complémentaires). Dans ce dernier cas, le demandeur doit fournir des réponses à l'ANMV, qui procédera à leur évaluation. Un nouveau passage en Commission d'AMM sera nécessaire.

L'AMM précise les espèces de destination, la posologie, les indications, les contre-indications et les précautions d'emploi, le temps d'attente et les conditions de conservation du médicament, ainsi que les mentions de la notice et de l'étiquetage.

L'AMM est octroyée pour une période de cinq ans. Toute modification des données présentées dans le dossier doit être déclarée et évaluée. Elle se concrétise par une modification de l'AMM.

La procédure de reconnaissance mutuelle d'un médicament vétérinaire dans plusieurs Etats de l'Union Européenne est basée sur la reconnaissance mutuelle d'une AMM obtenue dans un premier pays de l'Union Européenne qui devient rapporteur. Le demandeur obtient d'abord une AMM nationale de la part de l'autorité compétente d'un Etat de l'Union Européenne. Le rapport d'évaluation et le dossier d'AMM sont ensuite soumis aux autorités des autres Etats, afin qu'ils reconnaissent cette autorisation initiale en 90 jours. Ils disposent d'un délai de 60 jours pour présenter d'éventuelles objections. Les 30 derniers jours sont consacrés aux discussions. Dans l'hypothèse de divergences d'appréciation scientifique entre autorités nationales, le CVMP (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use)

de l'Agence européenne du médicament rend un arbitrage qui s'impose aux états concernés (1).

La procédure centralisée ouvre d'emblée l'accès à l'ensemble du marché communautaire. Elle est obligatoire pour les médicaments issus des biotechnologies et les médicaments destinés à accroître la productivité des animaux de rente (liste A), optionnelle pour les autres médicaments novateurs destinés aux animaux de rente (liste B). La demande, déposée directement à l'Agence européenne du médicament, est traitée par le CVMP. Celui-ci doit rendre un avis dans un délai de 210 jours auprès de la Commission européenne. En cas d'avis favorable, cette dernière doit notifier et publier l'AMM dans les 90 jours.

En ce qui concerne les moyens médicaux mis en œuvre (vaccins et flores de barrière), ces procédures sont, par le biais des autorisations délivrées, une garantie de la légitimité scientifique des produits mis sur le marché.

### **III.D.2.2. Etudes préalables**

Des investigations particulièrement approfondies doivent avoir été menées pour l'évaluation de la sécurité, de l'efficacité et des risques sur les produits finaux et l'environnement.

Les expérimentations cliniques doivent avoir démontré le respect des critères d'efficacité :

- la prévention et la réduction de la colonisation intestinale
- la diminution de l'excrétion fécale
- la diminution de la contamination des coquilles
- la diminution de la colonisation des organes reproducteurs

Les vaccins vivants doivent remplir des conditions supplémentaires relatives à la sécurité et au risque biologique. Ils doivent avoir été testés pour établir :

- l'avirulence pour l'Homme et les autres espèces non cibles.
- la capacité de propagation des animaux vaccinés aux animaux non vaccinés (de la même espèce et des autres espèces
- la dissémination de la souche vaccinale dans l'organisme, ainsi que dans les sécrétions, excréments et les œufs, et dans l'environnement
- la persistance et les sites de multiplication dans l'organisme
- les possibilités de réversion des atténuations
- les capacités à transmettre les gènes d'antibiorésistance (marqueurs) à d'autres microorganismes
- les propriétés biologiques de la souche, les probabilités de recombinaison génétique avec des souches sauvages : la stabilité génétique est un aspect important de la sécurité

La persistance de la souche vaccinale peut s'étaler sur plusieurs semaines. Un temps d'attente doit donc être prévu pour éviter tout passage de résidu ou de microorganisme dans la chaîne alimentaire.

### **III.D.3. Statut de la vaccination en Europe**

#### **III.D.3.1. Vaccination dans les états membres**

Actuellement le statut vaccinal des poules pondeuses dans les différents états membres est hétérogène. La vaccination est recommandée dans certains états, interdites dans d'autres.

Au niveau européen, les poulettes peuvent être vaccinées avec les deux types de vaccins, les poules pondeuses ne peuvent être vaccinées qu'avec des vaccins inactivés (voir Tableau 31).

La baisse du nombre de cas de salmonelloses s'observe dans un grand nombre de pays européens ayant mis en place des mesures de lutte au niveau des élevages de volailles, suite à la parution de la directive européenne 92/117/CEE du Conseil Européen du 17/12/1992.

La Grande-Bretagne a mis en place la vaccination systématique de ses troupeaux de pondeuses contre *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium et a ainsi vu le nombre de cas divisé par deux depuis 1997.

Tableau 31 : Vaccination dans les états européens. Source (119)

Etat	Prévalence	Vaccination	Type de vaccin en troupeau de ponte	Type de vaccin à l'élevage
Finlande	<1p. cent	Interdite	/	/
Norvège	<1p. cent	Interdite	/	/
Suisse	<1p. cent	Interdite	/	/
Danemark	<5p. cent	Interdite	/	/
Suède	<1p. cent (157)	Interdite	/	/
Irlande	<5p. cent	Interdite	/	/
Belgique		Recommandée	Vivant	Vivant ou inactivé
Allemagne		Recommandée	Vivant ou inactivé	Vivant ou inactivé
Autriche		Autorisée	Vivant	Vivant ou inactivé
Hongrie		Autorisée	Vivant	Vivant ou inactivé
Espagne		Autorisée	Vivant ou inactivé	Vivant ou inactivé
Portugal		Autorisée	Vivant	Vivant ou inactivé
Grèce		Autorisée	Vivant ou inactivé	Inactivé
France		Autorisée	Inactivé	Inactivé
Italie		Autorisée	Vivant ou inactivé	Vivant ou inactivé
Grande-Bretagne		Autorisée	Vivant ou inactivé	Vivant ou inactivé
Irlande du Nord		Autorisée	Vivant ou inactivé	Vivant ou inactivé
Pays Bas		Autorisée	Vivant	Inactivé
Pologne		Autorisée	Vivant	Inactivé

### III.D.3.2. Vaccination en France

Un avis de l'AFSSA du 27 mars 2001 a précisé les points suivants

- Les taux de prévalence des infections à *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium sont nuls à l'étage des reproducteurs de la filière œufs de consommation (aucun cas positif au cours des années 2000, 2001 et 2002 à l'étage de la sélection, au cours de l'année 2002 à l'étage de la multiplication (87), faibles, voire très faibles, à l'étage de rente des poules pondeuses de la filière œufs de consommation.
- L'évolution de la réglementation se fait vers une prophylaxie strictement sanitaire, impliquant le dépistage bactériologique de l'infection et un usage aussi limité que possible des méthodes de prophylaxie médicale fondées sur la vaccination.
- Le risque est avéré, lors d'utilisation de souches vaccinales bactériennes vivantes atténuées, de transmission verticale de certaines souches vaccinales et de diffusion de ces souches dans l'environnement et à d'autres volailles, ainsi que de la multiplication de certaines souches vaccinales dans les œufs de consommation avec une probabilité d'atteindre des doses de salmonelles importantes au moment de la consommation.
- L'utilisation de souches vaccinales atténuées entraîne des difficultés dans l'application des mesures de prophylaxie sanitaire, notamment lors du dépistage. Il est donc préconisé d'étendre l'interdiction de la vaccination chez les volailles de reproduction de la filière ponte d'œufs de consommation et de n'autoriser la vaccination que chez les volailles de rente de la filière ponte d'œufs de consommation.
- Les vaccins doivent être des vaccins inactivés ayant une AMM et utilisés dans des conditions conformes à celles définies dans la note de service émanant des autorités compétentes.
- L'utilisation de vaccins inactivés contre *Salmonella* Enteritidis peut aussi interférer avec les programmes de surveillance de *Salmonella* Gallinarum/Pullorum si les méthodes de détection ne permettent pas de différencier la souche vaccinale des souches sauvages (69).

Dans le contexte réglementaire, zootechnique et économique français, la vaccination ne concerne que les poulettes futures pondeuses, et ne concerne que les bâtiments de ponte ayant subi un épisode infectieux, voire un échec des mesures d'assainissement avec une rechute.

La vaccination peut permettre une immunisation avant que les animaux de remplacement n'arrivent dans le site à risque : la vaccination systématique des lots de poulettes destinés à être transférés dans des bâtiments de ponte qui ont connu un épisode de salmonellose constitue une protection supplémentaire contre une bactérie très résistante dans le milieu extérieur.

En élevage de rente œufs de consommation, l'enjeu vaccinal est essentiellement de limiter voire empêcher la contamination des œufs de consommation, qu'il s'agisse d'une contamination de surface ou d'une contamination interne de l'œuf, ceci afin de préserver la santé publique.

### **III.D.3.2.1.Elevages reproducteurs**

La vaccination n'empêche pas l'excrétion fécale des salmonelles. La présence de salmonelles dans les étages supérieurs de la pyramide de production aurait des conséquences graves en terme de répercussion sur les étages de production (cf. II.A.2.1) Pour ces raisons, réglementairement en France et en Europe, la vaccination contre la salmonellose des volailles de reproduction, aux étages sélection et multiplication, en filière ponte d'œufs de consommation est interdite.

### **III.D.3.2.2.Troupeaux de production**

Les arrêtés Salmonelles de 1998 ont autorisé la vaccination des poules pondeuses au stade de la production d'œufs et avec un vaccin inactivé. L'administration se fait obligatoirement par injection. Si les méthodes de détection permettaient de différencier l'immunité vaccinale de l'immunité due à l'infection, les vaccins vivants ou inactivés pourraient être utilisés indifféremment durant la vie de l'oiseau.

### **III.D.3.2.3.Vaccins disponibles en France**

#### **▪ Salenvac**

Un seul vaccin commercial dispose actuellement d'une AMM en France, le vaccin "Salenvac<sup>®</sup>", vaccin adjuvé (hydroxyde d'aluminium) à agent inactivé contre l'infection par *Salmonella* Enteritidis lysotype 4 (le lysotype le plus représenté en Europe), produit par les laboratoires Intervet, contenant des corps cellulaires de *Salmonella* Enteritidis lysotype 4, cultivées sur un milieu spécifique appauvri en fer.

Ce vaccin est très utilisé en Grande Bretagne où la vaccination des pondeuses d'œufs de consommation est obligatoire depuis 1998 et a permis la diminution significative des cas de toxi-infections alimentaires humaines provoquées par *Salmonella* depuis sa mise en place (baisse de 50p. cent environ) dans un contexte épidémiologique où les consommateurs avaient perdu confiance.

En France, ce vaccin est utilisé depuis 1997

L'AMM prévoit 2 schémas possibles pour la vaccination :

- Le schéma classique comprend deux injections intramusculaires (au niveau de la cuisse) de 0.5 ml au niveau de la cuisse à 4 semaines d'intervalle à 12 et 16 semaines d'âge. L'immunité s'installe 4 semaines après la 2<sup>ème</sup> injection et s'étend jusqu'à la 60<sup>ème</sup> semaine d'âge.
- Un schéma est réservé aux élevages nécessitant une vaccination précoce. Il consiste à vacciner des poussins de 1 jour (0.1ml) puis à effectuer 2 rappels (0.5ml) à 4 puis à 18 semaines d'âge.

Une précaution à prendre est de vacciner les volailles avant leur arrivée sur l'élevage à risque.

Une étude conduite en 2001 par WOODWARD *et al.* (158) ont permis de mettre en évidence les effets protecteurs de ce vaccin lors de contaminations expérimentales intraveineuses répétées à 8, 17, 23, 30 et 59 semaines d'âge. Deux protocoles de vaccination ont été utilisés sur les poules pondeuses (à 1 jour et 4 semaines d'âge ou idem plus une injection à 18 semaines). Il a été constaté

- réduction de la phase systémique de l'infection
- forte réponse humorale au lipopolysaccharide et à la flagelline comme lors d'infection naturelle.
- perte de poids moindre par rapport au groupe de contrôle
- diminution des signes cliniques sur les oiseaux jeunes
- diminution de l'excrétion fécale des salmonelles
- diminution de la colonisation des organes (vésicule biliaire, ovaire, oviducte, caecum)
- diminution de la contamination interne des œufs et de la contamination des coquilles, mais pas d'influence sur la diminution de la production d'œufs.

DAVIS et BRESLIN (35), en 2003, ont réalisé une étude de terrain sur l'efficacité du Salenvac. Ils ont obtenus des résultats en accord avec ceux de leurs prédécesseurs en la matière :

- Résultats positifs dans la majorité des troupeaux
- Protection non absolue
- Protection uniquement si la dose d'épreuve est faible
- La présence de rongeurs, de mouches, un nettoyage mal conduit, une désinfection inefficace, sont des facteurs conduisant à l'échec

Ils suggèrent la conduite d'une étude permettant de comparer les résultats obtenus avec le nettoyage à sec.

Avec la conduite en bande, il est possible d'éliminer les salmonelles sans vaccination, mais la vaccination peut constituer une assurance dans le but d'éviter la réintroduction des bactéries.

La vaccination des sites contaminés est recommandée pendant au moins 2 ou 3 bandes successives à un lot contaminé. Elle ne présente pas d'inconvénient démontré par rapport à la stratégie globale découlant de l'arrêté de 1998 (134).

#### ▪ **Autovaccins**

Il existe également la possibilité d'utiliser des autovaccins inactivés et adjuvés. (BIOVAC par exemple) obtenus à partir du prélèvement d'une souche effectué dans un élevage infecté. C'est un vaccin fabriqué sur mesure pour un élevage donné. Ces autovaccins ne sont pas soumis à l'obtention d'une AMM mais les laboratoires qui les fabriquent doivent obtenir une autorisation de l'AFSSA.

Ce type de vaccins est composé d'une culture tuée par divers processus (la chaleur, formoline, etc.) et divers adjuvants.

Le panel scientifique de l'AESA (119) pense que leur efficacité est très controversée et n'a jamais été prouvée.

### **III.E. Conclusion**

L'utilisation des vaccins pour le contrôle des salmonelles chez la poule pondeuse vise à contrôler et à éviter la contamination des oeufs. En France, elle n'est envisageable que dans le cadre du programme de contrôle, qui interdit la vaccination des reproducteurs.

Pour contrôler avec efficacité les infections à salmonelles, il faut avant tout respecter les bonnes pratiques agricoles et une hygiène rigoureuse (notamment en ce qui concerne la protection de la nourriture, la gestion des volailles, le nettoyage et la désinfection, le contrôle des rongeurs, etc.). La vaccination ne confère pas une protection absolue, c'est un outil parfois nécessaire mais jamais suffisant à lui seul.

1) Les vaccins existants ont un effet protecteur ciblé sur un seul sérovar, alors qu'il en existe des centaines, tous potentiellement pathogènes pour l'Homme.

En ce qui concerne *Salmonella* Enteritidis, l'épidémiologie de ce germe incite plutôt à concentrer les efforts sur les sites particuliers où il existe un risque objectif.

Pour *Salmonella* Typhimurium, si l'épidémiologie est comparable, le caractère hautement pathogène du lysotype DT104 et les résistances aux antibiotiques, incitent à la plus grande prudence et plaident en faveur de la vaccination.

Les risques Enteritidis et Typhimurium sont indépendants, l'exposition à l'une ne rend pas plus probable la survenue de l'autre et inversement : dans les sites à risque, il n'y a pas de raison objective d'associer les deux valences.

Dans certains pays européens, la vaccination contre *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium est largement utilisée. En France, elle reste réservée aux sites à risques, en raison notamment de son coût. De plus, la vaccination n'est pas une technique de contrôle pour les nombreux autres sérotypes pouvant être présents dans les exploitations avicoles.

Rappelons enfin que si la vaccination contre les sérovares Enteritidis fait partie des options de contrôle réglementaire, compte tenu de la fréquence des isolements, la vaccination contre les autres sérovares pouvant être détectés n'est pas possible en l'état actuel des choses.

L'extension de la vaccination dans un contexte à fort risque économique peut présenter des avantages, notamment avec un vaccin bivalent Enteritidis – Typhimurium (134) .

2) La comparaison de l'efficacité des différents vaccins entre eux est difficile car l'infection aviaire naturelle elle-même (par les voies de contamination normales, avec une souche de salmonelle sauvage non atténuée) ne confère pas une protection absolue et n'empêche pas la survenue d'une nouvelle infection, même à court terme.

Cependant, il a clairement été démontré que la vaccination des poulets conduit bien à un niveau et une durée de colonisation intestinale et systémique réduits considérablement vis à vis de salmonelles de challenge.

Les recherches permettront peut-être d'aboutir au vaccin idéal, vivant, administrable *per os* et en une seule dose, non pathogène, mais virulent et invasif, à spectre large, sans réaction croisée avec les tests de dépistage sérologiques.

La vaccinologie moderne bénéficiera sans doute fortement des développements de la biologie moléculaire et de l'immunologie : les connaissances croissantes du génome des pathogènes et du système immunitaire permettront l'identification de nouvelles cibles antigéniques ainsi que le développement de nouvelles stratégies de vaccination (91).

Les vaccins administrables par voie orale (dans l'eau de boisson, dans l'aliment ou par spray) seront sans doute privilégiés. C'est d'ailleurs dans cette perspective que H. KOPROWSKI, cité par AYNAUD (6) a lancé en 1995 le nouveau concept des vaccins "comestibles", c'est-à-dire incorporés à l'aliment. Les plantes transgéniques (maïs par exemple) productrices d'antigènes vaccinaux recombinants pourraient, à ce titre, être de bons candidats à explorer comme vaccin comestible pour l'animal.

Au niveau des conditions de la vaccination, l'accent est mis sur des aspects pratiques à développer : la voie d'administration orale afin de stimuler préférentiellement l'immunité locale au niveau des premières voies d'entrée des agents pathogènes dans l'organisme.

3) A la question « la vaccination contre les salmonelles est-elle une option de contrôle adaptée ? », la réponse dépend de l'objectif du programme de contrôle (réduction ou éradication), du type de volailles concernées, de l'étape de la filière, de la prévalence, des sérovares ciblés, des méthodes de détection et enfin du coût par rapport aux bénéfices.

Dans le cadre d'un contrôle ciblé des sérovares Enteritidis et Typhimurium (sérotypes humains les plus signalés en Europe), la vaccination peut permettre de réduire l'excrétion fécale et la contamination des œufs en cas de forte prévalence. Si la prévalence est basse, la vaccination est moins utile mais peut encore être utilisée comme un moyen pour

maintenir ce faible nombre de cas ou dans les cas difficiles avant le repeuplement d'un élevage ayant subi une rechute.

- Pour réduire la prévalence, n'importe quel type de vaccin peut être utilisé.
  - Pour réduire la prévalence et la contamination des œufs, seuls les vaccins inactivés peuvent l'être en raison du risque de contamination des œufs par les souches vaccinales vivantes.
  - Pour éradiquer les salmonelles, la vaccination n'est pas une option de contrôle qui puisse être retenue, puisqu'elle ne permet pas d'enrayer l'excrétion. De plus les vaccins commerciaux disponibles actuellement ne confèrent pas de protection croisée contre plusieurs sérovars.
- En vue de l'éradication, le dépistage et l'élimination des troupeaux infectés constituent la solution à retenir (119).

La vaccination contre les salmonelles ne peut pas se substituer à l'hygiène, qui constitue d'ailleurs le socle prophylactique au stade de la sélection.

4) Sur le terrain, les échecs de la lutte contre les salmonelles semblent liés à des défauts dans le contrôle des nuisibles et dans la mise en œuvre des opérations de nettoyage et de désinfection.

DAVIES et BRESLIN (36) suggèrent d'ailleurs de conduire de front l'amélioration des vaccins et l'amélioration des techniques d'élevage et d'alimentation. Ils recommandent la conduite en bande selon la technique all-in all-out (« tout vide tout plein »), qui pourrait faciliter la maîtrise des salmonelles.

Dans les environnements à risque, on ne peut pas être certain qu'il ne reste aucune salmonelle (c'est tout particulièrement le cas des poules ayant un parcours extérieur). Si les animaux ne sont pas vaccinés, une contamination résiduelle même minime risque d'exploser. Lorsque les poules sont immunisées, une petite contamination résiduelle ou accidentelle ne peut pas être amplifiée, stoppant aussitôt le cycle des salmonelles.

En 1999, ZHANG-BARBER *et al.* (162) soulignent que dans un contexte d'importation de volailles ou de produits de volailles en provenance de pays n'appliquant pas les mêmes niveaux d'hygiène et de management, la vaccination peut faire partie d'un programme de contrôle comprenant également l'utilisation des antibiotiques et de l'exclusion compétitive. Il est toutefois important de souligner que dans un contexte de généralisation de la vaccination, les conséquences économiques peuvent être importantes avec la perte du statut indemne sans vaccination pour les exportations vers certains pays tiers. Dans tous les cas, la vaccination ne présente un réel intérêt que dans des contextes particuliers (économique, génétique, rechute).

Certaines situations particulières soulèvent la question de la vaccination systématique :

- Pour les cheptels de plein air la vaccination est un moyen incontestable de réduire la circulation des germes, d'autant qu'il n'existe pas de mesures adaptées à la décontamination des parcours.
- Pour des troupeaux d'intérêt génétique particulier
- Pour des petites structures exploitant peu de troupeaux et ne pouvant se permettre d'abattre un lot sous peine de perdre une partie importante de leur planning
- Pour les sites d'élevage importants où un abattage généralisé se traduirait par une perte de production importante, voire un problème d'indemnisation, même si les critères de la charte sanitaire sont remplis (134) .

Tableau 32 : Récapitulatif des avantages et des inconvénients de la vaccination contre les salmonelles (V= vaccin vivant ; I= vaccin inerte)

Les enjeux	Les avantages	Les inconvénients
Santé publique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- diminution du risque de contamination des œufs (V/I)</li> <li>- alternative à l'utilisation des antibiotiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- risque de circulation de souches vaccinales (V)</li> <li>- risque de contamination de la chaîne alimentaire si le temps d'attente n'est pas respecté (V)</li> <li>- utilisation de marqueurs d'antibiorésistance dans certains vaccins vivants (V)</li> <li>- risque de sélection de nouvelles souches virulentes capable d'éviter la protection immunologique induite par la vaccination (V/I)</li> <li>-risque d'échange de gène entre bactéries sauvages et bactéries vaccinales (V)</li> <li>- pas de vaccin disponible pour les sérovars autres que Enteritidis et Typhimurium (V/I)</li> <li>- risque de maintien de troupeaux apparemment négatifs qui se révéleraient être des sources de recontamination</li> </ul>
Santé et bien-être des oiseaux	<ul style="list-style-type: none"> <li>- réduction de l'excrétion fécale (V/I) et rupture du cycle fécal/oral</li> <li>- phénomène de colonisation inhibition sur les poussins, plus spécifique que l'exclusion compétitive (V)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- stress par le vaccin lui-même et les manipulations des oiseaux (I)</li> <li>- risque de réversion de virulence (V)</li> <li>- minimales pour les salmonelles ubiquistes (V/I)</li> </ul>
Environnement	<ul style="list-style-type: none"> <li>- réduction de la contamination environnementale par les salmonelles (V)</li> <li>- alternative à l'utilisation des antibiotiques (V/I)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- circulation (au moins théorique) des souches vaccinales dans l'environnement (V)</li> </ul>
Dépistage bactériologique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- en théorie pas d'interférence avec le dépistage bactériologique pour les vaccins inertes (I)</li> <li>- les souches vivantes possèdent des marqueurs qui permettent de les différencier des souches sauvages</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- la détection des salmonelles infectieuses est rendue difficile pendant un certain délai après la vaccination : la souche vaccinale excrétée peut masquer les autres salmonelles</li> <li>- diminution de la sensibilité par diminution de la multiplication intestinale</li> </ul>
Dépistage sérologique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- les programmes de contrôle visant l'éradication des salmonelles ne sont pas gênés par la vaccination : les positifs sont abattus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- interférence avec le dépistage sérologique de <i>Salmonella</i> Gallinarum/Pullorum pour les vaccins inertes contre <i>Salmonella</i> Enteritidis (I)</li> </ul>
Exclusion compétitive	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pas d'interférence avec les vaccins inertes</li> <li>- les vaccins vivants doivent être inoculés avant ou simultanément</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- le traitement avec une flore d'exclusion préalable à un vaccin vivant en diminue l'efficacité</li> </ul>
Prébiotiques et probiotiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pas d'interférence avec les vaccins inertes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- les effets peuvent être néfastes sur les souches vaccinales vivantes (blocage de l'adhésion, ...)</li> <li>- les effets réels sont insuffisamment évalués</li> </ul>
Traitements antibiotiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pas d'interférence avec les vaccins inertes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- les traitements antibiotiques préalables ou simultanés peuvent avoir un effet néfaste sur la viabilité des souches vaccinales des vaccins vivants</li> </ul>
Bonnes pratiques d'élevage et d'hygiène	<ul style="list-style-type: none"> <li>- les vaccins peuvent renforcer les effets des bonnes pratiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- la vaccination seule ne permet pas d'éliminer les salmonelles</li> </ul>

## **IV. LES FLORES BACTERIENNES**

### **IV.A. Définitions et objectifs**

L'apparition de résistances aux antibiotiques, l'interdiction des antibiotiques promoteurs de croissance, les pressions économiques et réglementaires diverses ont rendu stratégique la recherche de moyens alternatifs (extraits naturels de plantes, huiles essentielles, enzymes, acides organiques) permettant aux animaux d'augmenter leur résistance aux maladies en général, aux salmonelloses en particulier.

Les formulations vaccinales actuelles ne réussissent pas à empêcher la colonisation initiale des muqueuses intestinales par les salmonelles, particulièrement chez les poussins au couvoir.

Il faut rappeler que les poussins ont un système immunitaire immature qui les prédispose, pendant les premiers jours de leur vie à la colonisation rapide et persistante par les bactéries, qu'elles soient commensales ou pathogènes.

L'objectif des recherches sur les germes probiotiques est de trouver une souche bactérienne ayant les mêmes caractéristiques de colonisation que les salmonelles et qui pourrait aussi les exclure mais qui n'aurait pas leurs attributs de virulence. Parmi tous les genres de bactéries testés pour leur effet inhibiteur sur *Salmonella* Typhimurium, les salmonelles elles-mêmes présentent l'effet inhibiteur le plus important. L'effet inhibiteur existe aussi avec des souches atténuées, il est plus important avec des souches isogéniques. Mais toutes les salmonelles sont potentiellement dangereuses pour l'Homme. De plus, il a été mis en évidence (III.B.2.3.2, 71) le risque d'utiliser la vaccination précoce sur les poussins d'un jour.

L'utilisation des flores bactériennes dans un but curatif ou prophylactique apparaît alors comme une voie dont les perspectives peuvent être intéressantes.

NURMI et RANTALA en 1972, cités par RIGGI (133) ont été les premiers à formaliser le concept d'exclusion compétitive en mettant en évidence l'effet protecteur de la flore intestinale d'animaux adultes distribuée à des poussins pour prévenir la colonisation par *Salmonella* Infantis.

On distingue deux types de flores microbiennes en usage dans la filière oeufs de consommation :

- Les flores de barrière sont des flores intestinales naturelles, extraites du tube digestif de poulets adultes sains, vivantes, qui s'implantent et se multiplient in situ à la différence des probiotiques. Elles exercent une influence bénéfique sur l'équilibre de la flore endogène, le système immunitaire et le bien-être en général. En élevage industriel, elles permettent de compenser l'absence des adultes « contaminateurs ».
- Les probiotiques sont des compléments alimentaires microbiens vivants, ne se multipliant pas et qui exercent une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal, et sa santé en général. Ils doivent être administrés en continu.

#### **IV.A.1. Flores probiotiques**

Le mot probiotique provient du grec : « *pro bios* » c'est-à-dire « pour la vie » ou « favorisant la vie »

L'idée qu'il existe des bactéries dont l'effet peut être bénéfique pour la santé a été présentée pour la première fois par le lauréat du prix Nobel russe Elie Metchnikoff au début du 20ème siècle. La conclusion de ses travaux était que l'on peut annuler les effets pathogènes de certaines bactéries par l'adjonction de bactéries lactiques.

Au début des années 60, la flore intestinale fut l'objet de recherches plus intensives, et on étudia de manière approfondie les interactions entre Entérobactéries et leurs effets sur des animaux préalablement débarrassés de leurs propres bactéries.

Non seulement les bactéries indigènes de l'intestin exercent une action probiotique, mais sans leur présence dans l'appareil digestif aucune vie normale ne serait possible pour l'être humain ou l'animal.

La flore est absente à la naissance et chez l'homme elle ne devient complète qu'à deux ans. Les espèces provenant de l'alimentation ou de l'environnement n'arrivent à s'installer que durant les premiers mois de la vie.

Chez les oiseaux, cette installation est sans doute beaucoup plus rapide. Cette flore reste stable durant toute la vie. La raison de cette stabilité est inconnue. Elle réside probablement dans l'interdépendance absolue des espèces coexistantes qui exploitent la totalité de ce qui est disponible dans l'intestin et ne laisse aucune place vacante.

Une des conséquences inévitables est que des additifs à base de flores bactériennes ne peuvent modifier fondamentalement cet équilibre dynamique lorsqu'il est établi. Il faut donc une ingestion continue pour assurer le résultat espéré.

D'autre part, lors du transit dans le tractus gastro-intestinal, les conditions de stress auxquelles sont soumises les bactéries ingérées (acidité gastrique, sécrétions biliaires) ainsi que la compétition exercée par les bactéries indigènes de l'intestin, réduisent considérablement les chances d'implantation et de développement durable de ces probiotiques dans le tube digestif.

Bien que dans certains cas un maintien temporaire après arrêt d'ingestion ait pu être observé, il semble que les probiotiques ne doivent en fait exercer leur effet qu'au cours de leur transit dans le tube digestif essentiellement.

Actuellement les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, ingérés en quantité convenable, ont des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal.

Il existe 4 grands groupes de probiotiques :

- Les ferments lactiques

Ils sont capables de produire de l'acide lactique par la fermentation de certains sucres comme le lactose. Ils sont regroupés en 2 catégories, en fonction de leur morphologie : les lactobacilles (*Lactobacillus bulgaris*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei*) et les coques (*Enterococcus* et *Streptococcus*)

- Les bifidobactéries

D'origine humaine ou animale, elles appartiennent à la flore intestinale lactique normale et possèdent une bonne résistance aux sucs gastriques. Avec l'âge, la population de bifidobactéries diminue et leurs espèces varient.

- Les différentes levures de type *Saccharomyces*

Elles sont principalement utilisées par l'industrie agroalimentaire.

- Les autres bactéries sporulées, dont *Bacillus subtilis* et *cereus*.

Les souches probiotiques utilisées sont principalement des bactéries et des levures, présentes ou non dans la microflore intestinale résidente. Il peut également s'agir de champignons ou d'enzymes.

Sont surtout étudiés, les genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Bifidobacterium* qui appartiennent au groupe des bactéries lactiques, mais aussi *Enterococcus*, *Escherichia*, *Propionibacterium*, *Bacillus* et des levures. Au sein d'un même genre il faut distinguer les

espèces, par exemple : *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii* ou *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. bifidum*, etc., et les souches qui diffèrent selon les industriels et dont les propriétés peuvent être différentes (108).

#### **IV.A.2. Flores de barrière**

En élevage plein air traditionnel, durant leurs premiers jours, les poussins nouveau-nés sont colonisés par une flore bactérienne variée issue de leur environnement. Cette colonisation par des agents inoffensifs prévient l'intrusion d'agents pathogènes ou indésirables. Ce phénomène d'occupation par une flore commensale est appelé exclusion compétitive.

L'exclusion compétitive est ainsi le procédé qui consiste à administrer à des poussins nouveau-nés des cultures de flores intestinales de poulets adultes, en bonne santé, prélevée entre 37 et 80 jours d'âge pour une meilleure efficacité (133), pour développer la résistance aux infections intestinales (161) L'utilisation de flore caecale normale peut ainsi réduire la colonisation caecale par les Salmonelles. On parle ainsi de flores de barrière. Ce traitement prophylactique compense ainsi la trop lente installation de la flore intestinale commensale en conditions d'élevage industriel.

Ces flores naturelles ne sont pas entièrement connues, aussi bien en terme de composition bactérienne qu'en terme d'effets induits. On parle alors de flore indéfinie. Quelques genres sont toutefois identifiés : *Bacteroides*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Propionobacterium*, *Streptococcus*.

Comme chez l'Homme, le tractus digestif de la volaille est intimement lié au statut immunitaire et, plus généralement, à la santé de l'organisme dans son ensemble. L'alimentation et les suppléments influent sur l'écologie microbienne.

L'intérêt pour la microflore digestive s'explique par trois facteurs : la recherche d'une utilisation optimale des nutriments, la prévention des pathologies aviaires et la sécurité de l'alimentation de l'Homme par l'élimination des pathogènes.

D'un point de vue économique, sanitaire et réglementaire, il serait idéal que les souches bactériennes utilisées soient bon marché, résistantes à la granulation, faciles à conserver et parfaitement définies. Leur effet n'est pas comparable à celui des antibiotiques, mais les flores de barrière et probiotiques constituent des voies prometteuses.

#### **IV.B. Les bases de l'utilisation des flores bactériennes**

##### **IV.B.1. Système digestif de la poule**

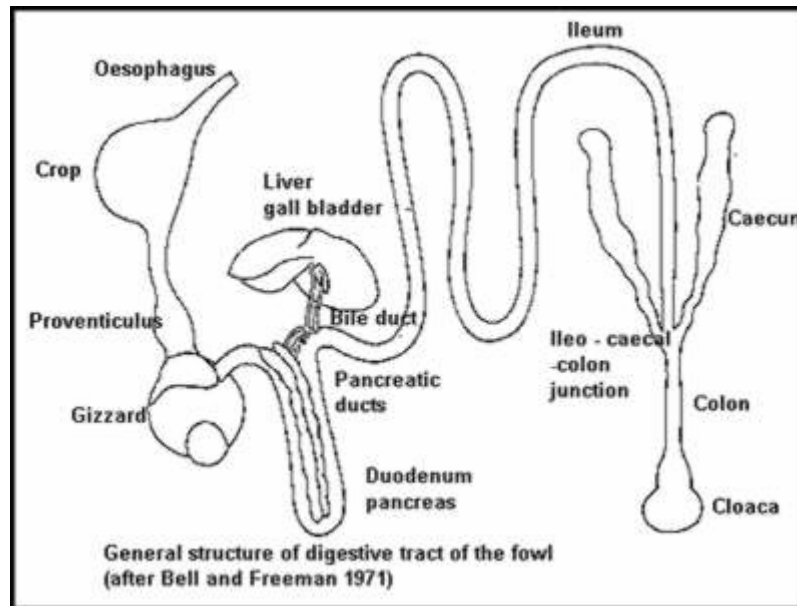
###### **IV.B.1.1. Anatomie et physiologie**

Le tractus gastro-intestinal présente quelques particularités anatomiques (voir Figure 13) et physiologiques (voir Tableau 33), importantes à considérer, compte tenu du mode de distribution des flores de barrière et des probiotiques. Dans chaque compartiment de ce tube digestif, les microorganismes sont organisés en niches où des états d'équilibre s'installent. Chez le poulet, les sites principaux d'activité bactérienne sont le jabot, les caeca et, dans une moindre mesure, l'intestin grêle. La flore microbienne est constituée d'une population stable et complexe.

On distingue (24) (16) :

- La cavité buccale ne comprend ni lèvres ni dents, mais un bec corné qui permet la préhension et une certaine fragmentation des aliments. Les glandes salivaires sont peu développées. Il n'y a ni voile du palais ni épiglote, si bien que la déglutition est un phénomène uniquement mécanique par redressement de la tête. Dans la bouche, les aliments sont peu fragmentés et grossièrement insalivés.

Figure 13 : Tractus gastro-intestinal de la Poule



- L'œsophage contient un renflement dont l'épithélium est riche en glandes à mucus : le jabot. Cet organe peut stocker des aliments qui s'y humectent et s'y ramollissent, il fonctionne chez le poulet alimenté à volonté. Il est le lieu d'une digestion microbienne (la microflore du jabot compte beaucoup de lactobacilles) d'une partie de l'amidon (hydrolyse avec formation d'acide lactique) et de formation d'acides gras volatiles. Dans le jabot, on trouve principalement des lactobacilles qui sont attachés à l'épithélium et forment presque une couche continue. On trouve aussi des streptocoques, des coliformes et des levures. (54)
- Le ventricule succenturié ou proventricule riche en glandes sécrétoires (acide chlorhydrique et pepsinogène précurseur de la pepsine) et permettant la digestion chimique : c'est l'estomac chimique. La protéolyse y débute à pH de 3 à 4,5. Dans le gésier et le proventricule, le faible pH fait chuter la population bactérienne.
- Le gésier, estomac mécanique, caractérisé par une couche superficielle très dure entourée de muscles puissants. Il y règne un pH très bas (2 à 3,5) et il peut contenir de petits graviers, nécessaires aux animaux consommant des grains intacts. C'est donc là que se produit véritablement la protéolyse sous l'action de la pepsine.
- L'intestin grêle a une paroi bien équipée en glandes sécrétrices, il reçoit à son début, dans l'anse duodénale, les sécrétions du pancréas et du foie. L'intestin grêle est très court. C'est le lieu préférentiel de la digestion chimique sous l'action des enzymes intestinales et pancréatiques et de la bile. Dans l'intestin grêle, la flore est beaucoup plus complexe et la recherche n'en est qu'au tout début tant en termes de quantification des souches que de connaissance de la complexité de l'écologie microbienne. Dans le duodénum, les conditions ne sont pas propices au développement de la flore : présence de nombreuses enzymes, forte pression en oxygène, présence de fortes concentrations de composés antimicrobiens tels que les sels biliaires et mouvements de reflux du jéjunum au gésier entraînant une modification rapide des conditions de milieu. Dans l'iléon, on trouve  $10^9$  bactéries par g de contenu. La flore anaérobie domine dans la partie basse du tractus digestif. L'environnement devient plus favorable à la croissance bactérienne en raison de la plus faible pression d'oxygène et de la faible concentration en enzymes et en sels biliaires (réabsorbés par l'hôte et dégradés en partie par la microflore). Cependant, si les aliments sont bien digérés, la flore est limitée par manque de substrat.

Globalement dans l'intestin grêle, on trouve principalement des bactéries anaérobies facultatives (lactobacilles, streptocoques et coliformes).

- Le gros intestin est peu développé et se réduit pratiquement à deux cæcums en cul-de-sac). Les deux très longs caeca possèdent un orifice très étroit qui restreint l'entrée des fluides et des grosses particules. Dans les caeca, on trouve  $10^{11}$  par g de contenu. L'ensemble du gros intestin, les caeca notamment, est le siège de fermentations importantes, donc de la production d'acides gras volatiles, mais aussi de la synthèse vitaminique et de la digestion des fibres. Comme chez les autres espèces, il y a à ce niveau absorption importante d'eau et de sels minéraux. Dans les caeca, les flores anaérobies strictes comme les *Eubacterium*, les bifidobactéries ou les clostridies, deviennent majoritaires, mais les bactéries anaérobies facultatives sont aussi présentes. La faible fréquence du renouvellement du contenu de cet organe (1 à 2 fois par jour) favorise le développement des bactéries. Le colon, très court, contrairement aux autres espèces animales, n'assure qu'un rôle de convoyeur du digestat. Après un court rectum, on trouve le cloaque, carrefour des voies génitales, urinaires et intestinales.

Du fait de la faible longueur du tube digestif, le transit est bref, de 12 à 24 heures. La défécation se produit une dizaine de fois par 24 heures.

Tableau 33 : pH habituels des segments du tube digestif du poulet.

	Source H. BRUGERE. (24)	Source GABRIEL <i>et</i> <i>al.</i> (54)
Bouche	6.7	/
Jabot	4.5	4.47 – 4.54
Ventricule	1.4-4.8	4.33 – 4.51
Gésier	4.7	2.46 – 2.79
Duodénum	5.7-6	5.68 – 6.07
Jéjunum	5.8-5.9	5.72 - 6
Iléon	6.3-6.4	6.18 – 6.5
caeca	6.3	5.6 – 5.83
Colon cloaque	6.3	6.08 – 6.58

Les caeca sont le principal site de colonisation par les salmonelles. Chez les Oiseaux âgés, ces organes contiennent la microflore plus abondante et la plus variée de toutes les portions du tube digestif.

L'intestin possède différents moyens non spécifiques et interconnectés de lutte contre les agressions bactériennes : la microflore, l'épithélium et le système immunitaire muqueux modulent la résistance aux agents pathogènes (133) :

- renouvellement rapide des cellules de l'épithélium digestif en 3 à 5 jours
- sécrétion de mucus (qui constitue un obstacle physique et contient en outre des substances à activité antibactérienne comme la mucine, la lactoferrine)
- péristaltisme intestinal avec un transit rapide en 4 à 12 heures
- cellules immunitaires (macrophages, plasmocytes sécrétant les IgA, lymphocytes T) dans le système lymphoïde. La population lymphoïde du tube digestif représente la moitié de la population lymphoïde totale de l'organisme.
- flore commensale digestive : dans le milieu naturel, l'installation de cette flore dans le tube digestif du nouveau-né, se fait à partir des bactéries fécales de l'adulte. Ce phénomène est retardé dans le système d'élevage industriel (133). Cette flore s'oppose à la multiplication et à l'implantation de bactéries étrangères et à leur passage dans les compartiments systémiques de l'organisme (translocation).

L'intestin est un organe immunitaire à lui seul. Sa muqueuse représente la plus grande surface de contact entre le monde extérieur et le système immunitaire.

La muqueuse intestinale est le premier organe lymphoïde de l'organisme. On dénombre au moins autant de cellules immunitaires dans la muqueuse intestinale que dans l'ensemble des autres organes lymphoïdes (thymus, rate, moelle osseuse, ganglions, cellules lymphoïdes circulantes dans le sang).

Mais parallèlement, le tube digestif contient une population bactérienne commensale.

Le système immunitaire intestinal doit « tolérer » les protéines étrangères à l'organisme comme les protéines alimentaires et celles des bactéries intestinales et en même temps, il doit développer des défenses immunitaires contre les germes pathogènes.

Inversement, la présence des bactéries intestinales va fortement influencer son développement et son fonctionnement, et entraîner des conséquences sur l'immunité de l'hôte.

#### **IV.B.1.2.Ecosystème digestif**

##### **IV.B.1.2.1.Caractérisation**

Les oiseaux naissent axéniques, c'est-à-dire, dépourvus de germes. En 1 ou 2 jours, une flore microbienne environnementale spécifique se développe et s'organise sous forme de populations, en état d'équilibre, le long du tube digestif.

La flore normale est installée en trois à 6 semaines (99).

Après l'éclosion, la flore augmente rapidement : ainsi dès le premier jour, l'iléon et les caeca hébergent  $10^8$  et  $10^{10}$  bactéries par g de contenu digestif. Leur nombre atteint  $10^9$  et  $10^{11}$  bactéries par gramme à 3 jours et reste relativement stable jusqu'à l'âge de 30 jours.

La flore est composée essentiellement de bactéries à Gram positif anaérobies facultatives du jabot à l'iléon terminal, alors que les caeca contiennent en plus des anaérobies strictes, ces dernières étant dominantes.(54)

D'un point de vue qualitatif, dès le premier jour, les coliformes, les streptocoques et les clostridies colonisent rapidement le tube digestif, du jabot aux caeca, alors que les lactobacilles ne sont pas mis en évidence avant 3 jours et les *Bactéroïdes* pas avant 5 jours et seulement au niveau des caeca.

La flore digestive du poulet comprend une trentaine de genres subdivisés en espèces et souches, ce qui fait au total au moins 200 types différents. Une poule contient dans son tube digestif plus de cellules bactériennes qu'elle ne possède elle-même de cellules.

La flore endogène se divise en trois groupes : une flore dominante composée de *Bifidobacterium* et *Bacteroïdes*, une flore sous-dominante composée en particulier de *Lactobacillus*, et une flore contaminante, potentiellement pathogène mais théoriquement absente.

Lactobacilles, Entérocoques, Coliformes, Levures, Clostridies, Streptocoques sont les principaux représentants. Ces micro-organismes se répartissent différemment dans l'appareil digestif avec une concentration particulière dans le gésier et les caeca.

L'essentiel de la flore du caecum des poulets est constitué par des anaérobies stricts. La densité est de  $10^{11}$  cellules par gramme. Environ 38 types différents de bactéries anaérobies ont été identifiés. On peut y trouver des cocci Gram<sup>+</sup> comme *Peptostreptococcus* qui assure 28 p. cent des bactéries cultivables, mais aussi des Bactéroidacées (20 p. cent), des *Eubacterium* (16 p. cent), des *Bifidobacterium* (9 p. cent), des cocci bourgeonnants (6 p. cent), *Gemmiger formicilis* (5 p. cent) et des *Clostridium* (5 p. cent).

Dans la plupart des cas, les microorganismes trouvés dans les caeca sont retrouvés dans le très court colon.

D'autres organismes non cultivables dont l'activité métabolique a été mise en évidence par les méthodes d'exploration moléculaire, n'ont pas pu être isolés et caractérisés du fait de leur besoin d'anaérobiose stricte ou de l'ignorance des composants nécessaires à leur croissance.

Seulement 25 p. cent des souches seraient identifiées à ce jour.

Les salmonelles peuvent être retrouvées dans tous les segments du tube digestif, mais elles se localisent préférentiellement dans les *caeca*.

#### **IV.B.1.2.2.Facteurs de variation**

La flore est en équilibre relativement stable dans le tube digestif en l'absence d'agression (antibiotiques, facteurs de croissance, stress, pathologies). Les facteurs de variation sont l'âge mais aussi de nombreux facteurs extérieurs

La flore, aussi bien intestinale que caecale, se diversifie avec l'âge. Ainsi, dans l'iléon, on observe avec l'âge différentes espèces de lactobacilles, une augmentation transitoire des streptocoques, et une augmentation continue de *Clostridium perfringens*. Dans les caeca, bien que les clostridies soient toujours majoritaires, les lactobacilles sont initialement présents en proportions importantes à 3 jours d'âge, puis diminuent au profit des clostridies à 7 jours, puis des fusobactéries à 21 jours, et à nouveau des clostridies à l'âge de 49 jours. (54)

L'intestin grêle des poussins présente une flore riche en *Lactobacillus* avec une population de *Bifidobacterium* qui devient prédominante dans les caeca chez l'individu plus âgé. Des *Clostridium* sont détectés dans les segments de l'intestin grêle des jeunes. Chez les animaux plus âgés, *Salmonella*, *Campylobacter*, and *E. coli* sont présents dans les caeca. (3).

Selon le milieu d'élevage, la microflore est différente. Des populations plus fortes sont observées chez des animaux élevés au sol (sur litière propre ou contaminée) par rapport à des animaux élevés en cages individuelles.

La flore digestive diffère entre des animaux à croissance rapide élevés en confinement et des animaux élevés en conditions plus extensives, c'est-à-dire avec des souches à croissance lente, une alimentation sans antibiotique, une densité d'élevage plus faible et l'accès à des parcours extérieurs.

L'augmentation de la densité d'élevage ou les stress thermiques semblent globalement augmenter les bactéries néfastes au détriment des bactéries bénéfiques.

La présence de parasites intestinaux comme les coccidies, entraînant la dégradation de la muqueuse intestinale et la production de nouveaux substrats pour la microflore, conduit à une modification de celle-ci.

Le type d'alimentation est aussi un facteur de variation puisque la flore digestive dépend directement de l'alimentation : cette dernière est à l'origine du type de substrat disponible pour la croissance des micro-organismes.

Les aliments peu digestibles constituent un support de développement favorable (93).

#### **IV.B.1.2.3.Rôle de la microflore digestive**

La microflore intestinale revêt une importance fondamentale du fait de ses fonctions essentielles pour la vie, qui sont, entre autres :

- La constitution et la préservation d'une barrière microbienne contre les germes "étrangers";
- L'alimentation de la muqueuse intestinale en substrats riches en énergie;
- Les influences exercées sur le système immunitaire associé à l'intestin;
- La stimulation de la motilité intestinale;

- La production de vitamines;
- La déconjugaison des acides biliaires, etc.

La flore microbienne intestinale joue un rôle important dans la santé de l'organisme qui l'héberge en participant à l'équilibre microbien et en rejetant ainsi les pathogènes éventuels en association avec le système immunitaire intestinal qui la tolère. Elle participe, par ailleurs, à la digestion de l'abondante production de mucus par les cellules mucipares (caliciformes ou en gobelet) de l'intestin, ce qui est en relation avec le phénomène d'adhésivité.

Les chercheurs essaient d'identifier les composants de la microflore, qui interviennent dans l'effet protecteur contre les bactéries pathogènes, afin de pouvoir les utiliser seuls ou en mélange défini, contre la colonisation par les salmonelles.

Les bactéries n'ont pas que des effets positifs. Elles peuvent produire des métabolites (voir Tableau 34) qui dans certains cas peuvent être néfastes, voire toxiques. Elles produisent de l'acide cholique qui accélère le renouvellement cellulaire intestinal. Certains acides aminés sont métabolisés en produits toxiques, comme le tryptophane en indole et scatole, ou la cystéine en mercaptan d'éthyl et de méthyl. Les bactéries à Gram négatif produisent des endotoxines libérées lors de la lyse des lipopolysaccharides contenus dans leurs parois cellulaires. Ces endotoxines entraînent de la fièvre et la libération de pyrogènes endogènes agissant sur les centres thermorégulateurs de l'hypothalamus. D'autres toxines peuvent affecter la motricité intestinale entraînant des diarrhées. Certaines bactéries peuvent retoxifier des substances détoxifiées dans le foie, entraîner la formation de substances mutagènes et carcinogènes ou libérer des oligopeptides potentiellement inflammatoires (54).

Tableau 34 : Métabolites produits par la microflore d'après GABRIEL *et al.* (54)

Produits bénéfiques	Produits mixtes (bénéfiques mais pouvant avoir un effet néfaste)	Produits néfastes
Vitamines Acide lactique Bactériocines Métabolites de l'oxygène Peroxyde d'hydrogène Radicaux libres	Acides gras volatiles (acétate, propionate, butyrate, isobutyrate, valérate, isovalérate) Ammoniac Amines (putrescine, histamine, etc)	Acide cholique Enzymes déconjuguant les sels biliaires Indoles et scatole Mercaptan Endotoxines Entérotoxines Substances mutagènes et carcinogènes Histamines

Le potentiel protecteur de la flore présente vis-à-vis des salmonelles peut varier largement et les oiseaux de certains troupeaux peuvent produire des flores peu ou pas protectrices pour les poussins. Pour cette raison, les oiseaux donneurs doivent être sélectionnés avant utilisation. Il est également important que les donneurs proviennent de troupeaux dont la flore est complètement développée. Dans une expérience, il est rapporté que la culture d'exclusion compétitive la plus efficace provient d'un oiseau adulte ayant été élevé dans 5 fermes différentes, optimisant ainsi la complexité de la microflore intestinale(97).

#### **IV.B.2. Différents mécanismes d'action**

Comment cet écosystème complexe que sont les bactéries digestives, échappant à la vigilance du système immunitaire, intervient-il pour entraver la colonisation par les salmonelles ? Cette question fait encore largement partie du domaine de la recherche et ne sera peut-être jamais complètement élucidée compte tenu de la complexité de l'intestin et la multiplicité des facteurs intervenant dans la régulation homéostatique.

La flore digestive peut se trouver dans la lumière intestinale, enfouie dans la couche de mucus ou adhérente à la muqueuse digestive où elle peut former des couches de cellules très importantes.

La flore luminale dépend des nutriments disponibles, de la vitesse de transit et de la présence ou non de substances antimicrobiennes.

La flore mucosale dépend de l'expression par l'hôte de sites d'adhésion spécifiques sur les membranes des entérocytes, de la vitesse de production du mucus, de la production d'anticorps sécrétoires, et de l'extrusion de matériel cellulaire de la membrane.

En pratique, un organisme ne peut coloniser l'intestin que s'il se multiplie à une vitesse suffisamment rapide pour compenser son élimination par le transit digestif, ou s'il s'attache à la muqueuse. Les bactéries ainsi fixées sont particulièrement importantes du fait de leur contact étroit avec l'hôte et de leur rôle dans le contrôle des pathogènes, de la modulation de l'immunité et de leurs effets sur l'absorption des nutriments par l'hôte. (54)

L'objectif de l'utilisation de flores bactériennes est avant tout un effet préventif sur la multiplication des salmonelles dans les *caeca*, les empêchant de se multiplier et les éliminant graduellement. C'est plus un effet bactériostatique que bactéricide et il peut arriver que les salmonelles reprennent le dessus si la microflore protectrice est perturbée lors du développement d'une coccidiose par exemple. Le mécanisme précis de l'effet protecteur est encore inconnu et le restera peut-être longtemps compte tenu de la complexité des interactions hôte/ microbes et microbes/microbes.

Selon NISBET (113) plusieurs types d'action sont à l'origine de l'activité des flores bactériennes mais les mécanismes ne sont pas clairement connus. Le mécanisme global peut reposer sur un seul ou plusieurs mécanismes à la fois en fonction des souches ou mélanges de souches étudiés (122). Il faut noter que certains effets inhibiteurs mis en évidence *in vitro* ne sont pas toujours reproductibles *in vivo*.

#### **IV.B.2.1.Compétition nutritionnelle**

Il peut exister une compétition pour l'utilisation des mêmes substrats, notamment les acides aminés et les sucres, entre les pathogènes et la flore indigène. Ces substrats deviennent alors facteur limitant pour la croissance des pathogènes. Ces situations de laboratoire sont difficiles à mettre en évidence *in vivo*.

AUDISIO *et al.* (5) ont montré que le développement des souches probiotiques est sous la dépendance de sources d'hydrates de carbones complexes.

MEAD (97) rappelle par exemple que la compétition entre *Salmonella* Typhimurium et *Escherichia fergusonii* est vraisemblablement liée à la faculté d'utiliser la serine de manière anaérobie par cette bactérie.

#### **IV.B.2.2.Compétition spatiale pour des sites d'attachement**

D'après STAVRIC (141), la compétition pour les sites d'attachement sur les parois caecales (effet spatial) est un critère important pour la sélection d'isolat potentiellement protecteur. La microflore administrée colonise la muqueuse et constitue une barrière physique comparable à un tapis cellulaire avec des interconnexions denses composées par les glycolipides et les glycoprotéines des membranes cellulaires bactériennes (appelés glycocalyx) (97). Cet effet spatial est d'ailleurs rapide puisqu'il devient apparent dans le délai d'une heure après l'administration de la flore. Ce critère d'attachement ne peut toutefois pas expliquer à lui seul la compétition avec les salmonelles. Il semble en effet que certaines salmonelles, par exemple *Salmonella* Kedougou, restent libres dans la lumière caecale.

Toutefois, il semble que l'utilisation de bactéries mucosales (par opposition aux bactéries restant libres dans la lumière intestinale) soit l'une des clés de l'exclusion des salmonelles (97).

DROLESKEY *et al.* (42) ont découvert par la microscopie électronique, que des oiseaux de 3 jours traités avec CF3 (mixture définie équivalente à PREEMPT) présentaient une large colonisation bactérienne de la muqueuse caecale, notamment au niveau des cryptes, colonisation qui n'existait pas chez les oiseaux non traités. Cette occupation spatiale est hautement corrélée au taux d'acide propionique dans les caeca (cf. *infra*).

#### **IV.B.2.3. Production de substances à effet inhibiteur**

Les flores bactériennes produisent des substances à effet inhibiteur, notamment pour les salmonelles, telles que

- des acides gras volatils (acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique, valérique, isovalérique), des gaz de fermentation entraînant une diminution du pH et inhibant ainsi la croissance des entéropathogènes grâce à un effet bactériostatique,
- du peroxyde d'hydrogène.

Ces produits sont le résultat du métabolisme normal des anaérobies (sporulants et non sporulants). Chez les jeunes oiseaux, ces acides gras volatils sont en concentrations plus basses que chez l'adulte, de même que le pH des caeca qui est plus haut, réservant un terrain favorable à la multiplication des salmonelles. La concentration des AGV (-) augmentent en même temps que la microflore devient plus complexe, et les conditions deviennent alors moins favorables aux salmonelles (97).

En 1999, YU BI *et al.* (160) ont étudié les effets d'une culture caecale sur les performances de croissance et la prévention contre les Salmonelles. Les poulets inoculés par les probiotiques ont des concentrations en acides gras volatiles plus importantes dans le caecum que les oiseaux non inoculés. Sur les oiseaux ayant reçu des probiotiques et contaminés expérimentalement par des Salmonelles, la muqueuse caecale portait plus de bactéries et significativement moins d'anaérobies et de coliformes. Les performances de croissance ont été améliorées pendant les 3 premières semaines de vie, l'effet bénéfique a disparu ensuite.

En 2000, RAMESH *et al.* (129) ont relevé que des oiseaux nourris avec *Lactobacillus acidophilus* avaient un pH plus bas dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon.

En 2000 VAN DER WIELEN *et al.* (149) ont montré que l'effet probiotique d'une association de *Lactobacillus Crispatus* et *Clostridium Lactatifermentans* était lié au pH du milieu (pH=5.8 dans le caecum) et à l'utilisation synergique du lactose par ces deux souches bactériennes, aboutissant à la production de lactate par le *Lactobacillus* puis d'acétate et de propionate par le *Clostridium*, substances qui sont inhibitrices pour *Salmonella* Enteritidis.

En 2000, une étude de JIN *et al.* (80) ont permis d'établir que la supplémentation avec une ou 12 souches de *Lactobacillus*, possédant un pouvoir antagoniste vis-à-vis des salmonelles, entraînait une augmentation de l'activité des amylases dans l'intestin grêle (sans aucune influence sur la lipolyse et la protéolyse), avec production accrue d'acides gras volatils.

Les résultats sont les mêmes avec une souche de *L. acidophilus* ou un mélange de 12 souches.

SAMANYA et YAMAUCHI (136) en 2002, ont observé une diminution de l'ammoniémie (Concentration plasmatique d'ammoniaque libre). Les fonctions intestinales sont activées par la diminution du taux d'ammoniaque dans le sang. Corrélativement à la diminution de l'ammoniémie, des modifications des villosités intestinales sont observées, suite à l'utilisation d'une souche déshydratée de *Bacillus subtilis* var. natto. Les oiseaux traités ont montré de meilleures performances de croissance et des modifications histologiques, telles que l'augmentation de la taille des villosités, de la surface des cellules intestinales et de la

mitose cellulaire. Ces résultats indiquent que les fonctions intestinales sont activées par la diminution du taux d'ammoniaque dans le sang.

NISBET (113) a démontré que la concentration en acide propionique dans le caecum des poulets est hautement corrélée avec le niveau de protection observé. Les cultures d'exclusion compétitives qui ne permettent pas d'augmenter suffisamment la concentration en acide propionique à l'âge de 3 jours dans les *caeca*, échouent à protéger efficacement contre la colonisation par *Salmonella* Typhimurium. Cette augmentation du taux d'acide propionique est, de plus, hautement corrélée à l'augmentation des populations anaérobies dans les caeca des poulets traités. Ce qui rejoint les observations de DROLESKEY *et al.* (42) sur la large occupation spatiale de la muqueuse caecale par les cultures d'exclusion compétitive (IV.B.2.2).

De plus, lorsque le côlon affiche un pH faible, l'ammoniaque est présente sous sa forme ionique et n'est pas absorbée; elle est plutôt utilisée comme source d'azote et permet la croissance de bactéries bénéfiques, dont les bifidobactéries (130).

#### **IV.B.2.4. Production de bactériocines**

Ce sont des protéines produites par certaines bactéries et qui tuent, sans les lyser, d'autres bactéries en se fixant sur des récepteurs spécifiques de leur paroi et en provoquant des blocages de synthèses d'ADN ou de protéines, ou des inhibitions de phosphorylations.

La nisine, produite par certaines souches de *Lactobacillus lactis lactis* a été étudiée et approuvée pour certains usages (81).

Certains *Bacillus* ssp produisant l'amicoumacine A pourrait avoir un effet protecteur contre les pathogènes (90).

En 1999, AUDISIO *et al.* (5) ont déterminé que l'effet antagoniste d'une souche d'*Enterococcus faecium* sur des pathogènes zoonotiques tels que les salmonelles est dû à l'accumulation des métabolites des bactéries d'exclusion compétitive, l'acide lactique et une bactériocine en l'occurrence, qui ont un effet bactériostatique et bactéricide contre les germes à gram négatif.

De même, PORTRAIT *et al.* (126) ont conclu à l'effet inhibiteur de la microcine J25 produite par certaines souches d'*Escherichia coli* sur *Salmonella* Enteritidis *in vitro*.

Toutefois l'effet des bactériocines, mis en évidence *in vitro*, n'est pas facile ni à mettre en évidence, ni à reproduire *in vivo*.

#### **IV.B.2.5. Diminution du potentiel d'oxydoréduction**

Une baisse de la tension en oxygène dans les *caeca* entraîne des conditions favorables pour les anaérobies (133).

#### **IV.B.2.6. Stimulation du système immunitaire**

La flore intestinale participe au développement et au maintien d'un système immunitaire intestinal efficace. Elle joue un rôle dans le développement et la régulation de la réponse immunitaire en influençant le nombre, la distribution et le degré d'activation des populations cellulaires du système immunitaire intestinal.

Elle représente une source majeure de stimuli antigéniques pour la maturation et la migration des cellules lymphoïdes présentes dans les plaques de Peyer.

Il peut y avoir stimulation par exemple la production de défensines (peptide produit par les granulocytes neutrophiles ayant des caractéristiques antibiotiques et qui détruit de nombreuses bactéries en s'insérant dans la paroi bactérienne), de cytokines (produites par les lymphocytes) (122).

En 2002, KUMAR *et al.* (86) ont comparé les modifications anatomopathologiques observées suite à l'infection salmonellique (*Gallinarum*) et à l'utilisation de probiotiques :

- hyperplasie réticulo-endothéliale hépatique
- formation de follicules lymphoïdes secondaires
- prolifération lymphoblastique hépatique
- hyperplasie des cellules caliciformes intestinales, sécrétant le mucus
- aucune modification de la Bourse de Fabricius : pas de réaction immunitaire humorale.

En 2002, BHATTI *et al.* (20) ont étudié l'influence d'un probiotique sur les paramètres sanguins et a constaté la stimulation du système hématopoïétique avec une augmentation des érythrocytes sans augmentation de l'hémoglobine, associé à une augmentation du volume globulaire (corpusculaire) moyen (VGM).

#### **IV.B.2.7.Cas des probiotiques**

Les probiotiques auraient des effets positifs sur la santé individuelle, mais également sur la prévention des désordres intestinaux et sur la microflore de l'intestin. En élevage, ils sont utilisés en tant qu'additifs pour augmenter les performances de croissance et peuvent cibler la prévention contre les salmonelles.

Ils ne contiennent en général que peu de bactéries en nombre et en genres représentés, par exemple, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*. Dans quelques cas, ils peuvent coloniser l'intestin, mais le plus souvent le probiotique doit être distribué en continu.

Les probiotiques peuvent être considérés comme un moyen de transmettre les principes actifs qu'ils contiennent (enzymes, composants de paroi, peptides immunomodulateurs, substances antibactérienne, etc.) jusqu'à leurs cibles d'action dans le tube digestif. Ils peuvent avoir des effets directs ou indirects en agissant via des modifications de l'immunité et de la flore. En particulier, ils inhibent les bactéries indésirables, neutralisent les produits toxiques, améliorent la digestibilité de la ration alimentaire et stimulent l'immunité. Ils sont également une source de vitamines (essentiellement du groupe B) et de sels minéraux assimilables.

L'effet favorable sur la santé des bactéries probiotiques dépend de :

- Ressemblance ou concordance avec des bactéries de la microflore commensale
- Taux de survie élevé après le passage de l'estomac.
- Adhérence élevée aux cellules intestinales :  
Certains probiotiques ont une capacité d'adhérence au tube digestif. Des études ont montré que des souches adhérentes pouvaient coloniser de manière prolongée une partie du tube digestif. Les probiotiques pourraient agir en limitant l'implantation des germes pathogènes par compétition au niveau des sites de fixation pour la colonisation : si les probiotiques utilisent la surface du tube digestif, les germes pathogènes n'ont plus de place pour s'implanter.
- Amélioration la digestibilité de nombreux nutriments.  
Leur rôle essentiel est de garantir une bonne hygiène digestive en favorisant la dégradation et l'absorption de certains aliments
- Capacité de déconjuguer les sels biliaires.  
Ces derniers sont sécrétés lors de la digestion et transformés avec d'autres substances en sels biliaires conjugués. Les formes déconjuguées ont un pouvoir inhibiteur plus important sur le développement des bactéries.
- Neutralisation de produits toxiques.  
Ils provoqueraient une atténuation du catabolisme digestif et une orientation de la microflore intestinale pour réduire l'absorption des substances toxiques (ammoniac, amines et indoles) et diminuer les biotransformations des sels biliaires et des acides gras en produits toxiques. Les bactéries probiotiques auraient aussi la capacité de produire des métabolites susceptibles de neutraliser in situ certaines toxines bactériennes.

En 2003, PANDA *et al.* (118) ont étudié les conséquences d'une supplémentation en probiotiques sur des poules pondeuses âgées de 24 à 72 semaines. Il a relevé :

- une augmentation de la production d'œufs, du poids des coquilles, de l'épaisseur des coquilles, de la calcémie : l'abaissement du pH dans l'intestin solubilise le calcium qui est alors mieux absorbé
- une diminution de la cholestérolémie et du cholestérol du jaune
- aucune influence sur la conversion alimentaire, le poids des œufs, le phosphore sérique, et l'activité des phosphatases alcalines.
- une augmentation des marqueurs de l'immunité humorale et cellulaire pour les oiseaux âgés de 64 semaines et plus.

Un second champ d'application pour les probiotiques est représenté par le complément thérapeutique dans :

- la prévention des surinfections après traitement antibiotiques contre les salmonelles par exemple,
- le traitement des diarrhées (bactériennes ou autres)

Ces applications pourraient même dans certains cas aider à éviter l'usage des antimicrobiens.

D'après PASCUAL *et al.* (121), il existe une corrélation positive entre l'adhérence aux cellules intestinales et leur capacité d'agrégation et co-agrégation aux bactéries pathogènes.

#### **IV.C. Efficacité : les résultats des essais expérimentaux**

Les résultats expérimentaux relatifs à la prévention de la colonisation par les salmonelles ont parfois été contradictoires.

Certains essais ont conclu à l'absence totale d'effet.

D'autres ont démontré des effets positifs non seulement sur le portage des salmonelles, mais aussi sur le gain de poids, l'efficacité alimentaire et la réduction de la mortalité.

La plupart des essais relatent les effets stimulant sur la croissance. Quelques essais se focalisent sur les effets induits sur les bactéries pathogènes, mais seulement sur une très courte période.

Bien que la plupart des études soient focalisées sur les cultures anaérobies, il convient de prendre en compte toutes les variables qui peuvent jouer un rôle dans l'efficacité :

- la durée de la culture
- le nombre de passages en milieu de culture
- les espèces bactériennes
- la technique d'administration
- les sérotypes de salmonelles utilisés pour les inoculations d'épreuve (challenge).

De plus les méthodes expérimentales sont très différentes des conditions d'élevage industriel. En laboratoire les oiseaux sont étudiés en petits groupes, placés en carton, en cage ou en isolement avec un sol en mailles métalliques. Ils peuvent être élevés sur litière en petits enclos. Les floes testées sont administrées individuellement dans l'eau de boisson ou par spray. Les oiseaux sont toujours inoculés individuellement avec les bactéries challenge, mais d'autres méthodes peuvent être utilisées : technique des oiseaux contaminateurs placés dans des cohortes non infectées, aliments contaminés, par exemples.

Après les traitements, les oiseaux peuvent être conservés de quelques jours à plusieurs semaines avant d'être examinés pour déterminer le niveau de protection. Il est reconnu que tous ces facteurs peuvent influencer les résultats.

Par exemple, des oiseaux élevés sur caillebotis métallique seront moins exposés aux contaminations fécales.

L'intervalle entre le traitement par la flore et l'inoculation des salmonelles est également très important, la protection augmentant lorsque cet intervalle s'allonge.

De même, une longue période d'élevage est plus favorable à un niveau bas de salmonelles puisque le système immunitaire et la microflore commensale deviennent plus efficaces chez l'oiseau plus âgé.

Les conditions utilisées en essai de laboratoire ne sont pas standardisées mais une procédure a été reconnue par un groupe international de chercheurs (97). Il n'en reste pas moins que ces conditions ne miment pas les conditions du terrain. Les résultats expérimentaux obtenus sont donc plus une mesure du potentiel protecteur de la flore de traitement qu'un indicateur fiable des performances sur le terrain.

En dépit de ces facteurs limitants, de nombreuses informations sont fournies par ces études sur les capacités protectrices des flores bactériennes.

Les essais de terrains posent certaines difficultés, telle que trouver des troupeaux de contrôle appropriés, pour être soumis à la même salmonelle-test, de manière à valider les résultats. Le challenge-test est aussi imprévisible, il peut avoir un effet sur un seul des deux troupeaux, ou sur aucun des deux. Il est également difficile de garantir que l'approvisionnement en poussins sera toujours indemne de salmonelles. Pour des raisons éthiques, il n'est pas possible de tester artificiellement des troupeaux avec des salmonelles, à moins de les détruire à la fin de l'essai. En raison de toutes ces difficultés, les essais uniques ne sont pas probants et nécessitent des observations à grande échelle.

Pour tenter de déterminer la fraction de la flore totale responsable de l'effet protecteur sur les poussins, des dilutions de matériel fécal ou caecal ont été testées pour leur action protectrice. Les résultats suggèrent que  $10^{-8}$ /g de matériel initial ne suffisent pas pour obtenir un effet protecteur du fait du nombre insuffisant des germes contenus. Ce type d'expérimentation montre qu'une partie spécifique de la microflore est essentielle et l'éliminer par dilutions successives élimine l'aptitude bénéfique.

#### **IV.C.1. Importance des caractéristiques biochimiques des flores**

##### **IV.C.1.1. Flores anaérobies**

Il est certain que les anaérobies stricts sont impliqués dans l'effet protecteur, à condition que des anaérobies facultatifs soient inclus dans la préparation.

En ce qui concerne les poules, il apparaît que le niveau de protection contre la colonisation par les salmonelles est hautement corrélé au taux d'acide propionique produit dans le caecum. De même, ce taux d'acide est lui aussi hautement corrélé à la concentration en bactéries anaérobies des cultures d'exclusion compétitive (113).

##### **IV.C.1.2. Flores aérobies ou anaérobies facultatives**

Les expériences d'ANDREATTI FILHO *et al.* (4) ont mis en évidence une efficacité importante des flores aérobies seules par rapport aux flores mixtes ou strictement anaérobies. Ces flores utiliseraient en effet l'oxygène du caecum, et en réduiraient ainsi le taux, rendant le milieu plus favorable aux anaérobies. La préparation de flores bactériennes à partir de flore aérobie est d'ailleurs beaucoup moins coûteuse, techniquement beaucoup plus simple, et pourrait représenter une alternative plus facilement supportable économiquement.

Les flores caecales aérobies démontrent une meilleure efficacité pour diminuer le nombre de poulets infectés par *Salmonella* Enteritidis et la colonisation caecale, mais les cultures aérobies et/ou anaérobies ont la même efficacité pour diminuer l'excrétion des salmonelles. Dans tous les cas, l'utilisation de la flore caecale, aérobie ou non, conduit à un plus petit nombre de salmonelles pour tous les paramètres. Il a d'ailleurs été démontré que les poussins pouvaient être protégés par des cultures extraites de la litière des nids, ce qui prouve une certaine tolérance à l'oxygène des flores protectrices.

#### **IV.C.2. Importance de l'adhésivité**

Le potentiel protecteur semble être en rapport avec l'adhésivité aux cellules épithéliales intestinales, on parle ainsi de flore mucosale protectrice : la compétition entre les pathogènes et la microflore pour les sites récepteurs est considéré comme un des facteurs majeurs dans l'exclusion des pathogènes.

STAVRIC (141) a en effet montré que des organismes protecteurs pouvaient être obtenus en utilisant une culture dérivant d'un homogénat de lavage caecal. Ces organismes améliorent l'efficacité de mélanges protecteurs définis.

HOSZOWSKI et TRUSZCZYNSKI (72) ont obtenu des résultats similaires avec le lyophilisat du rinçage de caeca de poules pondeuses.

PASCUAL *et al.* (121) ont étudié une souche de *Lactobacillus salivarius* pendant toute la période d'élevage afin d'évaluer son aptitude à minimiser la colonisation par les salmonelles et à survivre dans les aliments pour les volailles. Certaines souches de *Lactobacillus salivarius* ont démontré un degré d'adhésivité important sur les cellules épithéliales intestinales ainsi qu'un potentiel d'exclusion compétitive jusqu'à 21 jours après une seule administration vis-à-vis de salmonelles en rapport avec leur adhésivité.

GUSILS *et al.* (62) ont étudié les interactions entre des souches de Lactobacilles et le mucus intestinal, suggérant qu'une glycoprotéine de ce mucus se comportait comme un récepteur pour ces flores. *Salmonella pullorum* et *Salmonella gallinarum* montrent également une forte adhésivité au mucus intestinal, mais il semblent que les sites d'attachement ne soient pas les mêmes.

#### **IV.C.3. Composition des flores**

##### **IV.C.3.1. Flores indéfinies (ou microflores natives)**

La culture d'exclusion compétitive doit provenir de préférence d'un oiseau donneur exempt de tout germe pathogène (oiseau SPF specific pathogen free), mais ces oiseaux n'ont pas la possibilité d'acquérir une microflore normale. En pratique, le matériel fécal ou caecal initial provient d'un donneur conventionnel, il est utilisé pour établir la flore d'un poussin SPF. Celui-ci est alors testé pour la recherche d'éventuels pathogènes (97).

En 2002, EHRMANN *et al.* (45) ont montré que la microflore naturelle des volailles est une excellente source pour obtenir des souches probiotiques. Une batterie de tests simples peut permettre la sélection de souches candidates à l'intérieur d'un écosystème naturel (la microflore d'animaux sains) ou même dans une collection de souches.

Avec les techniques moléculaires basées sur l'ADN ribosomique, la caractérisation des flores (aérobies et anaérobies) est devenue beaucoup plus facile sans culture.

Des méthodes permettant d'évaluer les propriétés d'exclusion compétitive des souches ont été mises au point. Ces avancées sont importantes pour le développement des produits définis, seuls autorisés par les autorités européennes.

Les préparations indéfinies présentent une plus grande efficacité, probablement en rapport avec leur complexité et le fait qu'elles contiennent la plupart des éléments d'une microflore naturelle. Elles sont spécifiquement destinées aux animaux de la même espèce avec lesquels elles peuvent former une association stable. L'inconvénient réside dans l'obligation de dépister tous les pathogènes, ce qui est coûteux (la liste des pathogènes ayant plutôt tendance à s'allonger).

En raison de l'activité remarquable des flores indéfinies, l'Organisation mondiale pour la santé a défini une nouvelle catégorie de produits appelée « flore intestinale normale » dont la définition est la suivante :

« en relation avec le tractus intestinal aviaire, la flore intestinale normale est une préparation indéfinie de bactéries vivantes anaérobies strictes et facultatives, provenant d'oiseaux adultes normaux et en bonne santé, qui sont indemnes de germes pathogènes et dont la qualité est contrôlée. L'objectif de ce type de préparations est de compenser des déficiences dans la composition microbiologique de la flore intestinale en rapport avec le contrôle naturel des micro-organismes indésirables et les systèmes modernes de production avicole ».

BROILACT par exemple est une flore mucosale indéfinie partiellement caractérisée : elle contient 32 types différents de bactéries, avec 22 anaérobies stricts représentant 5 genres et 10 anaérobies facultatifs représentant 3 genres. En analysant ce type de produit, il apparaît que seuls les microorganismes représentant 1 p. cent ou plus de la population totale peuvent être isolés, à moins d'utiliser des milieux sélectifs. Il n'est de toute façon pas possible d'identifier tous les organismes présents.

Existent également sur le marché quelques autres produits dérivant de matériel caecal : (97) :

- CF3 → PREEMPT (29 types différents, 14 anaérobies stricts dans 7 genres, 15 facultatifs dans 7 genres)
- Mucosal Starter Culture®
- Avifree®
- Aviguard® (partiellement caractérisé)
- etc.

FUKUTA *et al.* (52) ont démontré l'effet positif de Broilact distribué à des poussins de un jour contre la colonisation par *Enteritidis* inoculées à l'âge de 7 jours. Lorsque l'inoculation par les salmonelles est faite à 21 jours d'âge, l'effet positif n'est plus significatif. Dans ces essais, l'ajout de fructo-oligosaccharides (FOS) améliore l'efficacité de la culture d'exclusion compétitive. Les FOS semblent conduire à une stimulation de la croissance des bifidobactéries et des lactobacilles lorsqu'ils sont distribués sur une longue période.

En 1998, BAILEY *et al.* (9) ont évalué un produit d'exclusion compétitive dans un essai terrain en milieu contaminé pour déterminer comment l'extension des salmonelles dans l'éclosoir affecte l'efficacité du traitement par les flores de barrière. Des poussins ayant eu un contact avec *Salmonella* Typhimurium par le moyen d'un œuf contaminé sur 67 (ou 1 sur 100) ont reçu la solution bactérienne 1) en spray ou 2) dans l'eau de boisson ou 3) en spray et dans l'eau de boisson, ou 4) par gavage oral. Il s'est avéré que 99p. cent des poussins (ou 96p. cent) étaient positifs en salmonelles à l'âge de 7 jours, et que le traitement d'exclusion compétitive (quel que soit le mode d'administration), dans ces conditions, n'a eu aucun effet protecteur sur les poussins. *A contrario*, des poussins n'ayant eu aucun contact avec les salmonelles, ont été totalement protégés en dépit de l'inoculation d'épreuve réalisée à l'âge de 2 jours.

ZIPRIN et DELOACH (163) ont utilisé des microflores caecales indéfinies qu'il a maintenues pendant deux ans par passage sur des pondeuses et des poulets de chair recevant une ration contenant 5p. cent de lactose : ces flores ont éliminées par exclusion compétitive des souches de Salmonelles fermentant le lactose ou ne fermentant pas le lactose. La colonisation par ces deux types de Salmonelles a été réduite même lorsque la flore d'exclusion compétitive était distribuée 3 jours après la contamination orale par les *Salmonella* Typhimurium.

STAVRIC (141) a montré que la flore digestive administrée peut être le contenu caecal des adultes ou une culture anaérobie de ce contenu. Les animaux à l'origine de la culture doivent être de la même espèce que ceux à traiter, mais il est possible d'observer une certaine protection croisée entre les poulets et les dindes.

Aucun mélange associant différentes cultures pures de bactéries anaérobies et aéro-anaérobies ne permet d'atteindre une protection aussi efficace que celle obtenue par l'utilisation de la flore complexe non définie. Les mélanges expérimentaux les plus efficaces contiennent environ 50 bactéries différentes et sont ainsi comparables aux flores fécales indéfinies en terme d'efficacité : ils peuvent conférer une protection contre des inoculations de  $10^4$  UFC de salmonelles par poussin (cependant à la différence d'une flore indéfinie, ils ne sont pas efficace sur les dindons).

En 1995, SPENCER et GARCIA (140) avaient testé du vermicompost (produit de la digestion par des lombrics de fèces fraîches de poulets SPF) en tant que traitement d'exclusion compétitive contre des salmonelles. Des poussins d'un jour, logés dans des enclos au sol, ont reçu le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> jour du vermicompost saupoudré sur l'aliment. L'inoculation avec *Salmonella* Typhimurium a été faite le 5<sup>ème</sup> jour avec  $10^4$  UFC. Les oiseaux ont été sacrifiés 7 à 9 jours plus tard. Le traitement a réduit significativement la colonisation caecale. L'inoculation avec  $10^5$  UFC de *Salmonella* Enteritidis sur des oiseaux entretenus sur grillage a abouti à une protection des oiseaux (un seul oiseau traité positif avec technique d'enrichissement contre 9 oiseaux non traités positifs sur 10).

Quatre types de préparations de flores intestinales indéfinies ont été testés sur des poussins de un jour par HOSZOWSKI et TRUSZCZYNSKI (72) pour déterminer leur pouvoir protecteur vis à vis de *Salmonella* Typhimurium ( $10^7$  UFC inoculées à l'âge de 3 jours) (voir Tableau 35) : per os, fécès fraîches de poules pondeuses, ou fécès cloacales lyophilisées, ou contenu caecal avec rinçage lyophilisé (à 1 jour ou 3 jours consécutifs dans l'eau de boisson) ou culture anaérobie de matériel caecal.

Le contenu caecal + le produit de rinçage des parois caecales, le tout lyophilisé, a donné les meilleurs résultats.

La distribution dans l'eau de boisson s'est révélée peu protectrice, sans doute à cause de l'effet négatif de l'oxygène sur les flores anaérobies.

La culture anaérobie a été moins protectrice que les fécès fraîches ou lyophilisées peut-être en raison de conditions anaérobies imparfaites.

Tableau 35 : Effet des différentes préparations sur le nombre de salmonelles dans le contenu caecal des poussins à 10 jours (72)

Groupe	Log10 <i>Salmonella</i> / g de contenu caecal	p. cent de poussins infectés	Facteur de protection
Contrôle	4.08 +/- 0.64	100	0
Fécès fraîches	0.61 +/- 1.06	50	6.7
Fécès lyophilisées	1.03 +/- 1.46	65	4
Contenu caecal + rinçage caecal lyophilisé	0.37 +/- 1.0	30	11
Contenu caecal + rinçage caecal lyophilisé dans l'eau de boisson 3 jours	1.05 +/- 1.22	50	3.9
Culture anaérobie	1.93 +/- 1.72	75	2.1
Nb : un facteur de protection inférieur à 4 est insuffisant			

#### IV.C.3.2. Préparations définies (les cultures pures)

Aucun mélange associant différentes cultures pures de bactéries anaérobies et aéro-anaérobies isolées du caecum d'oiseaux adultes, ne permet d'obtenir une protection équivalente à celle obtenue avec l'utilisation de la flore totale complexe non définie (141). Les mélanges définis dont l'efficacité est comparable aux cultures indéfinies contiennent environ 50 types différents, et offrent une protection contre une contamination de plus de  $10^4$  germes pathogènes par poulet.

Il apparaît en outre que :

- différents genres sont nécessaires pour obtenir l'effet protecteur.
- des mélanges contenant différentes souches du même genre, *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* par exemple, sont en général moins efficaces voire inefficaces
- la conservation des isolats en milieu de culture ou par la congélation diminue progressivement leur capacité protectrice en 14 à 36 mois ; elle peut être partiellement restaurée par passage in vivo.

Les préparations définies présentent l'énorme avantage de garantir l'absence de pathogène humain ou aviaire.

Sur le marché, on trouve quelques produits tels que PREEMPT®.

La difficulté réside dans l'identification des microorganismes clés pour les effets protecteurs :

- les mécanismes d'exclusion compétitive ne sont pas entièrement compris, et donc sur quelle base scientifique peut on sélectionner des souches potentiellement protectrices ?
- les milieux de culture pour l'isolement des éléments mineurs font défaut.

- seul un quart de la population bactérienne est parfaitement identifiée, et même pour cette fraction connue, les souches de référence ne sont pas toujours disponibles pour les chercheurs.

Certaines études, notamment celles de PASCUAL *et al.* (121), mettent en évidence une efficacité importante de certaines souches (*Lactobacillus salivarius* CTC2197 résistant à la rifampicine) utilisées seules contre *Salmonella* Enteritidis sur des poussins de un jour, comparativement à des mélanges de souches, réputés pourtant plus efficaces. Dans ces essais, des doses de  $10^5$  UFC/g étaient suffisantes pour assurer la présence de la souche dans le tractus intestinal une semaine après l'administration. Des doses plus importantes n'ont pas permis d'obtenir de meilleurs résultats. Quatre semaines après l'inoculation, il y a eu une chute des lactobacilles dans les groupes ayant reçu  $10^5$  ou  $10^7$  germes par gramme d'aliment, alors que le taux est resté stable chez les poulets ayant reçu de plus grosses doses. Le comptage des lactobacilles résistants à la rifampicine a mis en évidence l'élimination de la souche probiotique entre 21 et 28 jours, suggérant qu'une nouvelle administration serait nécessaire pour couvrir toute la période d'élevage.

En 1998, LINE *et al.* (94) ont étudié l'utilisation de *Saccharomyces boulardii* sur des poulets de chair avec  $3.2 \times 10^8$  UFC de *Salmonella* Typhimurium. La fréquence de colonisation des caeca a été réduite significativement (voir Tableau 36).

Tableau 36 : Utilisation de levures selon LINE *et al.* 1998 (94)

	Dose de levure distribuée <i>Saccharomyces boulardii</i>	Dose challenge <i>Salmonella</i> Typhimurium	Contamination par <i>Salmonella</i> après 3 semaines	Nombre moyen de salmonelles par g de contenu caecal
Lot 1	1g/ kg d'aliment	$3.2 \times 10^8$ UFC	20 p. cent	Log 0.35
Lot 2	100g/kg d'aliment		5 p. cent	Log 0.15
Lot témoin	Aliment sans additif		70 p. cent	Log 1.64

En 1997, EDEN *et al.* (44) ont montré la possibilité d'utiliser l'exclusion compétitive in ovo et après l'éclosion avec *Lactobacillus reuteri* sur des poulets et des dindons.

#### **IV.C.4. Polyvalence des flores**

Les salmonelles en élevage aviaire sont variées, les salmonelles utilisées pour les essais de laboratoire sont surtout représentées par les sérovars Enteritidis et Typhimurium, même si de très nombreuses souches ont été testées.

MEAD (97) a rappelé l'efficacité des flores de barrière sur des salmonelles non adhésives comme *Salmonella* Kedougou.

Néanmoins, le concept d'exclusion compétitive peut être appliqué à d'autres zoonoses digestives d'origine alimentaire, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* O157 notamment, qui infectent largement les troupeaux et peuvent être à l'origine d'entérites humaines majeures (97).

Certaines études comme celle de LA RAGIONE *et al.* (90) montrent une efficacité « polyvalente » sur plusieurs agents pathogènes : *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* et *Salmonella* Enteritidis. Les flores seraient alors plus généralistes que les vaccins.

#### **IV.C.5. Effet barrière sur le poussin**

Sur le terrain, l'exclusion compétitive a été utilisée en Suède depuis 1981 dans le programme national de contrôle pour les troupeaux de chair. Entre 1981 et 1990, 179 troupeaux ont été traités, représentant 3,82 millions de poussins. Un seul de ces troupeaux a été retrouvé positif à la suite du traitement. Le facteur très important ayant contribué au succès de cette étude de terrain est l'absence de salmonelle au niveau des couvoirs et un

haut niveau d'hygiène d'élevage. Au total, moins de 1p. cent des poulets se sont révélés contaminés par des salmonelles après abattage (157).

L'exclusion compétitive pour des poussins venant d'éclore a été beaucoup étudiée et démontrée dans des cadres expérimentaux divers.

L'inoculation de flore d'exclusion compétitive aux poussins a pour objectif d'établir rapidement une flore intestinale indigène qui résiste à la colonisation par *Salmonella spp.* L'efficacité de la prévention de l'infection semble dépendre : (61).

- de la culture d'exclusion compétitive utilisée,
- de l'âge au moment de l'exposition à la salmonelle,
- du nombre de salmonelles lors de l'exposition,
- de la salmonelle utilisée pour l'épreuve d'inoculation
- et peut-être de l'adjonction de divers additifs tels que le lactose, les fructo-oligosaccharides, etc.

En ce qui concerne les cultures d'exclusion compétitive utilisées, elles sont variées.

En 1999 PASCUAL *et al.* (121) ont étudié une souche de *Lactobacillus salivarius* (CTC 2197) pour la prévention de la colonisation par *Salmonella* Enteritidis C-114. Le probiotique a été donné à l'âge de un jour par gavage oral et le pathogène a été complètement éliminé après 21 jours. Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque le probiotique était distribué dans l'eau ou la nourriture à la dose de  $10^5$  UFC/g : en une semaine, le tractus gastro-intestinal était colonisé avec persistance entre 21 et 28 jours, ce qui démontre que le renouvellement du traitement est nécessaire pour couvrir la période de production. Cette souche montre toutefois une sensibilité à la chaleur notamment pendant la phase de stockage et en chambre d'éclosion, ce qui rend son utilisation délicate.

En 2001, TELLEZ *et al.* (143) ont testé une flore aviaire à base de *Lactobacillus acidophilus* et *Streptococcus faecium*, combiné à des anticorps anti-Enteritidis, anti-Typhimurium et anti-Heidelberg (AVIAN PAC PLUS) sur des poussins de chair : spray à l'éclosoir et dans l'eau de boisson durant les trois premiers jours dans l'élevage. Il a obtenu une différence significative par rapport à un lot témoin non traité, sur la colonisation caecale et l'invasion des organes internes (rate et foie) par *Salmonella* Enteritidis. Il n'y a pas eu de différence significative sur le poids corporel moyen entre les deux lots d'oiseaux.

En 2000, AUDISIO *et al.* (5) ont démontré l'effet préventif d'une souche d'*Enterococcus faecium* J96 produisant de l'acide lactique et une bactériocine sur des poussins âgés de 30 heures et l'absence d'effet thérapeutique lorsque l'administration est effectuée après la contamination d'épreuve par *Salmonella* Pullorum.

En 2002, NAKAMURA *et al.* (111) ont étudié l'action d'Aviguard® sur l'infection par *Salmonella* Enteritidis et Typhimurium et les conséquences sur la réponse en anticorps vis-à-vis de ces pathogènes. Il a montré que ce produit protège bien les oiseaux de la colonisation par ces 2 salmonelles malgré des doses challenge importantes. Contrairement aux résultats de HOLT *et al.* (70), la réponse en anticorps est importante contre les salmonelles de challenge. Le taux d'anticorps produits contre les salmonelles (Typhimurium ou Enteritidis) n'est pas significativement différent pour les oiseaux traités par Aviguard et les oiseaux non traités.

En 2003, LA RAGIONE et WOODWARD (90) ont testé une souche de *Bacillus subtilis* PY 79 sur des poussins de un jour et de 20 jours. Les poussins ont reçu 24h avant l'inoculation d'épreuve par *Salmonella* Enteritidis, une dose de  $10^9$  spores de *Bacillus subtilis*, métaboliquement inertes. Cette dose unique a suffi à contrôler la colonisation et la persistance de *Salmonella* Enteritidis et de *Clostridium perfringens*, ainsi que l'excrétion fécale des salmonelles pendant les 36 jours de l'expérience. Durant cette période, les *Bacillus* persistent en diminuant.



En 2003, DAVIES et BRESLIN (36) ont testé un traitement d'exclusion compétitive (Aviguard Bayer) dans des élevages liés à un épisode de salmonellose humaine à *Salmonella* Enteritidis phage type 29 et a montré la diminution rapide des salmonelles dans l'environnement de l'élevage et du centre de conditionnement des œufs. Le traitement n'a pas eu d'incidence sur la séroprévalence des anticorps du jaune d'œuf. Le traitement n'a pas modifié les réactions immunitaires. Enfin la contamination de l'environnement ne s'est pas étendue aux endroits non contaminés malgré l'absence de précaution pour éviter la transmission horizontale.

#### **IV.C.6. Probiotiques**

Pour les probiotiques, les aléas sont sans doute liés à l'incapacité à coloniser ou survivre au-delà d'un certain délai dans le tractus gastro-intestinal.

En 2002, PANDA *et al.* (118) ont utilisé sur des poules pondeuses de 28 semaines un probiotique contenant *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Aspergillus oryzae*, *Streptococcus faecium* et *Torulopsis spp.* Le produit a amélioré la production d'œufs et l'épaisseur des coquilles mais aucun effet sur l'immunité n'a pu être noté.

En 2001, BALEVI *et al.* (10) ont testé un probiotique (Protexin®) et a obtenu des résultats favorables sur la consommation alimentaire, l'efficacité alimentaire et la coquille des œufs pour une incorporation de 500ppm, alors que des incorporations à 250 ou 750ppm n'ont pas donné de différences significatives sur ces critères. Enfin à 250, 500, ou 750ppm aucune influence significative sur les réponses immunitaires périphériques n'a été obtenue.

Les preuves obtenues sur le terrain de l'efficacité de probiotiques chez les poules adultes proviennent également du Royaume-Uni et des Pays-Bas. Dans les deux pays, un traitement antibiotique était appliqué à des troupeaux dont on savait qu'ils étaient infectés et les poules étaient ensuite inoculées avec des cultures d'exclusion compétitive. L'inoculation de flore d'exclusion compétitive à des poules était destinée à restaurer rapidement la flore intestinale – détruite par le traitement antibiotique – afin d'aider les poules à résister à de futures expositions à *Salmonella*.

Au Royaume-Uni, 20 sur 22 essais associant traitement avec antibiotiques et traitement d'exclusion compétitive ont réussi à empêcher la réinfection des troupeaux pendant une période d'étude de 3 mois (61). L'état infectieux était déterminé à partir d'échantillons de prélèvements effectués dans le cloaque des troupeaux traités.

Aux Pays-Bas, l'association des traitements antibiotiques et d'exclusion compétitive a permis d'empêcher la réinfection de 72p. cent (n =32) des troupeaux. Deux de ces traitements associés évitaient la réinfection dans 93p. cent des troupeaux.

#### **IV.C.7. Flores et antibiotiques**

##### **IV.C.7.1.Essais comparatifs flores/antibiotiques**

En 2000, ZULKIFLI *et al.* (164) ont comparé la supplémentation en *Lactobacillus* (1g/ kg) à celle en oxytétracycline (50 mg/kg) et à un régime normal sur deux souches d'oiseaux soumises à un traitement par la chaleur (Exposé à 36°C de 21<sup>ème</sup> au 42<sup>ème</sup> jours)

Il a comparé les résultats pour les critères suivants :

- l'efficacité alimentaire avant le traitement par la chaleur (jours 1 à 21) est meilleure pour les oiseaux ayant reçu *Lactobacillus* mais seulement pour une seule des 2 souches (HH)
- le poids corporel et gain de poids de j21 à j42 sont meilleurs pour les oiseaux recevant *Lactobacillus*
- la production d'anticorps à j42 est meilleure pour une des deux souches recevant *Lactobacillus* (HH) (aucun effet à j21)
- la mortalité n'est pas modifiée par les différentes diètes.

#### IV.C.7.2. Thérapie combinée antibiotique/flores

Les flores d'exclusion compétitive sont utilisées sur des animaux âgés, suite à une thérapie antibiotique visant à éliminer les salmonelles invasives : la flore distribuée sert alors à restaurer la microflore de manière la plus proche possible de la flore initiale. Dans cette situation, les bonnes pratiques d'élevage doivent être rigoureuses pour garantir le succès du traitement.

SEO *et al.* (138) ont évalué cette méthode dans des conditions de laboratoire pour la prévention des infections persistantes par *Salmonella* Enteritidis chez les poussins de un jour en utilisant l'enrofloxacin et un produit d'exclusion compétitive (Aviguard).

Le produit d'exclusion compétitive a prouvé dans un premier temps son efficacité pour réduire le nombre de salmonelles (challenge de  $1,5 \cdot 10^6$  UFC par oiseau à 2 jours d'âge) dans les caeca à 4 semaines et 8 semaines post infection par rapport au groupe témoin.

Dans un deuxième temps, le traitement d'exclusion compétitive combiné à l'utilisation d'enrofloxacin n'a pas permis de détecter de salmonelles 10 semaines après l'infection challenge (voir Tableau 37).

Tableau 37 : Effet des différents traitements sur l'infection précoce des poussins avec *Salmonella* Enteritidis

	Nombre de salmonelles (log10 UFC/g)					
	8 semaines post infection			10 semaines post infection		
	témoins	Enro seule	CE + Enro.	témoins	Enro seule	CE + Enro.
Foie	0	0	0	0	0	0
Rate	0	0	0	0	0	0
Caecum	2.8 +/- 2.0 (80 p. cent)	2.4 +/- 1.4 (100 p. cent)	1.0 +/- 1.6 (40 p. cent)	2.6 +/- 1.8 (80 p. cent)	0.8 +/- 1.4 (30 p. cent)	0 (0 p. cent)

CE : culture d'exclusion compétitive

(x p. cent) : pourcentage d'animaux positifs en culture sur 10 oiseaux sacrifiés à chaque échantillonnage.

Enfin dans un troisième temps, l'utilisation d'enrofloxacin (10 mg/kg) pendant 10 jours, suivie d'administration du produit d'exclusion compétitive (2 doses) puis d'une dose de  $10^7$  UFC de salmonelles sur des animaux présentant une infection persistante au départ, a permis de protéger les oiseaux de la réinfection par les salmonelles dans 40p. cent des cas (voir Tableau 38).

Tableau 38 : Effet des deux procédés sur la réinfection par *Salmonella* Enteritidis

Organes	Nombre de salmonelles (log10UFC/g)	
	Produit d'exclusion compétitive + enrofloxacin	Enrofloxacin seule
Foie	0	0
Rate	0	0
Caecum	1.5+/- 1.8 (50 p. cent d'oiseaux +)	2.2+/- 1.7 (88 p. cent d'oiseaux +)

Les chercheurs concluent que le traitement d'exclusion compétitive pourrait être envisagé préventivement dans les situations dans lesquelles la flore intestinale a été sérieusement perturbée par un traitement antibiotique ou par un stress important comme l'induction de la mue. Ils rappellent que l'effet des cultures d'exclusion sera optimal si le traitement antimicrobien précédent a éliminé les salmonelles le plus complètement possible.

*In ovo* dans les conditions d'essais de laboratoire, l'usage d'antibiotique peut gêner l'usage de flore d'exclusion compétitive, mais EDENS *et al.* (44) ont montré que l'utilisation conjointe était possible en administrant les additifs dans des compartiments séparés de l'œuf.

#### **IV.C.7.3. Action des antibiotiques sur les flores**

Certains antibiotiques peuvent déséquilibrer la flore commensale :

- les macrolides, les pénicillines,
- ou des facteurs de croissance comme l'avoparcine, la tylosine,
- ou des coccidiostatiques comme la nicarbazine.

D'autres comme les tétracyclines ou les quinolones n'ont pas ou peu d'action sur l'équilibre des flores intestinales (133).

La consommation d'antibiotiques entraîne une dégradation de la symbiose hôte /flore commensale en facilitant, notamment, la colonisation par des pathogènes. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Bacteroides* y sont particulièrement sensibles. Dès que le traitement a cessé, la place est libre pour l'infection par certains pathogènes si l'hygiène d'élevage n'est pas suffisante.

L'avoparcine (désormais interdite) peut même augmenter le portage caecal des salmonelles chez des poussins traités avec une flore d'exclusion compétitive puis contaminés par *Salmonella ssp* (97).

#### **IV.C.8. Flores et bactériophages**

L'utilisation de bactériophages spécifiques des salmonelles a été étudiée pour des traitements combinés avec des produits d'exclusion compétitive. Les bactériophages lytiques infectent la cellule bactérienne et se multiplient à l'intérieur du cytoplasme jusqu'à la mort de la bactérie et sa lyse, largant ainsi de nouvelles particules bactériophages infectantes. La résistance aux bactériophages se développant rapidement dans une population bactérienne, il est choisi d'utiliser un cocktail de ces virus.

TORO *et al.* (145) ont testé un procédé où le produit d'exclusion compétitive était utilisé seul ou avec un cocktail de bactériophages. Le but d'une telle association était d'obtenir un résultat supérieur à celui obtenu avec l'utilisation de produit d'exclusion compétitive seul. La synergie n'est pas apparue évidente aux chercheurs et ils en ont conclu à la nécessité d'effectuer des recherches supplémentaires avant de pouvoir recommander l'utilisation combinée des bactériophages et de produits d'exclusion compétitive comme alternative aux traitements antibiotiques.

#### **IV.C.9. Pouvoir protecteur**

La protection ne dépend pas de la race, de la souche ou du sexe des oiseaux. Elle s'exerce contre de nombreux sérotypes de salmonelles, incluant des sérotype invasifs.

Il existe une certaine protection croisée entre poules et dindons. Une protection des poussins par de la flore de canard a également été rapportée, mais aucune autre espèce ne semble convenir. De même, il n'existe pas de protection croisée avec mouton, vache, cheval ou rat. (97)

Dans le cas de l'exclusion compétitive, il semble que les flores soient relativement inefficaces contre *Salmonella Gallinarum* qui cause tout d'abord une infection systémique avant de coloniser les *caeca*.

Avec les salmonelles provoquant des toxiinfections alimentaires, un haut degré de protection peut être démontré, bien qu'il soit rarement absolu.

Une fois que la microflore de barrière est acquise par le poussin, elle semble devoir être conservée pendant toute la vie du lot, à moins qu'elle ne soit déséquilibrée par un traitement antibiotique ou un stress.

Bien que la protection puisse être débordée sur des poussins contaminés avec  $10^8$  salmonelles ou plus, le traitement d'exclusion compétitive peut conduire à des niveaux très bas de salmonelles.

HUME *et al.* (74) ont démontré un pouvoir protecteur important sur des poussins ayant reçu la culture d'exclusion compétitive (PREEMPT®) le jour de l'éclosion, avec des doses de  $10^2$  et  $10^4$  UFC *Salmonella* Typhimurium inoculées seulement 4 heures après.

Il est très important de pouvoir administrer les flores de barrière avant toute contamination par des salmonelles.

Une étude de BAILEY *et al.* (9) ont clairement montré qu'une pré-exposition à des salmonelles avant le traitement d'exclusion compétitive peut réduire substantiellement la protection qui pourrait être obtenue sans cette pré-exposition, mais également qu'une infection existante peut être réduite par le traitement d'exclusion compétitive.

Des chercheurs (GAST *et al.* (58), HOLT *et al.* (70), SEO *et al.* (138)) s'accordent à dire qu'en réduisant le nombre de salmonelles caecales aux stades précoces de la vie des volailles, on réduit ainsi les infections persistantes (excrétion intermittente de salmonelles pendant au moins 24 semaines, alors que l'entrée en ponte débute vers la 20<sup>ème</sup> semaine) qui caractérisent les animaux contaminés très jeunes, réduisant d'autant la contamination de la chaîne et le risque de contamination des oeufs.

Il apparaît en outre, que le traitement de toutes les bandes successives dans un élevage présente un bénéfice cumulatif, en réduisant le pool de salmonelles de l'environnement de l'élevage.

Plus récemment a été mis en évidence l'intérêt du lactose (ou d'autres sources d'hydrates de carbones) pour les flores d'exclusion compétitive, pour réduire la colonisation par *Salmonella* Typhimurium (diminution du pH du caecum) à la concentration de 2.5p. cent dans l'eau de boisson (68).

Dans des conditions d'élevage de rente, l'installation de la microflore commensale du poussin ou le bénéfice du traitement d'exclusion peuvent être très diminués par des facteurs variés de stress, mais peu d'études ont été conduites dans ce domaine. Il peut s'agir d'une exposition à des températures extrêmes, à des agents infectieux, une privation de nourriture ou d'eau. A l'âge de 2 semaines, ce type de stress n'altère plus l'équilibre de la flore installée chez des poussins traités. Il est donc important d'éviter tout stress pendant cette période critique de l'établissement de la microflore (156).

Pour mémoire, l'utilisation des antibiotiques dans le cadre de la prophylaxie, de la thérapie ou comme promoteurs de croissance est également un facteur qui peut influencer l'efficacité en déséquilibrant la flore.

#### **IV.D. L'usage des flores bactériennes.**

##### **IV.D.1. Sécurité**

##### **IV.D.1.1. Santé et bien être animal**

Pour un usage prophylactique, les oiseaux doivent être exempts de salmonelles avant le traitement. Dans le cas contraire, l'effet sera nul ou minimal avec simple diminution du niveau d'infection.

Par ailleurs l'utilisation de flore de barrière indéfinie pourrait conduire à la transmission de bactéries pathogènes (121).

Les flores de barrière doivent donc être exemptes des germes pathogènes connus pour les volailles. L'absence de ces germes doit être vérifiée. Il s'agit de :

##### **► Bactéries**

*Campylobacter spp*

*Clostridium botulinum, colinum, difficile, perfringens A et C*

*Erysipelothrix rhusiopathiae*

*Escherichia coli* entéropathogènes : O1, O2, O157  
*Haemophilus paragallinarum*  
*Listeria spp*  
*Salmonella spp*  
*Pasteurella spp*  
*Shigella spp*  
*Staphylococcus aureus*  
*Vibrio cholerae*  
*Yersinia spp*  
*Ornithobacterium rhinotracheale*

► Mycoplasmes

*Mycoplasma gallisepticum*  
*Mycoplasma synovia*  
*Mycoplasma meleagridis*  
*Mycoplasma iowae*

► Virus

Adénovirus aviaires  
Virus de l'encéphalomyélite  
Virus de la bronchite infectieuse  
Virus de la maladie de Gumboro  
Virus de l'influenza aviaire A  
Virus de la leucose lymphoïde type A et B  
Coronavirus néphropathogène  
Réovirus aviaire  
Virus de la réticuloendothéliose aviaire  
Virus de l'anémie infectieuse  
Virus du syndrome chute de ponte  
Virus de la variole aviaire  
Virus de la laryngotrachéite infectieuse  
Virus de la maladie de Marek  
Virus de la rhinotrachéite de la Dinde  
Virus de la maladie de Newcastle  
(133)

#### **IV.D.1.2.Santé publique**

En premier lieu, les flores d'exclusion compétitive doivent être exemptes de tout germe potentiellement pathogène pour l'Homme. Les germes pathogènes sont faciles à identifier et ne posent guère de problème aux industriels.

Le problème réside plutôt dans les populations humaines à risques telles que les personnes immunodéprimées, pour lesquelles il est difficile de définir les critères pour les germes pathogènes. Les Enterococci, par exemple, considérés hier comme des commensaux ubiquistes, sont aujourd'hui reconnus comme des pathogènes opportunistes potentiels, représentant une éventuelle menace pour ces catégories de la population.

En second lieu, l'antibiorésistance de certaines souches, *Lactobacillus salivarius* à la rifampicine par exemple, peut permettre de différencier les souches indigènes des souches administrées. Pour autant cette antibiorésistance présente un risque pour la santé humaine, d'autant plus qu'elle concerne un antibiotique réservé à l'usage humain. Ces antibiorésistances peuvent en effet être transférées à d'autres organismes, notamment des pathogènes humains.

#### **IV.D.2. Programmes de maîtrise et l'efficacité des flores**

Selon le rapport de la FAO, les effets du traitement d'exclusion compétitive sont difficiles à chiffrer sur la base des données de terrain.

La Suède, la Finlande, les Pays-Bas, par exemple, incluent l'exclusion compétitive dans leurs programmes de lutte contre *Salmonella* pour les poussins d'élevage. Ce traitement ne constitue cependant qu'un élément de ces programmes et ses effets ne peuvent être aisément distingués des autres éléments.

En Suède les flores d'exclusion compétitive (Broilact®) ont été utilisées depuis 1981 dans le cadre du programme de contrôle des salmonelles. De 1981 à 1990, des flores ont été distribuées dans 179 élevages ayant subi un épisode de salmonellose, à raison de 2 bandes consécutives traitées par élevage touché, soit 3.82 millions d'animaux. Un seul parmi les troupeaux soignés, a été testé positif avant l'abattage. Un essai réalisé dans les conditions du terrain a même montré l'efficacité de la flore lors d'une contamination salmonellique par les aliments distribués aux volailles (157).

En France, l'utilisation des flores de barrière n'est pas prévue dans le cadre du programme maîtrise des salmonelles, mais n'est pas interdite.

#### **IV.D.3. Antibiorésistance et flores**

Comme les souches vaccinales et leurs marqueurs, les bactéries qualifiées de probiotiques peuvent être porteuses de gènes de résistance aux antibiotiques, éventuellement transférables par des vecteurs plasmidiques à des bactéries pathogènes de passage dans le tube digestif. Des chercheurs ont vérifié cette possibilité en analysant les résistances de 62 souches de *Lactobacillus* à 25 agents antimicrobiens. Il s'agissait de différentes espèces de *Lactobacillus* : *plantarum/pentosus*, *L.rhamnosus*, *L.paracasei*, *L.sakei*, *L.curvatus* et des représentants des *L.acidophilus*, comme *L.johnsonii*, *L.crispatus*, *L.gasseri* et *L.acidophilus* lui-même. Il ressort que la sensibilité aux antimicrobiens est espèce-dépendante. Des résistances de niveaux très variables en fonction des espèces ont ainsi été mises en évidence à la vancomycine, téicoplanine, tétracycline, norfloxacin, ciprofloxacine, acide fusidique et clindamycine. Les chercheurs suggèrent donc la détermination de CMI (concentration minimale inhibitrice) et recommandent d'effectuer des dépistages avant de commercialiser un probiotique (34). Cela est de toute façon prévu dans la réglementation européenne pour les additifs destinés aux animaux

#### **IV.D.4. Procédure d'autorisation des additifs**

Le dossier de demande d'AMM est identique à celui d'un vaccin (cf. III.D.2)

#### **IV.D.5. Usages**

Le mode d'administration dépend du type d'animaux concerné, sachant que l'effet maximal d'exclusion compétitive sera obtenu par des administrations de courtes durées, avant des expositions potentielles aux salmonelles.

##### **IV.D.5.1.Aux différents étages de la filières**

Les flores s'utilisent

- au démarrage,
- entre le 15<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> jour d'élevage
- et lors des périodes de déséquilibre microbien (changement d'aliment, stress...).

##### **IV.D.5.1.1.Sur les poussins**

Des administrations en spray à l'éclosoir sont plus efficaces que des distributions dans l'eau à l'arrivée dans l'élevage. Idéalement la microflore doit être administrée le plus tôt possible avant toute exposition aux salmonelles. Il faut de plus que les poussins traités ne soient pas porteurs de salmonelles, auquel cas, l'efficacité du traitement est diminuée (9).

- En spray au couvoir : c'est la méthode de choix (97). Les bactéries probiotiques sont rapidement ingérées car les oiseaux se lissent naturellement les plumes après l'arrosage en spray. Ce réflexe de lissage est augmenté en présence d'une lumière

vive faisant scintiller les gouttelettes. Ce procédé ne permet pas la prévention des infections survenant pendant les derniers stades de l'incubation.

- Dans l'eau de boisson à l'arrivée dans l'élevage, mais cela peut déjà être trop tard compte tenu du délai entre l'éclosion et l'arrivée dans le bâtiment d'élevage. De plus, certains poussins peuvent ne pas boire la quantité nécessaire et la protection est alors hétérogène au sein du troupeau. La viabilité des bactéries anaérobies, essentielles pour l'effet protecteur, n'est pas évidente dans l'eau, même si la présence d'anaérobies facultatifs permet de prolonger leur survie. Les précautions à prendre sont les mêmes que pour une vaccination à vaccin vivant. L'administration en spray au couvoir combinée à une distribution dans l'eau de boisson à l'arrivée dans l'élevage peut permettre d'améliorer l'assurance d'un traitement adéquat pour chaque poussin.
- Ou par gavage directement dans le jabot : cette méthode semble peu applicable en élevage industriel
- Au laboratoire, la technique par injection *in ovo* durant l'incubation est possible : ce type de traitement peut toutefois diminuer l'éclosabilité. EDENS *et al.* (44) en 1991 ont testé avec succès *Lactobacillus reuteri in ovo* sur des poulets et des dindons dans la lutte contre les salmonelles. Mais peu de souches sont utilisables *in ovo*. En effet, certaines bactéries intestinales utilisables après l'éclosion produisent des gaz, des toxines, des molécules protéolytiques néfastes *in ovo*).

#### **IV.D.5.1.2. Sur les futurs reproducteurs**

Il s'agit alors d'une distribution de probiotiques (2 à 4 jours en général après le transfert) faisant suite à un traitement antibiotique dans un parquet contaminé et un transfert dans un bâtiment propre.

Ce type de traitement peut être tenté sur les reproducteurs de la filière chair, mais n'est pas autorisé en filière ponte. Il peut permettre de surseoir à l'abattage total d'un troupeau reproducteur.

La méthode usuelle est la distribution dans l'eau de boisson

#### **IV.D.5.1.3. Sur les poulettes et les poules**

En 1998, CHEN *et al.* (28) ont comparé différents modes d'administration, différentes dilutions pour conclure à la supériorité de la méthode combinant la voie orale et la voie respiratoire (par diffusion au moyen d'un spray), sur les méthodes utilisant soit le spray seul ou la distribution par gavage seule. De même une dilution de la culture initiale à  $10^{-6}$  a produit les mêmes effets que la culture elle-même.

La distribution dans l'aliment est plutôt utilisée pour la distribution de probiotique pour le maintien de l'équilibre de la flore intestinale. Les probiotiques sont autorisés et utilisés en tant qu'additifs alimentaires et ne peuvent être administrés individuellement dans l'eau de boisson ou en pâte orale, ni être apporté en traitement de choc. Ce ne sont pas des médicaments. Leur rôle est clairement de préserver la flore intestinale fonctionnelle, accélérer le retour à la normale après un trouble digestif et/ou un traitement antibiotique.

#### **IV.D.5.2. Doses**

CORRIER *et al.* (33) ont testé différents dosages sur des poussins de chair de un jour pour un challenge à *Salmonella* Typhimurium à  $10^4$  UFC à j3 :  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$  UFC d'une culture d'exclusion compétitive anaérobie définie. Le dosage minimal pour l'efficacité est  $10^7$  UFC /oiseau et l'efficacité augmente progressivement jusqu'à  $10^8$  UFC (sur la base de recherche de salmonelles dans les caeca).

PASCUAL *et al.* (121) ont conclu, avec 3 concentrations différentes  $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  UFC/g d'aliment) de *Lactobacillus salivarius* CTC2197 que  $10^5$  UFC/g d'aliment étaient suffisantes pour obtenir les effets les plus importants (présence de la souche une semaine après l'inoculation). De plus fortes doses n'ont pas donné de meilleurs résultats.

En 2003, BIELKE *et al.* (21), testant une méthode de sélection des souches probiotiques in vitro, ont pu constater que la plus faible dilution de microflore (10 UFC) était suffisante pour obtenir la meilleure protection contre une inoculation d'épreuve avec  $10^2$  à  $10^3$  UFC d'une souche *Salmonella* PT 13A 48 heures après.

#### **IV.D.5.3.Conservation**

MEAD (97) pense que la viabilité des bactéries lors de l'administration orale est également très importante, d'où l'importance capitale des conditions de conservation des produits commerciaux.

La congélation ou la lyophilisation avec du glycérol ou du lait écrémé comme agents cryoprotecteurs sont de bonnes méthodes pour la conservation des souches probiotiques en laboratoire (121). Après plus d'un an de conservation dans ces conditions, une culture anaérobie montre la même efficacité que des fèces fraîches (4).

Il semble toutefois que les produits définis n'aient pas la même stabilité dans le temps que les mixtures indéfinies (99).

A la ferme ou au couvoir, les flores sont des additifs très sensibles aux conditions de stockage, notamment aux conditions de température.

Le premier produit d'exclusion compétitive mis sur le marché (BROILACT®) était une suspension mais sa faible durée de vie a limité son usage. D'autres produits commerciaux ont été développés et ont un plus long délai d'utilisation. Ce sont des produits lyophilisés utilisables en spray ou dans l'eau de boisson (111).

#### **IV.D.5.4.Techniques**

##### **IV.D.5.4.1.Dans l'eau de boisson**

Les flores doivent être dissoutes dans de l'eau ne contenant ni chlore, ni iode (bactériostatique), ni désinfectant, ni antibiotique. Si l'eau de l'adduction est utilisée, l'ajout de thiosulfate de sodium à la dose de 16 mg/litre permet de neutraliser le chlore comme dans le cadre d'une vaccination. La dissolution doit être effectuée environ une heure avant emploi dans de l'eau à température comprise entre 20 et 35°C.

##### **IV.D.5.4.2.En spray**

Soit dans les salles d'éclosion soit dans les boîtes de livraison, en utilisant des buses permettant de produire des gouttes de 1 mm de diamètre (97).

#### **IV.E. Prébiotiques et symbiotiques**

Les recherches les plus récentes ont abouti à la mise en évidence des symbiotiques qui sont des associations synergiques d'une souche probiotique et d'une source nutritionnelle appelée prébiotique, valorisée par la bactérie d'exclusion compétitive.

Cette autre approche consiste à favoriser l'activité et/ou le développement de certaines bactéries bénéfiques naturellement présentes dans l'intestin en utilisant des prébiotiques, naturellement présents dans l'alimentation ou ajoutés.

En effet les bactéries intestinales fermentent des composés présents dans leur environnement naturel, tels que certains constituants du mucus intestinal et des substances non digérées dans la partie supérieure du tractus gastro-intestinal. De plus certains de ces composés peuvent être spécifiquement utilisés par les bactéries bénéfiques.

Le prébiotique est donc un promoteur du développement du microorganisme probiotique.

Un prébiotique est un ingrédient alimentaire non digestible qui exerce une action bénéfique sur la santé en stimulant sélectivement la croissance et/ou l'activité métabolique d'une ou d'un nombre limité de bactéries de l'intestin (137).

Les prébiotiques sont des composés qui agissent comme substrats sélectifs sur la croissance de bactéries bénéfiques dans le gros intestin. Ces composés ne doivent pas être

hydrolysés ni absorbés dans le tractus digestif supérieur, ils doivent agir comme substrat sélectif d'une ou d'un nombre restreint de bactéries bénéfiques qui résident dans le côlon et en stimuler la croissance, et ils doivent pouvoir modifier la flore du côlon afin d'en assainir la composition, en plus d'offrir des effets systémiques ou luminaux aptes à améliorer la santé de l'organisme hôte. Les principaux substrats de croissance bactérienne sont les glucides alimentaires non digérés dans le tractus digestif supérieur.

Cependant, ces glucides peuvent servir à la croissance de plusieurs espèces bactériennes. Au cours des dernières années, on a reconnu des propriétés prébiotiques à plusieurs substances. C'est le cas, notamment, des nouveaux sucres utilisés dans les aliments, comme l'inuline et l'oligofructose (FOS ou fructo-oligo-saccharide).

Plusieurs études démontrent que ces sucres ne se dégradent pas dans le tractus digestif supérieur et qu'ils sont intacts à leur arrivée dans le côlon, dont la microflore tire parti. Les oligofructoses sont des composés présents naturellement et en abondance dans plusieurs plantes dont la chicorée, les oignons, les asperges et les tomates. Ils sont faits d'une molécule de glucose à laquelle plusieurs molécules de fructose sont associées. L'inuline a généralement un taux de polymérisation supérieur à celui des oligofructoses. Comme les humains et les animaux sont dépourvus des enzymes nécessaires à l'hydrolyse de ces glucides, ceux-ci parviennent intacts au côlon, où la présence de bactéries, comme les bifidobactéries, provoque leur fermentation (130).

Le mot « symbiotique » est de plus en plus utilisé pour exprimer la relation synergique entre des bactéries bénéfiques viables et leurs substrats sélectifs. Selon la symbiotique, l'aliment ou le supplément alimentaire comprend non seulement les cellules vivantes de bactéries bénéfiques, mais aussi un substrat sélectif. L'idée sous-jacente est que les cellules bactériennes bénéfiques qui survivent au passage dans l'estomac peuvent croître rapidement et affronter la concurrence grâce à la présence du substrat sélectif, puis établir leur prépondérance.

#### **IV.F. Flores bactériennes pour coloniser les bâtiments**

A la suite de la désinfection, la recontamination d'un bâtiment avicole se fait en quelques jours, non pas par des apports extérieurs comme la litière par exemple, mais par l'intermédiaire du biofilm des parois, véritable mémoire du microbisme de l'élevage.

Toute surface exposée à l'air est colonisée ou recolonisée très rapidement par des bactéries. Celles-ci vont constituer un biofilm dont la nature précise n'est pas déterminée, mais contenant un échantillonnage de la flore présente dans l'environnement à ce moment. En élevage, le principe est le même : toutes les surfaces (bâtiments, installations) sont recouvertes d'un biofilm constitué de nombreuses souches bactériennes, dont des pathogènes : c'est le « biofilm négatif ».

D'où la perspective d'utiliser des flores bactériennes pour coloniser le bâtiment avant sa recontamination par des bactéries pathogènes, selon le même principe que celui des flores de barrière.

L'utilisation de flores bactériennes consiste donc à recouvrir le biofilm négatif d'un autre biofilm de composition connue, dont les micro-organismes sont choisis en fonction de leur activité bactéricide vis-à-vis des pathogènes présents en élevage. Une fois installé, ce biofilm, qualifié de « biofilm positif », devra empêcher le relargage de pathogènes provenant du biofilm négatif qui lui ne peut pas être détruit (124).

Il est nécessaire, pour utiliser ces flores, de faire baisser le niveau des bactéries pathogènes entre deux lots : décapage et désinfection sont les deux premières étapes à envisager. L'application se fait ensuite avant l'arrivée des poulettes, à l'aide d'un pulvérisateur, à une pression de 4 bars afin de ne pas détruire les germes du complexe biofilm.

Le traitement des fientes, des litières est également possible.

#### **IV.F.1. Bâtiment et matériel**

Les complexes bactériens doivent être dissous dans de l'eau non chlorée, sans produit bactéricides ou bactériostatiques. La solution doit être pulvérisée à une pression inférieure à 4 bars, sous forme de fines gouttelettes sur les surfaces nettoyées et désinfectées. Après application, il faut laisser sécher et refaire une pulvérisation 24 à 48 heures plus tard. Il faut à nouveau laisser sécher avant l'introduction des animaux.

#### **IV.F.2. Litière**

Après curage et nettoyage complet du bâtiment, il faut attendre trois jours après désinfection (sans chaux vive) et épandre directement sur le sol le complexe bactérien à raison de 25 g/m<sup>2</sup> en élevages de pondeuses et reproducteurs (15 g/m<sup>2</sup> en chair). Il faut ensuite mettre la litière en place et procéder à une autre application aux mêmes doses. Il ne faut plus remuer la litière. Par la suite, il faut pailler en fonction des besoins avant que la litière ne devienne humide et une fois par semaine, épandre la flore après le paillage sur toute la surface du bâtiment à raison de 10 g/m<sup>2</sup>.

#### **IV.G. Conclusion**

La flore intestinale joue un rôle essentiel chez l'animal.

L'objectif de son utilisation est de bénéficier de ses effets protecteurs comme l'effet barrière (sur le poussin), l'effet probiotique (développement et modulation du système immunitaire), tout en minimisant ses effets néfastes (métabolites toxiques, compétition nutritionnelle avec l'hôte, coût métabolique pour l'hôte du fait du développement plus important de l'intestin et du système immunitaire activé en permanence, effet négatif sur la nutrition minérale).

Ces effets positifs ou négatifs varient en fonction de la composition de la flore (aérobie, anaérobie stricte ou facultative, adhésivité, naturelle indéfinie ou définie) qui elle-même varie en fonction de nombreux paramètres. Il s'agit d'un équilibre complexe (voir Figure 14) qui doit encore faire l'objet de recherches pour pouvoir le maîtriser et l'orienter pour le bénéfice de l'animal, du système de production et du consommateur.

Les flores bactériennes présentent l'avantage d'un effet protecteur contre un éventail plus large de sérovars de salmonelles, voire d'autres bactéries pathogènes. Elles ont de manière générale un effet promoteur de l'immunité non spécifique.

Les flores probiotiques démontrent en outre un effet intéressant sur la qualité de la coquille qui constitue la porte d'entrée des salmonelles.

Les inconvénients principaux sont le risque de transmission de bactéries pathogènes dans les flores indéfinies les plus efficaces et d'antibiorésistances par des vecteurs plasmidiques.

L'utilisation de flores bactériennes doit être raisonnée dans un environnement le plus sain possible (gestion sanitaire avec maîtrise de l'hygiène).

Au niveau nutritionnel, l'utilisation de flore et le respect de l'écosystème digestif sont à envisager dans le cadre plus global de l'alimentation et des nombreuses alternatives proposées dans ce domaine.

L'administration de flore de barrière peut offrir un degré de protection supplémentaire à des poussins pendant les premiers jours d'élevage, en accélérant le phénomène naturel de colonisation du tube digestif du nouveau-né par des bactéries fécales d'adultes.

Dans ce cas, la protection conférée permet de couvrir la période d'installation de la compétence immunitaire (environ 6 semaines).

A l'heure actuelle, les résultats obtenus sont hétérogènes. Mais il semble que les flores puissent être bénéfiques lors d'un épisode microbien.

Certains jugent que le nombre de bactéries apportées par les probiotiques est insuffisant pour réorienter une flore intestinale déjà implantée et que leurs actions sont limitées.

Enfin le coût reste relativement élevé par rapport aux marges de la plupart des producteurs d'œufs de consommation.

Même s'ils ne sont pas encore de taille à égaler l'efficacité des antibiotiques, les flores bactériennes semblent être une voie prometteuse à étudier par de nouvelles recherches pour la mise au point de préparations sûres et performantes.

Depuis l'apparition du concept, de nombreuses études expérimentales ont montré que certains prébiotiques ont un impact réel sur le fonctionnement de l'intestin, et que leurs effets peuvent être bénéfiques pour la prévention et même la thérapie des désordres intestinaux. Néanmoins, l'effort de recherche est à poursuivre pour établir de façon incontestable l'intérêt de ces nouveaux ingrédients, en particulier chez les sujets en bonne santé.

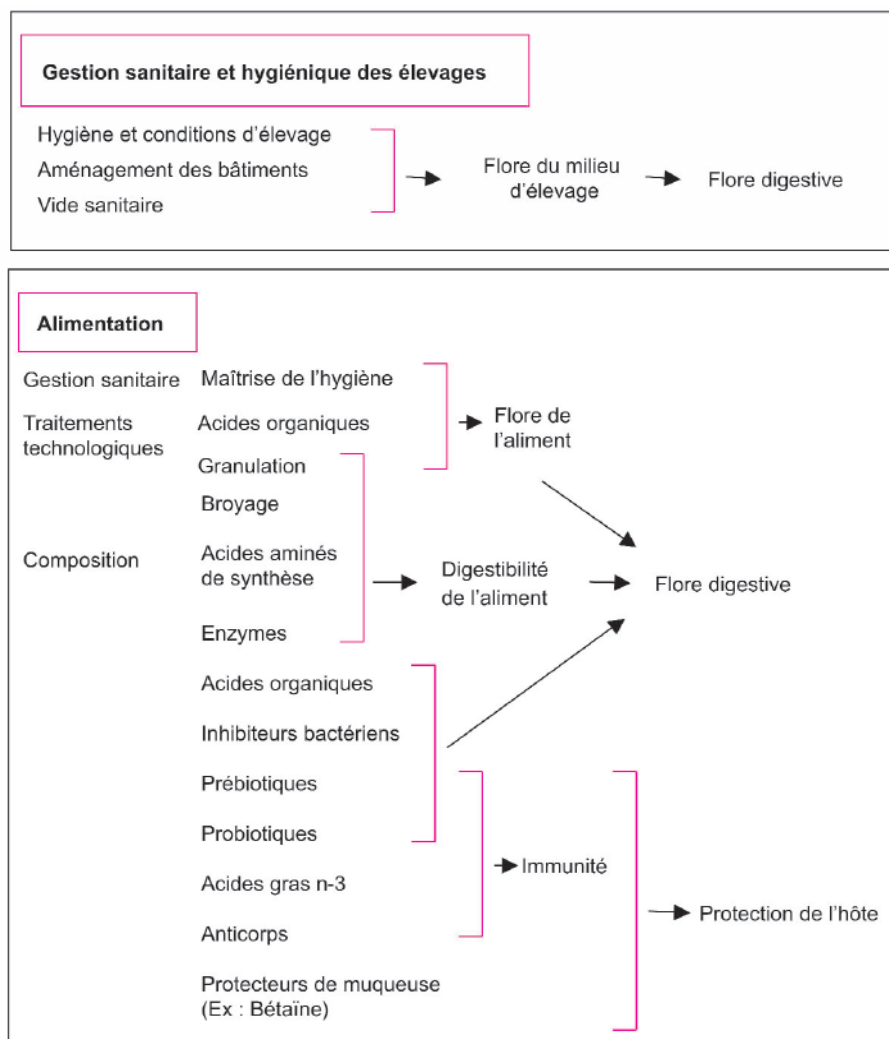
Certains reproches faits aux vaccins peuvent être formulés à l'encontre des flores :

- en augmentant le niveau de protection des volailles, ils rendent plus difficile le dépistage avec les tests habituels, si les salmonelles sont présentes en faible nombre
- la difficulté de la distribution et de la conservation de ces flores

Certains avantages leurs sont propres :

- à la différence des vaccins qui stimulent l'immunité spécifique, les flores de barrière visent une protection plus large contre toutes les salmonelles ou autres flores pathogènes

Figure 14 : La place des flores bactériennes dans le contrôle de la flore digestive. (54)



## **V. COMBINAISON DES DEUX METHODES**

La vaccination et l'utilisation des probiotiques sont deux méthodes intéressantes dans les programmes de lutte contre les Salmonelles ; leur utilisation simultanée a été étudiée afin d'évaluer les bénéfices d'une telle association.

L'administration conjointe de flores d'exclusion compétitive (Aviguard®) et d'une souche vaccinale vivante atténuée (Salmonella vac T®) a été testée par METHNER *et al.* (101) afin d'évaluer l'intérêt éventuellement synergique d'une telle pratique. Le même type d'étude a été conduit avec une souche sauvage utilisée comme vaccin et a donné des résultats analogues, montrant un degré de protection supérieur à la protection générée par l'une des deux méthodes, utilisée seule (100).

Il ressort que le vaccin doit être administré avant la flore afin de permettre le développement et la persistance de la souche vaccinale au niveau des *caeca*, afin de permettre le développement d'une inhibition spécifique contre les autres salmonelles et le développement d'une réponse immunitaire forte (voir Tableau 39).

Lorsque la flore est administrée un jour avant la souche du vaccin atténué, celle-ci est massivement inhibée mais persiste jusqu'à l'âge de 9 jours. L'effet protecteur de la flore est le plus fort et est encore évident à l'âge de 6 semaines.

Lors d'administration simultanée, la concentration de la souche vaccinale n'est significativement diminuée qu'après 9 jours de vie.

Tableau 39 : Nombre (en log10 UFC/g) de salmonelles vaccinales dans les *caeca* en fonction de l'ordre des administrations. (101)

Age en jours	Groupe			
	1	2	3	4
1	Vaccin	Vaccin	Flore barrière	Flore + Vaccin
2	-	Flore barrière	Vaccin	-
9	<b>5.4</b>	<b>4.5</b>	1.7	<b>4.3</b>
14	<b>4.3</b>	<b>4.3</b>	0	1.8
21	<b>3.7</b>	<b>2.7</b>	0	0.3
Moyenne	<b>4.5</b>	<b>3.9</b>	0.6	2.1

Une contamination expérimentale par *Salmonella* Typhimurium 421 à 3 jours ne modifie pas ces paramètres d'installation (voir Tableau 40).

Tableau 40 : Nombre (en log10 UFC/g) de salmonelles vaccinales dans les *caeca* avec challenge infectieux à 3 jours. (101)

Age en jours	Groupe			
	1	2	3	4
1	Vaccin	Vaccin	Flore barrière	Flore + Vaccin
2	-	Flore barrière	vaccin	-
3	Challenge à 10 <sup>5</sup> UFC <i>Salmonella</i> Typhimurium 421 par oiseau			
5	7.1	5.5	2.7	4.5
9	5.6	5.4	1.8	3.9
Moyenne	<b>6.3</b>	<b>5.4</b>	2.3	4.2

Les expériences de contamination par une salmonelle infectieuse montre l'effet protecteur de la flore de barrière par rapport au groupe de contrôle (expérience 1, voir Tableau 41) et par rapport au vaccin seul, dont l'effet inhibiteur est très faible.

A 9 jours, l'exclusion induite par la flore de barrière est très importante et il n'y a aucun effet additionnel significatif avec le vaccin contre la salmonelle infectieuse.

Lorsque les oiseaux atteignent l'âge de 44 et 50 jours (c'est-à-dire lorsqu'ils sont immunocompétents) (expérience 2, voir Tableau 41), le procédé d'administration du vaccin avant la flore (ou simultanée) démontre alors un effet additionnel significatif et prévient presque complètement la colonisation intestinale par la souche de challenge appliquée à la dose de  $10^9$  UFC.

L'expérience 3 est une vérification des résultats de l'expérience 2, en réalisant une injection vaccinale de rappel à 21 jours d'âge et inoculant une plus forte dose de salmonelles challenge ( $5.10^9$  UFC). Le groupe ayant reçu le vaccin avant la flore révèle des nombres de salmonelles infectieuses beaucoup plus faibles dans les caeca que n'importe lequel des autres groupes.

L'auteur pense que la combinaison de l'exclusion compétitive et de la vaccination comme mesure dans un programme de contrôle intégré contre les salmonelles dans les filières volailles pourrait augmenter considérablement la protection non seulement des très jeunes animaux mais aussi des poulets plus âgés.

Tableau 41 : Nombre (en log<sub>10</sub> UFC/g) de salmonelles infectieuses dans les caeca en fonction des expériences. (101)

Age en jours	Groupes					
	1	2	3	4	5	6
1	Vaccin	Flore barrière	Vaccin	Flore barrière	Flore + Vaccin	contrôle
2	-	-	Flore barrière	Vaccin	-	-
3	Expérience 1 : Challenge à $10^5$ UFC <i>Salmonella</i> Typhimurium 421 par oiseau					
5	5.8	<b>3.8</b>	<b>3.7</b>	<b>4.4</b>	<b>2.1</b>	7.5
9	8.0	<b>3.4</b>	<b>3.6</b>	<b>5.1</b>	<b>3.2</b>	8.7
moyenne	6.9	<b>3.6</b>	<b>3.6</b>	<b>4.7</b>	<b>2.6</b>	8.1
43	Expérience 2 : Challenge à $10^9$ UFC <i>Salmonella</i> Typhimurium 421 par oiseau					
44	1.8	2.0	<b>0.8</b>	1.5	<b>0.6</b>	3.5
46	3.2	2.5	<b>0.4</b>	2.0	<b>0.7</b>	3.9
50	0.9	0.8	<b>0.3</b>	1.1	<b>0.5</b>	2.6
moyenne	1.9	1.8	<b>0.5</b>	1.5	<b>0.6</b>	3.3
21	Expérience 3 : Vaccination booster pour les groupes concernés					
43	Challenge à $5.10^9$ UFC <i>Salmonella</i> Typhimurium 421 par oiseau					
44	5.1	4.1	<b>3.3</b>	4.2	4.4	5.6
46	5.3	5.5	<b>3.3</b>	4.9	3.7	5.9
50	5.2	5.4	<b>2.3</b>	5.1	4.7	5.8
moyenne	5.2	5.0	<b>2.9</b>	4.7	4.3	5.8

Ces résultats indiquent également que la souche de salmonelle vaccinale administrée à un jour préalablement à une flore de barrière pourrait devenir un composant permanent de la flore intestinale (cf infection persistante) et être utilisée pour cette caractéristique. Mais pour l'exploitation de ce potentiel et pour atteindre un effet synergique maximal avec la flore d'exclusion compétitive, il faudrait que la souche vaccinale utilisée soit suffisamment atténuée tout en ayant conservé non seulement le potentiel immunogénique mais aussi les gènes essentiels codant pour les mécanismes d'inhibition des autres salmonelles.

## **CONCLUSION**

La vaccination et l'utilisation de flore bactérienne sont des outils qui ont encore un fort potentiel de développement, compte tenu des progrès à venir dans ces domaines.

Pour l'instant et sans doute pour longtemps encore, la maîtrise des salmonelles en filière ponte passe avant tout par la prévention sanitaire avec la mise en place des barrières sanitaires efficaces à l'entrée de l'élevage.

Toutefois si les barrières sanitaires tentent d'atteindre le « zéro salmonelle », elles ne signifient pas le « zéro bactérie » et les stratégies vaccinale et nutritionnelle paraissent donc cohérentes.

Le programme de contrôle national des salmonelles en production d'œufs de consommation repose essentiellement sur les bonnes pratiques d'élevage et d'hygiène, mais aussi sur le dépistage systématique et l'assainissement des troupeaux positifs.

La vaccination des poules pondeuses s'inscrit dans un cadre de prévention de la santé humaine, elle permet d'augmenter la résistance des oiseaux et de diminuer l'excrétion fécale, mais elle ne confère pas de protection absolue. Elle ne se substitue donc pas à la prophylaxie sanitaire, qu'elle ne fait que renforcer.

La connaissance de la structure et de la fonction des constituants des salmonelles, ainsi que la connaissance des réactions immunitaires spécifiques de la poule sont encore incomplètes. Les difficultés pour la production d'un vaccin efficace sont liées en partie à cette méconnaissance. Les domaines d'investigation en cours sont donc l'identification des cibles bactériennes, des mécanismes de la réponse immunitaire protectrice après vaccination ou infection, et les approches biotechnologiques (les nouvelles technologies en vaccinologie) nécessaires pour induire cette réponse protectrice, même dans le cas où l'infection naturelle ne le ferait pas. Les tests de dépistage et les marqueurs vaccinaux doivent également permettre de distinguer efficacement les souches vaccinales des souches sauvages.

L'utilisation des flores bactériennes pour influencer sur la résistance à la colonisation par des pathogènes, particulièrement lors de stress, même si elle paraît séduisante, ne bénéficie pas du même intérêt que la vaccination. Le champ de la recherche y est vaste et encore largement inexploré, notamment en ce qui concerne l'écologie microbienne du tube digestif des oiseaux, le métabolisme, les aspects moléculaires de la physiologie bactérienne, et donc sur les mécanismes des effets bénéfiques.

La flore digestive des oiseaux et ses variations reste mal connue. *In vivo*, les flores bactériennes constituent un environnement protecteur vis-à-vis des germes pathogènes. Le contrôle des écosystèmes bactériens se révèle donc un paramètre important dans l'objectif d'un bon statut sanitaire des élevages.

La difficulté principale pour l'utilisation des flores d'exclusion compétitive naturelle réside dans la connaissance incomplète de leurs compositions (indéfinies) et dans la complexité des procédures d'autorisation.

Force est de constater que les flores bactériennes présentent des difficultés analogues à celles des vaccins vivants en ce qui concerne la sécurité et la santé.

Dans tous les cas de figure, et comme pour les vaccins, l'efficacité n'est pas absolue et l'utilisation des flores bactériennes ne peut pas compenser une hygiène d'élevage déficiente. Certaines expériences montrent l'intérêt potentiel de la combinaison des deux méthodes.

## VI. BIBLIOGRAPHIE

- 1) Agence nationale du médicament vétérinaire. *Site de l'agence nationale du médicament vétérinaire* [en ligne]. [<http://www.anmv.afssa.fr/procedures/proceduresAMM.asp>] (consulté le 02/03/2005).
- 2) ALDERTON MR, FAHEY KJ, COLOE PJ. Humoral responses and salmonellosis protection in chickens given a vitamin-dependent *Salmonella typhimurium* mutant. *Avian Dis.* 1991 Jul-Sep, **35**(3), 435-42.
- 3) AMIT-ROMACH E, SKLAN D, UNIL Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poult Sci.* 2004 Jul, **83**(7), 1093-8.
- 4) ANDREATTI FILHO RL, MARCOS SAMPAIO H, RODRIGUES BAARROS M, ROBERTO GRATAO P, CATANEO A. Use of cecal microflora cultured under aerobic or anaerobic conditions in the control of experimental infection of chicks with *Salmonella enteritidis*. *Vet Microbiol.* 2003, **92**(3), 237-244.
- 5) AUDISIO CM, OLIVER G, APELLA MC. Antagonistic effect of *Enterococcus faecium* J96 against human and poultry pathogenic *Salmonella* spp. *J Food Prot.* 1999. Jul, **62**(7), 751-5.
- 6) AYNAUD J.M. Les recherches à l'INRA dans le domaine des vaccins et vaccinations 1996, INRA *Prod. Anim.*, hors série, 119-126. INRA Département de pathologie animale, 37380 Nouzilly.
- 7) BABU U, SCOTT M, MYERS MJ, OKAMURA M, GAINES D, YANCY HF, LILLEHOJ H, HECKERT RA, RAYBOURNE RB. Effects of live attenuated and killed *Salmonella* vaccine on T-lymphocyte mediated immunity in laying hens. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003 Jan, **91**(1), 39-44.
- 8) BABU U, DALLOUL RA, OKAMURA M, LILLEHOJ HS, XIE H, RAYBOURNE RB, GAINES D, HECKERT RA. *Salmonella* Enteritidis clearance and immune response in chickens following *Salmonella* vaccination and challenge. *Vet Immunology and Immunopathology.* 2004.101, 251-257.
- 9) BAILEY JS, CASON JA, COX NA. Effect of *Salmonella* in young chicks on competitive exclusion treatment. *Poult Sci.* 1998 Mar, **77**(3), 394-339.
- 10) BALEVI T, UCAN US, COSKUN B, KURTOGLU V, CETINGUL IS. Effect of dietary probiotic on performance and humoral immune response in layer hens. *Br Poult Sci.* 2001 Sep, **42**(4), 456-61.
- 11) BARBOUR EK, FRERICHS WM, NABBUT NH, POSS PE, BRINTON MK. Evaluation of bacterins containing three predominant phage types of *Salmonella* Enteritidis for prevention of infection in egg-laying chickens. *Am J Vet Res.* 1993 Aug, **54**(8), 1306-1309.
- 12) BARROW PA; LOVELLS MA; BERCHIERI A. The use of two live attenuated vaccines to immunize egg-laying hens against *Salmonella* Enteritidis phage type 4. *Avian-Pathology.* 1991, **20** (4), 681-692.

- 13) BARBEZANGE C, HUMBERT F, ROSE V, LALANDE F, SALVAT G. Some safety aspects of salmonella vaccines for poultry: distribution and persistence of three *Salmonella* typhimurium live vaccines. *Avian Dis.* 2000 Oct-Dec, **44**(4), 968-976..
- 14) BEAL RK, WIGLEY P, POWERS C, HULME SD, BARROW PA, SMITH AL. Age at primary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. *Vet. Immunology and Immunopathology.* 2004. **100**, 151-164.
- 15) BEAUMONT C, CHAPUIS H. Génétique et sélection avicoles : évolution des méthodes et des caractères. *Prod. Anim.* 2004.**17**, 35-43.
- 16) BECART C. HERBIN A. LEFEVRE MC. MOLARD P. PRZYBYLSKI L. RIGAUDIERE P. SAGOT N. WAVELET S. La filière alimentation animale. DESS. Qualimapa Année Universitaire mars 2000. 129p. [en ligne] [<http://www.univ-lille1.fr/pfeda/iaal/docs/dess1999/animal/animal.htm>].
- 17) BÉGUÉ P, BUISSON Y, CARRAT F, FUCHS F, GILBERG S, GULSO N *et al.* Système immunitaire muqueux et vaccination in *Vaccinations : Actualités et perspectives Expertise Collective.* Les Editions INSERM. [en ligne] ,1999.INSERM. [<http://ist.inserm.fr/BASIS/elgis/fqmr/rapp/DDD/388.pdf>] (consulté le 11/08/2005).
- 18) BELOEIL A. Maîtrise de la qualité sanitaire et commerciale dans la filière « œufs coquille ». Formco Lorraine. 2005, 136p
- 19) BERNDT A, METHNER U. B cell and macrophage response in chicks after oral administrations of *Salmonella* Typhimurium strains. *Comp Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* 2004, **27**, 235-246.
- 20) BHATTI-BM; TANZEELA-TALAT; ROZINA-SARDAR; GHAZALA-NAHEED. Estimation of biochemical and haematological parameters after treatment with Biovet in different strains of laying hens. *Pakistan-Veterinary-Journal.* 2002, **22** (4), 162-165.
- 21) BIELKE LR, ELWOOD AL, DONOGHUE DJ, DONOGHUE AM, NEWBERRY LA, NEIGHBOR NK, HARGIS BM. Approach for selection of individual enteric bacteria for competitive exclusion in turkey poults. *Poult Sci.* 2003 Sep, **82**(9), 1378-1382.
- 22) BORNET F. CONNER D. Profeed : la flore intestinale de la volaille. Journée d'information annuelle Beghin Meiji. Newsletter n°10. août/septembre 2004 [en ligne] [<http://www.beghinmeiji.com/newsletter/profeedFR10/dossiervolaille10.html>]].
- 23) BOUVET P. Salmonelles et santé humaine *In* : Forum Salmonelles [cd-rom] avril 2001.Angers. Intervet.
- 24) BRUGERE H. Particularités de la physiologie des oiseaux. *In* : L'aviculture française. Ed Rosset. 1988, 71-80.
- 25) CATALA M, ANDRE J-M, POIRIER J. Histologie : organes, systèmes et appareils. [en ligne], mise à jour 15 septembre 2006, Faculté de médecine Pierre et Marie Curie.Université Paris-VI. [<http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/POLY.Chp.1.2.1.2.html>], consulté le 11/08/2005.
- 26) CERQUETTI MC, GHERARDI MM. Orally administered attenuated *Salmonella* enteritidis reduces chickens cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. *Vet Microbiol.* 2000, **76** (2), 185-192.

- 27) CHARLES SD, HUSSAIN I, CHOI CU, NAGARAJA KV, SIVANANDAN V. Adjuvanted subunit vaccines for the control of *Salmonella* Enteritidis infection in turkeys. *Am J Vet Res*. 1994 May, **55**(5), 636-42.
- 28) CHEN MW; STERN NJ; BAILEY JS; COX NA. Administering mucosal competitive exclusion flora for control of salmonellae. *Journal of Applied Poultry Research*. 1998, **7**(4), 384-391.
- 29) CLIFTON-HADLEY FA, BRESLIN M, VENABLES LM, SPRIGINGS KA, COOLES SW, HOUGHTON S, WOODWARD MJ. A laboratory study of an inactivated bivalent iron restricted *Salmonella enterica* serovars and Typhimurium dual vaccine against Typhimurium challenge in chickens. *Vet Microbiol*. 2002 Oct 22, **89**(2-3), 167-179.
- 30) CNRSS. Centre national de référence des salmonelles et des shigelles. Résumé du rapport d'activité annuel 2002 du Centre National de Référence des *Salmonella*. 02/02/2004. 3p. [en ligne] [<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmcnr/salmcnr-rap2002.pdf>]
- 31) COGAN TA, JØRGENSEN F, LAPPIN-SCOTT HM, BENSON CE, WOODWARD MJ, HUMPHREY TJ. Flagella and curli fimbriae are important for the growth of *Salmonella enterica* serovars in hen eggs. *Microbiology*. 2004, **150**, 1063–1071.
- 32) CONSTANTIN A. Le système immunitaire chez les Oiseaux. In : L'aviculture française. Ed R. ROSSET. 1988, 455-475.
- 33) CORRIER DE; NISBET DJ; BYRD JA II; HARGIS BM; KEITH NK; PETERSON M; DELOACH JR. Dosage titration of a characterized competitive exclusion culture to inhibit *Salmonella* colonization in broiler chickens during growout. *Journal-of-Food-Protection*. 1998, **61**(7), 796-801.
- 34) DANIELSEN M, WIND A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol*. 2003, Jan 26, **82**(1), 1-11
- 35) DAVIES R, BRESLIN M. Effects of vaccination and other preventive methods for *Salmonella* on commercial laying chicken farms. *Vet Rec*. 2003 Nov 29, **153**(22), 673-677.
- 36) DAVIES RH, BRESLIN MF. Observations on the distribution and persistence of *Salmonella enterica* serovar phage type 29 on a cage layer farm before and after the use of competitive exclusion treatment. *Br Poult Sci*. 2003 Sep, **44**(4), 551-557.
- 37) DAVISON S, BENSON CE, HENZLER DJ, ECKROADE RJ. Field observations with *Salmonella enteritidis* bacterins. *Avian Dis*. 1999, **43**(4), 664-669.
- 38) DGAL. Direction Générale de l'alimentation. Bilan de l'exécution 2003 du programme de maîtrise de *Salmonella* dans l'espèce *Gallus gallus*. 03/06/2004.
- 39) DELMAS G., LE QUERREC F., WEILL F-X., GALLAY A., ESPIE E., HAEGHEBAERT S., VAILLANT V. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001-2003. *Maladies d'origine alimentaire. Surveillance nationale des maladies infectieuses, 2001-2003* [<http://www.invs.sante.fr/publications/2005/snmi/pdf/tiac.pdf>]. 1-10.
- 40) DEVOS N. Les académiciens veulent réhabiliter l'œuf industriel. *La semaine vétérinaire*, n° 1160 du 27 novembre 2004.
- 41) DE VRIES TS. Lutte contre les salmonelles chez les volailles aux Pays-Bas. In : Forum Salmonelles [cd-rom] avril 2001. Angers. Intervet.
- 42) DROLESKEY RE; CORRIER DE; NISBETDJ; DELOACH JR. Colonization of cecal mucosal epithelium in chicks treated with a continuous flow culture of 29 characterized

bacteria: confirmation by scanning electron microscopy. *Journal of Food Protection*. 1995, **58**(8), 837-842.

43) DUEGER EL, HOUSE JK, HEITHOFF DM, MAHAN MJ. Salmonella DNA adenine methylase elicits protective immune responses to homologous and heterologous serovars in chickens. *Infect. Immun.* Dec 2001. **6**(12), 7950-7954.

44) EDENS FW, PARKHURST CR, CASAS IA, DOBROGOSZ WJ. Principles of ex ovo competitive exclusion and in ovo administration of *Lactobacillus reuteri*. *Poult Sci.* 1997 Jan, **76**(1), 179-96.

45) EHRMANN MA, KURZAK P, BAUER J, VOGEL RF. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J Appl Microbiol.* 2002, **92**(5), 966-975.

46) ELOIT M. Vaccins traditionnels et vaccins recombinants. INRA. *Prod. Anim.*, 1998, **11**, 5-13.

47) EUZEBY JP. In : Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. [En ligne] [<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html>] (mise à jour le 31/07/2000)(consulté le 03/03/2004)

48) FAO. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. [Site Web : <http://www.fao.org/es/esn>]

49) FEBERWEE A, DE VRIES TS, HARTMAN EG, DE WITT JJ, ELBERS AR, DE JONG WA. Vaccination against *Salmonella* Enteritidis in Dutch commercial layer flocks with a vaccine based on a live *Salmonella gallinarum* 9R strain: evaluation of efficacy, safety, and performance of serologic salmonella tests. *Avian Dis.* 2001, **45**(1), 83-91.

50) FEBERWEE A, HARTMAN EG, DE WIT JJ, DE VRIES TS. The spread of *Salmonella gallinarum* 9R vaccine strain under field conditions. *Avian Dis.* 2001 Oct-Dec, **45**(4), 1024-1029.

51) FISHER IST. Dramatic shift in the epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types in Western Europe, 1998-2003 - results from the Enter-net international salmonella database. On behalf on the Enter-net participants. *Euro Surveill.* 2004, **9**(11), 7-8.

52) FUKATA T, SASAI K, MIYAMOTO T, BABA E. Inhibitory effects of competitive exclusion and fructooligosaccharide, singly and in combination, on *Salmonella* colonization of chicks. *J Food Prot.* 1999 Mar, **62**(3), 229-33.

53) FUKUTOME K, WATARAI S, MUKAMOTO M, KODAMA H. Intestinal mucosal immune response in chickens following intraocular immunization with liposome-associated *Salmonella enterica* serovar antigen. *Dev Comp Immunol.* 2001 Jun-Jul, **25**(5-6), 475-484.

54) GABRIEL I., MALLET S., SIBILLE P. La microflore digestive des volailles : facteurs de variation et conséquences pour l'animal. INRA Prod. Anim. 2005, **18**(5), 309-322.

55) GANIERE JP. *Maladies réputées contagieuses et maladies à déclaration obligatoire des Oiseaux*. Polycopié. Ecoles nationales vétérinaires françaises, Unités Pédagogiques des Maladies Contagieuses. 07/2004, 27p.

56) GAST RK, STONE HD, HOLT PS. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of *Salmonella* Enteritidis by laying hens. *Avian Dis.* 1993 Oct-Dec, **37**(4), 1085-91.

- 57) GAST RK, GUARD-PETTER J, HOLT PS. Characteristics of Salmonella contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. *Avian Dis.* 2002 Jul-Sep, **46**(3), 629-35.
- 58) GAST RK, GUARD-BOULDIN J, HOLT PS. Colonization of reproductive organs and internal contamination of eggs after experimental infection of laying hens with *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Enteritidis. *Avian Diseases.* 2004. **48**,863–869.
- 59) GOATER E. L'expérience terrain française en matière de prophylaxie salmonelles Filière ponte oeuf de consommation. In : Forum Salmonelles Intervet. Angers. 24 Avril 2001 .21-32.
- 60) GRANSART C. Les facteurs de virulence des salmonelles. Thèse Méd. Vet., Alfort. 1998, n°13. 115p.
- 61) GROUPE DE REDACTION DE L'EVALUATION DES RISQUES. Évaluation des risques liés à Salmonella dans les oeufs et les poulets de chair : Résumé interprétatif. In : *Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture et Organisation mondiale de la santé.* [en ligne]. Octobre 2000, [http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/micro/en/mra1\_fr.pdf] consulté le 15/06/2005.
- 62) GUSILS C, OPPEZZO O, PIZARRO R, GONZALEZ S. Adhesion of probiotic lactobacilli to chick intestinal mucus. *Can J Microbiol.* 2003 Jul, **49**(7), 472-8.
- 63) HAEGHEBAERT S, LE QUERREC F, VAILLANT V, DELAROCQUE ASTAGNEAU E, BOUVET P. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1998. *BEH.* Avril 2001,
- 64) HAEGHEBAERT S, LE QUERREC F, GALLAY A., BOUVET P, GOMEZ M, VAILLANT V. Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1999 et 2000. In *Zoonoses alimentaires.* 2003, 161-169.
- 65) HASSAN JO, CURTIS R. Effect of vaccination of hens with an avirulent strain of Salmonella Typhimurium on immunity of progeny challenged with wild-type Salmonella strains. *Infection and Immunity.* 1996, **64**(3), 938-944.
- 66) HASSAN JO, CURTIS R. Efficacy of a live avirulent Salmonella typhimurium vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis. *Avian Dis.* 1997 oct-dec, **41**(4), 783-791.
- 67) HENDERSON S, BOUNOUS D, LEE M. Early events in the pathogenesis of avian Salmonellosis. *Infection and Immunity.* 1999, **67**(7), 3580-3586.
- 68) HINTON A JR, CORRIER DE, ZIPRIN RL, SPATES GE, DELOACH JR. Comparison of the efficacy of cultures of cecal anaerobes as inocula to reduce Salmonella typhimurium colonization in chicks with or without dietary lactose. *Poult Sci.* 1991 Jan, **70**(1), 67-73.
- 69) HIRSCH M. Avis l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur les projets d'arrêtés modifiant les arrêtés du 26 octobre 1998 relatifs à la lutte contre les infections salmonelliques chez *Gallus gallus* .Saisine n° 2000-SA-0335.27 mars 2001.
- 70) HOLT PS, GAST RK, PORTER RE JR, STONE HD. Hyporesponsiveness of the systemic and mucosal humoral immune systems in chickens infected with *Salmonella* enterica serovar Enteritidis at one day of age. *Poult Sci.* 1999 Nov, **78**(11), 1510-1517.
- 71) HOLT PS, GAST RK, KELLY-AEHLE S. Use of a live attenuated Salmonella typhimurium vaccine to protect hens against Salmonella infection while undergoing molt. *Avian Dis.* 2003 Jul-Sep, **47**(3), 656-661.

- 72) HOSZOWSKI A, TRUSZCZYNSKI M. Prevention of *Salmonella* Typhimurium caecal colonisation by different preparations for competitive exclusion. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2 February 1997, **20**(2), 111-117.
- 73) HUMBERT F. Salmonelles et filières avicoles. *In* : Forum Salmonelles. [cd-rom] avril 2001. Angers. Intervet.
- 74) HUME ME, CORRIER DE, NISBET DJ, DELOACH JR. Early *Salmonella* challenge time and reduction in chick cecal colonization following treatment with a characterized competitive exclusion culture. *Journal of Food Protection*. 1998, **61**(6), 673-676.
- 75) HUMPHREY TJ. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: a review. *Int J Food Microbiol*. 1994 Jan, **21**(1-2), 31-40
- 76) HUMPHREY TJ, BASKERVILLE A, CHART H, ROWE B, WHITEHEAD A. Infection of laying hens with *Salmonella* enteritidis PT4 by conjunctival challenge. *Vet Rec*. 1992 Oct 24, **131**(17), 386-8.
- 77) INRA. Site de l'Institut national de la recherche agronomique [en-ligne]. [<http://www.inra.fr/>] consulté le 21/05/2006.
- 78) INRA. Centre de Tours. Site de l'Institut national de la recherche agronomique [en ligne]. Comment sont élevées les poules pondeuses. 2002 [[www.tours.inra.fr/centre/internet/connaissances/expos/poule-pondeuse/p1elevation-poule.pdf](http://www.tours.inra.fr/centre/internet/connaissances/expos/poule-pondeuse/p1elevation-poule.pdf)] consulté le 08/11/2006.
- 79) Institut Pasteur. Site de l'institut Pasteur [en ligne]. La recherche vaccinale à l'institut Pasteur. Mars 2004. [<http://www.pasteur.fr/actu/presse/dossiers/vaccins/vacfuturs.html>], consulté le 10/11/2005
- 80) JIN LZ, HO YW, ABDULLAH N, JALALUDIN S. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poult Sci*. 2000 Jun, **79**(6), 886-891.
- 81) JOERGER RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult Sci*. 2003 Apr, **82**(4), 640-647.
- 82) KAISER MG, LAKSHMANAN N, WING T, LAMONT SJ. *Salmonella* enterica serovar burden in broiler breeder chicks genetically associated with vaccine antibody response. *Avian Dis*. 2002 Jan-Mar, **46**(1), 25-31.
- 83) KHAN MI, FADL AA, VENKITANARAYANAN KS. Reducing colonization of *Salmonella* in chicken by targeting outer membrane proteins. *J Appl Microbiol*. 2003, **95**(1), 142-145.
- 84) KELLER L, BENSON C, KROTEK K, ECKROADE R. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and fresh laid eggs of chickens. *Inf. and Imm*. July 95, **63**(7), 2443-2449.
- 85) KÜHNE P. « Tour d'horizon sur la prophylaxie des salmonelles en Europe » *In Forum Salmonelles* Angers, 24 avril 2001, [cd-rom] Intervet)
- 86) KUMAR-BS; VIJAYASARATHI-SK; GOWDA-RNS; SATYANARAYANA-ML Probiotics for the prevention of experimental fowl typhoid in broilers - a pathomorphological study. *Indian Journal of Animal Sciences*. 2002, **72**(7), 528-531.

- 87) KLINGER T, BELOEIL P-A. Mesures d'adaptation et de renforcement du programme français de maîtrise des salmonelles en filières *Gallus gallus* et bilan de l'exécution 2002 de ce programme. *Lettre d'information et d'orientation*. 15-10-2003.
- 88) KRAMER TT, HIRL M. Loss of virulence by heterophil-adapted *Salmonella pullorum*. *Avian Dis*. 2001 Apr-Jun. **45**(2). 452-5.
- 89) LAHELLEC C, COLIN P. Exemples de risques microbiens associés aux aliments. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Site Internet : [www.afssa.fr](http://www.afssa.fr).
- 90) LA RAGIONE RM, WOODWARD MJ. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Vet Microbiol*. 2003 Jul 17. **94**(3). 245-56.
- 91) LECLERC C. New approaches in vaccine development comparative immunology, microbiology and infectious diseases. *Vaccines*. Oct 2003, **26**(5-6), 329-341.
- 92) LEMAHIEU J-C. Cellules, molécules et organes de l'immunité <http://anne.decoster.free.fr/immuno/orgcelri/orgcelmo.htm> consulté le 06/12/2004.
- 93) LE DOUARIN P. La flore digestive des volailles est mal connue. *Réussir Aviculture*. Avril 03. [en ligne][<http://www.pleinchamp.com/>].
- 94) LINE JE, BAILEY JS, COX NA, STERN NJ, TOMPKINS T. Effect of yeast-supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poult Sci*. 1998 Mar. **77**(3). 405-10.
- 95) MAGDELAINE P. Economie et avenir des filières avicoles et cunicoles. *Inra Prod. Anim*. 2003, **16** (5), 349-356.
- 96) MASTROENI P, CHABALGOITY JA, DUNSTAN SJ, MASKELL DJ, DOUGAN G. *Salmonella*: immune responses and vaccines. *Vet J*. 2001 Mar, **161**(2), 132-164. Comment in: *Vet J*. 2001 Mar, **161**(2), 104-106.
- 97) MEAD G. C. Prospects for 'Competitive Exclusion' Treatment to Control *Salmonellas* and Other Foodborne Pathogens in Poultry. *The Veterinary Journal*. March 2000.**159**(2). 111-123.
- 98) MEENAKSHI M, BAKSHI CS, BUTCHIAIAH G, BANSAL MP, SIDDIQUI MZ, SINGH VP. Adjuvanted outer membrane protein vaccine protects poultry against infection with *Salmonella* Enteritidis. *Vet. Res. Commun*.1999mar, **23**(2), 81-90.
- 99) METHNER U, BARROW PA, MARTIN G, MEYER H. Comparative study of the protective effect against *Salmonella* colonisation in newly hatched SPF chickens using live, attenuated *Salmonella* vaccine strains, wild-type *Salmonella* strains or a competitive exclusion product. *Int J Food Microbiol*. 1997 Apr 15, **35**(3), 223-30.
- 100) METHNER U, BARROW PA, BERNDT A, STEINBACH G. Combination of vaccination and competitive exclusion to prevent *Salmonella* colonization in chickens: experimental studies. *Int J Food Microbiol*. 1999, **49**(1-2), 35-42.
- 101) METHNER U, BERNDT A, STEINBACH G. Combination of competitive exclusion and immunization with an attenuated live *Salmonella* vaccine strain in chickens. *Avian Dis*. 2001 Jul-Sep, **45**(3), 631-638.

- 102) METHNER U, KEILING S, KREUTZER B, SCHWEINITZ P. Will the effectiveness of the immunization of chicks with live *Salmonella* vaccines be affected by maternal antibodies? *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2002 Apr, **109**(4), 149-53[Article in German].
- 103) METHNER U, BARROW PA, GREGOROVA D, RYCHLIK I. Intestinal colonisation-inhibition and virulence of *Salmonella* phoP, rpoS and ompC deletion mutants in chickens. *Vet Microbiol.* 2004 Jan 14; **98**(1), 37-43.
- 104) Ministère de l'agriculture et de l'agroalimentaire du Canada. *Agriculture et agroalimentaire Canada*. [en ligne], [[http://www.agr.gc.ca/volaille/elsc-brcs\\_f.htm](http://www.agr.gc.ca/volaille/elsc-brcs_f.htm)], consulté le 08/11/2006).
- 105) Ministère de l'agriculture et de la pêche. *Site Agreste la statistique agricole*. [en ligne][<http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/>] consulté le 08/11/2006.
- 106) MISHRA RS, SHARMA VD. Comparative efficacy of various toxoids against salmonellosis in poultry. *Vet Res Commun.* 2001, 25(5), 337-344.
- 107) MIYAMOTO T, KITAOKA D, WITHANAGE GS, FUKATA T, SASAI K, BABA E. Evaluation of the efficacy of *Salmonella* Enteritidis oil- emulsion bacterin in an intravaginal challenge model in hens. *Avian Dis.* 1999, **43**(3), 497-505.
- 108) MOREAU MC. Les probiotiques : des microorganismes bénéfiques pour notre système immunitaire *Cholé-doc* n° 63-2001. Unité d'Ecologie et de Physiologie du Système Digestif (UEPSD) INRA, Jouy-en-Josas. Centre de recherche et d'informations nutritionnelles. Site internet consulté le 18-04-2004.
- 109) MUIR WI, BRYDEN WL, HUSBAND AJ. Evaluation of the efficacy of intraperitoneal immunization in reducing *Salmonella* Typhimurium infection in chickens. *Poult Sci.* 1998 Dec; **77**(12), 1874-83.
- 110) NAKAMURA M, NAGATA T., OKAMURA S., TAKEHARA K., HOLT PS. The effect of killed *Salmonella* Enteritidis vaccine prior to Induced molting on the shedding of *S. Enteritidis* in laying hens. *Avian Diseases.* 2004, **48**, 183–188.
- 111) NAKAMURA A, OTA Y, MIZUKAMI A, ITO T, NGWAI YB, ADACHI Y. Evaluation of Aviguard, a commercial competitive exclusion product for efficacy and after-effect on the antibody response of chicks to *Salmonella*. *Poult Sci.* 2002, **81**(11), 1653-1660.
- 112) NASSAR TJ. AL NAKHLI HM; AL OGAILY ZH. Use of live and inactivated *Salmonella* phage type 4 vaccines to immunise laying hens against experimental infection. *Revue Scientifique et Technique – Office International des Epizooties.* 1994, **13**(3), 855-867.
- 113) NISBET D. Defined competitive exclusion cultures in the prevention of enteropathogen colonisation in poultry and swine. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002, **81**(1-4), 481-486.
- 114) NOREL F. Régulon rpoS et plasmide de virulence des salmonelles. In *Rapport d'activité de l'unité Génétique des Bactéries Intracellulaires* [en ligne] [<http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR1998/Gebi.html>] (Consulté le 16/03/2005).
- 115) O'BRIEN SJ. DE VALK H. *Salmonella*, un vieux pathogène qui gêne encore. *Eurosurveillance.* février 2003, **8**(2), 29-31.
- 116) OFIVAL. *Site de l'Office national interprofessionnel des viandes, de l'élevage et de l'aviiculture*. [en ligne], [<http://www.ofival.fr/>], Chiffres clés 2004, [en ligne], [<http://www.ofival.fr/statistiques/chiffre-04/union/oef-ue.pdf>], consulté le 08/11/2006

- 117) OKAMURA M, LILLEHOJ HS, RAYBOURNE RB, BABU U, HECKERT R. Antigen-specific lymphocyte proliferation and interleukin production in chickens immunized with killed *Salmonella enteritidis* vaccine or experimental subunit vaccines. *Avian Dis.* 2003 Oct-Dec, **47**(4), 1331-1338.
- 118) PANDA AK, REDDY MR, RAMA RAO SV, PRAHARAJ NK. Production performance, serum/yolk cholesterol and immune competence of white leghorn layers as influenced by dietary supplementation with probiotic. *Trop Anim Health Prod.* 2003 Feb, **35**(1), 85-94.
- 119) PANEL SCIENTIFIQUE. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the use of vaccines for the control of *Salmonella* in poultry. *The EFSA Journal* (2004) 114, 74p. [En ligne] consulté le 25/02/2005 [[http://www.efsa.eu.int/science/biohaz/biohaz\\_opinions/721/opinion\\_biohaz15\\_ej114\\_vacc\\_salminpoultry\\_v2\\_en1.pdf](http://www.efsa.eu.int/science/biohaz/biohaz_opinions/721/opinion_biohaz15_ej114_vacc_salminpoultry_v2_en1.pdf)].
- 120) PARKER C, ASOKAN K, GUARD-PETTER J. Egg-contamination by salmonella serovar enteritidis following vaccination with Delta-aroA *Salmonella* serovar typhimurium. *FEMS Microbiol Lett.* 2001, **195**(1), 73-78.
- 121) PASCUAL M, HUGAS M, BADIOLA JI, MONFORT JM, GARRIGA M. Lactobacillus salivarius CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. *Appl Environ Microbiol.* 1999, **65**(11), 4981-4986.
- 122) PATTERSON JA, BURKHOLDER KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult Sci.* 2003 Apr, **82**(4), 627-31..
- 123) PETERS T., MAGUIRE C., THRELFALL E., FISHER I., GILL N., GATTO A. Le projet Salm-gene : une collaboration européenne pour les empreintes génétiques des salmonelloses liées à l'alimentation. *Eurosurveillance.* février 2003, **8**(2), 46-50.
- 124) PENAUD J. Cobiotech. Journée scientifique sur l'hygiène et la biosécurité en élevage. ISPAIA. 24 avril 2002. En ligne [[http://www.sogeval.com/pdf/proximal\\_29.pdf](http://www.sogeval.com/pdf/proximal_29.pdf)].
- 125) POIRIER E., co-dirigée par DESENCLOS JC., WATIER L. Evaluation du lien entre la politique de lutte contre les salmonelles dans les élevages de volailles et la diminution du nombre de cas de salmonelloses chez l'homme en France. DEA de santé publique. Paris XI. [en ligne]. Nov 2004, [[http://www.invs.sante.fr/publications/2004/salmonelles\\_volailles/salmonelles.pdf](http://www.invs.sante.fr/publications/2004/salmonelles_volailles/salmonelles.pdf)] 32p.
- 126) PORTRAIT V; GENDRON-GAILLARD S; COTTENCEAU G; PONS AM. Inhibition of pathogenic *Salmonella* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Canadian Journal of Microbiology.* 1999, **45**(12), 988-994.
- 127) QUINET C, BOTTON Y. Salmonelloses : Pathologie animale et santé publique. *Vétérinaire.* VIII/2003. [[http://www.arsia.be/pages\\_web/FR/veterinaria.htm](http://www.arsia.be/pages_web/FR/veterinaria.htm)], Site consulté le 18/10/2004.
- 128) RABSCH W, LIESEGANG A, TSCHAPE H. Laboratory-based surveillance of salmonellosis of humans in Germany--safety of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis live vaccines. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2001 Nov-Dec; **114**(11-12), 433-7.
- 129) RAMESH-BK; SATYNARAYANA-ML; GOWDA-RNS; VIJAYASARATHI-SK; SUGUNA-RAO; RAO-S. Effect of *Lactobacillus acidophilus* on gut pH and viable bacterial count in experimental fowl typhoid in broilers. *Indian-Veterinary-Journal.* 2000, **77**(6), 544-546.

- 130) RAO A. V. Département de Sciences nutritionnelles Faculté de médecine, Université de Toronto. Prébiotiques et probiotiques : nouvelles théories en matière de nutrition et de santé. *Documentation*. 2002, **19**(2), 1-3.
- 131) RAUPACH B, KAUFMANN SH. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain? *Microbes Infect*. 2001 Nov-Dec; **3**(14-15), 1261-9.
- 132) REYNOLDS DJ. David Reynolds looks at the varying properties of 'good bacteria'. *Microbiologist*. 2004. sept, 27-30.
- 133) RIGGI A. Contribution à l'étude de l'efficacité d'une flore de barrière indéfinie contre la colonisation intestinale par les salmonelles en poulet de chair. Thèse Méd. Vét., Alfort, n°102, 157p.
- 134) ROBINEAU B. L'expérience terrain française en matière de prophylaxie salmonelles. Forum Salmonelles Intervet. 24 avril 2001, 1-21.
- 135) ROBINEAU B. Salmonelles : « la vaccination ne se substitue pas à l'hygiène ». *Filières Avicoles*. 2002. Février. 48p.
- 136) SAMANYA M, YAMAUCHI KE. Histological alterations (modifications) of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2002 Sep, **133**(1), 95-104.
- 137) SCHNEIDER F. Probiotiques et prébiotiques. In : Colloque Le lait aliment santé. [en ligne]. Novembre 2000 [<http://www.ensaia.u-nancy.fr/News/laitsante/Resumep.cent20Francoisp.cent20SCHNEIDER.htm>] consulté le 11/11/2004.
- 138) SEO KH, HOLT PS, GAST RK, HOFACRE CL. Elimination of early *Salmonella* enteritidis infection after treatment with competitive-exclusion culture and enrofloxacin in experimentally infected chicks. *Poult Sci*. 2000 Oct, **79**(10), 1408-1413.
- 139) SINQUIN JP. Economie de la production avicole et contexte international. In *L'aviculture française*. Ed., R. Rosset, 1988, 23-27.
- 140) SPENCER JL; GARCIA MM. Resistance of chicks and poults fed vermicompost to caecal colonization by *Salmonella*. *Avian Pathology*. 1995, **24**(1), 157-170.
- 141) STAVRIC S. Defined cultures and prospects. *Int J Food Microbiol*. 1992 Mar-Apr; **15**(3-4), 245-63.
- 142) TAKASE K, NAKAYAMA T, KAWAI T, FUJIKAWA H. Growth of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in egg yolks from highly immunized hens. *J Vet Med Sci*. 1999 Aug, **61**(8), 959-960.
- 143) TELLEZ G, PETRONE VM, ESCORCIA M, MORISHITA TY, COBB CW, VILLASENOR L, PROMSOPONE B. Evaluation of avian-specific probiotic and *Salmonella* -, *Salmonella* Typhimurium-, and *Salmonella* Heidelberg-specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of *Salmonella* in broilers. *J Food Prot*. 2001 Mar, **64**(3), 287-91. Erratum in: *J Food Prot*. 2001 Jul, **64**(7), 933.
- 144) TOMA B. *et al.* Les zoonoses infectieuses, Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises, Merial (Lyon), 171 p.

- 145) TORO H, PRICE SB, MAC KEE S, HOERR FJ, KREHLING J, PERDUE M, BAUERMEISTER L. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian Dis.* 2005 Mar, **49**(1), 118-24.
- 146) THRELFALL EJ, FISHER IST, BERGHOLD C., GERNER-SMIDT P., TSCHÄPE H., CORMICAN M., LUZZI I., SCHNIEDER F., WANNET W., MACHADO J., EDWARDS G. Résistance aux antibiotiques d'isolats de *Salmonella enterica* issus de cas de salmonellose humaine en Europe en 2000 : résultats d'une surveillance multicentrique internationale. *Eurosurveillance.* Fev 2003, **8**(2), 41-45.
- 147) VAILLANT V, DE VALK H, BARON E. Salmonelloses non typhiques. In : *Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France*. [en ligne], 2004. [[http://www.invs.sante.fr/publications/2004/inf\\_origine\\_alimentaire/inf\\_origine\\_alimentaire.pdf](http://www.invs.sante.fr/publications/2004/inf_origine_alimentaire/inf_origine_alimentaire.pdf)], consulté le 19/10/2004. 92-105.
- 148) VALLAT B Conférence de l'OIE sur la prophylaxie des maladies animales infectieuses par la vaccination Buenos Aires, Argentine, 13-16 avril 2004 [[http://www.oie.int/fr/press/fr\\_040422.htm](http://www.oie.int/fr/press/fr_040422.htm)] (site consulté le 29/10/2004).
- 149) VAN DER WIELEN PW, LIPMAN LJ, VAN KNAPEN F, BIESTERVELD S. Competitive exclusion of *Salmonella enterica* serovar by *Lactobacillus crispatus* and *Clostridium lactatifermentans* in a sequencing fed-batch culture. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Feb, **68**(2), 555-559.
- 150) VAN IMMERSEEL F, DE BUCK J, DE SMET I, MAST J, HAESEBROUCK F, DUCATELLE R. The effect of vaccination with a *Salmonella aroA* mutant on early cellular responses in caecal lamina propria of newly-hatched chickens. *Vaccine.* 2002 Jul 26, **20** (23-24), 3034-3041.
- 151) VAN IMMERSEEL F, DE BUCK J, DE SMET I, MAST J, HAESEBROUCK F, DUCATELLE R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. *Dev comp immunol.* 2002 may; **26**(4), 355-364.
- 152) VAN PELT W., VAN DER SEE H., WANNET W., VAN DE GIESSEN A., MEVIUS D., BOLDER N., KOMIJN R, VAN DUYNHOVEN Y. augmentation explosive de *Salmonella* Java dans la volaille aux Pays-Bas : conséquences pour la santé publique. *Eurosurveillance.* février2003, **8**(2), 31-35.
- 153) VERMOUT S., DENIS M., LOSSON B., MIGNON B. Choix d'un adjuvant lors d'essais vaccinaux. *Ann. Méd. Vét.* 2003, **147**, 393-401.
- 154) WALLIS TS. *Salmonella* pathogenesis and immunity: we need effective multivalent vaccines. *The veterinary Journal.* 2001, **161**, 104-106.
- 155) WEILL F-X, GRIMONT A.D. Les salmonelloses en France : données 2001-2003 du Centre national de référence. *Site du Centre national de référence des salmonelles, Institut Pasteur.* [en ligne], [<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmcnr-index.html>], 2003, 12p.
- 156) WEINACK OM, SNOEYENBOS GH, SOERJADI-LIEM AS, SMYSER CF. Influence of temperature, social, and dietary stress on development and stability of protective microflora in chickens against *S. Typhimurium*. *Avian Dis.* 1985 Oct-Dec, **29**(4), 1177-1183.
- 157) WIERUP M, WAHLSTROM H, ENGSTROM B. Experience of a 10-year use of competitive exclusion treatment as part of the *Salmonella* control programme in Sweden. *Int J Food Microbiol.* 1992 Mar-Apr, **15**(3-4), 287-91.

- 158) WOODWARD MJ, GETTINBY G, BRESLIN MF, CORKISH JD, HOUGHTON S. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Pathol.* 2002, **31**(4), 383-392.
- 159) YAMANE Y. LEONARD JD. KOBATAKE R. AWAMURA N. TOYOTA Y. OHTA H. OTSUKI K. INOUE T. A case study on *Salmonella* origin at three egg-laying farms and its control with a *S. bacterin*. *Avian-Diseases.* 2000, **44**(3), 519-526.
- 160) YU-BI; TSEN-HAU YANG; CHIOU-PWS; YU-B; TSEN-HY. Caecal culture enhances performance and prevents *Salmonella* infection in broilers. *Journal of Applied Poultry Research.* 1999, **8**(2), 195-204.
- 161) ZHANG-BARBER L, TURNER AK, DOUGAN G, BARROW PA. Protection of chickens against experimental fowl typhoid using a *nuoG* mutant of *Salmonella* serotype *Gallinarum*. *Vaccine.* 1998 May-Jun, **16**(9-10), 899-903.
- 162) ZHANG-BARBER L, TURNER AK, BARROW PA. Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. *Vaccine.* 1999. **17**(20-21):2538-45.
- 163) ZIPRIN RI, DELOACH JR. Comparison of probiotics maintained by in vivo passage through laying hens and broilers. *Poult Sci.* 1993, **72**(4), 628-635.
- 164) ZULKIFLI I, ABDULLLAH N, AZRIN NM, HO YW. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. *Br Poult Sci.* 2000 Dec, **41**(5), 593-597.

## VII. ANNEXES

### VII.A. Arrêté du 26 octobre 1998

Arrêté du 26 octobre 1998 Relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* Enteritidis ou *Salmonella* Typhimurium dans les troupeaux de l'espèce *Gallus gallus* en filière ponte d'oeufs de consommation (JORF du 08/12/98)

Modifié par : \*1\* Arrêté du 9 août 2001 (JORF du 29/08/2001)

Le ministre de l'économie, des finances et de l'industrie et le ministre de l'agriculture et de la pêche,  
Vu le règlement (CEE) n° 2782/75 du Conseil du 29 octobre 1975 concernant la production et la commercialisation des oeufs à couvrir et des poussins de basse-cour ;  
Vu la directive 92/117/CEE du 17 décembre 1992 modifiée concernant les mesures de protection contre certaines zoonoses et certains agents zoonotiques chez les animaux et dans les produits d'origine animale, en vue de prévenir les foyers d'infection et d'intoxication dues à des denrées alimentaires, et notamment son annexe III ;  
Vu le code rural, notamment les articles 214, 215-8, 225 à 228 et 258 à 262 ;  
Vu le décret n° 63-136 du 18 février 1963 relatif aux mesures de lutte contre les maladies des animaux ;  
Vu le décret n° 90-1033 du 19 novembre 1990 modifié relatif au mandat sanitaire institué par l'article 215-8 du code rural ;  
Vu l'avis du comité consultatif de la santé et de la protection animale en date du 18 novembre 1997,  
Arrêtent :

#### Chapitre Ier Généralités

Art. 1er. - Le programme national de lutte contre les infections à salmonelles chez les volailles de l'espèce *Gallus gallus* en filière ponte d'oeufs de consommation, institué par le présent arrêté, sous le contrôle des services vétérinaires, a pour objet :

- le dépistage systématique des infections à *Salmonella* enteritidis ou *Salmonella* typhimurium des volailles de reproduction et des poulettes futures pondeuses d'oeufs de consommation de l'espèce *Gallus gallus* en filière ponte d'oeufs de consommation ;
- le dépistage systématique des infections à *Salmonella* enteritidis des pondeuses d'oeufs de consommation de l'espèce *Gallus gallus* ;
- l'abattage des troupeaux infectés par *Salmonella* enteritidis ou *Salmonella* typhimurium ou l'assainissement des produits qui en sont issus.

Art. 2. - Pour l'application du présent arrêté, on entend par :

- a) Volailles de reproduction : les volailles de l'espèce *Gallus gallus* maintenues en captivité, âgées de soixante-douze heures ou plus, destinées à la production d'oeufs à couvrir en filière ponte d'oeufs de consommation ;
- b) Oeufs à couvrir : les oeufs produits par les volailles définies au point a et destinés à être incubés ;
- c) Oeufs de consommation : les oeufs de poule en coquille, propres à la consommation humaine en l'état ou à l'industrie de l'alimentation humaine, à l'exclusion des oeufs cassés, des oeufs couvés et des oeufs cuits ;
- d) Volailles de rente : les volailles de l'espèce *Gallus gallus* âgées de soixante-douze heures ou plus et élevées en vue de la production d'oeufs de consommation ;
- e) Poussins d'un jour : toutes les volailles de l'espèce *Gallus gallus* de la filière ponte d'oeufs de consommation, âgées de moins de soixante-douze heures et non encore nourries ;
- f) Couvoir : tout établissement dont l'activité comprend la mise en incubation, l'éclosion d'oeufs à couvrir et la fourniture de poussins d'un jour de l'espèce *Gallus gallus* en filière ponte d'oeufs de consommation ;
- g) Troupeau : tout ensemble de volailles de l'espèce *Gallus gallus* en filière ponte d'oeufs de consommation, de même statut sanitaire, détenues dans un même bâtiment ou un même enclos et constituant une unité épidémiologique. Dans les batteries, ce terme inclut tous les oiseaux partageant le même volume d'air.

\*1 h) Volailles : les volailles de reproduction, volailles de rente et poussins d'un jour définies au présent article ;

i) Détenteur de volailles : toute personne physique ou morale qui a la garde, à titre permanent ou temporaire, de volailles, à l'exception des animaux détenus aux seules fins de l'autoconsommation. 1\*

Art. 3. - Un vétérinaire sanitaire doit être désigné pour chaque élevage de volailles et établissement d'accouaison en vue de l'exécution des opérations de prophylaxie et de police sanitaire définies dans le présent texte.

Il incombe aux éleveurs et aux responsables de couvoir ou à leurs représentants de prendre sous leur responsabilité toutes dispositions nécessaires pour aider à la réalisation des mesures prescrites par le présent arrêté.

\*1 Art. 4. - Tout détenteur de volailles est tenu de se déclarer auprès de l'établissement départemental de l'élevage afin que ce dernier puisse lui attribuer, en collaboration avec les services vétérinaires, un numéro national d'exploitation pour toute surface d'exploitation inscrite dans un cercle de 500 mètres de diamètre, sauf cas particulier précisé par instruction ministérielle.

L'attribution et l'enregistrement du numéro national d'exploitation, ainsi que l'identification des bâtiments ou enclos dans lesquels sont détenus les troupeaux de volailles, s'effectueront sur la base de la déclaration du détenteur qui doit comprendre les éléments suivants :

- le(s) type(s) de volaille(s) présente(s) dans l'exploitation : filière (chair ou ponte d'oeufs de consommation), étage dans la filière (sélection, multiplication, rente), stade de production (période d'élevage ou de ponte) ;
- les autres espèces animales ou autres volailles de l'espèce *Gallus gallus* non visées par le présent arrêté, qu'il peut détenir ;
- l'éventuel numéro national d'exploitation qui lui a été attribué pour une autre espèce avec indication de l'espèce concernée ;
- les coordonnées géographiques du pourtour de son (ses) exploitation(s) ;

- dans le cas où l'exploitation comporte plusieurs bâtiments et plusieurs activités, l'activité prise en compte pour chaque bâtiment et les éventuels mouvements de volailles entre les différents bâtiments de l'exploitation.
- Afin de permettre l'exécution des mesures prévues par le présent arrêté, tout propriétaire d'un troupeau de volailles doit adresser au préfet (directeur des services vétérinaires) du département où est situé le troupeau et avant chaque introduction d'un nouveau troupeau une déclaration de mise en place comprenant au minimum les indications suivantes :
- nom ou raison sociale et adresse du propriétaire du troupeau ;
  - nom ou raison sociale, adresse et numéro d'immatriculation de l'exploitation où il est détenu ;
  - numéro d'identification des bâtiments et/ou des enclos réservés à l'hébergement du troupeau et nombre de volailles mises en place. 1\*

\*1 Art. 5. - Sans préjudice du respect des dispositions de l'arrêté du 5 juin 2000 relatif au registre d'élevage, afin de retracer les mouvements des volailles et des œufs qui en sont issus, tout détenteur de volailles ainsi que tout responsable du couvoir doit tenir à jour un registre mentionnant, par troupeau ou par lot d'œufs, leur origine et leur destination ainsi que les dates des mouvements effectués.

Ces documents doivent être conservés pendant une période minimale de trois ans et présentés à toute demande des agents des services vétérinaires.

Ils comprennent au minimum les informations suivantes :

a) Pour les troupeaux :

- les dates d'entrée et sortie des volailles ;
- la provenance des volailles, et notamment l'identification du couvoir ;
- le nombre de volailles ;
- la destination des œufs et des volailles.

b) Pour les couvoirs :

- la provenance des œufs, et notamment l'identification du troupeau d'origine ;
- leurs dates de collecte, ou dates de ponte, et d'arrivée ;
- le nombre et la destination des œufs incubés non éclos ;
- la destination des poussins d'un jour.

Le responsable du couvoir doit être en mesure d'apporter la preuve de l'origine des lots d'œufs à couvrir et des poussins qui en sont issus, notamment en la rapportant à un troupeau. 1\*

## Chapitre II

### Dépistage obligatoire des infections à *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium*

\*1 Art. 6. - Il est institué un dépistage obligatoire des infections des troupeaux de volailles à *Salmonella enteritidis* ou *Salmonella typhimurium*.

Il vise :

a) Pour la recherche de *Salmonella enteritidis* et de *Salmonella typhimurium* :

- tous les troupeaux de poussins d'un jour comprenant au moins 250 oiseaux ;
- tous les troupeaux de volailles de reproduction comprenant au moins 250 oiseaux ;
- tous les troupeaux de poulettes futures pondeuses d'œufs de consommation comprenant au moins 250 oiseaux ;

b) Pour la recherche de *Salmonella enteritidis* :

- tous les troupeaux de poules pondeuses d'œufs de consommation dont toute ou une partie de la production d'œufs est destinée à un centre d'emballage d'œufs. 1\*

\*1 Art. 7. - Les modalités de ce dépistage sont définies à l'annexe I.

Les propriétaires de troupeaux soumis à ce dépistage sont tenus d'en faire assurer la réalisation.

Les prélèvements sont effectués sous la responsabilité du vétérinaire sanitaire de l'élevage où est détenu le troupeau soumis au dépistage ou, dans le cas des prélèvements devant être réalisés au couvoir où éclosent les œufs à couvrir issus de ce troupeau, du vétérinaire sanitaire de cet établissement d'accouaison. Le vétérinaire sanitaire doit notamment désigner le ou les agents chargés de la réalisation des prélèvements et s'assurer de leur compétence technique et de leur connaissance des modalités de dépistage prévues par le présent arrêté. Le vétérinaire sanitaire doit vérifier que les prélèvements réalisés l'ont été par les personnes désignées et selon les modalités prévues en annexe I.

Les analyses bactériologiques effectuées dans le cadre de ce dépistage sont réalisées dans des laboratoires répondant aux conditions précisées en annexe II. 1\*

Art. 8. - L'ensemble des résultats d'analyses et contrôles effectués sur un troupeau, y compris les résultats des analyses effectués dans le couvoir et se rapportant à ce troupeau, doit être conservé par le propriétaire des animaux pendant une durée au moins égale à deux ans et présenté aux agents des services vétérinaires et au vétérinaire sanitaire à leur demande.

Les résultats des analyses effectuées dans le couvoir doivent être également disponibles dans le couvoir même.

Art. 9. - Des contrôles complémentaires peuvent être réalisés dans l'exploitation avicole ou le couvoir par les agents des services vétérinaires et/ou le vétérinaire sanitaire.

\*1 Art. 10. - Tout résultat d'analyse portant sur des prélèvements effectués dans un couvoir, dans un lieu d'élevage de volailles, dans des boîtes de transport de poussins d'un jour, sur des volailles vivantes ou mortes, sur un produit des volailles ou sur un malade ayant consommé un produit de volailles, permettant de suspecter la présence de *Salmonella enteritidis* ou de *Salmonella typhimurium*, constitue une suspicion d'infection salmonellique réputée contagieuse des volailles. 1\*

\*1 Art. 11. - Toute suspicion d'infection doit être déclarée au directeur des services vétérinaires du département où a été réalisé le prélèvement à l'origine de la suspicion par toute personne ayant, à quelque titre que ce soit, la charge des soins ou la garde du troupeau concerné. 1\*

## Chapitre III

\*1 **Mesures à prendre en cas de suspicion ou de confirmation d'infection dans les troupeaux de volailles de reproduction** 1\*

\*1 Art. 12. - I. - Lorsque le résultat d'analyse ayant entraîné la suspicion d'infection correspond à un prélèvement réalisé dans un couvoir, le directeur des services vétérinaires diligente une enquête épidémiologique afin d'identifier les établissements ayant

approvisionné ce couvoir en œufs à couvrir ainsi que les troupeaux qui doivent être placés sous arrêté préfectoral de mise sous surveillance selon les critères suivants :

a) Lorsque le résultat d'analyse ayant entraîné la suspicion concerne un prélèvement réalisé dans un éclosier, les troupeaux qui doivent être placés sous arrêté préfectoral de mise sous surveillance sont ceux qui ont fourni des œufs à couvrir chargés dans cet éclosier le jour du prélèvement, dans la mesure où la traçabilité permet de les identifier ;

b) Lorsque le résultat d'analyse ayant entraîné la suspicion concerne un prélèvement de méconium de poussins, les troupeaux qui doivent être placés sous arrêté préfectoral de mise sous surveillance sont ceux qui ont fourni des œufs à couvrir chargés dans l'éclosier des poussins dont le méconium a été prélevé, dans la mesure où le fonctionnement du couvoir permet de garantir un traitement séparé des poussins regroupés par éclosier et l'application de mesures de nettoyage désinfection efficaces entre chaque lot ;

c) Dans les autres cas, les troupeaux qui doivent être placés sous arrêté préfectoral de mise sous surveillance sont ceux qui ont fourni des œufs à couvrir éclos dans le couvoir le jour du prélèvement.

Le préfet prend un arrêté de mise sous surveillance du ou des troupeaux ainsi identifiés.

II. - Dans les autres cas, le préfet prend un arrêté de mise sous surveillance du ou des troupeaux concernés par la suspicion d'infection.

III. - Le directeur des services vétérinaires fait procéder dans les plus brefs délais aux prélèvements et analyses de confirmation définies à l'annexe III du présent arrêté dans tous les troupeaux du ou des élevages dans lesquels sont détenus un ou plusieurs troupeaux placés sous arrêté préfectoral de mise sous surveillance.

IV. - Lorsque le résultat d'analyse ayant entraîné la suspicion concerne un prélèvement réalisé dans un couvoir, le directeur des services vétérinaires peut faire procéder aux prélèvements et analyses de confirmation définies à l'annexe III du présent arrêté dans les élevages ayant approvisionné le couvoir en œufs à couvrir non visés au point III. 1\*

Art. 13. - L'arrêté de mise sous surveillance prévoit que le ou les troupeaux sont immédiatement séquestrés et maintenus isolés. En l'attente du résultat des analyses de confirmation, tout traitement antibiotique est interdit et les œufs à couvrir sont stockés à part, dans un local approprié de façon à éviter toute dissémination de l'infection. Sur autorisation du directeur des services vétérinaires, ils peuvent être mis sur le marché après avoir subi un traitement thermique garantissant la destruction des salmonelles.

Les œufs en incubation au moment de la déclaration de suspicion doivent être manipulés et traités à part lors de l'éclosion. Un protocole de désinfection renforcée des locaux du couvoir doit être aussitôt mis en œuvre et son efficacité doit être contrôlée.

Art. 14. - L'arrêté de mise sous surveillance est levé par le préfet, sur proposition du directeur des services vétérinaires, lorsqu'un second contrôle, réalisé conformément à l'annexe III, effectué après un premier contrôle négatif, s'avère également négatif.

Art. 15. - Lorsque la présence de l'infection est confirmée par la positivité d'au moins une des analyses prévues à l'article 12, le préfet prend un arrêté portant déclaration d'infection du ou des troupeaux infectés.

\*1 Art. 16. - L'arrêté portant déclaration d'infection entraîne l'exécution des mesures de police sanitaire suivantes :

- interdiction de sortie de l'exploitation des volailles du troupeau déclaré infecté et des œufs qui en sont issus, sauf pour abattage ou destruction ;
- réalisation des prélèvements nécessaires au diagnostic ou aux enquêtes épidémiologiques ;
- abattage des troupeaux de volailles de reproduction infectés. Les volailles sont transportées, sous laissez-passer du directeur des services vétérinaires du département où se trouve le troupeau infecté, vers un abattoir bénéficiant d'un agrément sanitaire et où est pratiquée une inspection en application des dispositions de l'article L. 231-1 du code rural ;
- destruction des œufs produits par le troupeau infecté, quels que soient leurs lieux de stockage ou d'incubation. Par dérogation et sur autorisation du directeur des services vétérinaires, les œufs issus des troupeaux infectés peuvent cependant être mis sur le marché après avoir subi un traitement thermique garantissant la destruction des salmonelles ;
- après l'abattage du ou des troupeaux infectés, nettoyage et désinfection des locaux, de leurs abords, de leurs voies d'accès et du matériel d'élevage du ou des troupeaux infectés et des véhicules servant au transport des volailles ou des œufs, suivis d'un vide sanitaire et réalisés conformément à l'article 20. 1\*

\*1 Art. 17. - L'arrêté portant déclaration d'infection est levé par le préfet sur proposition du directeur des services vétérinaires, après élimination du ou des troupeaux infectés, réalisation des opérations de nettoyage et désinfection et de vide sanitaire puis vérification de leur efficacité, conformément aux dispositions de l'article 20. 1\*

#### Chapitre IV

**\*1 Mesures à prendre en cas de suspicion ou de confirmation d'infection dans les troupeaux de volailles de rente 1\***

\*1 Art. 18. - Le préfet prend un arrêté de mise sous surveillance du ou des troupeaux concernés par la suspicion d'infection.

L'arrêté de mise sous surveillance prévoit que le ou les troupeaux sont immédiatement séquestrés et maintenus isolés. En l'attente du résultat des analyses de confirmation, tout traitement antibiotique est interdit et les œufs produits par ces troupeaux sont stockés à part, dans un local approprié de façon à éviter toute dissémination de l'infection. Sur autorisation du directeur des services vétérinaires, ils peuvent être mis sur le marché après avoir subi un traitement thermique garantissant la destruction des salmonelles.

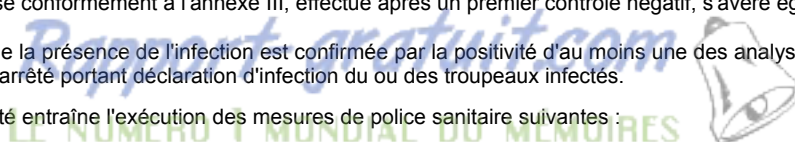
Le directeur des services vétérinaires fait procéder dans les plus brefs délais aux prélèvements et analyses de confirmation définies à l'annexe III du présent arrêté dans tous les troupeaux de volailles de l'élevage où le ou les troupeaux mis sous surveillance sont détenus.

Lorsque le résultat d'analyse ayant entraîné la suspicion concerne des oiseaux d'un jour, le directeur des services vétérinaires diligente une enquête épidémiologique dans le couvoir ayant assuré l'éclosion de ces animaux.

L'arrêté de mise sous surveillance est levé par le préfet, sur proposition du directeur des services vétérinaires, lorsqu'un second contrôle, réalisé conformément à l'annexe III, effectué après un premier contrôle négatif, s'avère également négatif. 1\*

\*1 Art. 19. - I. - Lorsque la présence de l'infection est confirmée par la positivité d'au moins une des analyses prévues à l'article 18, le préfet prend un arrêté portant déclaration d'infection du ou des troupeaux infectés.

II. - Cet arrêté entraîne l'exécution des mesures de police sanitaire suivantes :



- interdiction de sortie de l'exploitation des volailles du ou des troupeaux déclarés infectés, sauf pour l'expédition sous laissez-passer du directeur des services vétérinaires du département où est situé l'élevage détenant le ou les troupeaux infectés, vers un abattoir bénéficiant d'un agrément sanitaire et où est pratiquée une inspection en application des dispositions de l'article L. 231-1 du code rural ;
- réalisation des prélèvements nécessaires au diagnostic ou aux enquêtes épidémiologiques ;
- lorsqu'il s'agit de poulettes futures pondeuses d'œufs de consommation, abattage des volailles du troupeau déclaré infecté ;
- lorsqu'il s'agit de pondeuses d'œufs de consommation :
  - traitement thermique garantissant la destruction des salmonelles, avant leur mise sur le marché, des œufs produits par le troupeau déclaré infecté, et ce jusqu'à son abattage ;
  - après l'abattage du ou des troupeaux infectés, nettoyage et désinfection des locaux, de leurs abords, de leurs voies d'accès et du matériel d'élevage du ou des troupeaux infectés et des véhicules servant au transport des volailles ou des œufs, suivis d'un vide sanitaire et réalisés conformément à l'article 20.

III. - L'arrêté portant déclaration d'infection est levé par le préfet sur proposition du directeur des services vétérinaires, après élimination du ou des troupeaux infectés, réalisation des opérations de nettoyage et de désinfection et de vide sanitaire puis vérification de leur efficacité, conformément aux dispositions de l'article 20. 1\*

## Chapitre V

### Dispositions générales

\*1 Art. 20. - Les opérations de nettoyage et désinfection prévues à l'article 16 et à l'article 19 sont effectuées sous contrôle officiel.

Le fumier doit être retiré du bâtiment avant les opérations de nettoyage et désinfection. Les tracteurs et autres matériels de manipulation du fumier doivent être décontaminés après cette opération. Le stockage, l'épandage des déjections animales et des eaux de nettoyage ne doivent pas constituer une source de contamination pour l'environnement. Les eaux de nettoyage doivent être évacuées soit dans une fosse, soit vers un réseau d'eaux usées. Le nettoyage et la désinfection des locaux d'élevage et de leurs annexes ainsi que du matériel sont effectués selon un protocole écrit, à l'aide de produits agréés pour la désinfection dans le cas de maladies contagieuses. Ce protocole doit également prendre en compte la lutte contre les animaux, les insectes et les acariens indésirables, ainsi que la décontamination des abords.

La durée minimale du vide sanitaire après les opérations de nettoyage et de désinfection des locaux ainsi que du matériel d'élevage (nids de ponte, chaînes d'alimentation, silos, abreuvoirs, bacs réservoirs d'eau, tuyauteries, etc.) doit permettre un assèchement le plus complet possible des locaux et du matériel.

Leur efficacité doit être officiellement validée par un contrôle visuel de la qualité du nettoyage et par un contrôle bactériologique négatif des surfaces vis-à-vis des salmonelles, avant le repeuplement des locaux. Les contrôles doivent être effectués suivant les modalités précisées par instructions réglementaires. 1\*

Art. 21. - Lors de la réalisation des prélèvements définis à l'annexe III du présent arrêté ou en cas de confirmation d'infection, des prélèvements peuvent être effectués sur instruction du directeur des services vétérinaires, sur les aliments utilisés pour l'alimentation du troupeau sur place ou dans l'usine de production.

Lorsqu'un prélèvement se révèle contaminé par *Salmonella enteritidis* ou *Salmonella typhimurium*, le directeur des services vétérinaires :

- fait rechercher en vue de l'identifier, la source de la contamination dans l'exploitation ou à tous les stades de la production ou du transport des aliments ;
- prescrit des procédures pour assainir les aliments et en vérifie l'application.

\*1 Art. 22. - La vaccination contre les infections par salmonelles des volailles de reproduction est interdite. La vaccination des volailles de rente ne peut être pratiquée qu'avec des vaccins inactivés disposant d'une autorisation de mise sur le marché. 1\*

\*1 Art. 23. - Pour l'application des dispositions du présent arrêté, un arrêté conjoint du ministre chargé de l'agriculture et du ministre chargé du budget détermine :

- les conditions dans lesquelles la recherche des salmonelles peut faire l'objet d'une participation financière de l'Etat ;
- les conditions d'attribution et les montants des indemnités d'abattage des troupeaux de volailles infectés ;
- les conditions d'attribution et les montants des indemnités de destruction ou de traitement thermique des œufs à couvrir produits par des troupeaux de volailles infectés ;
- le montant de la participation financière de l'Etat attribuée au vétérinaire sanitaire pour l'exécution des mesures de police sanitaire. 1\*

Art. 24. - Sans préjudice de la perte des indemnités prévues à l'article 23 ci-dessus, les contrevenants aux dispositions du présent arrêté sont notamment passibles des pénalités prévues à l'article 2 du décret n° 63-136 du 18 février 1963 modifié relatif aux mesures de lutte contre les maladies des animaux.

Art. 25. - La directrice générale de l'alimentation au ministère de l'agriculture et de la pêche et les préfets sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française.

Fait à Paris, le 26 octobre 1998.

Le ministre de l'agriculture et de la pêche, Pour le ministre et par délégation : Le directeur général de l'alimentation, M. GUILLOU  
Le ministre de l'économie, des finances et de l'industrie, Pour le ministre et par délégation : Par empêchement du directeur du budget : Le sous-directeur ; F. MONGIN

## ANNEXE I

\*1 MODALITES DU DEPISTAGE DES INFECTIONS A *SALMONELLA ENTERITIDIS* OU *SALMONELLA TYPHIMURIUM* DANS LES TROUPEAUX DE L'ESPECE *GALLUS GALLUS* EN FILIERE PONTE D'OEUF DE CONSOMMATION

### Chapitre Ier

#### Périodicité et nature des prélèvements

##### 1. Troupeaux de volailles de reproduction

### 1.1. Troupeaux en période d'élevage

1.1.1. Quand les oiseaux ont l'âge d'un jour, les prélèvements sont constitués pour chaque troupeau de cinq garnitures de fonds de boîtes différentes prélevées lors de la livraison des oiseaux, avant leur entrée dans le bâtiment d'élevage.

1.1.2. Quand les oiseaux ont l'âge de quatre semaines, puis deux semaines avant l'entrée en ponte si les oiseaux restent dans le bâtiment d'élevage ou, dans le cas contraire, deux semaines avant le transfert de bâtiment, les prélèvements sont constitués pour chaque troupeau :

- d'un pot de 60 fientes caecales fraîches différentes, pesant chacune au moins 1 gramme, prélevées au hasard en au moins cinq points différents du bâtiment dans lequel les oiseaux sont détenus ;
- et d'une chiffonnette constituée d'une ou deux pièces de matériau de type non tissé d'une surface totale d'au minimum 900 centimètres carrés, imbibées de liquide stérile et humides au moment de l'emploi, frottées sur le maximum de surfaces situées à l'intérieur du bâtiment dans lequel les oiseaux sont détenus et replacées dans le contenant d'origine étanche et stérile.

### 1.2. Troupeaux en période de ponte

1.2.1. Les prélèvements sont effectués toutes les deux semaines dans le couvoir où sont livrés les œufs à couver produits par le troupeau de reproducteurs à tester et ils sont constitués pour chaque troupeau :

- soit d'une chiffonnette constituée d'une ou deux pièces de matériau de type non tissé d'une surface totale d'au minimum 900 centimètres carrés, imbibées de liquide stérile et humides au moment de l'emploi, frottées sur le maximum de surfaces situées à l'intérieur de l'éclosoir contenant les issues de ce troupeau et replacées dans le contenant d'origine, étanche et stérile. Le prélèvement doit être réalisé en fin d'éclosion lorsque les poussins sont secs ou douze heures après l'arrêt de la désinfection si elle est pratiquée en cours d'éclosion ;
- soit des méconiums de 250 poussins issus de ce troupeau, récoltés au couvoir par manipulation des poussins ;
- soit des garnitures de cinq fonds d'éclosoirs.

1.2.2. Toutes les huit semaines, les prélèvements prévus au point 1.2.1 doivent être remplacés par des prélèvements dans l'exploitation où est détenu le troupeau, effectués conformément au point 1.1.2.

1.2.3. Toutes les huit semaines, les prélèvements à effectuer au couvoir conformément aux dispositions de la présente annexe doivent être réalisés par le vétérinaire sanitaire.

## 2. Troupeaux de volailles de rente

### 2.1. Troupeaux en période d'élevage

2.1.1. Quand les oiseaux ont l'âge d'un jour, les prélèvements sont constitués pour chaque troupeau de cinq garnitures de fonds de boîtes différentes prélevées lors de la livraison des oiseaux, avant leur entrée dans le bâtiment d'élevage.

2.1.2. Quand les oiseaux ont l'âge de quatre semaines, puis moins de quatre semaines avant la date d'entrée en ponte ou de transfert, le résultat de l'analyse des prélèvements devant être connu avant le départ des animaux, les prélèvements sont constitués pour chaque troupeau :

- d'un pot de 60 fientes caecales fraîches différentes, pesant chacune au moins 1 gramme, prélevées au hasard en au moins cinq points différents du bâtiment dans lequel les oiseaux sont détenus ;
- et d'une chiffonnette constituée d'une ou deux pièces de matériau de type non tissé d'une surface totale d'au minimum 900 centimètres carrés, imbibées de liquide stérile et humides au moment de l'emploi, frottées sur le maximum de surfaces situées à l'intérieur du bâtiment dans lequel les oiseaux sont détenus et replacées dans le contenant d'origine étanche et stérile.

Le prélèvement de fientes peut être remplacé par deux chiffonnets traînés sur la litière ou bien fixés à des pèdisacs et portés sur la longueur totale du bâtiment pendant au moins trois minutes.

Dans les élevages en batterie, le pot de fientes peut être remplacé par une chiffonnette constituée d'une ou deux pièces de matériau de type non tissé d'une surface totale d'au minimum 900 centimètres carrés, imbibées de liquide stérile et humides au moment de l'emploi, frottées sur le maximum de surfaces des tapis de fientes et replacées dans le contenant d'origine étanche et stérile ou, lorsque ces tapis ne sont pas accessibles, frottées sur un minimum de 20 fonds de cages par rangée.

### 2.2. Troupeaux en période de ponte

Les prélèvements doivent être effectués quatre semaines après la mise en place des pondeuses et au plus tard lorsque les pondeuses ont 24 semaines d'âge, puis à 40 et à 55 semaines et, dans le cas de mue, deux semaines avant et deux semaines après l'entrée en ponte puis toutes les douze semaines.

Les prélèvements sont constitués pour chaque troupeau :

- d'un pot de 60 fientes caecales fraîches différentes, pesant chacune au moins 1 gramme, prélevées au hasard en au moins cinq points différents du bâtiment dans lequel les oiseaux sont détenus ;
- et d'une chiffonnette constituée d'une ou deux pièces de matériau de type non tissé d'une surface totale d'au minimum 900 centimètres carrés, imbibées de liquide stérile et humides au moment de l'emploi, frottées sur le maximum de surfaces situées à l'intérieur du bâtiment dans lequel les oiseaux sont détenus et replacées dans le contenant d'origine étanche et stérile.

Le prélèvement de fientes peut être remplacé par deux chiffonnets traînés sur la litière ou bien fixés à des pèdisacs et portés sur la longueur totale du bâtiment pendant au moins trois minutes.

Dans les élevages en batterie, le pot de fientes peut être remplacé par une chiffonnette constituée d'une ou deux pièces de matériau de type non tissé d'une surface totale d'au minimum 900 centimètres carrés, imbibées de liquide stérile et humides au moment de l'emploi, frottées sur le maximum de surfaces des tapis de fientes et replacées dans le contenant d'origine étanche et stérile ou, lorsque ces tapis ne sont pas accessibles, frottées sur un minimum de 20 fonds de cages par rangée.

## Chapitre II

### Analyses

1. Documents d'accompagnement des prélèvements :

Un document précisant l'identité de l'élevage et du bâtiment ou de l'enclos où le troupeau ayant fait l'objet des prélèvements est détenu, le lieu et la nature du prélèvement, la filière et le stade de production concernés, l'âge des animaux à la date du prélèvement, l'identité de la personne ayant effectué le prélèvement et le nom du vétérinaire sanitaire responsable de sa réalisation doivent accompagner chaque prélèvement transmis pour analyse au laboratoire.

## 2. Méthode d'analyse :

La recherche de *Salmonella enteritidis* et de *Salmonella typhimurium* dans les prélèvements prévus au chapitre Ier, points 1.1, 1.2 et 2.1, et la recherche de *Salmonella enteritidis* dans les prélèvements prévus au chapitre Ier, point 2.2, doivent être réalisées selon les textes de référence correspondant à la NF U 47 101 (isolement et identification des salmonelles chez les volailles), à la NF U 47 100 (isolement et identification des salmonelles en élevage avicole) pour l'application du programme d'accréditation n° 116 du COFRAC, en fonction du type de prélèvement effectué. 1\*

## ANNEXE II

### \*1 LABORATOIRES CHARGES DU DIAGNOSTIC DES INFECTIONS A SALMONELLES

Les laboratoires chargés du diagnostic des infections à salmonelles doivent être accrédités selon le programme COFRAC ou à défaut bénéficier d'une dérogation accordée à titre individuel par le ministre de l'agriculture et de la pêche et respecter les prescriptions suivantes :

1. La réalisation des analyses de recherche des salmonelles doit être effectuée selon les textes de référence correspondant à la NF U 47 101 (isolement et identification des salmonelles chez les volailles) ou à la NF U 47 100 (isolement et identification des salmonelles en élevage avicole) pour l'application du programme d'accréditation n° 116 du COFRAC, en fonction du type de prélèvement effectué.

2. Un registre permettant d'identifier pour chaque prélèvement l'identité de l'élevage et du bâtiment ou de l'enclos où est détenu le troupeau ayant fait l'objet des prélèvements, le lieu et la nature du prélèvement, la filière et le stade de production concernés, l'âge des animaux à la date du prélèvement, l'identité de la personne ayant effectué le prélèvement et le nom du vétérinaire sanitaire responsable de sa réalisation, la date de réception et l'identification des échantillons reçus, la date de réalisation des analyses, la méthode utilisée et les résultats de recherche et d'identification des salmonelles faisant l'objet du dépistage obligatoire doit être tenu à jour et mis à disposition du directeur des services vétérinaires du département où se trouve le laboratoire ou de son représentant.

Ces renseignements doivent être conservés au minimum pendant trois ans.

3. Le responsable du laboratoire est tenu de se soumettre et de satisfaire aux contrôles de qualité organisés par le laboratoire national de référence et d'en supporter les frais.

4. Le responsable du laboratoire est tenu de maintenir le niveau de compétence requis de son personnel, et notamment par participation régulière aux sessions de recyclage organisées par le laboratoire national de référence.

5. Le responsable du laboratoire est tenu d'informer dans les plus brefs délais le directeur des services vétérinaires du département où se trouve le couvoir et/ou l'élevage où a été effectué le prélèvement concerné de tout résultat positif de recherche de *Salmonella enteritidis* ou de *Salmonella typhimurium* pour les volailles de reproduction et les poulettes futures pondeuses et de *Salmonella enteritidis* pour les pondeuses d'œufs de consommation, en précisant l'identité de l'élevage et du bâtiment ou de l'enclos où est détenu le troupeau ayant fait l'objet du prélèvement concerné, le lieu et la nature du prélèvement, la filière et le stade de production concernés et l'âge des animaux à la date du prélèvement.

6. Le responsable du laboratoire est tenu de transmettre tous les résultats de recherche *Salmonella enteritidis* ou *Salmonella typhimurium* pour les volailles de reproduction et les poulettes futures pondeuses et de *Salmonella enteritidis* pour les pondeuses d'œufs de consommation, en précisant l'identité de l'élevage et du bâtiment ou de l'enclos où est détenu le troupeau ayant fait l'objet du prélèvement concerné, le lieu et la nature du prélèvement, la filière et le stade de production concernés et l'âge des animaux à la date du prélèvement, au directeur des services vétérinaires du département où a été réalisé le prélèvement, sous la forme et avec la périodicité demandées par ce dernier.

7. Tous les résultats d'analyses de dépistage et d'identification des salmonelles effectués dans le cadre du présent arrêté doivent être enregistrés et envoyés au laboratoire national de référence pour la surveillance des salmonelles dans la filière avicole, notamment en vue de leur exploitation par le Réseau national d'épidémiosurveillance en aviculture (RENESA). Cette surveillance s'exercera de façon anonyme. 1\*

## ANNEXE III

### \*1 MODALITES DE CONFIRMATION DES INFECTIONS A *SALMONELLA ENTERITIDIS* OU *SALMONELLA TYPHIMURIUM* DANS LES TROUPEAUX DE L'ESPECE *GALLUS GALLUS* EN FILIERE PONTE OEUFS DE CONSOMMATION

#### Chapitre Ier

#### **Nature des prélèvements**

##### **1. Troupeaux de reproduction**

1.1. Les prélèvements de confirmation sont constitués pour chaque troupeau à contrôler :

- d'un pot de 60 fientes caecales fraîches différentes, pesant chacune au moins 1 gramme, prélevées au hasard en au moins cinq points différents du bâtiment dans lequel les oiseaux sont détenus ;
- et d'une chiffonnette constituée d'une ou deux pièces de matériau de type non tissé, d'une surface totale d'au minimum 900 centimètres carrés, imbibées de liquide stérile et humides au moment de l'emploi, frottées sur le maximum de surfaces situées à l'intérieur du bâtiment dans lequel les oiseaux sont détenus et replacées dans le contenant d'origine étanche et stérile.

Lorsque le résultat d'analyse ayant entraîné la suspicion d'infection correspond à un prélèvement réalisé dans un couvoir, ces prélèvements sont complétés par un prélèvement de 60 œufs incubés non éclos issus de chaque troupeau à contrôler.

1.2. Dans le cas d'un résultat négatif des analyses effectuées sur ces prélèvements, il devra être procédé à une deuxième série de prélèvements constitués des organes de 60 sujets pour analyse des foies, ovaires et caecums groupés par cinq.

##### **2. Troupeaux de rente**

2.1. Les prélèvements de confirmation sont constitués pour chaque troupeau à contrôler :

- d'un pot de 60 fientes caecales fraîches différentes, pesant chacune au moins 1 gramme, prélevées au hasard en au moins cinq points différents du bâtiment dans lequel les oiseaux sont détenus ;
- et d'une chiffonnette constituée d'une ou deux pièces de matériau de type non tissé, d'une surface totale d'au minimum 900 centimètres carrés, imbibées de liquide stérile et humides au moment de l'emploi, frottées sur le maximum de surfaces situées à l'intérieur du bâtiment dans lequel les oiseaux sont détenus et replacées dans le contenant d'origine étanche et stérile.

Le prélèvement de fientes peut être remplacé par deux chiffonnettes traînées sur la litière ou bien fixées à des pèdisacs et portées sur la longueur totale du bâtiment pendant au moins trois minutes.

Dans les élevages en batterie, le pot de fientes peut être remplacé par une chiffonnette constituée d'une ou deux pièces de matériau de type non tissé, d'une surface totale d'au minimum 900 centimètres carrés, imbibées de liquide stérile et humides au moment de l'emploi, frottées sur le maximum de surfaces des tapis de fientes et replacées dans le contenant d'origine étanche et stérile ou, lorsque ces tapis ne sont pas accessibles, frottées sur un minimum de 20 fonds de cages par rangée.

2.2. Dans le cas d'un résultat négatif des analyses effectuées sur ces prélèvements, il devra être procédé à une nouvelle série de prélèvements constitués :

- soit des prélèvements prévus au point 2.1. ;
- soit des organes de 60 sujets pour analyse des foies, ovaires et caecums groupés par cinq.

## Chapitre II

### **Analyses**

La recherche de *Salmonella enteritidis* et de *Salmonella typhimurium* dans les prélèvements prévus au chapitre Ier doit être réalisée selon les textes de référence correspondant à la NF U 47 101 (isolement et identification des salmonelles chez les volailles) ou à la NF U 47 100 (isolement et identification des salmonelles en élevage avicole) pour l'application du programme d'accréditation n° 116 du COFRAC, en fonction du type de prélèvement effectué. 1\*

## **VII.B. Règlement 2160/2003**

(Actes dont la publication est une condition de leur applicabilité)

### **RÈGLEMENT (CE) No 2160/2003 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL**

**du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire**

(Paru Journal officiel de l'Union européenne 12.12.2003)

LE PARLEMENT EUROPÉEN ET LE CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE,

Vu le traité instituant la Communauté européenne, et notamment son article 152, paragraphe 4, point b),

Vu la proposition de la Commission,

Vu l'avis du Comité économique et social européen,

Après consultation du Comité des régions,

Statuant conformément à la procédure visée à l'article 251 du traité,

Considérant ce qui suit:

(1) Les animaux vivants et les produits d'origine animale figurent sur la liste de l'annexe I du traité. L'élevage et la mise sur le marché de produits d'origine animale constituent une importante source de revenus pour la population agricole. Un développement rationnel de ce secteur passe par la mise en oeuvre d'actions vétérinaires visant à élever le niveau sanitaire et zoosanitaire de la Communauté.

(2) La protection de la santé humaine contre les maladies et les infections directement ou indirectement transmissibles entre les animaux et l'homme (zoonoses) est d'une importance capitale.

(3) Les zoonoses transmissibles par les aliments peuvent causer des souffrances humaines ainsi que des pertes économiques tant à la production qu'à l'industrie alimentaires.

(4) Les zoonoses transmises par des sources autres que les aliments, notamment par les populations d'animaux sauvages et de compagnie, constituent également un sujet de préoccupation.

(5) Les zoonoses existant dans la phase de production primaire doivent faire l'objet d'un contrôle approprié en vue de garantir la réalisation des objectifs du présent règlement. Toutefois, dans le cas de la production primaire à l'origine de l'approvisionnement direct du consommateur final ou de commerces locaux en petites quantités de produits primaires par l'exploitant du secteur alimentaire qui les produit, il convient de protéger la santé publique dans le cadre du droit national. Il existe en effet dans ce cas une relation étroite entre le producteur et le consommateur. Cette production ne devrait pas avoir d'effet significatif sur la prévalence moyenne de zoonoses dans les populations d'animaux à travers l'ensemble de la Communauté. Les prescriptions générales en matière d'échantillonnage et d'analyse peuvent ne pas s'avérer pratiques ou appropriées pour des producteurs possédant très peu d'animaux et se trouvant dans des régions soumises à des contraintes géographiques particulières.

(6) La directive 92/117/CEE du Conseil du 17 décembre 1992 concernant les mesures de protection contre certaines zoonoses et certains agents zoonotiques chez les animaux et dans les produits d'origine animale, en vue de prévenir les foyers d'infection et d'intoxication dus à des denrées alimentaires prévoyait des systèmes de surveillance de certaines zoonoses et des mesures de contrôle des salmonelles dans certains troupeaux de volailles.

(7) Cette directive exigeait que les États membres soumettent à la Commission les mesures nationales qu'ils avaient prises pour atteindre les objectifs de la directive et qu'ils établissent des plans de surveillance des salmonelles chez les volailles. La directive 97/22/CE du Conseil modifiant la directive 92/117/CEE a toutefois suspendu cette dernière exigence, dans l'attente du réexamen prévu à l'article 15 *bis* de la directive 92/117/CEE.

(8) Plusieurs États membres ont déjà soumis des plans de surveillance des salmonelles, qui ont été approuvés par la Commission. En outre, tous les États membres ont été invités, à compter du 1<sup>er</sup> janvier 1998, à respecter les mesures minimales fixées à l'égard des salmonelles à l'annexe III, section I, de la directive 92/117/CEE et à établir des règles spécifiant les mesures à prendre afin d'éviter l'introduction de salmonelles dans les exploitations.

(9) Ces mesures minimales étaient axées sur la surveillance et le contrôle des salmonelles dans les troupeaux de reproduction de l'espèce *Gallus gallus*. Si la présence des sérotypes *Salmonella enteritidis* ou *Salmonella typhimurium* était détectée et confirmée dans les échantillons prélevés, la directive 92/117/CEE fixait les mesures spécifiques à prendre pour contrôler l'infection.

(10) D'autres textes de la législation communautaire prévoient la surveillance et le contrôle de certaines zoonoses au sein des populations animales. Ainsi, la directive 64/432/CEE du Conseil du 26 juin 1964 relative à des problèmes de police sanitaire en matière d'échanges intracommunautaires d'animaux des espèces bovine et porcine traite de la tuberculose bovine et la brucellose bovine. La directive 91/68/CEE du Conseil du 28 janvier 1991 relative aux conditions de police sanitaire

régissant les échanges intracommunautaires d'ovins et de caprins traités, quant à elle, de la brucellose ovine et caprine. Le présent règlement ne doit pas entraîner de duplication de ces exigences déjà existantes.

(11) En outre, la législation communautaire à adopter relative à l'hygiène des denrées alimentaires devrait couvrir des éléments spécifiques nécessaires à la prévention, au contrôle et à la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques et comprendre des exigences spécifiques pour la qualité microbiologique des aliments.

(12) La directive 92/117/CEE prévoyait la collecte de données sur l'apparition de zoonoses et d'agents zoonotiques dans les aliments pour animaux, chez l'animal, dans les denrées alimentaires et chez l'homme. Ce système de collecte de données, bien que non harmonisé et donc impropre à permettre des comparaisons entre États membres, constitue une base pour l'évaluation de la situation actuelle en matière de zoonoses et d'agents zoonotiques dans la Communauté.

(13) Les résultats de ce système de collecte de données montrent que certains agents zoonotiques, à savoir *Salmonella* spp. et *Campylobacter* spp., sont responsables de la plupart des cas de zoonose chez l'homme. Il semble que les cas de salmonellose chez l'homme tendent à diminuer, notamment ceux dus à *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium*, ce qui témoigne du succès des mesures de contrôle prises par la Communauté. Cependant, on considère que de nombreux cas ne sont pas notifiés et que les données ainsi collectées ne donnent donc pas nécessairement une image complète de la situation.

(14) Dans son avis sur les zoonoses adopté le 12 avril 2000, le comité scientifique des mesures vétérinaires en rapport avec la santé publique a considéré que les mesures destinées à combattre les infections zoonotiques d'origine alimentaire alors en vigueur étaient insuffisantes. Il a en outre estimé que les données épidémiologiques recueillies alors par les États membres n'étaient ni complètes, ni pleinement comparables. En conséquence, le comité recommandait d'améliorer les modalités de surveillance et identifiait les options possibles en matière de gestion des risques.

(15) Il est par conséquent nécessaire d'améliorer les systèmes de contrôle existants pour certains agents zoonotiques. Simultanément, les règles définies dans la directive 2003/99/CE du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques, modifiant la décision 90/424/CEE du Conseil et abrogeant la directive 92/117/CEE du Conseil remplaceront les systèmes de surveillance et de collecte de données instaurés par la directive 92/117/CEE.

(16) En principe, les contrôles devraient couvrir l'ensemble de la chaîne alimentaire, de la ferme à la table.

(17) Les règles régissant ces contrôles devraient de manière générale être celles fixées par la législation communautaire relative aux aliments pour animaux, à la police sanitaire et à l'hygiène des denrées alimentaires.

(18) Toutefois, pour certaines zoonoses et certains agents zoonotiques, il est nécessaire de définir des exigences spécifiques de contrôle.

(19) Ces exigences spécifiques devraient être fondées sur des objectifs visant à réduire la prévalence des zoonoses et des agents zoonotiques.

(20) Pour les zoonoses et les agents zoonotiques affectant les populations animales, il y a lieu de fixer les dits objectifs en tenant compte, notamment, de leur fréquence et de leur évolution épidémiologique dans les populations animales et humaines et dans l'alimentation animale et humaine, de leur gravité pour l'homme, de leurs conséquences économiques potentielles, des avis scientifiques ainsi que de l'existence de mesures appropriées visant à réduire leur prévalence. Si nécessaire, des objectifs peuvent être fixés pour d'autres parties de la chaîne alimentaire.

(21) Afin de garantir la réalisation des objectifs en temps voulu, il convient que les États membres établissent des programmes spécifiques de contrôle soumis à l'approbation de la Communauté.

(22) Il importe que la responsabilité principale en matière de sécurité alimentaire incombe aux exploitants des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale. Les États membres devraient dès lors encourager l'élaboration de programmes de contrôle à l'échelon des entreprises.

(23) Dans le cadre de leurs propres programmes de contrôle, les États membres et les exploitants des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale peuvent souhaiter appliquer des méthodes de contrôle spécifiques. Néanmoins, certaines de ces méthodes peuvent se révéler inacceptables, notamment si elles entravent la réalisation générale de l'objectif poursuivi, interfèrent spécifiquement avec des systèmes de test nécessaires ou risquent de mettre en péril la santé publique. Il y a donc lieu d'établir des procédures appropriées permettant à la Communauté d'exclure certaines méthodes des programmes de contrôle.

(24) Des méthodes de contrôle qui ne relèvent d'aucune législation communautaire spécifique en matière d'approbation des produits, mais contribueraient à la réalisation des objectifs de réduction de la prévalence de certaines zoonoses et de certains agents zoonotiques peuvent également exister ou être mises au point. Il devrait donc être possible d'approuver l'utilisation de ces méthodes au niveau communautaire.

(25) Il sera essentiel de veiller à ce que les animaux de repeuplement proviennent de cheptels ou de troupeaux ayant été soumis à des contrôles conformes aux exigences du présent règlement. Lorsqu'un programme spécifique de contrôle est en vigueur, les résultats des tests effectués devraient être communiqués à l'acquéreur des animaux. À cet effet, il importe d'ajouter des exigences spécifiques à la législation communautaire pertinente relative aux échanges intracommunautaires et aux importations en provenance de pays tiers, notamment pour les lots d'animaux vivants et d'oeufs à couvrir. La directive 64/432/CEE, la directive 72/462/CEE du Conseil du 12 décembre 1972 concernant des problèmes sanitaires et de police sanitaire lors de l'importation d'animaux des espèces bovine et porcine, et des viandes fraîches en provenance des pays tiers et la directive 90/539/CEE du Conseil du 15 octobre 1990 relative aux conditions de police sanitaire régissant les échanges intracommunautaires et les importations en provenance des pays tiers de volailles et d'oeufs à couvrir devraient être modifiées en conséquence.

(26) L'adoption du présent règlement ne devrait pas avoir d'incidence sur les garanties supplémentaires accordées à la Finlande et à la Suède lors de leur adhésion à la Communauté et confirmées par les décisions de la Commission 94/968/CE, 95/50/CE, 95/160/CE, 95/161/CE, 95/168/CE, et les décisions du Conseil 95/409/CE, 95/410/CE et 95/411/CE. Le présent règlement devrait prévoir une procédure pour l'octroi de garanties, pendant une période transitoire, à tout État membre dont le programme national de contrôle agréé va au-delà des exigences communautaires minimales concernant les salmonelles. Les résultats d'essais effectués sur des animaux vivants et des oeufs à couvrir commercialisés dans un tel État membre devraient satisfaire aux critères fixés dans son programme national de contrôle. La législation communautaire à adopter relative aux denrées alimentaires d'origine animale devrait prévoir une procédure analogue en ce qui concerne la viande et les oeufs de table.

(27) Les pays tiers exportant vers la Communauté doivent appliquer des mesures équivalentes pour le contrôle des zoonoses, parallèlement aux mesures appliquées dans celle-ci.

(28) Pour ce qui est du contrôle des salmonelles, les informations disponibles tendent à montrer que les produits à base de volaille constituent une source majeure de salmonellose chez l'homme. Les mesures de contrôle devraient donc être appliquées à la production de ces produits et élargir ainsi les mesures prises au titre de la directive 92/117/CEE. Pour la production d'oeufs de table, il est important d'établir des mesures spécifiques pour la mise sur le marché de produits provenant de cheptels qui, au terme des tests, ne se sont pas avérés exempts d'une contamination aux salmonelles concernées. En ce qui concerne la viande de volaille, l'objectif est de placer de la viande sur le marché avec une garantie raisonnable de sa non contamination par les salmonelles en cause. Une période de transition est nécessaire pour que les exploitants du secteur alimentaire s'adaptent aux mesures prévues, qui pourront encore évoluer, notamment en fonction de l'évaluation scientifique des risques.

(29) Il convient de désigner des laboratoires nationaux et communautaires de référence chargés de fournir conseil et assistance sur des questions relevant du présent règlement.

(30) Pour assurer l'application uniforme du présent règlement, il y a lieu de prendre des dispositions en vue de l'organisation d'audits et d'inspections communautaires conformément aux autres dispositions législatives communautaires en la matière.

(31) Il y a lieu d'arrêter des procédures appropriées afin de modifier certaines dispositions du présent règlement pour tenir compte du progrès technique et scientifique, et d'adopter des mesures d'exécution et des mesures transitoires.

(32) Pour tenir compte des progrès techniques et scientifiques, il convient d'assurer une coopération étroite et efficace entre la Commission et les États membres au sein du comité permanent institué par le règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires (1).

(33) Il convient que les mesures nécessaires pour la mise en oeuvre du présent règlement soient arrêtées conformément à la décision 1999/468/CE du Conseil du 28 juin 1999 fixant les modalités de l'exercice des compétences d'exécution conférées à la Commission (2),

ONT ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT :

## CHAPITRE I

### DISPOSITIONS INTRODUCTIVES

#### *Article premier*

#### **Objet et champ d'application**

1. L'objectif du présent règlement est de faire en sorte que soient prises des mesures adaptées et efficaces pour détecter et contrôler les salmonelles et d'autres agents zoonotiques à tous les stades

pertinents de la production, de la transformation et de la distribution, en particulier au niveau de la production primaire, y compris dans l'alimentation animale, de manière à réduire leur prévalence et le risque qu'ils représentent pour la santé publique.

2. Le présent règlement porte sur:

a) l'adoption d'objectifs visant à réduire la prévalence de certaines zoonoses chez les populations animales :

i) au niveau de la production primaire, et

ii) quand cela est approprié en fonction de la zoonose ou de l'agent zoonotique concerné, à d'autres stades de la chaîne alimentaire incluant à la fois l'alimentation humaine et l'alimentation animale;

b) l'approbation de programmes spécifiques de contrôle établis par les États membres et les exploitants des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale;

c) l'adoption de règles spécifiques concernant certaines méthodes de contrôle appliquées en vue de réduire la prévalence de zoonoses et d'agents zoonotiques;

d) l'adoption de règles concernant les échanges intracommunautaires et les importations de certains animaux et produits qui en dérivent en provenance de pays tiers.

3. Le présent règlement ne s'applique pas à la production primaire :

a) aux fins de l'utilisation privée, ou

b) à l'origine de l'approvisionnement direct, par le producteur, du consommateur final ou du commerce de détail local fournissant directement le consommateur final, en petites quantités de produits primaires.

4. Les États membres établissent, dans le cadre de leur législation nationale, des dispositions régissant les activités visées au paragraphe 3, point b). Ces règles nationales concourent à la réalisation des objectifs du présent règlement.

5. Le présent règlement s'applique sans préjudice de dispositions communautaires plus spécifiques sur la santé animale, l'alimentation animale, l'hygiène alimentaire, les maladies transmissibles de l'homme, la santé et la sécurité sur le lieu de travail, le génie génétique et les encéphalopathies spongiformes transmissibles.

#### *Article 2*

##### **Définitions**

Aux fins du présent règlement, sont d'application :

1) les définitions figurant dans le règlement (CE) no 178/2002;

2) les définitions figurant dans la directive 2003/99/CE, et

3) les définitions suivantes :

a) «troupeau» : un animal ou l'ensemble des animaux gardés dans une exploitation comme une unité épidémiologique;

b) «cheptel de volailles» : l'ensemble des volailles de même statut sanitaire détenues dans un même local ou dans un même enclos et constituant une unité épidémiologique. Dans les batteries, ce terme inclut tous les oiseaux partageant le même cubage d'air.

#### *Article 3*

##### **Autorités compétentes**

1. Chaque État membre désigne une autorité compétente ou des autorités compétentes aux fins du présent règlement et en informe la Commission. Si un État membre désigne plusieurs autorités compétentes,

a) il indique à la Commission quelle sera l'autorité compétente qui servira de point de contact avec la Commission, et

b) il veille à ce que les autorités compétentes coopèrent de manière à garantir la bonne application des prescriptions du présent règlement.

2. L'autorité compétente ou les autorités compétentes sont notamment chargées:

a) d'élaborer les programmes prévus à l'article 5, paragraphe 1, et de préparer les modifications qui se révéleront nécessaires, notamment à la lumière des données recueillies et des résultats obtenus;

b) de recueillir les données nécessaires à l'évaluation des moyens mis en oeuvre et des résultats obtenus lors de l'exécution des programmes de contrôle nationaux visés à l'article 5 et de présenter chaque année à la Commission ces données et résultats, y compris les résultats de toute enquête éventuellement réalisée, en tenant compte des règles fixées à l'article 9, paragraphe 1, de la directive 2003/99/CE;

c) de réaliser des contrôles réguliers dans les locaux des entreprises du secteur des denrées alimentaires et, si nécessaire, des aliments pour animaux, en vue de s'assurer du respect du présent règlement.

## **CHAPITRE II**

## OBJECTIFS COMMUNAUTAIRES

### Article 4

#### Objectifs communautaires visant à réduire la prévalence des zoonoses et des agents zoonotiques

1. Les objectifs communautaires sont fixés en vue de réduire la prévalence des zoonoses et des agents zoonotiques énumérés à l'annexe I, colonne 1, chez les populations animales recensées à l'annexe I, colonne 2, en tenant compte notamment:

- a) de l'expérience acquise dans le cadre des mesures nationales, et
- b) des informations transmises à la Commission ou à l'Autorité européenne de sécurité des aliments conformément aux exigences communautaires existantes et, notamment, dans le cadre des informations obtenues en application de la directive 2003/99/CE, en particulier son article 5.

Les objectifs et toute modification qui leur est apportée sont établis selon la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2.

2. Les objectifs visés au paragraphe 1 contiennent au moins :

- a) l'expression numérique :
  - i) du pourcentage maximal d'unités épidémiologiques restant positives, et/ou
  - ii) du pourcentage minimal de la réduction dans le nombre d'unités épidémiologiques restant positives;
- b) le délai maximal dans lequel l'objectif doit être atteint;
- c) la définition des unités épidémiologiques visées au point a);
- d) la définition des programmes de tests nécessaires pour vérifier la réalisation de l'objectif, et
- e) la définition, le cas échéant, des sérotypes qui présentent un intérêt du point de vue de la santé publique ou d'autres sous-types de zoonoses ou d'agents zoonotiques énumérés à l'annexe I, colonne 1, compte tenu des critères généraux énumérés au paragraphe 6, point c), et des critères spécifiques fixés à l'annexe III.

3. Les objectifs communautaires sont fixés pour la première fois avant les dates à respecter indiquées à l'annexe I, colonne 4.

4. a) Pour chaque objectif communautaire qu'elle définit, la Commission fournit une analyse des coûts et avantages escomptés. Cette analyse tient compte, notamment, des critères prévus au paragraphe 6, point c). Les États membres fournissent, sur demande, toute l'aide nécessaire à la Commission pour lui permettre de préparer cette analyse.

b) Avant de proposer chaque objectif communautaire, la Commission consulte les États membres, dans le cadre du comité visé à l'article 14, paragraphe 1, sur les résultats de cette analyse.

c) À la lumière des résultats de cette analyse et de la consultation des États membres, la Commission propose, le cas échéant, des objectifs communautaires.

5. Cependant, par dérogation au paragraphe 2, point e), et au paragraphe 4, les règles ci-après s'appliquent à la volaille pendant une période transitoire.

L'objectif communautaire fixé pour les cheptels reproducteurs de *Gallus gallus* au cours de cette période transitoire couvre les cinq sérotypes de salmonelles les plus fréquents dans la salmonellose humaine, qui sont identifiés sur la base des données recueillies par le biais des systèmes communautaires de surveillance. Les objectifs communautaires fixés pour les poules pondeuses, les poulets de chair et les dindes au cours de la période transitoire couvrent *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium*. Toutefois, ces objectifs peuvent au besoin être étendus à d'autres sérotypes, sur la base des résultats d'une analyse réalisée conformément au paragraphe 4. La période transitoire s'applique aux fins de chaque objectif communautaire relatif à la réduction de la prévalence des salmonelles dans la volaille. Elle est de trois ans dans chaque cas, et commence à la date indiquée à l'annexe I, colonne 5.

6. a) L'annexe I peut être modifiée, conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2, aux fins énumérées au point b), et après prise en compte notamment des critères énoncés au point c).

b) Les modifications apportées à l'annexe I peuvent changer la portée des exigences concernant l'établissement d'objectifs communautaires en complétant, réduisant ou modifiant la liste dans laquelle figurent :

- i) les zoonoses ou agents zoonotiques;
- ii) les stades de la chaîne alimentaire, et/ou
- iii) les populations animales concernées.

c) Les critères à prendre en considération avant de modifier l'annexe I incluent, en ce qui concerne la zoonose ou l'agent zoonotique en cause :

- i) leur fréquence dans les populations animales et humaines, et dans l'alimentation animale et humaine;
- ii) leur degré de gravité pour l'homme;
- iii) leurs conséquences économiques sur les soins de santé animale et de santé humaine ainsi que sur les entreprises du secteur de l'alimentation animale et humaine;

- iv) les tendances épidémiologiques chez l'homme et l'animal, et dans les secteurs de l'alimentation animale et humaine;
  - v) les avis scientifiques;
  - vi) les progrès technologiques, concernant notamment la possibilité de mettre en oeuvre les différents types de contrôle existants, et
  - vii) les prescriptions et les tendances concernant les modes d'élevage et les méthodes de production.
7. L'annexe III peut être modifiée ou complétée conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2.
8. La Commission réexamine la mise en oeuvre des objectifs communautaires et prend en considération ce réexamen lors qu'elle propose de nouveaux objectifs.
9. Les mesures prises en vue de réduire la prévalence des zoonoses et des agents zoonotiques énumérés à l'annexe I sont mises en oeuvre conformément aux dispositions arrêtées dans le présent règlement et à toute autre disposition adoptée en vertu de celui-ci.

### CHAPITRE III

## PROGRAMMES DE CONTRÔLE

### Article 5

#### Programmes de contrôle nationaux

1. Pour réaliser les objectifs communautaires prévus à l'article 4, les États membres établissent des programmes de contrôle nationaux pour chacune des zoonoses et chacun des agents zoonotiques énumérés à l'annexe I. Les programmes de contrôle nationaux tiennent compte de la répartition géographique des zoonoses dans chaque État membre et des conséquences financières de la mise en place de contrôles efficaces pour les producteurs primaires et les exploitants des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale.
2. Les programmes de contrôle nationaux sont continus et couvrent une période d'au moins trois années consécutives.
3. Les programmes de contrôle nationaux :
  - a) prévoient la détection des zoonoses et agents zoonotiques conformément aux exigences et aux règles minimales d'échantillonnage établies à l'annexe II;
  - b) définissent les responsabilités respectives des autorités compétentes et des exploitants des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale;
  - c) indiquent les mesures de contrôle à prendre à la suite de la détection de zoonoses et d'agents zoonotiques, notamment en vue de protéger la santé publique, y compris la mise en oeuvre des mesures spécifiques définies à l'annexe II;
  - d) permettent d'évaluer les progrès accomplis au titre de leurs dispositions et peuvent être revus, notamment à la lumière des résultats obtenus lors de la détection des zoonoses et des agents zoonotiques.
4. Les programmes de contrôle nationaux couvrent au moins les stades suivants de la chaîne alimentaire :
  - a) la production des aliments pour animaux;
  - b) la production primaire d'animaux;
  - c) la transformation et la préparation de denrées alimentaires d'origine animale.
5. Les programmes de contrôle nationaux contiennent, si nécessaire, les dispositions établies concernant les méthodes de test et les critères d'évaluation des résultats de ces tests pour les recherches effectuées sur les animaux et les oeufs à couvrir expédiés au sein du territoire national, dans le cadre des contrôles officiels prévus à l'annexe II, partie A.
6. Les exigences et les règles minimales d'échantillonnage fixées à l'annexe II peuvent être modifiées, adaptées ou complétées, selon la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2, et après prise en compte notamment des critères énoncés à l'article 4, paragraphe 6, point c).
7. Dans un délai de six mois après la fixation des objectifs communautaires visés à l'article 4, les États membres soumettent à la Commission les programmes de contrôle nationaux et définissent les mesures à mettre en oeuvre.

### Article 6

#### Approbation des programmes de contrôle nationaux

1. Une fois qu'un État membre a présenté un programme de contrôle national en vertu de l'article 5, la Commission dispose de deux mois pour demander à cet État membre des informations complémentaires pertinentes et nécessaires. L'État membre fournit lesdites informations complémentaires dans les deux mois suivant la réception de la demande. Dans les deux mois qui suivent la réception de ces informations complémentaires ou, si elle n'a pas demandé de telles informations, dans les six mois qui suivent la présentation du programme de contrôle, la Commission établit si celui-ci est conforme aux dispositions pertinentes, y compris notamment au présent règlement.

2. Lorsque la Commission a établi la conformité d'un programme de contrôle national, ou à la demande de l'État membre qui a présenté ledit programme, celui-ci est examiné sans retard indu en vue de son approbation conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2.

3. Les modifications apportées à un programme précédemment approuvé en vertu des dispositions du paragraphe 2 peuvent être adoptées conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2, afin de tenir compte de l'évolution de la situation dans l'État membre concerné, notamment à la lumière des résultats visés à l'article 5, paragraphe 3, point d).

#### *Article 7*

### **Programmes de contrôle des exploitants des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale**

1. Les exploitants des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale ou les organisations les représentant peuvent établir des programmes de contrôle, couvrant autant que possible tous les stades de la production, de la transformation et de la distribution.

2. S'ils souhaitent que leurs programmes de contrôle fassent partie d'un programme de contrôle national, les exploitants des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale ou leurs organisations représentatives soumettent, pour approbation, leurs programmes de contrôle et toute modification de ceux-ci à l'autorité compétente de l'État membre dans lequel ils se trouvent. Lorsque les activités en question ont lieu dans plusieurs États membres, les programmes sont approuvés séparément pour chaque État membre.

3. L'autorité compétente ne peut approuver les programmes de contrôle soumis conformément au paragraphe 2 que si elle est convaincue qu'ils satisfont aux exigences applicables visées à l'annexe II et aux objectifs du programme de contrôle national concerné.

4. Les États membres tiennent à jour les listes des programmes de contrôle approuvés des exploitants des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale ou de leurs organisations représentatives. Lesdites listes sont mises à la disposition de la Commission, à sa demande.

5. Les exploitants des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale ou leurs organisations représentatives communiquent régulièrement les résultats de leurs programmes de contrôle aux autorités compétentes.

## **CHAPITRE IV**

### **MÉTHODES DE CONTRÔLE**

#### *Article 8*

#### **Méthodes de contrôle spécifiques**

1. À l'initiative de la Commission ou à la demande d'un État membre et conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2 :

a) il peut être décidé que des méthodes de contrôle spécifiques peuvent ou doivent être appliquées afin de réduire la prévalence des zoonoses et des agents zoonotiques au stade de la production primaire des animaux et à d'autres stades de la chaîne alimentaire;

b) des règles peuvent être adoptées concernant les conditions d'emploi des méthodes visées au point a);

c) des modalités détaillées régissant les documents et les procédures nécessaires ainsi que les exigences minimales applicables aux méthodes visées au point a) peuvent être adoptées, et

d) il peut être décidé que certaines méthodes de contrôle spécifiques sont exclues des programmes de contrôle.

2. Les dispositions visées au paragraphe 1, points a), b) et c), ne s'appliquent pas aux méthodes utilisant des substances ou techniques relevant de la législation communautaire relative à l'alimentation animale, aux additifs alimentaires et aux médicaments vétérinaires.

## **CHAPITRE V**

### **ÉCHANGES**

#### *Article 9*

#### **Échanges intracommunautaires**

1. À compter au plus tard des dates mentionnées à l'annexe I, colonne 5, avant toute expédition d'animaux vivants ou d'oeufs à couvrir à partir de l'entreprise du secteur alimentaire d'origine, les cheptels de volailles et les troupeaux d'origine des espèces recensées dans la colonne 2 sont soumis à des tests de recherche des zoonoses et agents zoonotiques répertoriés dans la colonne 1. La date et le résultat des tests sont indiqués dans les certificats sanitaires concernés prévus par la législation communautaire.

2. L'État membre de destination, conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2, peut être autorisé pendant une période de transition à exiger que les résultats des tests à mentionner dans

les certificats sanitaires concernés des lots d'animaux et d'oeufs à couvrir analysés dans l'État membre d'expédition répondent aux mêmes critères en ce qui concerne les salmonelles que ceux applicables, conformément à l'article 5, paragraphe 5, dans le cadre de son programme national approuvé, aux lots expédiés sur son territoire.

Cette autorisation peut être retirée selon la même procédure.

3. Les mesures spéciales concernant les salmonelles qui s'appliquaient aux animaux vivants expédiés vers la Finlande et la Suède avant l'entrée en vigueur du présent règlement continuent de s'appliquer comme si elles avaient été autorisées en application du paragraphe 2.

4. Sans préjudice de l'article 5, paragraphe 6, des règles spécifiques relatives à l'établissement, par les États membres, des critères visés à l'article 5, paragraphe 5, et au paragraphe 2 du présent article, peuvent être définies conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2.

#### *Article 10*

##### **Importations de pays tiers**

1. À compter des dates mentionnées à l'annexe I, colonne 5, l'admission ou le maintien sur les listes prévues par la législation communautaire, pour les espèces ou la catégorie concernées, de pays tiers à partir desquels les États membres sont autorisés à importer les animaux ou oeufs à couvrir relevant du présent règlement sont subordonnés à la présentation à la Commission, par le pays tiers concerné, d'un programme équivalent à ceux prévus à l'article 5 et à son approbation conformément à cet article. Ce programme précise les garanties offertes par le pays en matière d'inspections et de contrôles relatifs aux zoonoses et agents zoonotiques. Lesdites garanties doivent être au moins équivalentes aux garanties prévues par le présent règlement.

L'Office alimentaire et vétérinaire de la Commission est pleinement mis à contribution afin de vérifier que des programmes de contrôle équivalents existent dans les pays tiers.

2. Ces programmes sont approuvés conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2, pour autant que l'équivalence des mesures qu'ils décrivent et des exigences pertinentes applicables au titre de la législation communautaire soit objectivement prouvée. Des garanties autres que celles prévues par le présent règlement peuvent être autorisées conformément à ladite procédure, pour autant qu'elles ne soient pas plus favorables que celles applicables aux échanges intracommunautaires.

3. Les pays tiers avec lesquels sont établis des courants d'échanges réguliers sont soumis aux dispositions de l'article 5, paragraphe 7, et de l'article 6, paragraphe 1, en ce qui concerne les délais de présentation et d'approbation des programmes. Pour les pays tiers instaurant ou reprenant des échanges, les délais applicables sont ceux prévus à l'article 6.

4. Avant toute expédition d'animaux vivants ou d'oeufs à couvrir à partir de l'entreprise du secteur alimentaire d'origine, les cheptels de volailles et les troupeaux d'origine des espèces recensées à l'annexe I, colonne 2, sont soumis à des tests. Les cheptels de volailles et les troupeaux sont soumis à des tests de recherche des zoonoses et agents zoonotiques répertoriés à l'annexe I, colonne 1, ou si nécessaire pour atteindre l'objectif de garanties équivalentes visé au paragraphe 1, à des tests de recherche des zoonoses et agents zoonotiques spécifiés conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2. La date et le résultat des tests sont indiqués dans les certificats d'importation concernés, dont les modèles établis par la législation communautaire sont modifiés en conséquence.

5. L'État membre de la destination finale peut être autorisé, conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2, à exiger pendant une période de transition, que les résultats des tests visés au paragraphe 4 répondent aux mêmes critères que ceux fixés dans son programme national, en vertu de l'article 5, paragraphe 5. Cette autorisation peut être retirée et, sans préjudice des dispositions de l'article 5, paragraphe 6, des règles spécifiques concernant ces critères peuvent être établies, conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2.

6. L'admission ou le maintien sur les listes prévues par la législation communautaire, pour la catégorie concernée de produits, de pays tiers à partir desquels les États membres sont autorisés à importer les produits relevant du présent règlement sont subordonnés à la soumission à la Commission, par le pays tiers concerné, de garanties équivalentes à celles prévues par le présent règlement.

#### **CHAPITRE VI**

##### **LABORATOIRES**

#### *Article 11*

##### **Laboratoires de référence**

1. Les laboratoires communautaires de référence pour l'analyse et les tests de recherche des zoonoses et des agents zoonotiques énumérés à l'annexe I, colonne 1, sont désignés selon la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2.

2. Les responsabilités et les tâches des laboratoires communautaires de référence, notamment en ce qui concerne la coordination de leurs activités avec celles des laboratoires nationaux de référence, sont établies conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2.
3. Les États membres désignent les laboratoires nationaux de référence pour l'analyse et les tests de recherche des zoonoses et des agents zoonotiques visés à l'annexe I, colonne 1. Leurs noms et adresses sont communiqués à la Commission.
4. Certaines responsabilités et tâches des laboratoires nationaux de référence, notamment en ce qui concerne la coordination de leurs activités avec celles des laboratoires compétents des États membres désignés conformément à l'article 12, para graphe 1, point a), peuvent être établies conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2.

#### *Article 12*

##### **Agrément des laboratoires, critères de qualité et méthodes agréées de test**

1. Aux fins de l'analyse des échantillons en vue de la recherche des zoonoses et agents zoonotiques énumérés à l'annexe I, colonne 1, les laboratoires participant aux programmes de contrôle au titre des articles 5 et 7:

- a) sont désignés par l'autorité compétente, et
- b) appliquent un système d'assurance qualité conforme aux critères de la norme EN/ISO actuelle au plus tard vingt-quatre mois après l'entrée en vigueur du présent règlement ou dans les vingt-quatre mois qui suivent l'ajout de nouvelles zoonoses ou agents zoonotiques à l'annexe I, colonne 1.

2. Les laboratoires participent régulièrement aux tests de recherche conjoints organisés ou coordonnés par le laboratoire national de référence.

3. Les tests de recherche des zoonoses et agents zoonotiques visés à l'annexe I, colonne 1, se fondent sur les méthodes et protocoles recommandés par les organismes internationaux de normalisation, qui servent de méthodes de référence.

D'autres méthodes peuvent être utilisées à condition d'avoir été validées selon des règles reconnues au niveau international et d'offrir des résultats équivalents à ceux obtenus avec la méthode de référence concernée.

Si nécessaire, d'autres méthodes de tests peuvent être approuvées conformément à la procédure visée à l'article 14, para graphe 2.

#### **CHAPITRE VII**

#### **EXÉCUTION**

##### *Article 13*

##### **Mesures d'exécution et mesures transitoires**

Les mesures transitoires ou les mesures d'exécution appropriées, y compris les modifications nécessaires des certificats sanitaires concernés, peuvent être adoptées conformément à la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2.

##### *Article 14*

##### **Procédure du comité**

1. La Commission est assistée par le comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale institué par le règlement (CE) no 178/2002 (ci-après dénommé «comité»).

2. Dans le cas où il est fait référence au présent paragraphe, les articles 5 et 7 de la décision 1999/468/CE s'appliquent, dans le respect des dispositions de l'article 8 de ladite décision.

La période prévue à l'article 5, paragraphe 6, de la décision 1999/468/CE est fixée à trois mois.

3. Le comité adopte son règlement intérieur.

##### *Article 15*

##### **Consultation de l'Autorité européenne de sécurité des aliments**

La Commission consulte l'Autorité européenne de sécurité des aliments sur toute question relevant du champ d'application du présent règlement qui pourrait avoir un effet important sur la santé publique, notamment avant de proposer des objectifs communautaires conformément à l'article 4 ou des méthodes spécifiques de contrôle en application de l'article 8.

##### *Article 16*

##### **Rapport sur les arrangements financiers**

1. La Commission présente un rapport au Parlement européen et au Conseil dans les trois ans qui suivent l'entrée en vigueur du présent règlement.

2. Le rapport examine :

- a) les arrangements en vigueur, au niveau communautaire et national, en ce qui concerne le financement des mesures prises pour contrôler les zoonoses et les agents zoonotiques, et
- b) l'incidence que de tels arrangements ont sur l'efficacité de ces mesures.

3. Le cas échéant, la Commission joint audit rapport des propositions appropriées.
4. Les États membres fournissent, sur demande, à la Commission toute l'aide nécessaire pour lui permettre d'établir son rapport.

## CHAPITRE VIII

### DISPOSITIONS GÉNÉRALES ET FINALES

#### Article 17

##### **Contrôles communautaires**

1. Les experts de la Commission procèdent à des contrôles sur place en coopération avec les autorités compétentes des États membres, afin de s'assurer que les dispositions du présent règlement, les règles adoptées en vertu de celui-ci et les mesures de sauvegarde adoptées sont appliquées uniformément. L'État membre sur le territoire duquel est effectué un contrôle apporte toute l'aide nécessaire aux experts pour l'accomplissement de leurs tâches. La Commission informe l'autorité compétente du résultat des contrôles effectués.
2. Les modalités d'application du présent article, notamment celles visant à régler les modalités de coopération avec les autorités nationales compétentes, sont arrêtées selon la procédure visée à l'article 14, paragraphe 2.

#### Article 18

**Entrée en vigueur** Le présent règlement entre en vigueur le jour de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*. Il est applicable six mois après son entrée en vigueur.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 17 novembre 2003.

*Par le Parlement européen Le président P. COX*

*Par le Conseil Le président G. ALEMANNO*

## ANNEXE I

**Zoonoses et agents zoonotiques pour lesquels des objectifs communautaires de réduction de la prévalence sont fixés conformément à l'article 4**

1. Zoonose ou agent zoonotique	2. Population animale	3. Stade de la chaîne alimentaire	4. Date à laquelle l'objectif doit être fixé (*)	5. Date à compter de laquelle le test doit avoir lieu
Tous les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique	Cheptels reproducteurs de <i>Gallus gallus</i>	Production primaire	12 mois après la date d'entrée en vigueur du présent règlement	18 mois après la date mentionnée à la colonne 4
Tous les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique	Poules pondeuses	Production primaire	24 mois après la date d'entrée en vigueur du présent règlement	18 mois après la date mentionnée à la colonne 4
Tous les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique	Poulets de chair	Production primaire	36 mois après la date d'entrée en vigueur du présent règlement	18 mois après la date mentionnée à la colonne 4
Tous les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique	Dindes	Production primaire	48 mois après la date d'entrée en vigueur du présent règlement	18 mois après la date mentionnée à la colonne 4
Tous les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique	Troupeaux de porcs de boucherie	Abattage	48 mois après la date d'entrée en vigueur du présent règlement	18 mois après la date mentionnée à la colonne 4
Tous les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique	Troupeaux reproducteurs de porcins	Production primaire	60 mois après la date d'entrée en vigueur du présent règlement	18 mois après la date mentionnée à la colonne 4

(\*) Ces dates partent du principe que des données comparables sur la prévalence seront disponibles au moins six mois avant que l'objectif soit défini. Si ces données ne sont pas disponibles, la date à laquelle l'objectif est fixé sera reportée en conséquence.

## ANNEXE II

**SURVEILLANCE DES ZOONOSES ET DES AGENTS ZOONOTIQUES ÉNUMÉRÉS À L'ANNEXE I**

**A. Exigences générales applicables aux programmes de contrôle nationaux** Le programme doit tenir compte de la nature de la zoonose et/ou de l'agent zoonotique considéré ainsi que de la situation particulière dans l'État membre. Il doit :

- énoncer son but, en prenant en compte l'ampleur de la zoonose ou de l'agent zoonotique en cause;
- respecter les exigences minimales d'échantillonnage fixées dans la partie B;
- le cas échéant, respecter les exigences spécifiques fixées dans les parties C à E, et d) préciser les points suivants :

### 1. Généralités

- 1.1. la présence de la zoonose ou de l'agent zoonotique en cause dans l'État membre, en faisant spécifiquement référence aux résultats obtenus dans le cadre de la surveillance prévue à l'article 4 de la directive 2003/99/CE;
- 1.2. la zone géographique ou, si nécessaire, les unités épidémiologiques dans lesquelles le programme doit être mis en oeuvre;
- 1.3. la structure et l'organisation des autorités compétentes concernées;
- 1.4. les laboratoires agréés où les échantillons prélevés dans le cadre du programme sont analysés;
- 1.5. les méthodes utilisées pour l'examen des zoonoses ou des agents zoonotiques;
- 1.6. les contrôles officiels (y compris les schémas d'échantillonnage) au niveau des aliments pour animaux, des cheptels de volailles et/ou des troupeaux;
- 1.7. les contrôles officiels (y compris les schémas d'échantillonnage) à d'autres stades de la chaîne alimentaire;
- 1.8. les mesures prises par les autorités compétentes en ce qui concerne les animaux ou les produits sur lesquels des zoonoses ou des agents zoonotiques ont été détectés, notamment en vue de protéger la santé publique; et toutes mesures de prévention qui sont prises, telles que la vaccination;
- 1.9. la législation nationale en la matière, y compris les dispositions nationales concernant les activités visées à l'article 1er, paragraphe 3, point b);
- 1.10. les aides financières accordées aux exploitants des secteurs de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale dans le cadre du programme de contrôle national.

*2. En ce qui concerne les entreprises du secteur de l'alimentation humaine et de l'alimentation animale couvertes par le programme :*

- 2.1. la structure de production des espèces considérées et des produits qui en dérivent;
- 2.2. la structure de production des aliments pour animaux;
- 2.3. les guides relatifs aux bonnes pratiques en matière d'élevage ou d'autres orientations (obligatoires ou facultatives), définissant au moins les éléments suivants:
  - la gestion de l'hygiène dans les exploitations,
  - les mesures destinées à prévenir l'apparition d'infections introduites par les animaux, les aliments pour animaux, l'eau potable, les personnes travaillant dans les exploitations, et
  - l'hygiène dans le cadre du transport des animaux à destination et au départ des exploitations;
- 2.4. le contrôle vétérinaire de routine des exploitations;
- 2.5. l'enregistrement des exploitations;
- 2.6. la tenue de registres dans les exploitations;
- 2.7. les documents devant accompagner les expéditions d'animaux;
- 2.8. les autres mesures pertinentes destinées à garantir la traçabilité des animaux.

## B. Exigences minimales d'échantillonnage

1. Une fois approuvé le programme de contrôle concerné visé à l'article 5, l'exploitant du secteur alimentaire doit faire prélever et analyser des échantillons en vue de réaliser les tests de recherche des zoonoses et agents zoonotiques énumérés à l'annexe I, colonne 1, en respectant les exigences minimales d'échantillonnage indiquées dans le tableau ci-après :

1. Zoonose ou agent zoonotique	2. Population animale	3. Phases de production devant être couvertes par l'échantillonnage
Tous les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique	Cheptels reproducteurs de <i>Gallus gallus</i>	
	— cheptels d'élevage	— poussins d'un jour — volailles de 4 semaines — 2 semaines avant l'entrée en ponte ou le passage à l'unité de ponte
	— cheptels d'animaux adultes de reproduction	— une semaine sur deux pendant la période de ponte
Tous les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique	Poules pondeuses:	
	— cheptels d'élevage	— poussins d'un jour — poulettes 2 semaines avant l'entrée en ponte ou le passage à l'unité de ponte
	— cheptels de pondeuses	— toutes les 15 semaines pendant la période de ponte
Tous les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique	Poulets de chair	— Oiseaux sortant pour abattage (*)
Tous les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique	Dindes	— Oiseaux sortant pour abattage (*)
Tous les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique	Troupeaux porcins:	
	— porcs d'élevage — porcs d'abattage	— animaux sortant pour abattage ou carcasses à l'abattoir — animaux sortant pour abattage ou carcasses à l'abattoir

(\*) Les résultats de l'analyse des échantillons doivent être connus avant que les animaux partent pour l'abattoir.

2. Les exigences fixées au point 1 s'appliquent sans préjudice des exigences prévues par la législation communautaire concernant l'inspection *ante mortem*.
3. Les résultats de l'analyse doivent être enregistrés, ainsi que les informations suivantes : a) la date et le lieu d'échantillonnage, et b) l'identification du cheptel de volailles/troupeau.
4. Les tests immunologiques ne peuvent être utilisés lorsque les animaux ont été vaccinés, sauf s'il a été prouvé que le vaccin employé n'interfère pas avec la méthode de test appliquée.

## C. Exigences spécifiques concernant les cheptels reproducteurs de *Gallus gallus*

1. Les mesures visées aux points 3 à 5 doivent être prises lorsque l'analyse d'échantillons effectuée conformément à la partie B indique la présence de *Salmonella enteritidis* ou de *Salmonella typhimurium* dans un cheptel reproducteur de *Gallus gallus*, dans les circonstances visées au point 2.
2. a) Si l'autorité compétente a approuvé la méthode d'analyse utilisée pour les échantillons prélevés conformément à la partie B, elle peut exiger que les mesures visées aux points 3 à 5 soient prises lorsque cette analyse révèle la présence de *Salmonella enteritidis* ou de *Salmonella typhimurium*.  
b) Autrement, les mesures visées aux points 3 à 5 doivent être prises lorsque l'autorité compétente confirme une suspicion de présence de *Salmonella enteritidis* ou de *Salmonella typhimurium* du fait de l'analyse d'échantillons effectuée conformément à la partie B.
3. Les oeufs non couvés du cheptel doivent être détruits.  
Cependant, ces oeufs peuvent être utilisés aux fins de la consommation humaine s'ils sont traités de manière à garantir l'élimination de *Salmonella enteritidis* et de *Salmonella typhimurium*, conformément à la législation communautaire relative à l'hygiène des denrées alimentaires.
4. Tous les oiseaux du cheptel— y compris les poussins d'un jour — doivent être abattus ou détruits de manière à réduire le plus possible le risque de propagation des salmonelles. L'abattage doit être réalisé conformément à la législation communautaire relative à l'hygiène des denrées alimentaires. Les produits dérivés de ces oiseaux peuvent être mis sur le marché aux fins de la consommation humaine conformément à la législation communautaire relative à l'hygiène des denrées alimentaires et, une fois qu'elle sera d'application, à la partie E. S'ils ne sont pas destinés à la consommation humaine, ces produits doivent être utilisés ou éliminés conformément au règlement (CE) no 1774/2002 du Parlement européen et du Conseil du 3 octobre 2002 établissant les règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine.
5. Lorsque des oeufs à couver provenant de cheptels dans lesquels *Salmonella enteritidis* ou *Salmonella typhimurium* est présente, sont encore présents dans un couvoir, ils doivent être détruits ou traités, conformément au règlement (CE) no 1774/2002.

#### **D. Exigences spécifiques concernant les cheptels de poules pondeuses**

1. Avec effet soixante-douze mois après l'entrée en vigueur du présent règlement, les oeufs ne doivent plus être utilisés pour la consommation humaine directe (comme oeufs de table) à moins qu'ils ne proviennent d'un cheptel commercial de poules pondeuses qui est soumis à un programme national établi en vertu de l'article 5 et qui ne fait pas l'objet de restrictions officielles.
2. Les oeufs provenant de cheptels au statut sanitaire inconnu qui sont soupçonnés d'être infectés ou de provenir de cheptels infectés ne peuvent être utilisés aux fins de la consommation humaine que s'ils sont traités de manière à garantir l'élimination de tous les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique, conformément à la législation communautaire relative à l'hygiène des denrées alimentaires.
3. Lorsque des oiseaux provenant de cheptels infectés sont abattus ou détruits, des mesures doivent être prises de manière à réduire le risque de propagation des zoonoses autant que possible. L'abattage doit être réalisé conformément à la législation communautaire relative à l'hygiène des denrées alimentaires. Les produits dérivés de ces oiseaux peuvent être mis sur le marché aux fins de la consommation humaine conformément à la législation communautaire relative à l'hygiène des denrées alimentaires et, une fois qu'elle sera d'application, à la partie E. S'ils ne sont pas destinés à la consommation humaine, ces produits doivent être utilisés ou éliminés conformément au règlement (CE) no 1774/2002.

#### **E. Exigence spécifique concernant les viandes fraîches**

1. Avec effet quatre-vingt-quatre mois après l'entrée en vigueur du présent règlement, les viandes fraîches de volaille provenant des animaux recensés à l'annexe I ne pourront être mises sur le marché aux fins de la consommation humaine, à moins qu'elles ne satisfassent au critère suivant : «Salmonelles : absence dans 25 grammes».
2. Dans un délai de soixante-douze mois à compter de l'entrée en vigueur du présent règlement, des règles détaillées relatives à ce critère seront fixées conformément à la procédure prévue à l'article 14, paragraphe. Ces règles préciseront en particulier les schémas d'échantillonnage et les méthodes d'analyse.
3. Le critère prévu au point 1 ne s'applique pas aux viandes fraîches de volaille destinées à un traitement thermique industriel ou tout autre traitement capable d'éliminer les salmonelles, conformément à la législation communautaire relative à l'hygiène des denrées alimentaires.

### **ANNEXE III**

#### **Critères spécifiques pour déterminer les sérotypes de salmonelles présentant un intérêt du point de vue de la santé publique**

Lors de la détermination des sérotypes de salmonelles qui présentent un intérêt du point de vue de la santé publique pour lesquels des objectifs communautaires seront fixés, les critères ci-après doivent être pris en considération :

- 1) les sérotypes les plus fréquents de salmonelles dans les salmonelloses humaines sur la base des données recueillies par le biais des systèmes communautaires de surveillance;
- 2) le mode d'infection (c'est-à-dire la présence du sérotype dans les populations d'animaux concernées et l'alimentation animale);
- 3) le fait qu'un sérotype présente depuis peu une capacité de se propager rapidement et de provoquer des maladies chez l'homme et l'animal;
- 4) le degré d'aggravation de la virulence d'un sérotype, ou en d'autres mots, le fait que, par exemple, il devient plus invasif ou plus résistant aux thérapies ad hoc utilisées pour remédier aux infections chez l'homme.

# ÉTUDE COMPARÉE DES VACCINS ET DES FLORES BACTÉRIENNES DANS LA LUTTE CONTRE LES SALMONELLES EN ÉLEVAGE DE POULES PONDEUSES Etude bibliographique

FEUILLET Laurence

**Résumé :**

Les salmonelles non typhoïdiques sont responsables d'un grand nombre de toxi-infections alimentaires. Les œufs sont fréquemment à l'origine de ces accidents.

Les salmonelles sont des germes très résistants dans le milieu extérieur. Dans certains troupeaux ayant fait l'objet d'un assainissement, l'ensemble des mesures se révèle insuffisant et des rechutes sont observées. L'utilisation de vaccins et de flores bactériennes est alors envisagée

Cette étude bibliographique présente dans sa première partie les bases de la lutte contre les salmonelles dans la filière œufs de consommation.

Dans la seconde partie sont présentés successivement les vaccins et les flores bactériennes utilisés dans cette lutte. Pour chacun de ces procédés sont passés en revue les fondements, les recherches en cours, les résultats obtenus, les aspects réglementaires et pratiques.

**Mots clés :** SALMONELLES, POULES PONDEUSES, VACCINATION, VACCINS, FLORES, PROBIOTIQUES

**Jury :**

Président : Pr.

Directeur : Dr.Bolnot

Assesseur : Pr.Bénet

Adresse de l'auteur :  
Laurence FEUILLET  
Lieudit Ropré  
02360 Parfondeval

# COMPARATIVE STUDY OF VACCINES AND BACTERIAL MICROFLORA IN FIGHT AGAINST SALMONELLA IN LAYING HENS

## Bibliographical study

FEUILLET Laurence

### **Summary:**

Salmonellosis is a leading cause of foodborne illness with eggs and poultry being important vehicles of transmission.

The Salmonella germ is a group of bacteria that can survive several months away from the host.

In cases of positive samples, appropriate action must be taken such as culling, cleaning and disinfection. In farms where cleaning and disinfection is too difficult, vaccination must be considered. Mixture of avian intestinal microflora can also be used.

The first part of this study presents the measures taken to prevent spreading of salmonella affecting livestock and consumable eggs.

The second part is devoted to the two means used to struggle salmonella infection: vaccines and bacterial microflora. Scientific aspects including current researches, results and legal aspects are analysed.

**Keywords:** SALMONELLA, LAYING HENS, VACCINATION, VACCINES, MICROFLORA, PROBIOTICS

### **Jury :**

Président : Pr.

Director : Dr.Bolnot

Assessor : Pr.Bénet

Author's address :  
Laurence FEUILLET  
Lieudit Ropré  
02360 Parfondeval