

**Détection et quantification du portage de
Chlamydophila psittaci chez le canard mulard en
gavage : enquête de prévalence**

A notre président de thèse,

Monsieur le professeur Patrick MASSIP

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Pathologie infectieuse

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Docteur Jean-Luc GUERIN

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Productions animales. Elevage et Santé Avicole et Cunicole.

Qui a inspiré et guidé notre travail et nous a soutenu pendant la réalisation de cette thèse.

Qu'il trouve l'expression de notre sincère gratitude.

Monsieur le professeur Alain MILON

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie.

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.

Qu'il veuille bien accepter le témoignage de notre profond respect.

A mes parents,
merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir
toujours soutenu.

A mon frangin, Arnaud,
que la vie t'apporte tout le bonheur possible.
Bisous à Mathilde.

A ma famille,
en remerciement des Noël et des bons moments
passés ensemble, en Suisse, à Besançon, à
Trésilley et ailleurs.

Salut à mes cousins et cousines,
soyez heureux.

A grand-mère Colette,
Ca y est, c'est fait ; je pense souvent à toi,
porte toi bien le plus longtemps possible

Je vous aime sincèrement.

A mes potes de Sartrouville

Nico (achète le, ce camion, qu'on aille surfer), Guillaume (et 1, et 2 ... et 3 ? Toutes mes félicitations !), Toun (t'es où ?), Olivier (et bibi, faisez gaffe au lapin), Benoit (allez, refais nous la blague des gestes !), Ivan (pas de mauvaise excuse pour le kite cette année), Alexandra (l'infirmière de chez Leroy Merlin), Cap'tain Jul (je crois que j'ai jeté ton caleçon, désolé), Mickaël (PSG, premier !), Bill (fais gaffe, y a un boulot qui te fonce dessus !).

Pour les vacances en Espagne, pour l'île de Tavira, pour nos années lycées, collège, primaire pour certains, et toutes ces soirées de notre adolescence, celles qu'on a faites ensuite et celles qu'on fera demain

A mes amis de la fac d'Orsay.

A Betty (ma coloc' préférée et au petit bout qui vient d'arriver), Cilou et Thomas (Prem's pour la thèse !), Amah et Adeline (et bien sûr Ella) (Ezechiel 25/17 : ze pafte ofe ze ridjousness ise becite frome all saïdse...), Richard (finalement c'est pas sûr pour le tatouage), Vivi et Benoît les solognotes (quand vous voulez pour un week end en boucherie), Pauline (c'est mieux avec des cheveux), Lolo et Julie (stresse pas trop lolo), Natacha (t'en as pas marre de ton coin perdu ?), Cédric (bons voyages),

De Orsay à Cahors, de Bonnevaux à Paimpol, nous avons déjà passé tant de formidables moments ensemble, que j'espère de tout cœur que cela continue (un petit effort, il reste moins de 60ans à tirer).

A Romain,
j'espère qu'on se perdra pas de vue, profite
bien de la campagne et à bientôt en Vendée.

A mes copains et amis de l'école

A Roca : toute la ménagerie et l'aspirateur
tant haï (et au proprio : connard, notre
caution...), au Queen : la reine des boîtes, au
Fourbite : les meilleures préchauffes se font
au Fourbite, bien sûr,

Aux copains SDF : Bubble, Antoine, Bide,
Dinico, Mimi la boum, Flo,

Aux copines : Soso, Florane, Céline, Julie (...),
Anne-Lise, Laeti,

Aux poulots nota le rectum, Web, Petrus, Ben,
Bide, Caps,

A Gallinette (Ah ben, elle va rouler beaucoup
moins bien maintenant !),

Au tube de Gray et Barbelivien, au bonheur
ressenti à vos côtés et à ces souvenirs
inoubliables...

A Lulu : "et oui eh ! un petit café ? " (t'as
raison, c'était mieux avant)

A toi, si tu utilises ma thèse pour faire la
tienne : méfie toi...

Merci à tous d'avoir enchanté les plus belles
années de ma vie, merci pour toutes ces soirées
et aux lendemains aspirinés ; la page scolaire
est maintenant tournée, vivement Vic et les GTV
qu'on puisse se retrouver pour faire un peu la
fête.

Merci à " Mr " Olivier Léon, dit la « fiotte à Martineau », pour l'aide apportée à cette thèse.

Remerciement spécial au Dr. Pierre Olivier Costedoat, co-instigateur de cette thèse et à sa femme, pour leur accueil à Arzacq même à des heures indues et pour ma première intervention en public. Dommage que personne n'ait compris...

Encore merci à Jean-Luc G., c'était pas facile mais tu as réussi à faire quelque chose de pas si mal...

**Détection et quantification du portage de
Chlamydophila psittaci chez le canard mulard en
gavage : enquête de prévalence**

Table des Matières

Première Partie : Etude Bibliographique

INTRODUCTION.....	p 21
<u>I. Historique, importance</u>	p 24
<u>I.1. Historique</u>	p 24
<u>I.2. Taxonomie</u>	p 25
I.2.1. Classification morphologique et phénotypique.....	p 25
I.2.1. Classification sérologique.....	p 25
I.2.3. Classification moléculaire.....	p 24
<u>I.3. Espèces hôtes pour <i>C. psittaci</i></u>	p 26
<u>I.4. Les infections à <i>Chlamydophila psittaci</i> chez l'Homme :</u> <u>l'ornithose- psittacose</u>	p 29
I.4.1. Symptômes chez l'homme.....	p 29
I.4.2. Quelques épisodes recensés.....	p 30
I.4.3. Populations à risque.....	p 31
I.4.4. Biais de recrutement des cas cliniques.....	p 32
I.4.5. Traitement.....	p 33
<u>II. La chlamydie aviaire</u>	p 34
<u>II.1. Biologie</u>	p 34
II.1.1. Morphologie.....	p 34
II.1.2. Cycle.....	p 34
II.1.3. Pouvoir antigénique.....	p 37
II.1.4. Pouvoir pathogène.....	p 37
<u>II.2. Clinique</u>	p 38
II.2.1. Incubation.....	p 38
II.2.2. Symptômes.....	p 38
II.2.3. Symptômes décrits chez le canard.....	p 39

<u>II.3. Lésions</u>	p 39
<u>II.4. Espèces réceptives</u>	p 39
<u>II.5. Transmission</u>	p 41
<u>II.6. Résistance</u>	p 41
<u>II.7. Facteurs favorisants</u>	p 41
<u>II.8. Prévention des infections</u>	p 42
<u>II.9. Traitement</u>	p 42

III. Détection de l'infection à *Chlamydophila psittaci* chez les oiseaux..... p 44

<u>III.1. Problématique de la détection</u>	p 44
<u>III.2. Détection indirecte</u>	p 44
III.2.1. Test d'agglutination au latex.....	p 44
III.2.2. Agglutination des Corps Élémentaires.....	p 45
III.2.3. Test d'inhibition de la fixation du complément.....	p 45
III.2.4. Test ELISA ou BELISA.....	p 45
<u>III.3. Détection directe</u>	p 46
III.3.1. Culture et isolement.....	p 46
III.3.2. Immunofluorescence (IFT).....	p 47
III.3.3. Cytologie.....	p 47
III.3.4. Autres techniques existantes.....	p 47
III.3.5. Test ELISA.....	p 48
III.3.6. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	p 48
III.3.6.1. Principe.....	p 48
III.3.6.2. Intérêts.....	p 49
III.3.7. PCR quantitative ou en Temps Réel.....	p 49
III.3.7.1. Description.....	p 49
III.3.7.2. Intérêts.....	p 50
<u>III.4. Choix des prélèvements</u>	p 50
III.4.1. Ecouvillon cloacal.....	p 50
III.4.2. Ecouvillons pharyngé et choanal.....	p 50

III.4.3. Ecouvillon conjonctival.....	p 50
III.4.4. Eléments du choix.....	p 51

Seconde Partie : Etude Expérimentale

INTRODUCTION.....	p 54
-------------------	------

I. Matériel et méthodes..... p 54

I.1. Echantillonnage des canards.....	p 54
---------------------------------------	------

I.1.1. Objectifs.....	p 54
-----------------------	------

I.1.2. Réalisation de l'échantillonnage.....	p 54
--	------

I.2. Prélèvements.....	p 55
------------------------	------

I.2.1. Déplacements dans les salles de gavage.....	p 55
--	------

I.2.2. Choix des animaux.....	p 55
-------------------------------	------

I.2.3. Technique de prélèvement et codage des échantillons.....	p 56
---	------

I.2.4. Transport et conservation des prélèvements.....	p 56
--	------

I.3. Mise au point d'un test PCR quantitative en chimie SYBR® Green.....	p 56
--	------

I.3.1. Analyse informatique des séquences du gène <i>OmpA</i> pour choisir un couple d'amorces de PCR.....	p 56
---	------

I.3.2. Clonage d'ADN plasmidique.....	p 57
---------------------------------------	------

I.3.3. Extraction de l'ADN des écouvillons.....	p 57
---	------

I.3.4. Réalisation de la PCR quantitative en chimie Sybr® Green.....	p 58
--	------

I.4. Analyses sérologiques.....	p 58
---------------------------------	------

II. Résultats..... p 59

II.1. Description de l'échantillon.....	p 59
---	------

II. 2. Données d'élevage.....	p 61
-------------------------------	------

II.3. Données de gavage.....	p 62
------------------------------	------

<u>II.4. Données d'abattoir</u>	p 63
<u>II.5. Mise au point d'un test de détection de <i>C. psittaci</i></u>	p 63
II.5.1. Choix des amorces de PCR quantitative.....	p 63
II.5.2. Clonage et quantification de l'ADN plasmidique.....	p 63
II.5.3. Optimisation de la concentration des amorces.....	p 64
II.5.4. Validation de la réaction de PCR quantitative.....	p 64
II.5.5. Application de la technique aux échantillons extraits au DTT.....	p 66
II.5.6. Détermination de seuils de quantification.....	p 66
II.5.7. Mise en oeuvre du test sur les échantillons extraits d'écouvillons conjonctivaux ou cloacaux.....	p 67
II.5.8. Analyse des résultats.....	p 79
<u>II.6. Comparaison de la sensibilité des techniques de PCR employées et des sites de prélèvement</u>	p 79
<u>II.7. Détermination de la prévalence de portage</u>	p 80
II.7.1. Prévalence globale.....	p 80
II.7.2. Prévalence selon la saison.....	p 80
II.7.3. Prévalence selon l'organisation.....	p 80
<u>II.8. Apports de la sérologie</u>	p 81
<u>II.9. Relations portage / éléments techniques</u>	p 81
<u>II.10. Description des pratiques de protection mises en place par les gaveurs</u>	p 81
II.10.1. Port du masque.....	p 82
II.10.2. Arrêt de la ventilation.....	p 82
II.10.3. Port de gants.....	p 83
II.10.4. Protection des visiteurs.....	p 83
<u>III. Discussion</u>	p 85

Conclusion

Table des Illustrations

<u>Tableau 1</u> : Taxonomie des Chlamydies.....	p 27
<u>Tableau 2</u> : Relevé des ordres et familles d'oiseaux pour lesquels l'infection à <i>Chlamydophila psittaci</i> a été démontrée.....	p 28
<u>Tableau 3</u> : Origine des lots de canetons.....	p 59
<u>Tableau 4</u> : Comparaison des résultats de positivité en fonction du site de prélèvement.....	p 79
<u>Tableau 5</u> : Capacité des types de prélèvements à détecter un lot positif.....	p 79
<u>Tableau 6</u> : Prévalence globale de <i>C. psittaci</i> chez le canard mulard en gavage.....	p 80
<u>Tableau 7</u> : Prévalence de <i>C. psittaci</i> chez le canard selon la saison.....	p 80
<u>Tableau 8</u> : Prévalence de <i>C. psittaci</i> chez le canard en fonction des organisations.....	p 81
<u>Figure 1</u> : Cycle de développement.....	p 35
<u>Figure 2</u> : Suivi longitudinal d'un élevage de dindes de une à douze semaines avec recherche sur 20 sujets des anticorps anti-chlamydia et des antigènes chlamydiens.....	p 46
<u>Figure 3</u> : Disposition des canards prélevés.....	p 55
<u>Figure 4</u> : Programmation des cycles de PCR classique.....	p 57
<u>Figure 5</u> : Localisation des salles de gavage dans le Sud-ouest.....	p 60
<u>Figure 6</u> : Localisation des salles visitées au cours de l'enquête épidémiologique.....	p 61
<u>Figure 7</u> : Gel d'électrophorèse des produits de PCR.....	p 64
<u>Figure 8</u> : Courbe d'amplification de la gamme de dilution de l'ADN.....	p 65
<u>Figure 9</u> : Courbe de dissociation.....	p 65
<u>Figure 10</u> : Droite de régression.....	p 66
<u>Figure 11</u> : Quantification de <i>C. psittaci</i> sur les écouvillons cloacaux ; session d'avril 2002.....	p 69
<u>Figure 12</u> : Quantification de <i>C. psittaci</i> sur les écouvillons conjonctivaux ; session d'avril 2002, lots 1 à 10.....	p 71
<u>Figure 13</u> : Quantification de <i>C. psittaci</i> sur les écouvillons conjonctivaux ; session d'avril 2002, lots 11 à 20.....	p 73
<u>Figure 14</u> : Quantification de <i>C. psittaci</i> sur les écouvillons conjonctivaux ; session de juillet 2002, lots 21 à 39.....	p 75
<u>Figure 15</u> : Quantification de <i>C. psittaci</i> sur les écouvillons conjonctivaux ; session de décembre 2002, lots 41 à 59.....	p 77

<u>Figure 16</u> : Port du masque de protection chez les gaveurs visités.....	p 82
<u>Figure 17</u> : Arrêt de la ventilation pendant le gavage.....	p 82
<u>Figure 18</u> : Port de gants par les gaveurs visités.....	p 83
<u>Figure 19</u> : Répartition des salles de gavage selon leur fréquentation.....	p 83

Références Bibliographiques

Annexes

<u>Annexe 1</u> : Fiche d'accompagnement des prélèvements.....	p 105
<u>Annexe 2</u> : Détermination du seuil de positivité d'après les calculs des faux positifs et faux négatifs.....	p 107
<u>Annexe 3</u> : Détermination du seuil « HEC » d'après les calculs des faux positifs et faux négatifs.....	p 108

Introduction

Le canard est-il un animal dangereux ?

En France, et particulièrement dans le Sud-ouest, des hommes courageux ont décidé de le domestiquer. Pour cela, ils l'élevaient en bâtiment lorsqu'il est jeune, avant de le lâcher en plein air, sur un parcours champêtre agréable.

Deux mois plus tard, ce palmipède est enfermé dans une petite cage où il sera saisi deux fois par jour pour avaler une dose croissante de maïs. Il ne sortira que deux semaines plus tard, pour se rendre à l'abattoir. Le canard aura donc vécu trois vies différentes au cours desquelles il aura été manipulé un grand nombre de fois.

Le contact de l'animal avec l'homme, s'il est souvent agréable, peut cependant être parfois risqué. En effet, certains pathogènes hébergés par les animaux sont capables de provoquer des maladies chez l'homme. Ce sont des agents de zoonoses.

Parmi ceux-ci se trouve une bactérie, *Chlamydomphila psittaci*, que l'on peut retrouver chez les canards. Les stress des différentes phases d'élevage ou de transport facilitent son excrétion et les nombreuses interactions avec l'homme augmentent le risque de contact avec la bactérie. Cependant, l'importance réelle de la chlamydiose chez les professionnels de la filière palmipède gras est difficile à évaluer car cette maladie est souvent sous diagnostiquée chez l'homme.

N'ayant jamais été évaluée précisément, la prévalence de *Chlamydomphila psittaci* chez le canard est inconnue, de même que le risque zoonotique induit, car, sur les animaux malades, la forme septicémique implique une virulence de tous les tissus, sécrétions et excréments. Il apparaissait donc urgent de préciser le portage sur cet animal pouvant aisément contaminer l'homme.

Nous nous sommes donc demandé comment détecter cette bactérie et quel était son niveau de prévalence dans les salles de gavage du Sud-ouest.

Pour répondre à cette question nous allons, dans une première partie, recenser les informations bibliographiques disponibles sur *Chlamydomphila psittaci*. Après avoir rappelé l'historique de sa découverte, de sa classification et évoqué la problématique de la contamination de l'homme, nous tenterons d'élucider les mystères de sa biologie. Puis, nous nous intéresserons aux techniques de diagnostic décrites dans la littérature, avant d'entreprendre, dans une seconde partie, notre étude expérimentale.

Lors de cette étude expérimentale, nous définirons un échantillonnage de canards à prélever. Nous développerons ensuite une méthode d'analyse de ces prélèvements, puis nous étudierons les résultats de prévalence de *C. psittaci*.

Nous tenterons, par la suite, d'établir quels sont les facteurs de risque grâce aux données retraçant le parcours des animaux, récupérées auprès des producteurs. Enfin, nous dresserons un bilan des pratiques de protection mises en place par les gaveurs.

1^{ère} Partie :
Etude Bibliographique

I. Historique, importance

I.1. Historique

La première description des chlamydies est attribuée à Halberstaedter et Von Prowazek (1907), (Longbottom, Coulter, 2003). Ils ont identifié des inclusions intracytoplasmiques contenant de grandes quantités de microorganismes dans des cellules issues d'un raclage conjonctival de patients humains atteints de trachome, ainsi que d'Orang-outang inoculés par du matériel provenant de cas de trachome. Ils pensaient que ces organismes étaient des protozoaires, c'est pourquoi ils les nommèrent « chlamydozoa », du grec « chlamys » signifiant manteau, car les Corps Élémentaires rouges semblaient être emmitouflés dans une matrice bleue.

Les premières descriptions de la maladie chez l'homme ont été réalisées par Juerguesen en 1874 et Ritter en 1876 (André, 1994). En 1879, celui-ci décrit, en Suisse, une épidémie de sept cas de pneumonie atypique associée à une exposition à des oiseaux tropicaux de compagnie (Longbottom, Coulter, 2003). Après un épisode à Paris en 1892, la maladie fut dénommée psittacose, du mot grec « psittakos », signifiant perroquet. En effet, la source de l'infection était déjà reliée à la possession de ces oiseaux, comme l'expose A. Morange dans une thèse soutenue à Paris en 1895 intitulée : De la psittacose ou infection spéciale déterminée par des perruches.

Entre 1929 et 1930, une épidémie humaine de psittacose due à l'importation d'oiseaux exotiques d'Argentine vers l'Europe et les Etats-Unis d'Amérique occasionnait au moins mille cas humains avec une mortalité de 20 à 30% (Longbottom, Coulter, 2003). L'agent responsable a été identifié par Bedson, et son cycle explicité. La relation entre les Corps Élémentaires déjà observés et les Corps Réticulés fut établie par Bedson et Bland en 1932. C'est d'ailleurs à la suite de cet épisode de 1929 que les principales recherches furent réalisées sur la chlamydie. La plupart des connaissances sur la clinique, la pathologie et l'épidémiologie ont ainsi été acquises à ce moment.

Jusqu'aux années 1930, la psittacose aviaire était considérée comme associée exclusivement aux oiseaux exotiques et notamment aux psittacidés. En 1938, il a été démontré sur un cas de pneumonie atypique humaine déclarée dans les îles Faroe, que des oiseaux non psittacidés, des Pétrels, pouvaient être à l'origine de contamination humaine (Bedson, 1940). A la fin de cette décennie, des chlamydies furent isolées de deux pigeons d'Afrique du Sud et des cas humains furent associés au contact des pigeons. En France, la psittacose fut classée Maladie Légale Réputée Contagieuse par le décret du 13 juillet 1937 (André, 1994). Il faut attendre 1965 et le décret du 16 août pour voir l'ornithose classée également MLRC. Psittacose et Ornithose seront déréglées en 1995.

L'importance de l'Ornithose chez les volailles devint de plus en plus claire pendant les années 50, où des études sérologiques montrèrent que les canards et les dindes pouvaient être atteints naturellement et contaminer l'homme (Andersen *et al.*, 1997). En effet, entre 1948 et 1953, 5 épizooties associées à la dinde et ayant entraîné 96 malades et 7 décès, ont permis d'établir que l'élevage de dinde représentait un danger pour les personnels (Williams, 1989). De plus, de nombreux cas de maladie ayant touché des hommes travaillant avec ces espèces ont été recensés à cette époque (Schachter, 1989). D'ailleurs Meyer, du Center for Disease Control (CDC), a relevé 5390 cas, dont 89 mortels, reportés entre 1931 et 1963. Plus récemment, entre 1975 et 1984, 1136 cas ont été répertoriés par le CDC, dont 8 décès.

I.2. Taxonomie

I.2.1. Classification morphologique et phénotypique

En 1938, le parasitologue français Brumpt propose de dénommer ce genre *Miyagawanella*, en l'honneur du professeur Miyagawa, qui avait décrit la morphologie, la transmission aux animaux de laboratoire et la capacité de l'agent responsable de la lymphogranulomatose vénérienne (LGV), à être cultivé dans la membrane chorioallantoïque de poulet, (Longbottom, Coulter, 2003). En 1945, Jones *et al.* démontrent la sensibilité aux sulfonamides de l'agent de la LGV et notent que d'autres agents du groupe psittacose-LGV-trachome sont également sensibles. Ils ont suggéré que ce groupe soit séparé des virus, catégorie dans laquelle il était classé, pour créer un nouveau genre nommé *Chlamydia*. Puis, en 1952, Meyer propose le nom de genre *Bedsonia* pour les agents de ce groupe, en l'honneur de Bedson qui fut le premier à décrire leur cycle de développement.

Entre 1945 et 1964, les taxonomistes ont réalisé 7 tentatives de définition des organismes responsables de la psittacose, de la lymphogranulomatose vénérienne et du trachome. Ces classifications furent déposées par Moshkovsky (1945), Rake (1948, 1957), Krasil'nikov (1949), Ryzhkov (1950), Zhdanov et Korenblit (1950), Zhdanov (1953) et Levaditi *et al.* (1964) (Longbottom et Coulter, 2003). La classification finale, proposée par Levaditi se résume par la proposition de quatre genres : *Chlamydia* Rake pour le trachome et les organismes à inclusions dans la conjonctive ; *Miyagawanella* Brumpt pour le LGV et les organismes assimilés ; *Bedsonia* Meyer pour les souches aviaires ; et *Rakeia* Levaditi, Roger et Destombes pour les souches des mammifères.

En 1966, Page suggéra que ces organismes du groupe psittacose-LGV-trachome, soient placés dans un seul et même genre, dans la mesure où leurs propriétés communes (morphologie, cycle de développement et antigène de groupe) les rapprochent plus que les spécificités d'espèce ne les éloignent. Le genre *Chlamydia* Jones, Rake et Stearns 1945 a donc été proposé (Page, 1966) et approuvé par le Sous-comité en charge des Chlamydiaceae, au sein du Comité de Taxonomie de l'American Society for Microbiology, le 4 mai 1971. Au milieu des années 60, les traits phénotypiques spécifiques des chlamydia identifiés et associés à la morphologie de l'inclusion devinrent la base du clivage des souches de chlamydia en deux espèces : *Chlamydia psittaci* et *Chlamydia trachomatis* (Page, 1968). Le groupe de *C. psittaci* est composé des souches d'une grande variété de sources animales, tandis que le groupe de *C. trachomatis* regroupe les souches d'origine humaine. Les inclusions de *C. trachomatis* sont rondes ou ovales, relativement rigides, rarement riches en Corps Élémentaires. Généralement, une cellule infectée ne contient qu'une inclusion. À l'opposé, les inclusions à *C. psittaci*, sont plus irrégulières, peu rigides, et souvent porteuses de Corps Élémentaires. Chaque cellule infectée contient en général plusieurs inclusions. Par ailleurs, les inclusions à *C. trachomatis* accumulent du glycogène, ce que ne font pas celles de *C. psittaci*. Dans le même esprit, il a été découvert que la plupart des souches de *C. trachomatis* sont sensibles à la sulfadiazine, tandis que la plupart des souches de *C. psittaci* ne le sont pas. En résumé, il a été défini que l'ordre des Chlamydiales était constitué d'une seule famille : les Chlamydiaceae qui ne comprennent elle-même qu'un seul genre : *Chlamydia* divisé en deux espèces : *C. trachomatis* et *C. psittaci* (Page, 1968).

I.2.2. Classification sérologique

Depuis les années 70, *C. trachomatis* est reconnue comme cause d'urétrite chez l'homme et de cervicite chez la femme. *Chlamydia trachomatis* est divisée en trois biovars : trachoma, LGV et murine (agent de la pneumonie des souris). En 1970, une méthode de

sérotypage a été développée, fondée sur un test de micro-immunofluorescence. Ce test permettra le typage immunologique de l'agent du LGV et la découverte de 18 immunotypes. Les biovars de *C. trachomatis* consistent en 14 sérovars désignés par les lettres A à K, ainsi que Ba, Da et Ia, qui infectent premièrement les cellules épithéliales des membranes des muqueuses. Les sérovars A à C sont spécifiques du trachome, tandis que D à K sont responsables d'infections sexuellement transmissibles. Les biovars du LGV sont répartis en quatre sérovars désignés L1, L2, L2a et L3, qui prolifèrent dans les tissus lymphatiques et sous-épithéliaux et causent des infections systémiques (Wang et Grayston, 1970).

Il a longtemps été reconnu que les organismes classés en *C. psittaci*, représentent un groupe divers d'organismes, incluant des pathogènes pour les mammifères non humains et les oiseaux. Ils diffèrent sur les points de vue sérologique, génétique et du tropisme d'hôte. Les souches aviaires ont été classées en six sérovars (A à F) à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques du sérovar. Les souches des mammifères ont été divisées, quant à elles, en 9 immunotypes grâce à un test d'immunofluorescence indirect (Perez-Martinez et Storz, 1985).

I.2.3. Classification moléculaire

Depuis les années 80, le développement des techniques de réassociation ADN-ADN a permis de retirer certains isolats des groupes de *C. trachomatis* et de *C. psittaci*, comme l'organisme nommé TWAR (Taiwan Acute Respiratory), responsable de troubles respiratoires sévères. En 1988, Cox *et al.* montrèrent que l'organisme TWAR avait moins de 10% de relation ADN avec *C. psittaci* ou *C. trachomatis*. Ceci, combiné à des analyses sérologiques, des profils de restriction par endonucléase et des études de l'ultrastructure des Corps Élémentaires, a amené à définir un nouveau nom d'espèce pour cette souche : *Chlamydia pneumoniae*.

Fukushi et Hirai (1992, 1993) ont proposé, sur la base d'études immunologiques et de l'ADN, que la souche associée à de la polyarthrite, des encéphalomyélites, de la pneumonie et une infection entérique inapparente chez le mouton, pouvait être rangée dans une quatrième espèce : *Chlamydia pecorum*. Cette séparation d'espèce est confirmée par des études d'hybridation Southern blot et de profils de restriction.

Par ailleurs, cette technique d'hybridation ADN-ADN permet de mieux différencier *C. trachomatis* et *C. psittaci*. En effet, comme il faut au moins 70% d'homologie nucléotidique pour que deux organismes soient considérés de la même espèce, ces études permettent de classer les chlamydia en huit groupes d'espèce. En 1993, un nouveau variant de *C. trachomatis* fut identifié après une analyse de la séquence ADN d'un isolat de porc. Il existe donc un biovar porcin au sein de l'espèce *C. trachomatis*. La séparation de la famille des Chlamydiaceae en neuf biovars est confortée par des analyses phénotypiques, antigéniques et génétiques, ainsi que par la maladie et le spectre d'hôte.

En 1999, Everett *et al.* proposèrent une nouvelle classification de l'ordre des Chlamydiales et de sa taxonomie basée essentiellement sur l'analyse phylogénétique de l'ADN ribosomique 16S et 23S, mais également sur les informations concernant le phénotype et la morphologie. Un résumé de cette nouvelle classification est disponible dans le tableau 1. Cette récente analyse montre que l'ordre contient quatre groupes distincts au sein de la famille, dénommés : Chlamydiaceae, Parachlamydiaceae, Simkaniaceae et Waddliaceae. La famille des Chlamydiaceae qui ne comprenait jusqu'alors que le genre *Chlamydia* est maintenant divisée en deux genres : *Chlamydia* et *Chlamydophila*. Au sein de ces deux genres, cinq nouvelles espèces vinrent rejoindre les quatre préexistantes. Inclus dans le genre *Chlamydia*, nous trouvons : *C. muridanum* et *C. suis* qui rejoignent *C. trachomatis*. Dans le nouveau genre *Chlamydophila*, dans lequel ont été classés *C. psittaci*, *C. pecorum* et *C. pneumoniae*, il a été ajouté trois nouvelles espèces : *C. abortus*, *C. felis* et *C. caviae*. Cette

classification est confortée par des analyses phylogénétiques portant sur les gènes de la Major Outer Membran Protein (MOMP), de la GroEl chaperonine, de la KDOtransférase, de la petite lipoprotéine riche en cystéine, de la protéine riche en cystéine de 60kDa et de la Rnase P RNA (Hermann *et al.*, 2000).

Les autres familles, Parachlamydiaceae, Simkaniaceae et Waddliaceae regroupent des genres bactériens dont les stades de développement sont similaires à ceux des Chlamydiaceae. Ces espèces, dont la classification n'est que partiellement établie sont nommées « lignées de chlamydiae environnementales » car elles furent découvertes principalement dans l'environnement et les eaux usées. L'hôte définitif n'a pas été identifié pour la plupart. Par ailleurs, d'après de récentes études PCR sur les séquences 16S, plus d'une centaine de nouvelles *Chlamydia-like* ont été identifiées, suggérant une diversité peut-être supérieure à celle actuellement admise.

Taxonomie des Chlamydies					
	Ancienne classification		Nouvelle classification		
Ordre	Chlamydiales		Chlamydiales		
Famille	Chlamydiaceae		Chlamydiaceae (et Simkaniaceae, Parachlamydiaceae, Waddliaceae)		
Genre	<i>Chlamydia</i>		<i>Chlamydia</i>		<i>Chlamydophila</i>
Espèces	<i>C. trachomatis</i>	Biovar Trachome	<i>C. trachomatis</i>	Biovar Trachome	
		Biovar LGV		Biovar LGV	
		Biovar Murin	<i>C. muridanum</i>		
		Biovar Porcin	<i>C. suis</i>		
	<i>C. pneumoniae</i>	Biovar Humain			<i>C. pneumoniae</i> Biovar TWAR
		Biovar Koala			Biovar Koala
		Biovar Equin			Biovar Equin
	<i>C. psittaci</i>	Sous-type Aviaire			<i>C. psittaci</i>
		Sous-type Abortif			<i>C. abortus</i>
		Sous-type Félin			<i>C. felis</i>
		Sous-type Cochon d'Inde			<i>C. caviae</i>
	<i>C. pecorum</i>				<i>C. pecorum</i>

Tableau 1 : Taxonomie des Chlamydies

I.3. Espèces hôtes pour *C. psittaci*

De nombreuses espèces d'oiseaux et de mammifères peuvent contracter une infection due à une bactérie de la famille des Chlamydiaceae. L'infection à *Chlamydophila psittaci* est particulièrement ubiquiste et l'homme peut être atteint à la suite d'un contact étroit avec des perroquets, des perruches, des oiseaux d'élevage tels que les dindes, les canards et même les pigeons.

Au moins 469 espèces aviaires sont actuellement recensées comme pouvant héberger, le plus souvent sous forme inapparente, *Chlamydophila psittaci*. Un quart de ces oiseaux sont des psittacidés :

- psittacidés : perroquets et perruches semblent relativement résistants mais, comme les pigeons, représentent des réservoirs naturels ;
- passériformes : canari, pinson, gould, paddy cardinal sont sensibles ;
- columbidés : colombes, tourterelles, pigeons (véritables réservoirs) ;

- gallinacés : poules, faisans, dindes (principale source d'infection humaine aux Etats-Unis), pintades ;
- palmipèdes : canards et oies ;
- mais aussi des oiseaux sauvages tels que les moineaux, les mouettes, les pétrels (Iles Féroé 1938), les autruches (Parc Réserve Africaine de Sigean), les rapaces...

Enfin, parmi les espèces réceptives n'appartenant pas au monde des oiseaux, il faut citer la classe des mammifères, au premier rang desquels on trouve l'homme.

Le tableau suivant est une synthèse actualisée (Kaleta et Taday, 2003 ; Trap et Mahe, 1996 ; Dubois *et al.*, 2000) présentant les 26 ordres d'oiseaux sensibles à *C. psittaci*.

ORDRE	Famille	Oiseaux	Nombre examiné	Nombre de positifs
Accipitriformes	Accipitridés	Aigles, milans...	225	30
Apodiformes	Apodidés	Martinets	92	1
Ansériformes	Anatidés	Canards, oies	244	108
	Méléagridés	Dinde	1	1
Apterygiiformes		Kiwis	3	1
Cathartiformes		Vautours du nouveau monde	7	1
Charadriiformes	Alcidés	Macareux	23	6
	Laridés	Mouettes	118	29
	Recurvirostridés	Echassiers	194	18
Ciconiiformes	Ardéidés	Hérons...	113	13
	Threskiornithidés	Spatules, ibis	2	2
Columbiformes	Columbidés	Pigeons	439	51
Coraciiformes	Alcedinidés	Martins pêcheurs	17	1
	Bucérotidés	Calaos	1	1
Cuculiformes	Cuculidés	Coucou...	131	2
Cupuliformes	Musophagidés	Touracos	34	10
Falconiformes	Falconidés	Faucons	63	9
Galliformes	Phasianidés	Poules	6	5
	Tétraonidés	Cailles, faisans	261	16
Gruiformes	Gruidés	Grues...	14	2
	Otididés	Outardes...	22	2
	Rallidés	Foulques...	140	2
Passériformes		Oiseaux percheurs	env. 4000	90
	Fringillidés	Canaris...	34	11
	Estrildidés	Bengalis...	11	6
	Turdidés	Rouge gorges	2	2
	Sturnidés	Mainates	5	3
	Corvidés	Geais	1	1
	Timaliidés	Rosignols du Japon	2	1
	Embérizidés	Bruants	1	1
Pelecaniformes	Pélécanidés	Pélicans et...	57	8
Piciformes	Picidés	Pics-verts	379	8
Podicipediformes	Podicipédidés	Grèbes	20	2
Procellariiformes		Divers	102	5

ORDRE	Famille	Oiseaux	Nombre examiné	Nombre de positifs
Psittaciformes	Psittacidés	Perroquets...	743	337
Sagittariiformes		Serpentaires	1	1
Sphénisciformes		Manchots	16	4
Strigidiformes		Hiboux, chouettes	142	12
Struthioniformes	Struthionidés	Autruches	27	20
Upupiformes		Huppes	53	2
Trochiliformes		Oiseaux mouche	317	2

Tableau 2 : Relevé des ordres et familles d'oiseaux pour lesquels l'infection à *Chlamydophila psittaci* a été démontrée

I.4. Les infections à *Chlamydophila psittaci* chez l'Homme : l'ornithose-psittacose

I.4.1. Symptômes chez l'homme

La voie de contamination chez l'homme est le plus souvent respiratoire (Longbottom et Coulter, 2003). La contamination se fait par inhalation d'aérosols de matières fécales séchées ou de sécrétions respiratoires des oiseaux infectés. D'autres voies de transmission de l'infection comme le contact direct avec les plumes, les tissus ou les sécrétions des oiseaux infectés, par le contact bouche à bec, la blessure par morsure ou toute effraction de la barrière cutanée, sont également décrites, bien que plus rares.

Certaines souches sont très infectieuses pour l'homme et l'infection peut alors résulter d'une exposition brève. La transmission inter-humaine a été suggérée (Olson et Treuting, 1944), mais semble être très rare, voire anecdotique.

Le temps d'incubation est de 5 à 14 jours, mais peut atteindre un mois dans de rares cas. Les symptômes d'une psittacose clinique varient d'une infection inapparente ou bénigne, avec un syndrome pseudo-grippal, jusqu'à des formes plus graves avec pneumopathie sévère parfois mortelle (Abadia, 2003). Les symptômes les plus souvent observés incluent de la fièvre, des migraines, une douleur des articulations et des myalgies, une photophobie et une gorge douloureuse (Schaffner *et al.*, 1967 ; Gregg et Wehrle, 1972 ; Byrom *et al.*, 1979 ; Eeckhout *et al.*, 1987). Lorsqu'une pneumonie atypique est installée, elle est bien souvent accompagnée de toux non productive et de difficultés ou de douleurs respiratoires. Lors de la phase aiguë, la numération des cellules leucocytaires est souvent normale, une leucopénie pouvant néanmoins être décelée dans 25% des cas. En général, la fréquence cardiaque est faible, en relation avec l'augmentation de la température corporelle. Des éruptions cutanées peuvent être observées. *Chlamydophila psittaci* peut infecter d'autres organes et entraîner des myocardites, des endocardites, des hépatites, des encéphalites ou des méningites. Des complications rénales et neurologiques peuvent également survenir (Crosse, 1990).

A l'autopsie, on observe des pneumonies extensives, les alvéoles affectées étant emplies d'exsudats séreux ou fibrineux. La rate peut être hypertrophiée et des zones de nécrose focale peuvent être visibles sur le foie. Par ailleurs, il peut y avoir des signes d'inflammation dans les méninges et de l'œdème dans le cerveau et la colonne vertébrale.

Le diagnostic biologique fait appel aux techniques de sérologie (Abadia, 2003). Les réactions de référence sont la fixation du complément (FC) et surtout la microimmunofluorescence (MIF). L'interprétation des résultats est toujours délicate du fait de croisements interspécies entre *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci* et *Chlamydia trachomatis*. De plus, la lecture au microscope de la réaction en MIF dépend de

l'expérience de l'opérateur et du microscope à fluorescence utilisé : de ce fait, la reproductibilité inter-laboratoire est limitée.

Le diagnostic par radiographie permet de déceler une opacification diffuse du parenchyme pulmonaire (Gosbell *et al.*, 1999). Cette image est intéressante et abonde dans le sens de l'infection à *C. psittaci*, lorsqu'elle est corrélée à d'autres signes cliniques.

En ce qui concerne l'immunité acquise suite à une première infection, celle-ci est relative et de courte durée. Pour cette raison, une vaccination contre *C. psittaci* ne protège pas d'une réinfection (Gosbell *et al.*, 1999).

I.4.2. Quelques épisodes recensés

Selon le Center for Disease Control (CDC) d'Atlanta (USA), 1987, lors d'une étude portant sur la surveillance de la psittacose entre 1975 et 1984 dans 47 états, 1136 cas de psittacose humaine sont répertoriés. Environ 60% de ces cas sont dus à l'exposition à des oiseaux de compagnie en cage ou des pigeons.

Au Japon, un homme de 44 ans, employé d'une animalerie a été hospitalisé avec de la fièvre et une radiographie montrant une infiltration dans la partie distale du poumon droit. Le lendemain, un de ses collègues, développa les mêmes symptômes. Les titres sérologiques d'un test d'inhibition de la fixation du complément ciblé sur *Chlamydophila psittaci*, étaient multipliés respectivement par quatre et par six, sur deux prises de sang réalisées en phase aiguë puis en phase de convalescence. Notons que dans l'animalerie où les deux patients travaillaient, à la même époque, plusieurs perruches sont mortes vraisemblablement après une infection par cette bactérie (Maegawa *et al.*, 2001).

A Anvers en Belgique, un douanier a été hospitalisé pour une psittacose, contractée une dizaine de jours plus tôt, au contact de perruches. Six autres douaniers ayant été au contact des oiseaux, souffrirent d'une pneumonie atypique. Deux de ces six cas ont été confirmés par sérologie. Le taux d'attaque s'élevait à 47%. Le risque de contracter une psittacose a été 2,8 fois plus élevé pour une exposition de plus de deux heures avec les perruches (Abadia *et al.*, 2001).

En décembre 1978, s'est déclarée une épidémie de psittacose au Collège de Médecine Vétérinaire de l'Université Cornell de New York, USA (Filstein *et al.*, 1981). Deux personnes furent hospitalisées et quatre autres soignées pour un syndrome grippal avec de la fièvre, des myalgies et des migraines. Des examens radiographiques ont révélé des infiltrats pulmonaires focaux ou diffus. Ces six cas, ainsi que la séroconversion d'un grand nombre de personnes travaillant au Département de Médecine Aviaire, semblent être dus aux flux d'air issus de la salle d'autopsie. Cet air diffusait vers le hall de dépose des animaux, ou le personnel laissait les boîtes contenant les animaux avant autopsie et venait les reprendre ensuite.

Des précautions furent prises par la suite afin d'éviter les mouvements d'air susceptible d'être porteur de germes (Filstein *et al.*, 1981).

Une étude transversale rétrospective de séroprévalence a été menée dans la population des salariés de la filière avicole de Bretagne et Pays de la Loire, sur les salariés ayant subi un arrêt de travail supérieur à 5 jours au cours de l'année 2000, avec au moins un épisode de fièvre élevée. La séroprévalence dans la population étudiée était de 43,8% (n= 162). Une liaison significative a été établie entre les résultats de sérologie et les espèces de contact dominant. Le canard était surreprésenté parmi les sujets ayant eu une sérologie positive (Abadia, 2003).

En Angleterre, une exploitation possédant son usine de transformation a développé son propre élevage de canards (St J. Newman *et al.*, 1992). Entre janvier et août 1985, il est devenu la source principale de matière première pour l'usine. Malgré un renouvellement du personnel toujours important dans cette unité, il faut remarquer que dans le premier semestre 1985, il fut maximal avec le départ de 36 membres du personnel. Entre juin et août 1985, trois employés, souffrant de pathologie respiratoire, furent admis à l'hôpital avec des résultats sérologiques évocateurs d'infection à *C. psittaci*. Douze personnes furent absentes de juin à fin août 1985. Ils ont été interrogés et lors de l'enquête, un échantillon de sang fut prélevé. Une séroconversion indicatrice d'ornithose fut relevée pour huit des douze employés.

En conclusion, nous dirons qu'il existe de nombreux cas de contamination humaine à *Chlamydophila psittaci*. La plupart se résolvent bien, grâce à une prise en charge rapide par des molécules efficaces. La présence d'oiseaux ou de volailles et plus précisément l'élevage de canards sont, comme nous venons de le voir, très souvent mis en cause. Sachant que le risque est plus que doublé lors d'un contact de plus de deux heures avec les animaux, nous évaluons aisément le risque important que courent les éleveurs, transporteurs et personnels d'abattoirs. N'oublions pas que la contamination par voie aéroportée dispense du contact et rend la bactérie particulièrement insidieuse. De plus, il s'agit d'un pathogène de répartition mondiale dont le portage par la faune sauvage est démontré, ce qui amène à considérer le caractère illusoire de son éradication. Par ailleurs, du fait de la faible persistance de la réponse immunitaire, une nouvelle contamination est toujours possible.

I.4.3. Populations à risque

Il existe trois sous-populations dans l'ensemble de la population à risque (Salisch *et al.*, 1996) :

a) Personnes sans contact avec des volailles

Une étude basée sur une mesure des titres sérologiques obtenus par un Test de Fixation du Complément sur une population rurale (Kewitsch et Berdau, 1965), montre que 47% des individus positifs n'avaient pas de contact avec les volailles. Une autre étude menée à Berlin en 1973, a mis en évidence que 26,6% de la population étudiée avait des titres sérologiques évocateurs d'une infection par *Chlamydia*. Il n'y avait pas de différence significative entre les individus au contact des oiseaux, volailles incluses, et ceux ne l'étant pas.

Dans cette population sans contact avec des volailles, il est important de reporter les cas de contamination par aérosols que nous avons évoqués plus haut. Ainsi, les voisins d'une salle d'autopsie de volaille (Filstein *et al.*, 1981), ou bien le personnel travaillant dans un laboratoire utilisant des chlamydies viables (Gosbell *et al.*, 1999), peuvent être exposés au risque, sous certaines conditions.

b) Eleveurs de volailles

Le risque de transmission de la psittacose des volailles à l'homme est faible, comparé à d'autres espèces aviaires (Salisch *et al.*, 1996). Une étude américaine menée entre 1975 et 1977 par Potter et Kaufmann (1979), rapporte que sur 212 cas, les oiseaux de cage sont responsables de 127 cas (60%) et les pigeons domestiques et sauvages de 39 cas (18%). Malgré la quantité importante de volailles élevées aux USA, celles-ci ne sont responsables que de 31 cas (15%), pour lesquels seul l'élevage de dindes est incriminé.

Bien que faible, ce risque est réel et la prévalence de titres sérologiques élevés est 10 fois plus forte dans la population d'éleveurs de volailles tchèque que dans la population générale (Šerý *et al.*, 1961).

c) Personnel d'abattoir de volaille

Il s'agit ici de la population vraisemblablement la plus exposée. En effet, la concentration importante d'aérosols contaminants, les mouvements des animaux remuant ces poussières et l'activité physique humaine nécessitant une respiration profonde sont autant de facteurs de risques.

Une comparaison de titres sérologiques a été menée sur du personnel d'abattoir de poulet (n=44), de dinde (n=119) et d'une usine de textile (n=60), exempts de signes cliniques (Hines *et al.*, 1957). Les résultats montrent des titres sérologiques plus élevés pour les travailleurs au contact des volailles (38,6% et 32,7%). Parmi les huit ouvriers séropositifs de l'usine de textile, trois étaient au contact d'oiseaux, psittacidés ou dindes.

En France, la psittacose est une zoonose professionnelle qui touche principalement les hommes travaillant avec les canards vivants. De par la nature des contacts homme-animal, les postes qui paraissent les plus exposés sont le gavage et l'abattage-éviscération. Les cas concernant les abattoirs de palmipèdes sont en particulier régulièrement décrits. Par rapport aux autres productions avicoles, la filière « palmipèdes à foie gras » présente des risques propres. Ces risques sont liés à la susceptibilité particulière des palmipèdes à l'infection et à l'itinéraire technique du canard gavé, notamment la phase de gavage pendant laquelle le canard est soumis à des conditions aptes à exacerber une excrétion de *Chlamydophila* (température, vitesses d'air) et des conditions de logement qui augmentent le risque de contamination de l'éleveur en contact (brassage d'air, aérosols, cages surélevées, manipulation à chaque gavage).

I.4.4. Biais de recrutement des cas cliniques

Les données épidémiologiques françaises sont encore insuffisantes et seuls quelques cas de maladies professionnelles indemnisables sont recensés chaque année en France (Abadia, 2003).

Plusieurs constats peuvent être établis :

- absence de système d'information organisé permettant d'apprécier la fréquence de la pathologie en dehors des cas hospitalisés,
- absence de prise en charge de la psittacose en tant que problème de santé publique,
- absence de moyens de prévention évalués.

Le sous-diagnostic de la psittacose en France peut également être dû au fait que les médecins ne pensent pas toujours à cette pathologie devant une pneumonie atypique.

Par ailleurs, les principaux symptômes de la psittacose sont des douleurs musculaires, de la fatigue et de la fièvre. Ces signes font principalement penser à la grippe en période hivernale et, en première intention, il est aisé de se tromper de diagnostic.

Cependant, l'inverse peut également se produire. Ainsi, des cas d'infections humaines diagnostiquées comme étant dues à *C. psittaci*, et finalement attribuées à *C. pneumoniae*, sont recensés dans la littérature (Persson et Treharne, 1989 ; Bruu *et al.*, 1991). En effet, des titres en anticorps élevés peuvent être dus à un contact préalable avec *C. pneumoniae* et la recherche des anticorps de genre n'est pas suffisante pour les différencier.

I.4.5. Traitement

Selon la sévérité de l'infection, les tétracyclines et les macrolides, notamment l'érythromycine, seront employés par voie orale ou parentérale. Les premiers signes d'amélioration sont visibles le plus souvent au bout de 48 à 72 heures (Schlossberg, 2000). Le traitement doit durer au moins 10 à 14 jours pour éradiquer les organismes pathogènes.

En général, l'érythromycine est conseillée pour soigner les individus jeunes et les femmes enceintes. L'immunité consécutive à l'infection sera de courte durée. Pour cette raison, des réinfections et des infections persistantes ont été observées (Meyer et Eddie, 1951).

II. La chlamydiose aviaire

Chlamydophila psittaci est un micro-organisme procaryote, cyto-parasite obligatoire, dépendant énergétiquement de sa cellule hôte, eucaryote. C'est un organisme ubiquiste fortement infectieux et remarquable par sa capacité à esquiver les défenses immunitaires de la cellule hôte.

Dans cette partie, nous allons tout d'abord étudier la biologie de *C. psittaci*, avant d'aborder ses conséquences sur l'organisme. Nous verrons quelles sont les espèces réceptives, comment se déroule la transmission ainsi que la résistance de la bactérie. Nous nous intéresserons enfin aux facteurs favorisant, à la prévention et aux traitements disponibles.

II.1. Biologie

II.1.1. Morphologie

Les chlamydies possèdent un tropisme pour les cellules épithéliales bordant les muqueuses. Du fait de leur mode de vie de parasites intracellulaires stricts, elles ont longtemps été considérées comme des virus. Cependant, elles sont entourées d'une membrane externe très proche de celle des bactéries Gram-, et contiennent de l'ADN, de l'ARN, ainsi que de nombreux ribosomes. Elles synthétisent des protéines spécifiques, des acides nucléiques, des lipides (Wyrick *et al.*, 1989).

La chlamydie se présente sous deux formes (André, 1994) :

a) Corps élémentaire (CE) : il s'agit de la forme infectieuse. C'est la forme que l'on peut retrouver dans le milieu extérieur. Le CE est sphérique (0,2 à 0,4 μm de diamètre), immobile, sans flagelle.

La membrane externe est rigide. Nous pouvons sûrement relier cet état à la présence de ponts disulfures au niveau de la Major Outer Membran Protein (MOMP), riche en cystéine. Elle renferme aussi un lipopolysaccharide (LPS), à propriétés antigéniques. Il contient des épitopes de genre, communs au genre *Chlamydophila*. Des antigènes d'espèce, protéiques, sont situés sur la MOMP. Une fine membrane intermédiaire sépare la membrane externe de la membrane cytoplasmique.

b) Corps réticulé (CR) : il représente la forme intracellulaire métaboliquement active (par division binaire) de la chlamydie. Son diamètre est de 0,6 à 0,8 μm . Sa paroi est fine et souple. Les capacités métaboliques de cette forme non infectieuse de la chlamydie sont réduites : elle synthétise son ADN, son ARN, ses protéines.

II.1.2. Cycle

Voir le schéma descriptif (figure 1), (André, 1994).

a) Fixation : le CE présente un tropisme préférentiel pour les cellules à épithélium cylindrique, essentiellement celles des muqueuses respiratoires et digestives ainsi que pour les macrophages mononucléaires. Il s'attache aux microvillosités de la surface apicale des cellules. Des phénomènes complexes interviennent dans cette fixation et dans les rapports entre chlamydie et cellule hôte.

b) Pénétration : à l'image de ce qui se passe pour les virus, on pense que, par l'intermédiaire des récepteurs, des signaux moléculaires permettent la réalisation d'une endocytose. Les CE franchissent la membrane externe (paroi) de la cellule hôte en des zones très précises de ces microvillosités. La cellule hôte génère des invaginations de sa membrane plasmique. Ces

vésicules abritent alors les CE et, par la suite, se focalisent, pour l'essentiel, dans la zone de Golgi. Par un mécanisme non encore élucidé et grâce à leur position intracellulaire, les CE restent partiellement protégés vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte. Ces vésicules endosomiques échappent à une fusion lysosomique classique et destructrice, et ce, durant tout le temps de leur séjour intracellulaire.

c) Transformation du CE en CR : les CE, métaboliquement inertes, vont se transformer en CR, métaboliquement actifs. On assiste à une modification au niveau des membranes du CE : les ponts disulfures inter-protéiques disparaissent. Il se réalise ensuite une synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines, conduisant à la formation du CR.

d) Croissance du CR : celui-ci est privé de système de transport d'électrons, incapable de générer des liaisons phosphates (ATP - GTP) de haut niveau énergétique. Il va donc devoir prélever l'énergie nécessaire dans la cellule hôte. Pour ce faire, le CR plaque son endosome contre les mitochondries de la cellule hôte et grâce à l'intermédiaire d'une ATPase spécifique (translocase), il parasite son ATP. Il semble que ce prélèvement se réalise au niveau de saillies cylindriques (disposées en rangées hexagonales) émergeant de la membrane cytoplasmique des CR et traversant leur membrane externe. Ces saillies pénétreraient alors la membrane endosomique protégeant les CR en développement, permettant alors le parasitisme énergétique de la cellule hôte. Des carences en éléments nutritifs chez celle-ci pourraient faire en sorte que la chlamydie se mette temporairement en sommeil, et reste alors à l'état latent chez l'hôte porteur. Par la suite, grâce à une scission binaire, se forme alors un groupe de un à plusieurs centaines (100 à 500) de CR. Ce groupe prend le nom d'inclusion (ou « corps de Levinthal-Cole-Lillie »).

En ce qui concerne *Chlamydophila psittaci*, il est possible d'observer plusieurs inclusions dans une même cellule hôte, alors que pour *Chlamydia trachomatis*, il n'est jamais observé qu'une seule inclusion.

Lors de la division de la cellule hôte, il est possible d'observer la transmission de l'inclusion.

e) Maturation des CR : ils sont considérés comme matures lorsque les éléments nutritifs de la cellule sont épuisés.

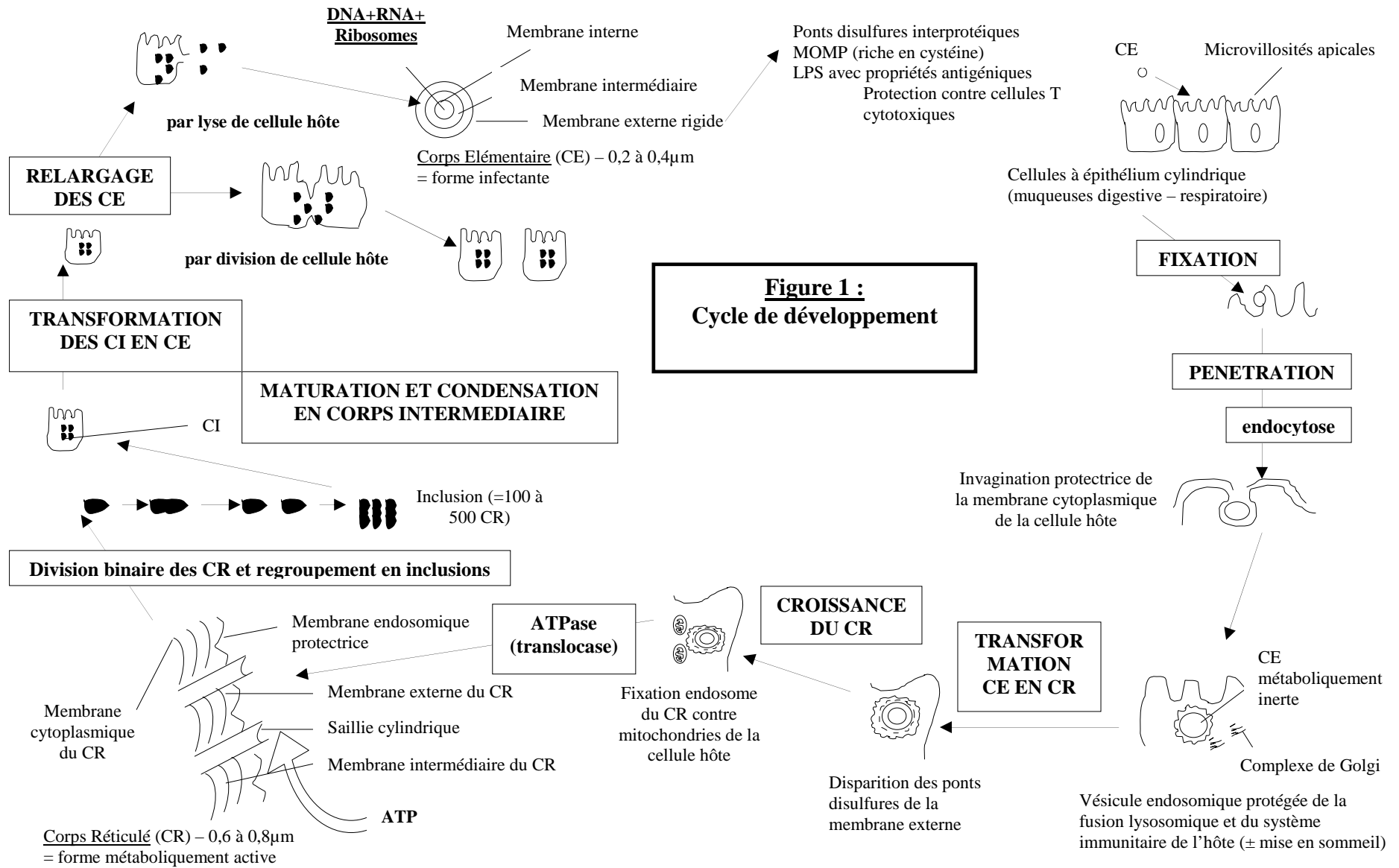
f) Condensation des CR en Corps Intermédiaires (CI) : cette mutation se déroule à l'intérieur de l'inclusion, et une fois mis en sommeil, ces agents peuvent persister plus ou moins longtemps, sans activité, dans les cellules hôtes. Il faut rappeler que seuls les CE sont infectants. Les CR et les CI ne le sont pas.

g) Transformation des CI en CE.

h) Relargage des CE : il se produit, généralement, suite à la lyse de la cellule hôte (sous l'action des enzymes produites par la chlamydie). Les CE envahissent alors de nouvelles cellules hôtes ou sont disséminés à l'extérieur.

Le LPS spécifique de la chlamydie, contenu dans la membrane externe, agit sur la surface de la cellule parasitée. Ce LPS protège le CE de l'attaque des cellules T cytotoxiques. Il est à peu près identique à celui de quelques bactéries Gram- (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter*). La présence de ces germes dans les prélèvements soumis à analyses peut poser des problèmes lors de l'utilisation de certaines méthodes de diagnostic (test ELISA notamment).

En culture cellulaire, ce cycle de développement demande environ 48h pour se réaliser complètement. Il dure une trentaine d'heures in vivo.



II.1.3. Pouvoir antigénique

Rodolakis, en 1993, classe les antigènes bactériens en 4 types :

a) Antigènes de genre : ils sont communs à toutes les chlamydies. Le LPS de la membrane externe porte au minimum 3 épitopes de genre. C'est cet antigène que met en évidence la réaction de fixation du complément (FC). En dehors du LPS, on dénombre au moins quatre autres antigènes de genre dont un, soluble, est excrété dans les milieux de culture cellulaire infectés par les chlamydies.

b) Antigènes d'espèce : ils permettent de faire la distinction entre les différentes espèces de chlamydies (*Chlamydophila psittaci* - *C. pneumoniae* - *Chlamydia trachomatis*). Ils sont mis en évidence grâce à l'emploi d'anticorps monoclonaux (test ELISA - IFT) ou par la réaction de fixation du complément.

c) Antigènes de sous-espèce : ils sont communs à certaines souches de *C. psittaci*. Deux antigènes de sous-espèce, au minimum, sont communs aux souches félines, aux souches ruminants et à certaines souches aviaires.

d) Antigènes de type : avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux, quelques résultats limités ont été obtenus pour *C. psittaci*.

II.1.4. Pouvoir pathogène

a) L'action pathogène de la chlamydie varie selon l'état de santé de l'hôte récepteur, son âge (les jeunes étant beaucoup plus sensibles que les adultes), la virulence de la souche, le tropisme d'hôte (André, 1994). Une même souche peut donc être à l'origine d'une infection inapparente comme d'une infection suraiguë.

La pathogénicité de la chlamydie résulte d'une part de l'action directe de la lyse des cellules hôtes, mais surtout de la production de toxines de puissance variable suivant les souches. Ces toxines sont liées à la membrane externe du CE libre. Elles ont une action hépato et néphro-toxique et déclenchent la production d'anticorps. Ces toxines disparaissent une fois le CE entré dans la cellule hôte.

b) Réponse immunitaire (Berche *et al.*, 1988) : Comme pour toute bactérie à croissance intracellulaire, la réponse immunitaire de type cellulaire semble capitale pour contrôler la dissémination des chlamydies. Des cellules T spécifiques, par la production de lymphokines comme l'interféron, accroissent le potentiel bactéricide des macrophages infectés par ces bactéries. Des cellules T pourraient aussi activer les cellules épithéliales qui hébergent des chlamydies et inhiber ainsi la croissance intracellulaire de ces germes. Cela a été suggéré par l'observation que l'interféron γ induisait dans la cellule hôte épithéliale une déplétion en tryptophane, acide aminé essentiel à la multiplication de *Chlamydophila*.

Un autre mécanisme immunitaire serait représenté par l'activité de cellules cytotoxiques capables de détruire spécifiquement les cellules infectées par des chlamydies.

Enfin, la présence d'IgG, d'IgM et d'IgA spécifiques peut être détectée chez l'homme et l'animal infectés par ces microorganismes. En cas d'atteinte limitée aux muqueuses, seules des IgA sécrétoires sont régulièrement mises en évidence (larmes, sécrétions génitales). Dans les infections généralisées (psittacose, lymphogranulomatose vénérienne...), des IgM et des IgG apparaissent dans le sérum. En situation intracellulaire, les chlamydies sont à l'abri de l'action des anticorps. Ceux-ci peuvent toutefois empêcher une dissémination des chlamydies libérées dans le milieu extracellulaire et protéger le sujet d'une réinfection exogène en inhibant l'adhésion du corps élémentaire aux cellules cibles et en permettant la fusion phagolysosomiale par opsonisation des germes. Leur rôle dans l'immunité n'est pas primordial car une injection de sérum immun n'assure pas de protection, des titres élevés d'IgG et d'IgM ne

sont pas protecteurs, mais il est possible que les IgA empêchent la pénétration du CE chez un hôte potentiel en assurant une protection des épithélium muqueux (André, 1994).

II.2. Clinique

II.2.1. Incubation

Des études menées chez des dindes soumises à un aérosol de chlamydie ont permis de retrouver ces micro-organismes dans les fientes environ 72 h plus tard, la formation des anticorps débutant juste après (Fudge, 1992). Cependant, cette incubation est fonction de la virulence de la souche en cause, de la concentration en germes des produits contaminants, de la sensibilité de l'oiseau récepteur. Elle peut varier de quelques jours à plusieurs semaines. Bien que certains oiseaux semblent pouvoir se débarrasser des chlamydie en deux à trois mois, la majorité d'entre eux deviennent des porteurs chroniques. Dans un groupe d'oiseaux en contact avec un animal infecté, 90% des individus peuvent devenir séropositifs (test FC) avant l'apparition des signes cliniques.

II.2.2. Symptômes

Il faut rappeler que, dans la plupart des cas, l'infection reste inapparente, d'où la difficulté des contrôles. Ces symptômes présentent une très grande diversité en fonction de l'état immunitaire de l'oiseau contaminé, de la pathogénicité de la souche impliquée, de la charge bactérienne infectante, de la présence concomitante d'autres maladies (bactériennes, virales, fongiques, parasitaires), souvent secondaires à la chlamydie et venant compliquer le tableau clinique, de l'existence de stress variés...

Trois formes de la maladie sont observées sur le terrain. A ces trois formes, il convient cependant d'ajouter la forme inapparente, qui est certainement très fréquente mais ne fait l'objet d'aucune recherche de routine dans les élevages (Fudge, 1984) :

- Forme suraiguë : elle est particulièrement observée chez les jeunes oiseaux et les petits exotiques. La mort survient en quelques heures, sans signe clinique particulier.

- Forme aiguë : il s'agit là d'une forme plus classique. Elle s'observe de préférence chez les amazones et les aras. Les symptômes décrits peuvent être présents en même temps ou séparément. La maladie prend, en général, une forme septicémique. L'oiseau est abattu, se tient en « boule », a du mal à se tenir perché, garde les paupières mi-closes, souffre de blépharo-conjonctivite, voire de kérato-conjonctivite, tient les ailes plus ou moins pendantes, a un aspect endormi, frissonne. On note également des troubles respiratoires : dyspnée, polypnée, jetage nasal séro-muqueux, éternuements, mais aussi des troubles digestifs : gastro-entérite, diarrhée verdâtre souillant les plumes péri-cloacales. On constate de plus une polyurie, les rejets d'urates étant fréquemment jaunâtres ou verdâtres, de par la présence de biliverdine.

Le malade s'amaigrit rapidement, ne chante plus. En saison de reproduction, les femelles atteintes cessent de pondre (une mortalité embryonnaire peut être constatée si la ponte persiste). Enfin, des troubles nerveux (paralysies, convulsions), traduisant une atteinte du système nerveux central, précèdent parfois la mort. Celle-ci peut survenir dans les 15 jours qui suivent le déclenchement de la maladie.

- Forme subaiguë ou chronique : on peut n'observer aucun des symptômes précédemment décrits, ou alors essentiellement des troubles respiratoires (dyspnée, toux, râles, éternuements, jetage nasal), souvent accompagnés d'un écoulement oculaire.

Chez de nombreux oiseaux, le seul signe extérieur tangible reste une conjonctivite (en particulier chez les pigeons où la chlamydie est très courante). Dans les élevages de

perruches ondulées ou perruches callopsittes, dans lesquels sévit souvent une chlamydie chronique, on note surtout une augmentation de la morbidité et de la mortalité chez les très jeunes oiseaux. On peut également relever un amaigrissement ainsi que des troubles modérés de la reproduction (diminution de la fertilité, de l'éclosabilité et mortalité embryonnaire). Bien entendu, des germes de sortie peuvent venir compliquer l'évolution. Une guérison apparente a souvent lieu.

- **Forme inapparente** : il existe des porteurs inapparents, ne présentant pas de symptômes extérieurs caractéristiques de la maladie. Chez les psittacidés, le taux de porteurs chroniques inapparents est estimé entre 10 à 40%, voire, dans quelques cas, jusqu'à 100%.

Aux Etats-Unis en 1988, on estimait que 7% des oiseaux étaient porteurs de chlamydies à leur sortie de quarantaine (Williams, 1989). En 1989, 40% des élevages de perruches ondulées des Pays-Bas étaient considérés comme excréteurs de chlamydies (Dorrestein, Van Buuren, 1986), de même que 12% des psittacidés vivant en Allemagne.

II.2.3. Symptômes décrits chez le canard

Farmer *et al.* (1982), décrivent les symptômes d'un cas de chlamydie aviaire en Tchécoslovaquie sur le canard. Cet épisode s'est, à l'inverse des cas asymptomatiques décrits aux USA, exprimé par des conjonctivites purulentes bilatérales et des kératoconjonctivites associées à une émaciation et une atrophie musculaire. L'autopsie a révélé la présence d'inflammation et d'exsudation des membranes séreuses du péricarde et des sacs aériens, ainsi qu'une congestion de la rate et du foie. Sur les canards plus âgés, l'infection latente a été associée à des hépato et splénomégalies.

Chalmers *et al.*, 1985, rapportent un cas ayant entraîné une mortalité de 15% sur des canetons de 4 à 6 semaines. La plupart présentaient, de plus, des conjonctivites. A l'autopsie, il a été noté des rates réactionnelles marbrées, des reins et des foies pâles et hypertrophiés. De plus, des foyers hémorragiques étaient parfois notés sur le pancréas.

II.3. Lésions

A l'autopsie, on note généralement :

- a. un amaigrissement,
- b. un dépôt fibrineux blanchâtre sur les séreuses péricardiques et péritonéales ainsi que sur les sacs aériens (dépôts habituellement très riches en chlamydies),
- c. un œdème pulmonaire, parfois une pneumonie secondaire, de l'aérosacculite,
- d. un foie hypertrophié, à bords arrondis, de couleur ocracée,
- e. une fréquente dégénérescence hépatique graisseuse et parfois la présence de psittacomes : petits foyers nécrotiques se présentant sous la forme de nodules gris jaunâtre, d'aspect tumoral, de quelques millimètres de diamètre,
- f. une splénomégalie souvent très importante (x 3 à 15), avec une pulpe rouge sombre, molle, avec parfois présence de psittacomes ; cette splénomégalie pouvant être la seule lésion en cas d'infection inapparente,
- g. des reins souvent hypertrophiés, friables, de couleur grisâtre,
- h. éventuellement une entérite catarrhale,
- i. un épanchement péritonéal dans certains cas.

II.4. Espèces réceptives

Il semble que de très nombreuses espèces d'oiseaux peuvent héberger *C. psittaci*. Le portage étant généralement asymptomatique, ces volatiles ne sont pas souvent amenés pour

des signes cliniques évocateurs de chlamydie. Il est donc difficile de dresser un bilan des oiseaux sensibles.

Dans le cadre d'une étude menée entre 1992 et 1995, des écouillons oculaires et/ou de narines et/ou de cloaque et/ou une récolte de fientes d'oiseaux vivants ont été réalisés sur un grand nombre d'espèces (Trap, Mahe, 1996). Sur les individus morts, il a été ajouté des prélèvements de rate et/ou de foie et/ou de poumons. Les analyses ont porté sur un total de 1950 prélèvements provenant de 701 oiseaux appartenant à dix ordres et dix-neuf familles. De 1 à 401 sujets ont été analysés par famille.

Après récolte, ces échantillons sont examinés par deux techniques : immunofluorescence et clearview (nous évoquerons ces techniques plus loin). Parfois, notamment lors de mortalité foudroyante ou de contamination humaine, une inoculation aux œufs embryonnés a été effectuée. Un oiseau est considéré comme positif lorsqu'au moins un prélèvement est positif par l'une des méthodes de diagnostic employées. Ils ont obtenu 366 oiseaux positifs sur les 701 analysés, soit 52,2%.

Ainsi, tous les ordres d'oiseaux étudiés sont sensibles à *C. psittaci*. Notons que les poules, de la famille des Phasianidés, considérées comme réfractaires peuvent être porteuses, comme l'ont été 5 des 6 poules étudiées.

Les prévalences présentées sont globalement élevées chez les espèces étudiées. Nous trouvons en effet des taux situés entre 40 et 86%, selon les familles. Il faut néanmoins prendre ces taux avec précaution du fait du biais de recrutement important et du faible nombre de sujets analysés par famille.

Cette étude démontre par ailleurs l'importance du portage sain. En effet, 35% des psittaciformes, 23% des passériformes, 33% des columbiformes et 80% des ansériformes testés se sont révélés positifs aux tests effectués sans présenter de signe clinique.

Deux enquêtes réalisées en mai 1980 et octobre 1982 par Milon *et al.*, sur des lots de 501 et 101 pigeons capturés dans la ville de Toulouse, donnent des taux de séro-prévalence de 37,1% et 45,5%, par les techniques de fixation du complément et d'immunofluorescence directe.

Les oiseaux d'élevage ne sont pas épargnés par cette bactérie.

Concernant les relations entre les dindes et *C. psittaci*, la littérature nous apporte différentes informations. Vanrompay *et al.*, 1997, ont testé des sérums à deux époques de l'année. Lors de l'étude, 90% des sérums de dindes mâles de 17 à 18 semaines d'âge prélevés en fin d'été (n=100) et 73% de ceux de fin d'hiver (n=100), avaient des anticorps anti-*Chlamydophila*. L'année suivante, 4 lots de 10 dindes furent testés et 20 des 40 animaux testés portaient des anticorps anti-*Chlamydophila*.

Il est reporté dans la Selezione Veterinaria de 1999, les résultats d'analyse de 229 écouillons cloacaux prélevés sur quatre groupes de dindes à l'abattoir. Parmi les dindes analysées par une méthode ELISA (IDEIAtm, DAKO Diagnostics, UK), 82,5% sont porteuses de *Chlamydophila psittaci* en absence de signe clinique et de lésion. En fonction des groupes, cela représente de 70,7% à 100% de positivité (Fezia *et al.*, 1999).

Entre Juillet et Août 1998, sur 64 lots de dindes arrivés dans un abattoir en Bretagne, 20 sérums furent prélevés et analysés par fixation du complément (FC) ainsi que par une méthode ELISA. La grande majorité des sérums se révèle négative par FC, alors que 25 des 30 lots analysés par ELISA ont au moins un sérum positif. Cette étude ne permet pas de conclure quant à la situation de *C. psittaci* sur la dinde, mais nous informe sur sa prévalence relativement élevée (>75% des élevages testés sont porteurs), au sein de l'élevage de dindes breton (Kempf *et al.*, 2000).

A propos du canard, un article de 1990 reporte une augmentation soudaine de la mortalité dans un lot de reproducteurs Pékins. Les animaux étaient allongés au sol et

mouraient en 4 à 6 heures. La morbidité a atteint 25% et 13% de mortalité fut constatée après quatre semaines d'évolution de la maladie. Un diagnostic de chlamydie fut posé suite à l'observation de Corps Élémentaires et de microcolonies sur des frottis. Un traitement à base d'oxytétracycline a été mis en place et la mortalité a chuté de 20 morts par jour à 20 morts en quatre semaines dès la mise en place du traitement (Arzey *et al.*, 1990).

En Egypte s'est déroulée une étude rapportée en 1996 et présentant un taux de prévalence de 69,23% de *Chlamydomphila psittaci* sur des canards en élevage. Des écouvillons cloacaux ont été collectés sur 156 canards en élevage. L'isolement a été réalisé par inoculation aux œufs embryonnés de poulet et par inoculation aux souris. Des frottis ont été effectués et testés par un test d'inhibition de la fixation du complément (Mousa *et al.*, 1996).

Ces études illustrent le fait qu'un grand nombre d'espèces aviaires tant sauvages que domestiques peuvent héberger *Chlamydomphila psittaci*. Par la quasi-généralité du portage, nous supposons que nombre d'autres espèces, non testées, sont également susceptibles d'être porteuses et ceci avec ou sans symptôme.

II.5. Transmission

Une transmission inter-espèces existe (oiseaux - mammifères - arthropodes). Il semble qu'un contact étroit entre oiseaux soit nécessaire, essentiellement par l'intermédiaire des fientes et des sécrétions oculaires et nasales (Page, 1959 ; Takahashi *et al.*, 1988). Habituellement, cette transmission est due à l'inhalation d'un aérosol de poussières de fientes, dispersées par les battements des ailes, à l'absorption de graines ou de plantes souillées par des excréments. Elle peut aussi se produire, pour certains oiseaux, chez les jeunes au nid lors du gavage par les parents (plus particulièrement par l'intermédiaire du lait de jabot), par les souillures provoquées par les excréments des parents. La présence d'ectoparasites pourrait jouer un rôle (Page *et al.*, 1975 ; Shewen, 1980). Sont également virulents le sang et, en règle générale, tous les excréments du fait d'une bactériémie.

Chez les dindes, on a pu mettre en évidence l'intervention d'insectes hématophages. La transmission verticale a été démontrée chez les poules, les canards, les perruches, les mouettes et les oies (Vanrompay *et al.*, 1995). Cette voie est loin d'être majoritaire. Elle peut cependant entraîner une contamination de produits biologiques exprimés dans l'œuf et poser problème pour la biosécurité de la production de vaccins vivants (Alexander *et al.*, 2002).

La transmission entre oiseaux dépend de nombreux facteurs, à savoir la sensibilité et le mode de vie de l'hôte, la virulence de la souche considérée, l'influence du milieu sur les probabilités de contact avec la chlamydie, les habitudes alimentaires... Une réinfection permanente est souvent réalisée à partir de sources extérieures.

II.6. Résistance

Les chlamydies sont très résistantes dans le milieu extérieur et peuvent garder leur pouvoir infectieux plusieurs mois, dans les fientes et les sécrétions (André 1994). Les CE non protégés par des matières protéiques sont rapidement inactivés. Les chlamydies sont très sensibles à l'action de la chaleur et du formol.

II.7. Facteurs favorisants

- a) L'âge : les jeunes oiseaux sont les plus sensibles
- b) L'espèce aviaire considérée : chez les psittacidés, les cacatoès semblent les plus résistants ; les amazones paraissent les plus sensibles, de même que les perruches ondulées et

les perruches callopsittes. Il a été suggéré de placer le padda comme sentinelle de l'infection dans les volières renfermant d'autres espèces aviaires. En effet, ce passereau passe pour être particulièrement réceptif à la chlamydie (André 1990).

c) Les stress divers subis par les oiseaux : le stress favorise le passage du stade inactif au stade actif de la chlamydie. Migrations, mues, transports (en particulier les importations), mauvaises conditions sanitaires, alimentaires, climatiques, surpopulation, parasitoses (ascaridiose, giardiose), période de reproduction, etc., sont autant de périodes à risque.

Dans la nature, l'extension de la chlamydie semble limitée par le fait que les malades sont rapidement éliminés par les prédateurs et que les cadavres disparaissent sous l'action conjuguée des vers et de la décomposition. La transmission entre les différentes espèces d'oiseaux arboricoles paraît moins importante qu'il ne semblerait à première vue.

II.8. Prévention des infections

Les mesures de prévention relèvent de la biosécurité et des bonnes pratiques sanitaires. Ainsi, le nettoyage et la désinfection des volières sont à effectuer quotidiennement car *C. psittaci* est sensible à la plupart des détergents et désinfectants ainsi qu'à la chaleur. Par exemple, sont efficaces les ammoniums quaternaires dilués à 1 pour 1000, l'eau de javel ou le chloroforme dilués à 1 pour 100. De même, il faut détruire les restes d'alimentation et les litières souillées car le pouvoir infectieux persiste 2 à 3 semaines dans la paille, 2 mois dans la nourriture pour canari et pendant plus de 8 mois dans des litières de volailles (Caul et Sillis, 1998).

Il est également important de diminuer la quantité d'aérosols par le choix de litière produisant le moins de poussière possible, par pulvérisation de désinfectant et par une ventilation suffisante.

La prévention doit porter également sur les personnes à risque, notamment les professionnels de l'aviculture, par une information sur la maladie et l'encouragement au port de vêtements de protection et de masque.

En ce qui concerne les animaux infectés ou suspects, destinés à l'autopsie, il faudrait les recouvrir d'eau et de détergent afin d'éviter les aérosols de particules infectieuses et ne faire les autopsies que dans un local équipé d'extracteur et de filtration d'air.

Pour les oiseaux d'importation, des restrictions sont à mettre en place, avec la nécessité que les sujets soient accompagnés d'un certificat de santé avec identification précise des animaux par une bague ou une puce. S'il y a une quarantaine, sa durée doit être d'au moins 30 jours, prolongeables jusqu'à deux mois après le traitement du dernier oiseau suspect.

II.9. Traitement

En l'absence de vaccination, le seul moyen de contrôle est le traitement antibiotique qui repose essentiellement sur les inhibiteurs de la synthèse protéique, tels que les tétracyclines, les macrolides, les phénicolés, ou les quinolones.

Les tétracyclines sont les molécules de choix pour la lutte contre les chlamydies. Ce sont plus précisément les chlortétracyclines que l'on utilise, principalement dans l'aliment et données en quantité suffisante pour que la concentration sanguine atteigne au moins 1µg/mL (Flammer, 1989). L'autre molécule utilisée appartenant à cette famille est l'oxytétracycline. Le traitement dure en général 45 jours avec un minimum de 2 semaines et un temps d'attente de 2 jours (Andersen, Vanrompay, 2000). Une étude allemande montre cependant une efficacité des tétracyclines à la concentration de 0,1µg/mL (Gylstorff, 1984).

Le traitement se fait très souvent dans l'alimentation, à raison de 400g/tonne en général, pour soigner une mortalité infligée par une souche de *C. psittaci* de faible virulence. Il existe néanmoins des inconvénients aux traitements administrés dans l'alimentation. Le premier, est le problème de la sous consommation due, souvent, à la faible appétence des molécules. Consécutivement, nous avons un sous dosage de la molécule avec un risque d'infection persistante. Le second problème est le fait que la quantité de calcium de la ration ne doit pas dépasser 0,7% pour que la molécule soit correctement absorbée.

Pour des animaux très malades, la voie parentérale peut être envisagée. Cette voie n'est cependant pas très pratique du fait de la nécessité de répéter les injections et des problèmes de tolérance locale avec nécrose au point d'injection.

Une autre molécule, la doxycycline peut également être utilisée pour soigner ces animaux. C'est une molécule de choix pour un traitement dans l'eau de boisson et elle est mieux absorbée, plus diffusible, plus stable, mieux tolérée, plus appétente. Elle est également utilisable en injection intramusculaire.

En contrepartie de leur efficacité, un effet bactériostatique de 30 jours peut résulter en un portage chronique (Andersen, Vanrompay, 2000). Leur utilisation peut, de même, masquer une infection sans obtenir de guérison bactériologique et engendrer ainsi un risque zoonotique pour le personnel d'abattoir, par exemple (St. J. Newman *et al.*, 1992). En prévention, la chlortétracycline est inefficace (Louzis, 1992) et des réinfections sont possibles, notamment par le vecteur animaux sauvages (Andersen, Vanrompay, 2003).

Il est possible d'utiliser d'autres familles antibiotiques comme les macrolides et les phénicolés. En effet, les inhibiteurs de la synthèse protéique sont efficaces si leur volume de distribution est important et si la répartition tissulaire est favorable. Les molécules utilisables sont l'érythromycine, la spiramycine et, anciennement car il est maintenant interdit : le chloramphénicol.

Les quinolones sont également efficaces si la concentration sanguine d'enrofloxacin est au moins égale à 0,5mg/L pendant 14 jours, ce qui est réalisable avec 250 à 1000ppm dans l'aliment (Vanrompay, 2000).

Il n'existe pas de vaccin contre la chlamydie aviaire. Des essais ont été menés dans les années 1970 avec une suspension inactivée de *C. psittaci* qui réussit à induire une réponse immunitaire à médiation cellulaire et à protéger 90% des dindes vaccinées soumises à un challenge (Page, 1975 ; 1978). Plus récemment, la vaccination de dindes par un vaccin à ADN a entraîné d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale, associée à une protection significative des dindes vis-à-vis d'une épreuve virulente (Vanrompay *et al.*, 1998 ; 1999a ; 1999b).

Cependant, le coût et les contraintes associées à la vaccination de masse limitent fortement l'usage d'un tel vaccin.

III. Détection de l'infection à *Chlamydomphila psittaci* chez les oiseaux

III.1. Problématique de la détection

Certaines maladies provoquent des symptômes semblables à ceux de la chlamydie. Il est aisé de considérer *C. psittaci* comme étant responsable des troubles observés car cette bactérie fréquemment isolée dans les élevages de volaille. Ainsi, Andral en 1989, retrace des cas d'infections attribués par erreur à *C. psittaci* sur des oiseaux d'élevage :

En 1981, est apparu sur des dindes un épisode de toux importante avec des râles respiratoires auxquels a succédé une phase de sinusite principalement bilatérale. Un jetage nasal accompagnait ces signes puis la sinusite a évolué vers une forme chronique. De l'entérite et une baisse rapide de l'état général ont également été remarqués. *Chlamydomphila psittaci* fut isolée des animaux et le diagnostic posé.

De nouveaux examens ont été effectués et la sérologie ainsi que la clinique s'accordèrent pour éliminer l'éventualité d'une chlamydie authentique de la dinde. Il fallait considérer *C. psittaci* comme responsable de complications secondaires (Durand *et al.*, 1983).

En 1986, est apparue sur la pintade une pathologie nommée « maladie foudroyante de la pintade », avec de l'entérite et une mortalité pouvant atteindre 100% du lot. Cette affection, alors considérée comme due à *C. psittaci* fut dénommée par la suite « maladie X de la pintade » et est en fait due à un virus.

L'interprétation de la présence de *Chlamydomphila psittaci* sur des animaux est donc délicate et il convient de ne pas sous estimer le portage asymptomatique.

III.2. Détection indirecte

La sérologie est fréquemment employée pour identifier les oiseaux infectés (Page, 1978(b) ; Kempf *et al.*, 2000). Il a cependant été démontré plusieurs fois que les données sérologiques n'étaient pas nécessairement corrélées aux résultats de détection d'antigènes, (Grimes, 1985(a et b) ; Tully *et al.*, 1996).

En général, un seul prélèvement ne permet pas de conclure et deux sérologies à 3 ou 4 semaines d'intervalle sont généralement nécessaires. L'infection sera alors confirmée par la mise en évidence de l'élévation du titre d'anticorps lors du deuxième prélèvement sanguin.

Le diagnostic sérologique présente des limites : chez un oiseau isolé ou préalablement traité avec un antibiotique actif sur les chlamydies, il n'y a pas d'augmentation significative du titre en anticorps avant au moins 3 semaines. Un résultat négatif impose une répétition du test quelques semaines plus tard. En cas de positivité, il faut encore pouvoir faire une corrélation avec le statut des animaux à ce moment précis.

III.2.1. Test d'agglutination au latex

Ce test, quasiment abandonné, détecte l'activité des anticorps chez l'oiseau présentant des signes cliniques depuis au moins une semaine, ou souffrant d'infection chronique. Associé à l'observation des symptômes, il contribue au diagnostic. Il est simple et rapide, mais en cas de positivité, il demande confirmation par le test de Fixation du Complément. Il détecte les IgM (dont la production est favorisée par la présence de LPS chlamydien) et les IgG.

III.2.2. Agglutination des Corps Élémentaires

La suspension de Corps Élémentaires colorés utilisés pour ce test est le produit dérivé obtenu lors de la préparation de l'antigène destiné au test d'agglutination au latex. Ce test est utilisable sur sérum (de préférence) ou plasma hépariné. Un titre de 1/10 est considéré négatif. Un titre de 1/20 à 1/40 est suspect et le seuil de positivité est 1/80. Ce test détecte uniquement les IgM. Il représente une aide pour un diagnostic rapide de la psittacose chez les oiseaux apparemment sains ou présentant des signes cliniques, en particulier chez les psittacidés de moyenne ou de grande taille.

III.2.3. Test d'inhibition de la fixation du complément

Très utilisé jusqu'à une époque assez récente, il est actuellement détrôné par des techniques beaucoup plus performantes.

Sur un seul échantillon, des titres de 1/32 ou 1/64 entraînent une suspicion, des titres de 1/128 confirment une chlamydie active (des titres allant jusqu'au 1/1024 et même au 1/4096 ont pu être constatés).

La fixation du complément normale est réalisée selon la technique décrite par de Saint Aubert *et al.*, 1975, pour le diagnostic des chlamydioses ovines. La méthode modifiée consiste à ajouter 0,6% de sérum frais de poulet au complément de cobaye dilué.

Pour évaluer l'efficacité de la Fixation du Complément, 241 sérums d'oiseaux (canards, dindes, poules) ayant présenté des troubles divers pouvant être attribués à l'ornithose, en particulier des troubles respiratoires, associés dans certains élevages à des chutes de ponte, ont fait l'objet d'une étude comparative entre les méthodes de fixation du complément dites normale et modifiée. Trap et Gaumont, 1983, constatent que seulement 6,6% des sérums sont positifs avec la méthode normale tandis que 31% le sont avec la méthode modifiée. L'addition de sérum frais de poulet normal au complément de cobaye améliore donc notablement la sensibilité de l'épreuve de fixation du complément pour le diagnostic sérologique chez les oiseaux.

III.2.4. Sérologie ELISA ou BELISA

Ce test permet la détection des IgM dans le sérum. Il est à associer avec le test ELISA.

- Avantages : il s'agit d'une méthode beaucoup plus sensible que la FC, indépendante des globulines spécifiques d'espèce, détectant davantage d'oiseaux suspects que la méthode ELISA. Les anticorps sont révélés 6 à 10 jours après le début de l'infection. Les excréteurs BELISA (Blocking Enzyme Linked Immunosorbent Assay) négatifs sont rares. La plupart des BELISA positifs ne sont pas excréteurs, le nombre de chlamydies intracellulaires étant, à priori, trop bas. Fudge, 1992, conseille d'associer au BELISA des analyses hématologiques et biochimiques, car les BELISA positifs ont une augmentation nette des troubles hématologiques et biochimiques, par rapport aux BELISA négatifs.

- Inconvénients : il est possible d'avoir des résultats négatifs chez certains oiseaux dont le taux d'antigènes n'est pas suffisant pour induire un taux d'anticorps détectable. Il y a donc risque de dissémination chlamydienne. Malgré une forte excrétion d'antigènes, le taux d'anticorps produits est relativement bas chez les perruches callopsittes. Là aussi, il peut y avoir une possibilité de BELISA négatif. Ce test n'indique pas si l'animal est malade. Il nécessite, d'autre part, des analyses groupées, une lecture au spectrophotomètre, et, par conséquent, un laboratoire spécialisé.

Vanrompay *et al.*, 1996, ont effectué un suivi longitudinal d'une ferme de dindes sur 12 semaines en mesurant les antigènes de chlamydia et les anticorps anti-chlamydia. Les résultats sont présentés dans la figure 2, ci-dessous.

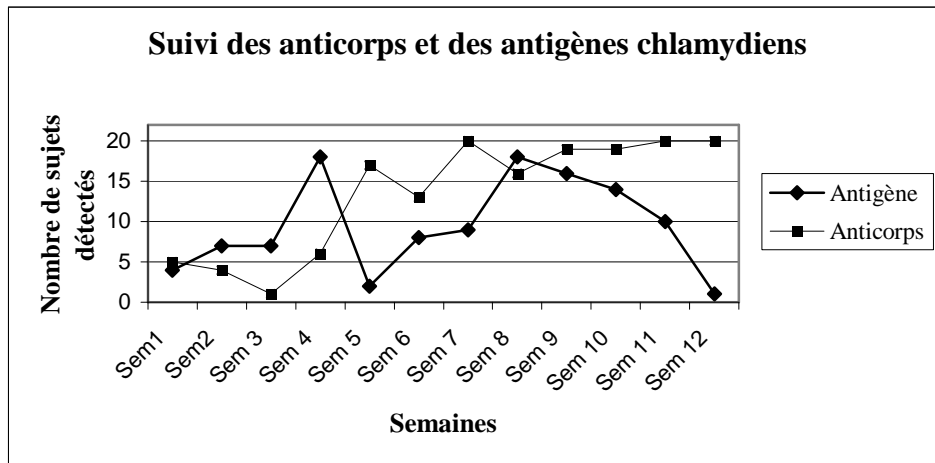


Figure 2 : Suivi longitudinal d'un élevage de dindes de une à douze semaines avec recherche sur 20 sujets des anticorps anti-chlamydia et des antigènes de chlamydia.

Ce graphique montre la non corrélation entre la présence d'anticorps et d'antigènes. La persistance des anticorps amène une baisse de la spécificité des tests basés sur la détection des conséquences de l'infection. Pour cette raison, nous allons nous intéresser aux tests permettant une détection directe de la bactérie.

III.3. Détection directe

III.3.1. Culture et isolement

La culture cellulaire est, *en théorie*, le meilleur système. Cette méthode ne nécessite pas l'entretien d'animaux. Les milieux de culture de cellules de Mc COY (incubation à 37°C, 3 à 6 jours) sont essentiellement employés. Des colorations sont effectuées avec des anticorps monoclonaux couplés à la fluorescéine, ou à d'autres fluorochromes. On peut également utiliser des cellules souris L (clone 929), des cellules BHK 21, VERO ou Hel A 229 (Pearson, 1989).

Les prélèvements se pratiquent habituellement au niveau des choanes ou du cloaque. Avec un premier écouvillon, il est souhaitable d'éliminer l'excès de mucosités. Un second écouvillon servira à récolter les cellules épithéliales. Des fientes, voire du sang, peuvent également être utilisés.

L'inoculation se fait sur œufs embryonnés de 7 jours. A la mort de l'embryon, on réalise un calque du sac vitellin, suivi d'une coloration. Cette méthode très lourde est utilisée essentiellement pour l'amplification et la conservation des souches. Il est également possible d'inoculer des souris de 3 semaines, mais cette technique est peu utilisée.

Les résultats obtenus vont dépendre de la qualité du prélèvement, de la vitalité de la chlamydie, de la nature du milieu de transport.

- Avantage : une très faible quantité d'organismes est nécessaire, étant entendu que ces derniers soient en état de se multiplier. Cette méthode assure un diagnostic définitif.

Elle est très sensible, sous réserve qu'il y ait émission de chlamydie. Elle pourrait détecter 1,3 CE/mL de prélèvement (Trap *et al.*, 1994).

- Inconvénients : il faut tenir compte de l'excrétion intermittente des bactéries et donc prélever durant plusieurs jours, en général une semaine. Ceci est bien entendu irréaliste dans le cas d'une forme aiguë.

La culture des chlamydie est inhibée lors de l'utilisation d'un traitement antibiotique spécifique préalable. Les chlamydie sont très fragiles. Leur conservation diminue leur viabilité. On a, par conséquent, des risques de faux négatifs. Enfin, l'isolement est relativement coûteux et nécessite l'intervention d'un laboratoire parfaitement équipé.

III.3.2. Immunofluorescence (IFT)

Cette technique immunohistochimique peut être employée à partir de calques de conjonctive, de cultures cellulaires ou de prélèvements (André, 1994). Le calque de l'organe suspect ou le frottis de l'écouvillon est fixé à la lame dans l'acétone à +4°C pendant 15 minutes. Puis, les lames sont placées en chambre humide et chaque étalement est recouvert par l'anticorps monoclonal conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine. L'ensemble est placé durant 30 minutes à l'étuve à 37°C. Après lavage en tampon PBS puis à l'eau distillée, la lecture s'effectue au microscope à fluorescence. L'épreuve est considérée comme suspecte lorsque de 1 à 5 Corps Élémentaires sont repérés dans un étalement, et positive au-delà.

- Avantage : cette technique, très sensible, assure une spécificité accrue du diagnostic de chlamydie.

III.3.3. Cytologie

Chez l'oiseau vivant, elle permet une présomption lors de psittacose active. Les meilleurs prélèvements sont les exsudats inflammatoires contenant des mononucléaires (macrophages). Le jetage, en temps normal, contient pour l'essentiel des cellules épithéliales squameuses.

- Méthode : on réalise un calque sur lame, fixé à la chaleur, puis coloré. Les prélèvements peuvent avoir diverses origines : conjonctive, choanes, trachée, biopsie hépatique, liquide péritonéal...

Les lames, après coloration, sont observées au microscope à la recherche d'éventuelles inclusions intracytoplasmiques, avec la coloration de Gimenez ou de Machiavello.

- Avantage : facilité de réalisation.
- Inconvénient : sensibilité réduite, manque de spécificité. Cette méthode, nécessitant du personnel spécialisé, n'identifie que les seuls CE. Un résultat négatif n'exclut pas la présence de chlamydie.

III.3.4. Autres techniques existantes

Il existe également d'autres techniques telles que l'immunoélectroscopie, le test Peroxydase-antiperoxydase (PAP), ou la méthode Alkaline phosphatase-antialcaline phosphatase (APAAP), qui permettent de détecter les Corps Élémentaires et Réticulés ou les antigènes chlamydiens. De réalisation délicate et nécessitant un laboratoire et un personnel très spécialisés, elles ne sont pas couramment utilisées (André, 1994).

III.3.5. Test ELISA

C'est la méthode de détection des antigènes la plus utilisée à l'heure actuelle. Cette technique, qui emploie des anticorps monoclonaux vis-à-vis de *C. trachomatis*, est également utilisable vis-à-vis de *C. psittaci* (Evans *et al.*, 1983). Ces anticorps sont associés à une peroxydase ou à des marqueurs fluorescents. On peut ainsi détecter l'antigène lipopolysaccharidique de la membrane externe du CE. L'anticorps monoclonal reconnaît un épitope dominant situé sur le LPS.

Cette méthode est particulièrement intéressante chez les jeunes oiseaux récemment acquis, ou chez les oiseaux en contact avec des oiseaux suspects. Les prélèvements peuvent être obtenus à partir de la trachée, des choanes, du cloaque et, généralement, des divers tissus organiques. Les prélèvements réalisés par écouvillonnage de la muqueuse cloacale sont à privilégier par rapport aux prélèvements de fientes.

- Avantages : il s'agit là d'un test rapide, sensible, spécifique (sur l'oiseau vivant comme sur le mort). Associé à la culture, la fiabilité du résultat avoisine les 97%. L'antigène chlamydien est détectable, même si la bactérie n'est plus vivante. Par ailleurs, cette méthode est intéressante pour tester de grandes quantités de sérums afin de déterminer le statut sérologique d'un troupeau (Chalmers, 1984).

- Inconvénient : l'usage de ce test est limité si l'excrétion bactérienne est faible. Les prélèvements de fientes sont souvent à l'origine de faux négatifs, en raison des possibilités d'excrétion intermittente. Là encore, il est indispensable de collecter des échantillons sur plusieurs jours. Ce test est moins sensible pour *C. psittaci* que pour *C. trachomatis*, lors d'utilisation de fientes (en raison de la présence d'enzymes endogènes). Le test ELISA ne permet pas de situer l'état de santé de l'oiseau. Il y a une possibilité de réaction croisée avec certaines bactéries ou peroxydes présents dans les fientes. Il est fréquent, avec certains tests, d'avoir des faux positifs, en particulier en présence d'*Acinetobacter*, germe très fréquent dans les fientes des oiseaux et dont le LPS de la membrane externe est identique à celui des chlamydies.

Parmi les tests ELISA commercialisés, le Clearview® est sans doute le plus utilisé, car il s'agit d'un test très pratique, de réalisation aisée, ne demandant ni personnel ni laboratoire spécialisé. Or, dans le meilleur des cas, ses sensibilité et spécificité ne dépassent guère 90%. Ce n'est donc pas une méthode suffisamment fiable pour une étude épidémiologique.

III.3.6. PCR (Polymerase Chain Reaction)

III.3.6.1. Principe

La PCR ou Polymerase Chain Reaction, consiste à amplifier un fragment choisi d'un gène dont on connaît la séquence nucléotidique (Glyn Hewison *et al.*, 1997). Ce gène doit être spécifique de l'espèce ou du genre bactérien recherché, selon le degré de précision voulu. Il s'agit de mettre en présence un mélange constitué de tampon de réaction, d'eau, de nucléotides, d'amorces, d'une enzyme (la Taq polymérase) et du milieu d'extraction contenant l'ADN issu du prélèvement.

Dans le thermocycleur, l'ADN va être dénaturé pour devenir simple brin avec lequel les amorces vont s'hybrider. La présence de la Taq polymérase et des nucléotides va permettre l'élongation de ce nouvel ADN double brin. 40 cycles d'hybridation – dénaturation sont ainsi réalisés. Les produits d'amplification, lestés par du Bromure d'éthidium (BET), sont ensuite analysés sur gel. Le BET est un agent intercalant qui fluoresce lorsqu'il est

éclairé avec des rayons UV. Deux témoins, positif et négatif également soumis à la réaction, et un marqueur de poids moléculaire participent à la migration.

III.3.6.2. Intérêts

La PCR est une technique d'analyse qui présente de nombreux avantages (Glyn Hewison *et al.*, 1997). Basée sur la détection du génome, la PCR s'affranchit de l'état de viabilité de l'organisme recherché. De plus, la stabilité élevée de la molécule d'ADN permet d'analyser des prélèvements mal conservés.

La recherche de l'organisme pathogène et non des conséquences de cette entité sur l'animal permet de réaliser la PCR sur des échantillons prélevés de manière non invasive, dès lors qu'il y a excréation. La spécificité de cette technique est remarquable, le risque de faux positif est généralement nul, en absence de contamination et mis en évidence par l'emploi de témoins de réaction. La sensibilité est également très bonne.

Il est possible de différencier les espèces de *Chlamydophila* rencontrées (*psittaci*, *pneumoniae*), car les amorces utilisées sont spécifiques d'espèce.

Enfin, cette méthode permet un résultat dans la journée avec environ 2 heures de PCR, et 1 heure de migration et révélation du gel d'électrophorèse. A l'inverse, les techniques nécessitant une culture cellulaire préalable ne donnent pas de résultat avant 2 à 3 semaines.

III.3.7. PCR quantitative ou en Temps Réel

III.3.7.1. Description

Il existe à l'heure actuelle deux types de chimies applicables à la méthode PCR-Temps Réel (PCR-TR) : celle des intercalants et celle des sondes

a) Chimie des intercalants

La chimie des intercalants est basée sur l'utilisation de marqueurs fluorescents lors de leur fixation à l'ADN double brin et après excitation (Collot *et al.*, 2001). On en distingue deux principaux : le *Sybr® Green* (SG) et le Bromure d'Ethidium ou BET utilisé surtout en PCR classique. Le SG est plus utilisé que le BET car il permet d'obtenir des signaux plus puissants. Ce n'est pas réellement un intercalant car il ne s'intercale pas entre les bases de l'ADN, comme le fait le BET, mais il se loge dans le sillon mineur de l'ADN double brin en cours de synthèse toutes les 10 bases environ. Sa forme non liée est très faiblement fluorescente, alors que sa liaison à l'ADN lui permet d'émettre, après excitation, une fluorescence intense. Au cours de la PCR, tout l'ADN devient simple brin après dénaturation. A ce stade, le SG ne se lie pas à l'ADN et la fluorescence est faible. Pendant l'hybridation puis l'élongation, le SG se lie à l'ADN double brin en cours de synthèse et à la fin de cette phase, tout l'ADN est double brin. La fluorescence est enregistrée à la fin de chaque phase d'élongation après excitation à 530nm. L'augmentation de la fluorescence peut ainsi être suivie d'un cycle sur l'autre. Comme la quantité d'ADN augmente grâce à la phase d'amplification, la fluorescence mesurée rend compte de la quantité d'ADN.

b) Chimie des sondes

La chimie des sondes est fondée sur l'utilisation de sondes fluorescentes et sur le principe du transfert d'énergie (Collot *et al.*, 2001). Quand le spectre d'émission d'un fluorophore (donneur) chevauche le spectre d'excitation d'un autre fluorophore (accepteur), l'excitation du donneur induit la fluorescence de l'accepteur alors que sa propre excitation décroît. Ce phénomène est extrêmement sensible à la distance entre le donneur et l'accepteur.

Pour ce procédé, plusieurs méthodes sont décrites, parmi lesquelles le TaqMan (TM) et le test d'hybridation sont les plus utilisées, bien que les sondes *beacon* soient également employées.

III.3.7.2. Intérêts

La PCR quantitative présente les mêmes avantages que la PCR classique et permet en plus la quantification du nombre de copies d'ADN cible dans l'échantillon. De plus, à la fin des cycles d'hybridation-élongation, une courbe de dissociation obtenue par élévation progressive de la température du milieu réactionnel est présentée. Cette courbe atteste de la spécificité de la réaction. En effet, la température pour laquelle la dissociation des amplicons est obtenue, est spécifique de la taille de ces derniers et des pourcentages de bases G-C. Ainsi, si le mélange réactionnel contenait le fragment de génome recherché, la montée en température du mélange, en fin de cycle, s'accompagne d'une élévation de la fluorescence et ce, jusqu'à la dissociation de l'ADN, marquée par le pic de fluorescence. Cette opération nous permet donc d'être sûrs que les résultats de la PCR ne proviennent pas d'une amplification non spécifique.

III.4. Choix des prélèvements

III.4.1. Ecouvillon cloacal

Le cloaque est un lieu de prélèvement de choix, longtemps porteur de *Chlamydia*. Pour cette raison, le prélèvement de fientes peut être également envisagé (Andersen, 1996).

Or, l'inconvénient de ce type de prélèvements, en vue d'analyses par PCR, est la présence d'inhibiteurs de la réaction souvent contenus dans les matières fécales.

III.4.2. Ecouvillons pharyngé et choanal

La glande nasale latérale reste longtemps infectée et ses sécrétions rejoignent la cavité pharyngée (Andersen, 1996). Par ailleurs, les sécrétions pulmonaires sont expulsées via le pharynx. Ces considérations anatomiques et fonctionnelles nous font penser que l'écouvillonnage de ces zones permettrait une détection intéressante du portage.

Or, l'écouvillonnage choanal ne se fait pas sans une bonne contention, qui n'exclut pas un dérangement important de l'animal, au moment du prélèvement et après. En effet, cette technique est légèrement invasive et peut entraîner des lésions internes de la cavité nasale. L'écouvillonnage pharyngé, quant à lui, nécessite d'ouvrir le bec du canard pour introduire l'outil que l'on frotera sur la cavité pharyngée. La principale difficulté de ce prélèvement est le maintien du canard, le cou tendu et le bec bien ouvert.

III.4.3. Ecouvillon conjonctival

La chlamydie aviaire, lorsqu'elle se déclenche, entraîne notamment de la conjonctivite dont les sécrétions font partie des matières virulentes les plus importantes. Dans ce contexte, il est intéressant de réaliser des prélèvements au niveau de la conjonctive. Techniquement, ce site ne pose pas de souci particulier et ne gêne pas outre mesure l'animal. Il suffit de maintenir la tête et de faire glisser l'écouvillon le long du cul de sac conjonctival de chaque œil.

III.4.4. Eléments du choix

Une expérience menée en 1996 par Andersen, comparant des prélèvements de différents types sur des dindes et des perruches nous apporte les informations suivantes :

Sur les perruches, parmi les oiseaux trouvés positifs par isolement :

- 80% ont été dépistés d'après un écouvillonnage pharyngé
- 45% ont pu être découverts d'après des prélèvements de fientes
- 37% l'ont été d'après un écouvillonnage cloacal.

Sur les dindes, parmi les oiseaux trouvés positifs par isolement :

- 93% l'ont été également d'après écouvillonnage pharyngé
- 77% l'ont été d'après des écouvillons cloacaux.

Nous voyons donc d'après ces deux exemples la variabilité de la sensibilité de la détection selon le type d'écouvillon. Les analyses réalisées d'après des écouvillons cloacaux présentent des prévalences trop faibles pour que nous nous basions sur ces examens pour faire notre choix.

Les matières virulentes les plus importantes étant les fientes et les sécrétions oculo-nasales, nous avons choisi comme site d'écouvillonnage le cloaque et le cul-de-sac conjonctival.

Nous venons d'évoquer l'historique de *C. psittaci*, son mode de développement et ses conséquences sur un organisme vivant. Nous avons également étudié la problématique que représentait sa détection.

Nous allons donc aborder maintenant la partie expérimentale, dans laquelle nous détaillerons la mise au point de la méthode d'analyse avant d'exploiter les résultats de prévalence obtenus.

2^{nde} Partie :
Etude Expérimentale

INTRODUCTION

L'objectif de cette étude est d'évaluer le portage de *Chlamydomytila psittaci* chez le canard mulard en gavage.

Pour ce faire, nous avons mis au point une méthode de détection du génome par PCR quantitative. Nous décrivons la mise au point de cette technique, ainsi que les contrôles nécessaires à la vérification de son fonctionnement correct.

Nous présenterons ensuite les bases de recrutement des lots de canards en gavage, choisis afin d'assurer une représentativité optimale à notre étude.

L'analyse de cet échantillon de canards nous permettra de déterminer le niveau de portage de *C. psittaci* en gavage que nous essayerons de mettre en relation avec les éléments techniques de l'élevage et du gavage, afin de rechercher les éventuels facteurs de risque.

Enfin, nous dresserons un état des lieux des pratiques des gaveurs de l'échantillon en matière de protection contre cette maladie professionnelle.

I. Matériel et méthodes

I.1. Echantillonnage des canards

I.1.1. Objectifs

L'objectif de cet échantillonnage est d'atténuer la plupart des biais pouvant influencer les résultats futurs de l'étude. Pour cela, nous les avons répertorié avant de construire notre échantillon.

Nous avons ainsi effectué trois séquences de prélèvements réparties sur une année, en avril, juillet et décembre 2002, afin d'éviter un éventuel effet saison dans le portage de *C. psittaci*. De plus, dans un souci de diversification des origines des animaux, nous avons travaillé avec cinq organisations de producteurs de foie gras du Sud-ouest, sur des canards issus de dix-huit couvoirs différents dont la moitié est localisée dans les Pays de la Loire. Dans la même logique, nous avons essayé d'éviter de tester des mulards provenant du même élevage, répartis chez des gaveurs différents.

Nos analyses ont porté sur 58 salles de gavage, soit une vingtaine par séquence, se situant, essentiellement, dans des localités différentes.

Les canards prélevés dans une même salle étaient choisis aléatoirement, répartis dans toutes les rangées afin de pallier un éventuel "effet local" de contamination.

Enfin, nous avons tenté de standardiser l'âge en prélevant préférentiellement des animaux en début de seconde semaine de gavage. En moyenne les tests ont été réalisés sur des canards en gavage depuis 7,5 jours.

I.1.2. Réalisation de l'échantillonnage

Comme nous l'avons précisé plus haut, nous avons travaillé en partenariat avec 5 organisations de producteurs de foie gras du Sud-Ouest. Leurs zones d'influences cumulées couvrent 5 départements. Pour chaque organisation, 3 à 6 salles ont été sélectionnées par séquence. La séquence regroupe une vingtaine de salles de gavage.

Nous avons ensuite prélevé vingt canards par salle, soit un total de 400 canards par séquence. Au final, 1160 canards ont été prélevés.

Chaque responsable des groupements de producteurs partenaires a donc eu la tâche de trouver 3 à 6 gaveurs acceptant notre passage et ayant des canards en seconde semaine de gavage. De plus, deux gaveurs de la même organisation ne devaient pas avoir d'animaux issus du même élevage. Enfin, dans la liste des producteurs répondant aux critères, le choix devait être fait de manière aléatoire.

Nous avons visité des salles réparties sur toute la zone géographique d'influence de l'organisation, l'âge demandé était globalement respecté et les lots provenaient rarement du même élevage.

I.2. Prélèvements

I.2.1. Déplacements dans les salles de gavage

Lors de chaque visite de salle, nous avons réalisé un interrogatoire concernant tout d'abord l'origine Prêt à Gaver (PAG) des animaux, ainsi que les pratiques de protection du gaveur. Ce questionnaire (Annexe 1), permet également de recueillir des informations sur les caractéristiques de la salle de gavage, telles que la capacité, la présence ou l'absence de « cooling » ou de gaine de ventilation, la capacité d'extraction.

Nous avons observé l'état global des animaux. En particulier, nous nous sommes attachés à relever si des signes d'écoulements oculaires ou nasaux étaient décelables, ainsi que de la toux. Ces observations ont été portées au dossier de prélèvement pour évaluer la relation avec le portage de *Chlamydophila psittaci*.

Il a été convenu avec l'encadrement technique des gaveurs, de récupérer les données mentionnées sur les fiches d'élevage, de gavage et de résultats d'abattoir. Sur ces fiches, nous examinerons les taux de mortalité en élevage et gavage et la survenue éventuelle d'épisodes pathologiques. Nous nous intéresserons également aux taux de saisies, afin d'étudier les relations entre le parcours du canard et le portage de la bactérie.

I.2.2. Choix des animaux

Comme nous l'avons expliqué plus haut, nous avons pris soin de répartir nos prélèvements sur toute la salle. La figure 3 ci-dessous, représentant une salle de gavage composée de six rangées de cages, disposées dos-à-dos sur trois colonnes nous donne un exemple de la répartition des canards prélevés. Chaque étoile représente un canard sélectionné.

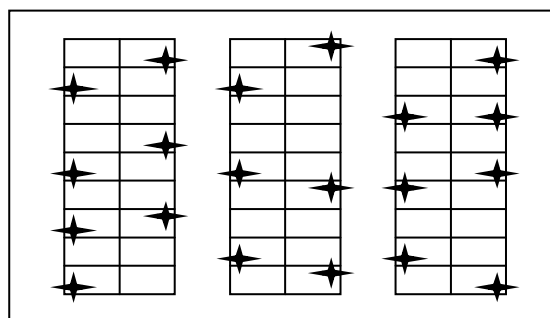


Figure 3 : Disposition des canards prélevés

I.2.3. Technique de prélèvement et codage des échantillons

Les prélèvements se sont déroulés de la façon suivante :

- Ecouillons conjonctivaux : le bouton est glissé entre la paupière et la conjonctive, sur le pourtour de l'œil et sur les deux yeux.
- Ecouillons cloacaux : après contention du canard la tête vers le bas, l'écouvillon est enfoncé d'environ 2 cm dans le cloaque en tournant.
- Prélèvement de sérum : le canard est sorti de la cage, maintenu fermement, et après avoir localisé la bosse occipitale avec le pouce de la main gauche, l'aiguille est enfoncée le long du pouce d'environ un demi centimètre (Vuillaume et Tournut, 1982).

Pour réaliser les prélèvements cloacaux, nous avons utilisé des écouillons à tige en bois et bouton en coton. Les écouillons conjonctivaux, dotés d'une tige en aluminium sont terminés par un bouton en rayonne de plus faible dimension. Ces écouillons sont fabriqués par la société CML.

Tous ces prélèvements ont été ensuite congelés ou mis en milieu de transport le plus rapidement possible. Nous avons codé les échantillons au laboratoire sous la forme d'un premier nombre, de 1 à 59 indiquant la salle de gavage toutes séquences confondues, suivi du numéro du canard, de 1 à 20. Un animal testé en juillet, c'est-à-dire lors de notre seconde semaine de prélèvements, portera donc un numéro de salle compris entre 21 et 40.

I.2.4. Transport et conservation des prélèvements

Suite à notre prélèvement, nous avons conservé les écouillons au froid positif jusqu'au dépôt dans le milieu de transport SPG avant de les rapatrier sur l'Ecole Vétérinaire de Toulouse.

Le milieu de transport utilisé, SPG, est un milieu de sucrose-phosphate-glutamate, supplémenté avec de 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques tels que de la streptomycine et de la gentamycine, mais pas de pénicilline (Spencer et Johnson, 1983). Ce milieu est bien adapté au transport et à la conservation des souches de *Chlamydomphila*.

Aussitôt après le dépôt des écouillons dans le milieu SPG, ceux-ci ont été congelés dans l'unité de congélation à -80°C de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse et n'ont pas été déplacés jusqu'à l'étape d'extraction.

I.3. Mise au point d'un test PCR quantitative en chimie SYBR® Green

I.3.1. Analyse informatique des séquences du gène *OmpA* pour choisir un couple d'amorces de PCR

Les séquences nucléotidiques complètes du gène *OmpA* de 14 souches de *Chlamydomphila psittaci* ont été saisies dans la banque de données GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) (numéros d'accès AF269259 à AF269259; AF269281; AJ310735; M73035) et alignées à l'aide du logiciel MultAlin® (version 5.4.1), développé par l'INRA (www.toulouse.inra.fr/multalin.html).

Le logiciel Primer-Express® (Perkin Elmer) a ensuite été utilisé afin de sélectionner des amorces optimisées pour la PCR quantitative.

I.3.2. Clonage d'ADN plasmidique

L'ADN de 4 souches de référence de *Chlamydomonas reinhardtii* nous a été aimablement fourni par le Dr. Daisy Vanrompay (Université de Gand, Belgique) : il s'agit des souches VS1, CP3, GR9 et NJ1, correspondant respectivement aux sérotypes A, B, C et D. Un fragment du gène *OmpA* de 264 nucléotides a été amplifié par PCR à l'aide des amorces CPF (GCAAGACACTCCTCAAAGCC) et CPR (CCTTCCCACATAGTGCCATC). Après préparation du milieu réactionnel, 35 cycles d'amplifications sont effectués en thermocycleur.

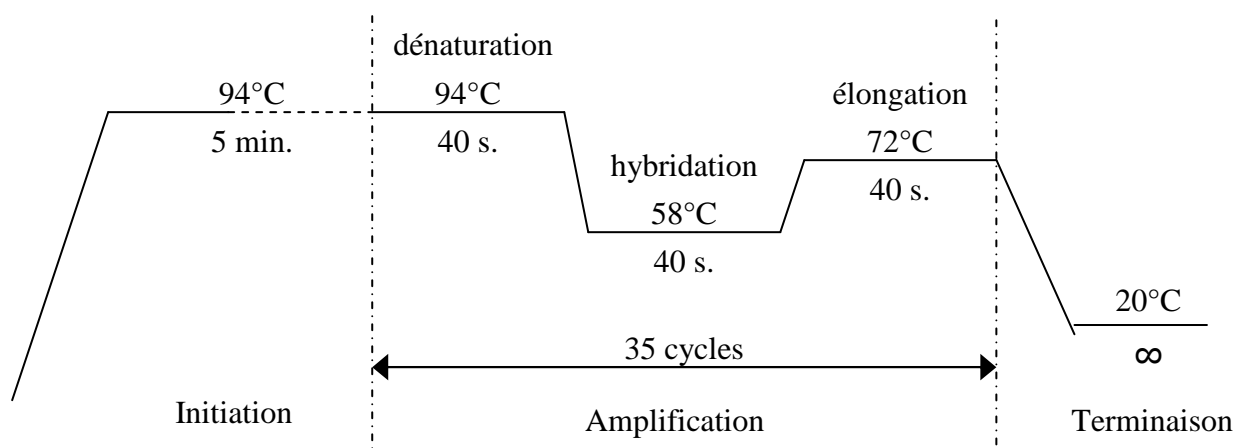


Figure 4 : Programmation des cycles de PCR classique

La réaction de PCR est caractérisée par 3 phases distinctes : initiation, amplification et terminaison. La phase d'amplification est divisée en dénaturation, hybridation et élongation. Trente cinq cycles d'amplifications sont réalisés. Toutes ces phases sont caractérisées par une température et une durée spécifiques, déterminées en fonction du fragment de génome à amplifier.

Le produit de PCR est ensuite cloné en vecteur pGEM-T (Promega Corp.) grâce à la propriété particulière de la Taq polymérase de créer des extrémités adénylées en fin d'amplification. La séquence amplifiée, dont les extrémités sont adénylées, est clonée dans un plasmide pGEMT grâce à la transformation de bactéries compétentes.

Une préparation en grand volume de plasmide est ensuite effectuée à l'aide d'un kit commercial (Qiagen). L'ADN purifié est dosé au spectrophotomètre aux longueurs d'onde 260 et 280 nm. Sur la base de la quantité d'ADN et de la taille du plasmide, le nombre de copies « théoriques » d'ADN est ainsi déterminé.

I.3.3. Extraction de l'ADN des écouvillons

MacDonald *et al.*, 1998, ont comparé les résultats obtenus en PCR avec une extraction classique à la protéinase K et une extraction réalisée dans du DTT à 95°C et dans du DTT dans de l'eau en ébullition. L'extraction de l'ADN des prélèvements a été effectuée par du dithiothréitol, à chaud. Les résultats de cette étude montrent que la sensibilité de la technique est améliorée par l'utilisation du DTT. La meilleure procédure est d'utiliser le DTT à 100°C qui permet de détecter une quantité d'unités de génome 1250 fois plus faible qu'avec le protocole original.

Après avoir laissé décongeler les tubes contenant les écouvillons et le milieu de transport SPG et les avoir passés au vortex, nous en avons prélevé 160µL, que nous avons mélangé à 40µL de tampon de lyse contenant le DTT.

Le DTT se trouve sous la forme d'une poudre à conserver à 4°C. Nous avons dilué cette poudre à hauteur de 10% (poids/volume) dans de l'eau nanopure, soit 1g de poudre dans 10mL d'eau nanopure. Nous avons ensuite aliquoté ce tampon en eppendorfs de 200µL que nous avons conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Le tout est mis à bouillir pendant 10 minutes, puis refroidi avant d'être congelé à -20°C, jusqu'à réalisation de la PCR.

I.3.4. Réalisation de la PCR quantitative en chimie Sybr® Green

Le Mix de réaction est préparé selon les indications du fabricant :

- 12,5 µl de Mix Sybr® Green, contenant la polymérase, les dNTP, le tampon réactionnel,
- 2,5 µl de chacune des amorces,
- 2,5 µl d'ARN de transfert dilués,
- 1 µl d'ADN extrait .

En parallèle aux échantillons testés, chaque plaque de 96 puits comporte un témoin sans ADN (NTC, pour « no template control ») et une gamme de 5 dilutions du plasmide OmpA-pGEMT (10 à 10⁵ copies).

Après ajout de l'ADN, les plaques 96 puits sont scellées sous film transparent et introduites dans le thermocycleur 5700 Sequence detector (PE Applied Biosystems); le programme de thermocyclage comporte 40 cycles [dénaturation à 95°C-hybridation-élongation à 60°C], puis un cycle unique de dissociation, consistant en la montée progressive de la température de 60 à 95 °C, pour établir la courbe de dissociation.

I.4. Analyses sérologiques

Les sérums de 100 canards de la première session (10 par lot), ont été envoyés sous régime de froid positif au laboratoire de Développement et d'Analyses des Côtes d'Armor (LDA 22), en vue d'analyse par le test d'inhibition de la fixation du complément (technique modifiée), réalisé selon le protocole de référence accrédité COFRAC.

II. Résultats

II.1. Description de l'échantillon

Notre échantillon est constitué de 58 lots de canards en gavage appartenant à 5 organisations de producteurs.

Parmi ces 58 lots, certains correspondent à des sites de gavage visités 2 ou 3 fois lors des trois séquences de prélèvements. Il s'agit des numéros 2-32-46, 34-49 et 8-39. Nous avons donc travaillé dans 54 salles de gavage différentes.

Ces ateliers de gavage se répartissent géographiquement sur 5 départements : la Dordogne, le Gers, les Landes, les Pyrénées Atlantiques et les Hautes Pyrénées. La figure 5 issue du recensement général agricole de 2000, présente les implantations des salles de gavage du Sud-ouest, la figure 6 indique la localisation des salles dans lesquelles nous nous sommes rendus.

Les couvoirs d'où sont issus les canards étudiés sont au nombre de 18, dont 10 sont localisés dans le Sud-ouest et 8 dans les Pays de Loire. Un même lot peut être constitué d'animaux issus de 2 couvoirs. Le tableau 3 ci-dessous présente l'origine géographique des canetons futur PAG. Nous avons choisi de présenter cette origine selon le département et non selon le couvoir.

Dpt	Sud-ouest		Pays de Loire				
	Gers	Landes	Indre et Loire	Loire Atlantique	Maine et Loire	Deux- Sèvres	Vendée
Nombre de lots	4	28	1	1	11	10	2

Tableau 3 : Origine des lots de canetons

Les lots de canards prélevés ont été élevés pour 24% d'entre eux (n=14), par les gaveurs eux-mêmes. Pour les autres, 74% (n=43), un éleveur différent du gaveur s'est chargé de ce travail. Nous n'avons pas d'information sur un lot. Les lots à la sortie de l'élevage sont effectués en fonction des places disponibles en gavage. Un éleveur d'une bande de grande taille va devoir séparer ses animaux pour les mettre en gavage chez différents gaveurs. De même, les gaveurs vont parfois devoir, pour occuper tout leur bâtiment, accepter des animaux d'origines différentes. Ceci explique pourquoi il n'est pas possible de superposer le nombre de salles de gavage visitées et le nombre d'éleveurs ayant fourni des animaux à ces gaveurs.

Figure 5 : Localisation des salles de gavage dans le Sud-ouest (données du RGA 2000)

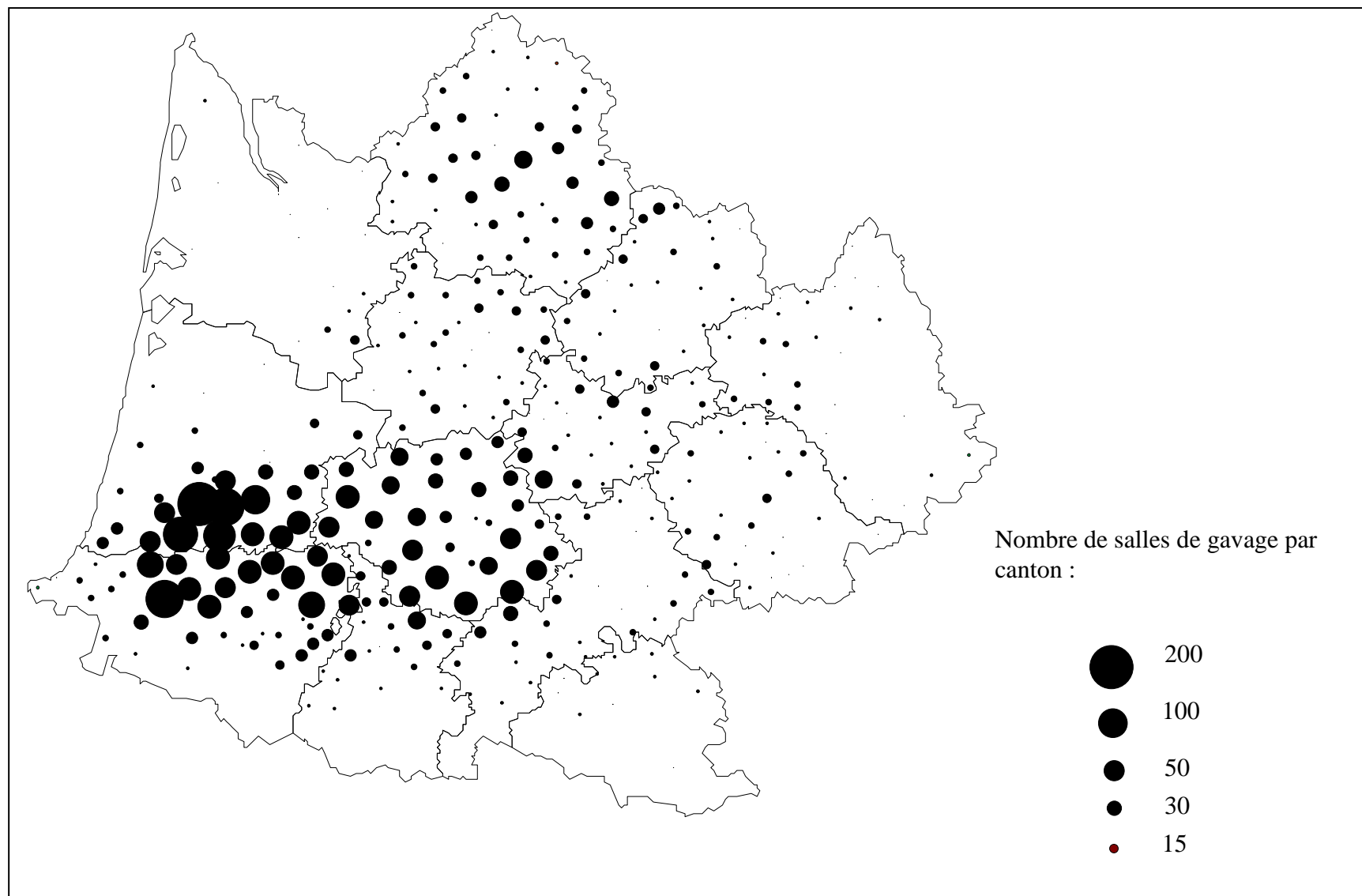
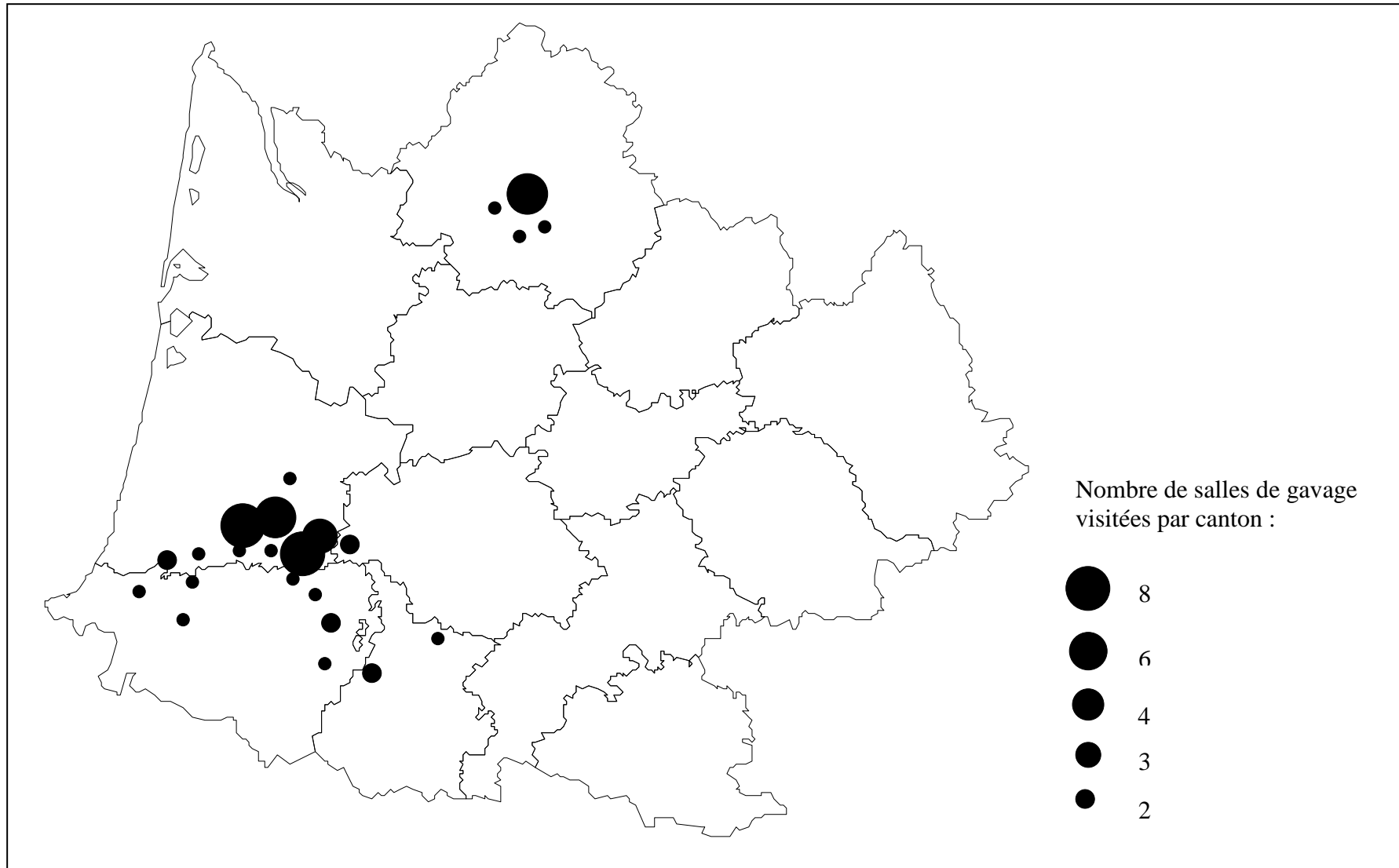


Figure 6 : Localisation des salles visitées au cours de l'enquête épidémiologique



II.2. Données d'élevage

Selon les données des fiches d'élevage, la mortalité varie de 0% (c'est-à-dire moins de 0,01%), jusqu'à 40%. Ces données sont difficiles à extraire car, lorsque la mortalité n'excède pas 0,1% par jour, elle n'est pas répertoriée. La quasi-totalité des lots en gavage a présenté, en élevage, un taux de mortalité inférieur à 10%.

Sur les 58 lots étudiés, 21 n'ont pas d'information exploitable. Il reste 37 lots que nous avons classés en deux catégories : présence ou non d'un accident de mortalité ponctuel pendant la phase d'élevage. Nous comptons autant d'élevage dans chaque catégorie.

Pour la majorité des élevages, soit 56, les canetons provenaient d'un seul couvoir. Cependant, 2 élevages ont reçu des animaux issus de deux couvoirs. Il s'agit des lots 10 et 11.

Les plans de prophylaxie des organisations étant divergeant, certains lots ont reçu une supplémentation en Oxytétracycline (OTC) en fin d'élevage. Il s'agit des lots : 10, 11, 12, 18, 19, 20, 26, 27, 28, 33, 34, 35, 42, 50, 51, 52, 53, 54 et 55.

Cette supplémentation se fait à hauteur de 400 ppm d'OTC dans l'aliment, pendant 7 à 10 jours, en toute fin d'élevage.

II.3. Données de gavage

Nous avons tout d'abord classé les salles de l'échantillon en trois catégories, selon leur capacité.

- les salles de moins de 700 places (faible capacité) : 26
- les salles de capacité située entre 700 et 900 places (capacité intermédiaire) : 11
- les salles de plus de 900 places (forte capacité) : 21

Le logement des canards dans ces salles est majoritairement composé de cages individuelles (49 salles). Cependant, 5 salles sont équipées en parcs collectifs, occupés par 12, 15 ou 21 canards, pour une capacité moyenne de 693 places.

Six des 54 salles visitées n'étaient pas dotées de système de refroidissement du type « Pad cooling ». Parmi celles-ci, 3 étaient équipées en parcs, avec un refroidissement assuré par une ouverture importante sur l'extérieur ainsi que de grands volumes d'air.

Pendant chaque visite, nous avons observé les animaux afin de déceler la présence de signes pouvant *évoquer* la chlamydie, tels que des écoulements oculaires et nasaux. Les salles ont donc été classées en fonction de la présence ou non d'écoulement et/ou de conjonctivite et, sur 58 lots, 24 présentaient des écoulements.

Lors des 24 à 26 repas donnés aux canards en salle de gavage, il n'est pas rare de constater un peu de mortalité. Cette mortalité est généralement faible, et souvent d'origine technique, bien qu'un problème plus grave puisse se déclencher et entraîner des mortalités plus importantes. Dans cet esprit, nous avons classé les ateliers de gavage en trois catégories :

- taux de mortalité inférieur à 1% : 19 salles,
- taux de mortalité compris entre 1 et 5% : 22 salles,
- taux de mortalité supérieur à 5% : 4 salles,
- taux de mortalité non communiqué : 13 salles.

La majorité des salles de gavages a reçu des PAG issus d'un seul élevage, sauf 7 salles alimentées par deux lots d'origines, PAG et couvoirs, différentes. Il s'agit des lots 7, 13, 36, 50, 53, 57 et 59.

Par ailleurs, quelques lots prélevés sont issus des mêmes élevages. Il s'agit des lots : 16-17, 25-32, 29-30, 46-48, 53-55 et 56-59.

II.4. Données d'abattoir

Les informations provenant de l'abattoir ne sont pas exploitables. En effet, outre les variations liées aux contraintes du marché et aux objectifs de la marque, qui laissent penser que les critères de production évoluent, le libellé des saisies ne fait pas l'objet d'un consensus entre abattoir. Des erreurs d'interprétations risquent donc de fausser l'analyse de ces données.

II.5. Mise au point d'un test de détection de *C. psittaci*

II.5.1. Choix des amorces de PCR quantitative

L'alignement de 14 séquences de *C. psittaci* nous a permis d'identifier un fragment du gène *OmpA* présentant une identité nucléotidique de 100% entre toutes les séquences de *C. psittaci* publiées. Ce fragment a été analysé à l'aide du logiciel Primer-Express® (Perkin Elmer), afin de sélectionner des amorces optimisées pour la PCR quantitative. Un couple d'amorces sens et antisens, nommées CP-SBF (GGGTTCCGCTCTCTCCTTACA) et CP-SBR (TGTAGGGAACCCAGCTGAACC), respectivement, a ainsi été retenu.



II.5.2. Clonage et quantification de l'ADN plasmidique

Le clonage d'un fragment du génome de *C. psittaci* a été réalisé afin de disposer d'un étalon de quantification. Les amorces CPF et CPR ont permis d'amplifier un fragment de 264pb (Figure 7, Gel d'électrophorèse des produits de PCR). Ces fragments ont été clonés en plasmide pGEM-T et une préparation en grand volume de ce plasmide a été effectuée à l'aide d'un kit commercial. Une gamme de dilutions a ensuite été dosée au spectrophotomètre aux longueurs d'onde 260 et 280 nm. Une gamme d'ADN plasmidique, allant de 10 à 10⁷ génomes « théoriques » a ainsi été préparée pour servir d'étalon de quantification pour les expérimentations de PCR en temps réel.

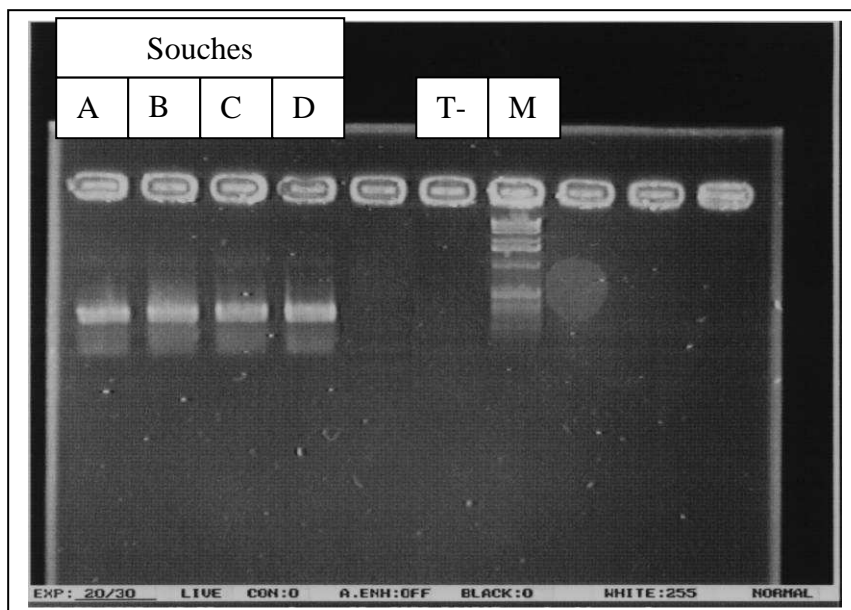


Figure 7 : Gel d'électrophorèse des produits de PCR

Amplification d'un fragment de 264 pb du gène *OmpA* des souches de référence A, B, C, D, T- (témoin négatif) et M, marqueur de poids moléculaire.

II.5.3. Optimisation de la concentration des amorces

Afin de limiter l'occurrence de dimères non-spécifiques au cours des cycles d'amplification, nous avons testé 3 concentrations pour chacune des amorces : 50µMol, 150µMol et 300µMol. La concentration optimale retenue était de 150 µMol pour CPF-SBF et 300 µMol pour CP-SBR (résultat non montré).

II.5.4. Validation de la réaction de PCR quantitative

Sur la base des concentrations optimisées de chacune des 2 amorces, la réaction est mise en oeuvre sur la gamme étalon. Les courbes d'amplification et de dissociation satisfont aux standard de cette technique (Figures 8 et 9). En particulier, le coefficient de régression est de -0,9998, ce qui signe une bonne linéarité (Figure 10). Dans nos conditions de réaction, la qualité de la quantification semble cependant se dégrader entre 100 et 10 copies, ce qui est décrit en chimie Sybr® Green (Huang *et al.*, 2001).

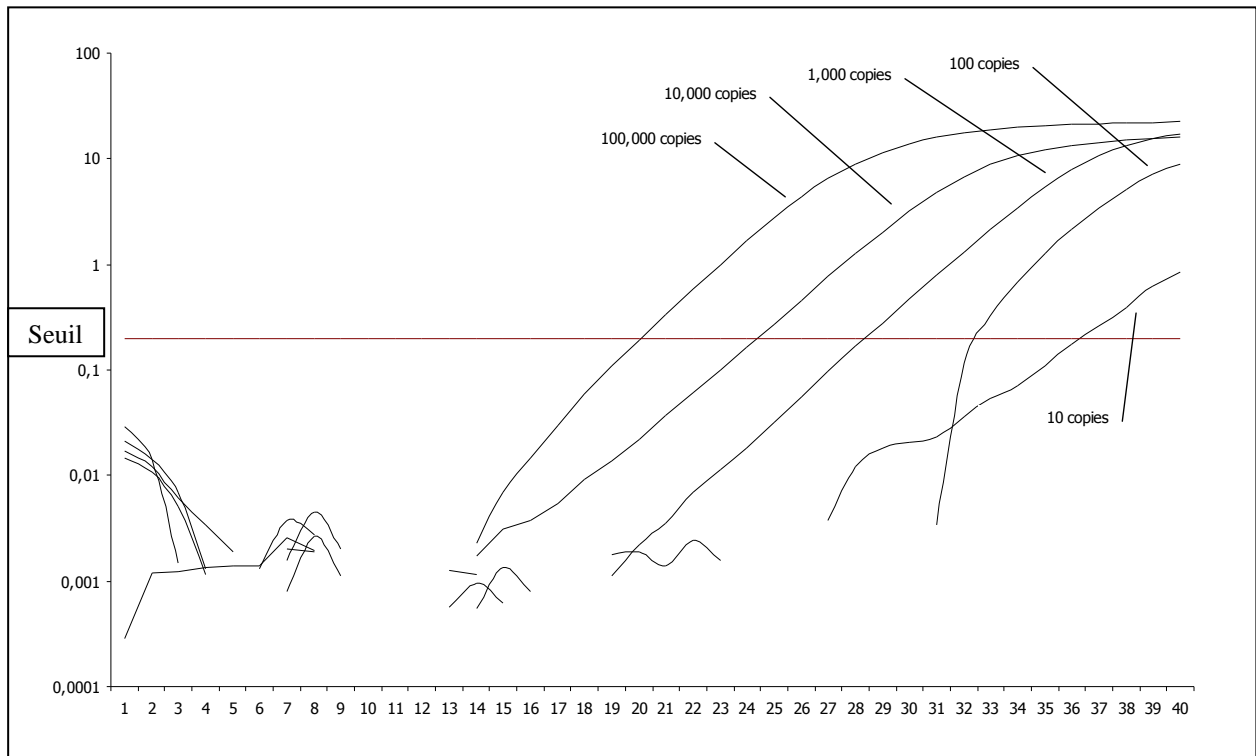


Figure 8 : Courbe d'amplification de la gamme de dilution de l'ADN plasmidique

En abscisse est porté le nombre de cycles de PCR, en ordonnées, la quantité de fluorescence émise par le Sybr® Green en échelle logarithmique. Les 5 dilutions de notre plasmide font fonction de gamme étalon. Le nombre de copies présentes dans chaque puits de réaction est calculé par comparaison avec la courbe d'amplification de cette gamme. La base de quantification est le nombre de cycles associé au franchissement du seuil de quantification (Ct). Le seuil est, ici, fixé à 0,2.

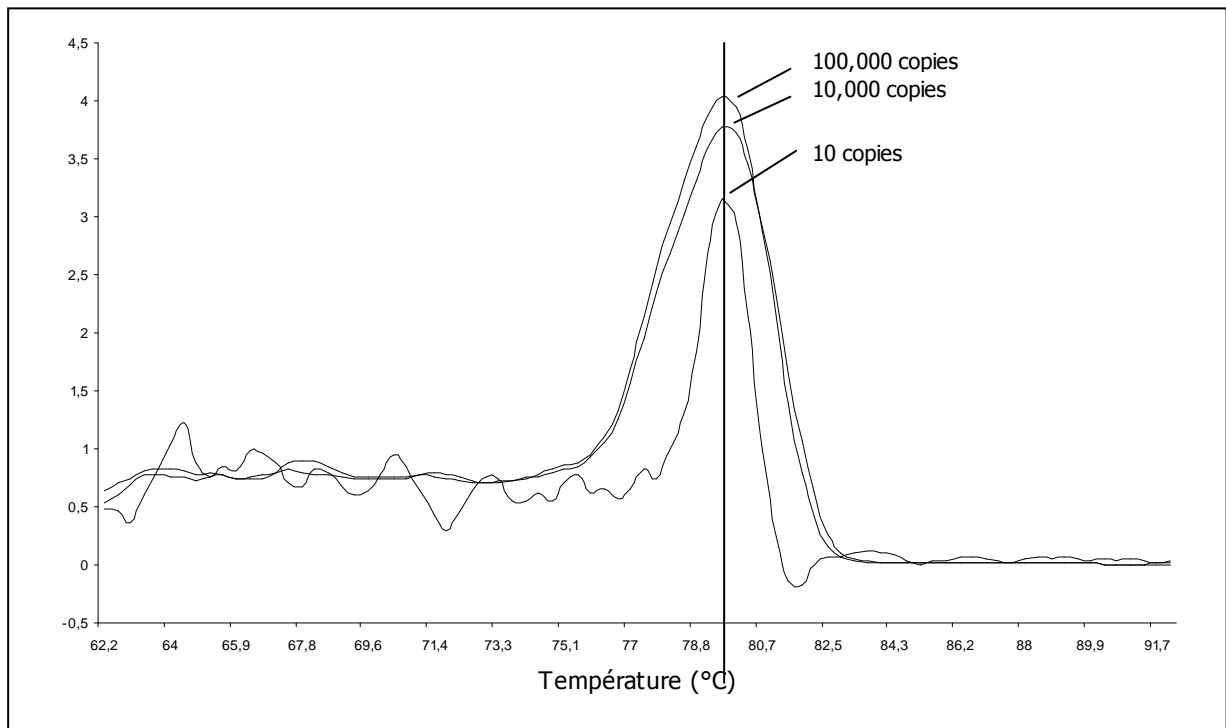


Figure 9 : Courbe de dissociation

En abscisse est portée la température en degrés Celsius, en ordonnées la quantité de fluorescence émise par le Sybr® Green. Cette courbe est construite en fin de PCR, par chauffage progressif du milieu réactionnel et observation de la fluorescence. Le pic de dissociation (ici env. 79°C), correspond à la température de séparation des 2 brins d'ADN amplifiés. La température de dissociation est donc étroitement dépendante de la séquence et témoigne de la spécificité de l'amplification.

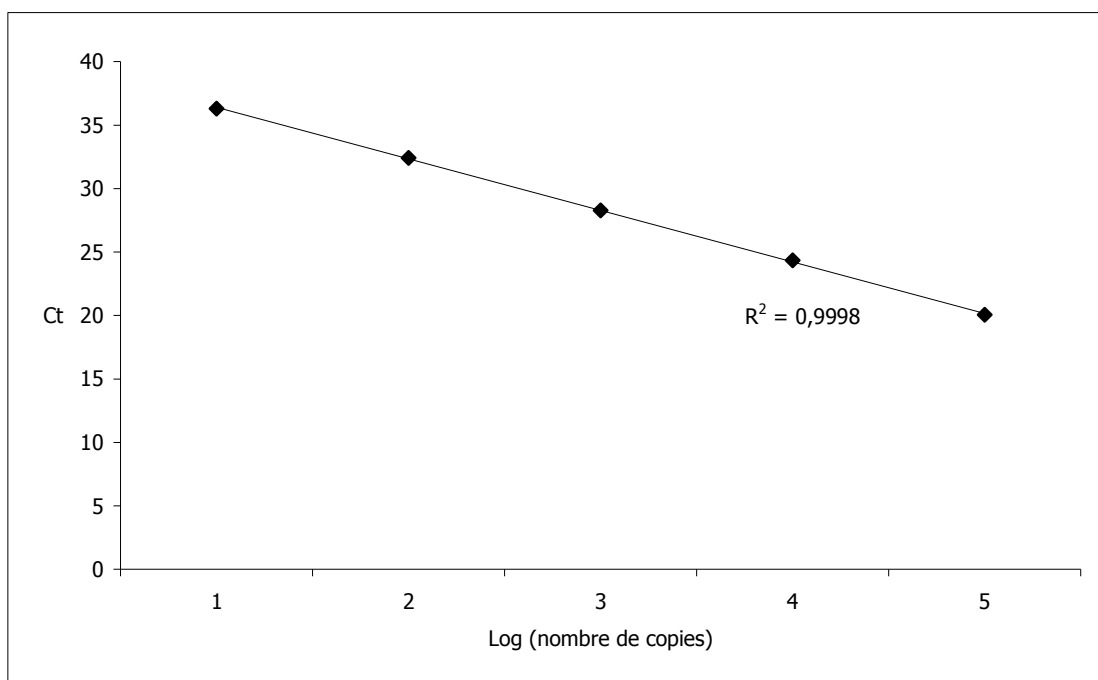


Figure 10 : Droite de régression

En abscisse est représenté le logarithme du nombre de copies et en ordonnées, l'intensité de la fluorescence. La droite de régression établit la linéarité de la relation entre l'intensité de la fluorescence et le nombre de copies.

II.5.5. Application de la technique aux échantillons extraits au DTT

La présence de DTT dans le produit d'extraction est censée ne pas inhiber la réaction de PCR (MacDonald *et al.*, 1998) ; nous avons cependant renouvelé le test précédent sur une gamme étalon diluée dans un tampon contenant, comme les ADN extraits, 0,4% de DTT. A cette concentration, l'efficacité de la réaction ne semble pas significativement modifiée. La température de dissociation est cependant légèrement abaissée (76-77°C) par rapport au contrôle ne comportant pas de DTT (80°C).

II.5.6. Détermination de seuils de quantification

En l'absence de « gold-standard », c'est à dire de technique de niveau de sensibilité équivalent, il ne nous a pas été possible de déterminer exactement le seuil de détection. La comparaison avec la gamme de quantification est elle même toute relative. Nous avons donc été amenés à définir une valeur seuil au dessus de laquelle la quantification était fiable.

Cette limite de quantification des écouvillons a été fixée à 80 copies par puits de réaction PCR, soit 10000 copies de génome par écouvillon prélevé. Ceux dont les résultats d'amplification sont en dessous de ce seuil peuvent cependant être considérés positifs, mais il n'est pas possible d'en quantifier précisément la charge.

Cette valeur seuil, forcément arbitraire, a été choisie pour des raisons de lisibilité et validée par le calcul des pourcentages de faux positifs et faux négatifs, obtenu d'après les résultats du test de répétitivité (annexe 2). Ce test a été appliqué à une série de 3 plaques, comportant chacune 5 répétitions de la gamme étalon de plasmide OmpA-pGEM-T. Les résultats de ce test nous ont permis de déterminer les seuils de quantification.

D'après ces résultats, le seuil de 80 copies permet d'éliminer le risque de faux négatif et de limiter les faux positifs. Nous avons, à ce niveau, un très faible pourcentage de faux positifs, qui peut être corrigé par l'analyse de la courbe de dissociation.

En effet, il est important de signaler que la PCR quantitative présente outre la courbe d'amplification, une courbe de dissociation des amplicons, qui valide la spécificité de la réaction. Nous pouvons donc discriminer les faux positifs et considérer que le calcul nous donne plus de faux positifs que la réalité.

Le choix du seuil pour les animaux dits « Hautement Excréteurs en *Chlamydomphila* », est basé sur les mêmes critères, le risque encouru par les professionnels dû à la non détection de ces animaux très excréteurs étant très supérieur dans ce cas. L'annexe 3 présente la méthode de calcul du seuil au-delà duquel les animaux sont dits « HEC ». Le seuil choisi est ici de 8000 copies par réaction, soit théoriquement 10^6 copies de génome par écouvillon.

Sur la base de ces seuils nous définirons donc par la suite les animaux de la manière suivante :

Qualification des canards :

- Un animal « négatif vrai » ne porte aucune copie décelable de *C. psittaci*.
- Un animal « porteur non quantifiable » est porteur de *C. psittaci* en quantité inférieure au seuil de 80 copies par échantillon, soit 10^4 par écouvillon.
- Un animal dit positif, est porteur de *C. psittaci* en quantité supérieure au seuil de quantification qui est de 10^4 copies par écouvillon.
- Un animal « HEC », ou Hautement Excréteur en *Chlamydomphila*, est porteur de cette bactérie en quantité supérieure au second seuil, qui est de 10^6 copies/écouvillon.

Qualification des lots de canards :

- Un lot « 100% sain » est composé de 100% d'animaux « négatifs vrais » dans l'échantillon.
- Un lot « positif » contient au moins un canard positif dans l'échantillon.
- Un lot « faiblement positif » comprend moins de 50% de canards positifs dans l'échantillon.
- Un lot « fortement positif » comprend plus de 50% de canards positifs dans l'échantillon.
- Un lot « HEC » possède au moins un sujet « HEC » dans l'échantillon.

II.5.7. Mise en oeuvre du test sur les échantillons extraits d'écouvillons conjonctivaux ou cloacaux

Sur la base de la mise au point évoquée ci-dessus, nous avons mis en oeuvre le test sur une série d'échantillons : les résultats de ces essais sont synthétisés sous forme d'histogrammes présentés dans les graphiques suivants (figures 11 à 15).

AVRIL ECOUVILLONS CLOACAUX

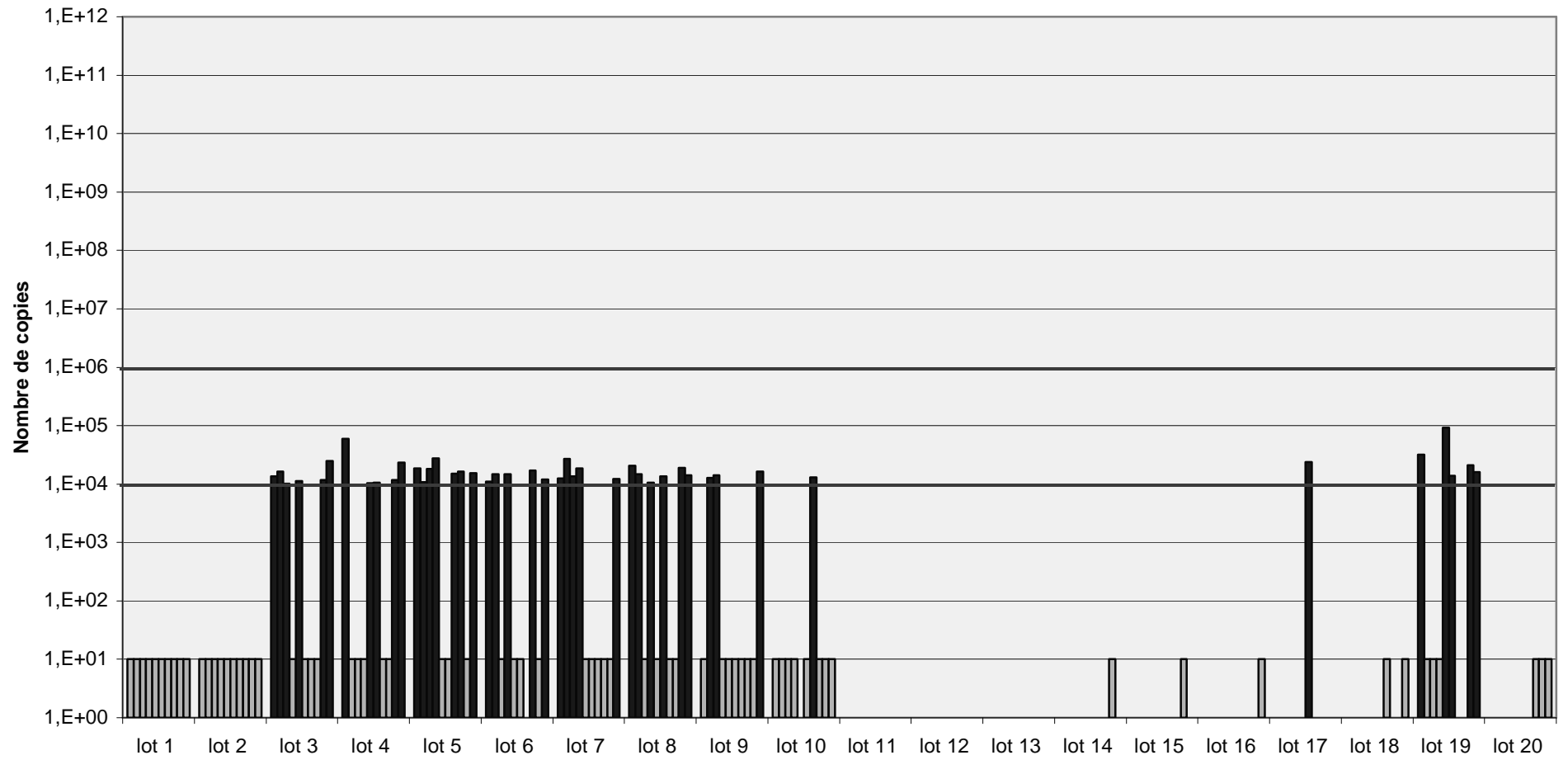


Figure 11 : Quantification de *C. psittaci* sur les écouvillons cloacaux ; session d'avril 2002

AVRIL ECOUVILLONS CONJONCTIVAUX (1)

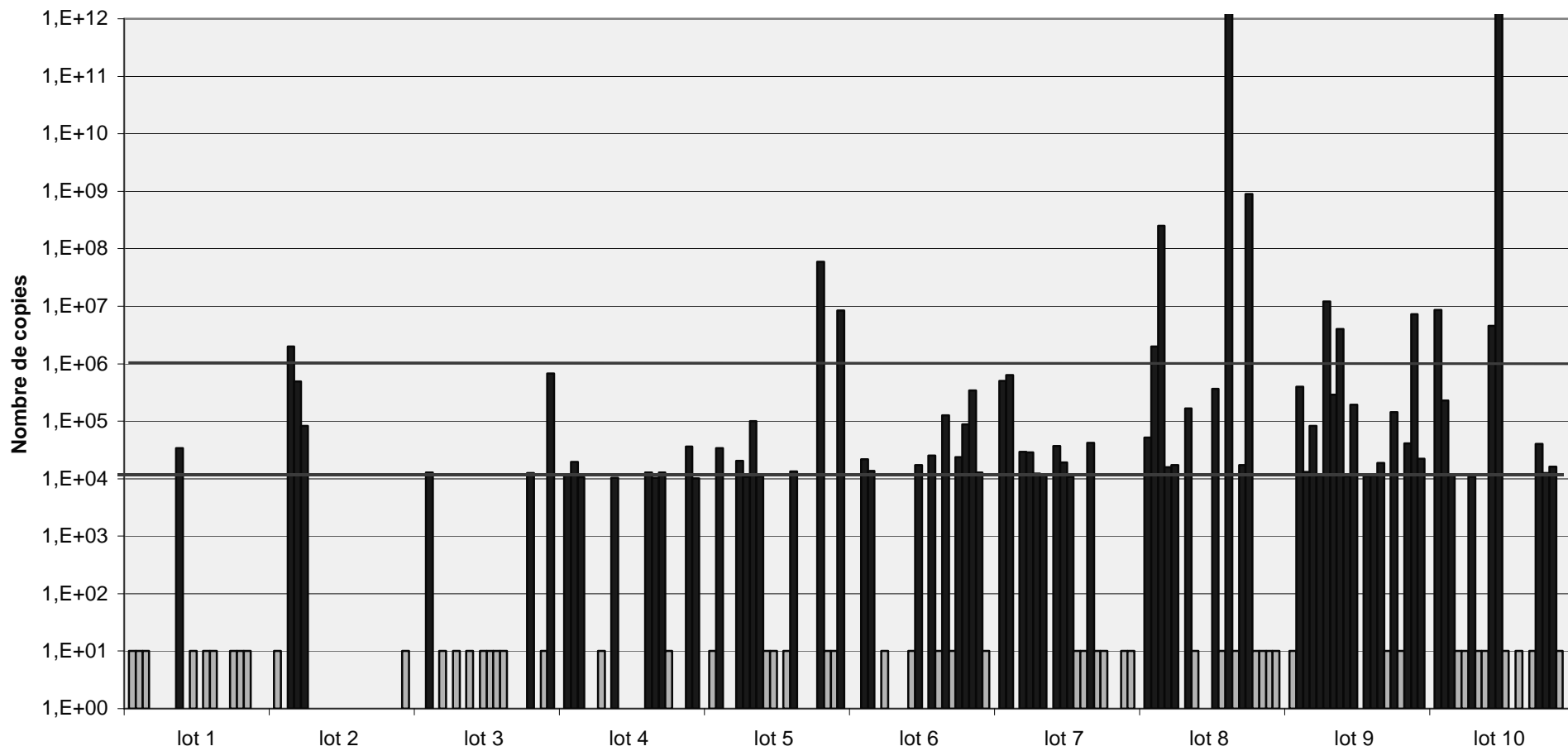


Figure 12 : Quantification de *C. psittaci* sur les écouvillons conjonctivaux ; session d'avril 2002, lots 1 à 10

AVRIL ECOUVILLONS CONJONCTIVAUX (2)

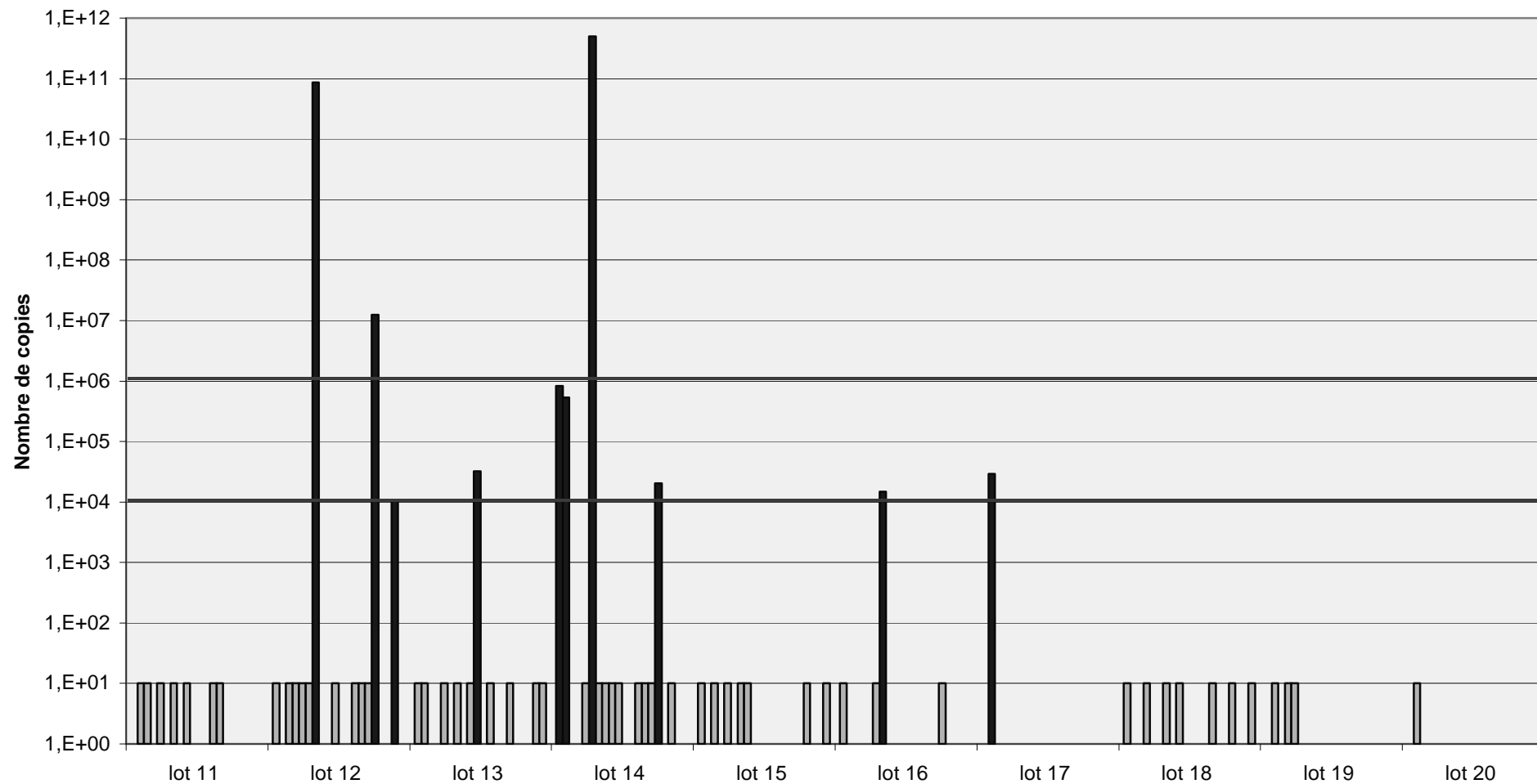


Figure 13 : Quantification de *C. psittaci* sur les écouvillons conjonctivaux ; session d'avril 2002, lots 11 à 20

JUILLET ECOUVILLONS CONJONCTIVAUX

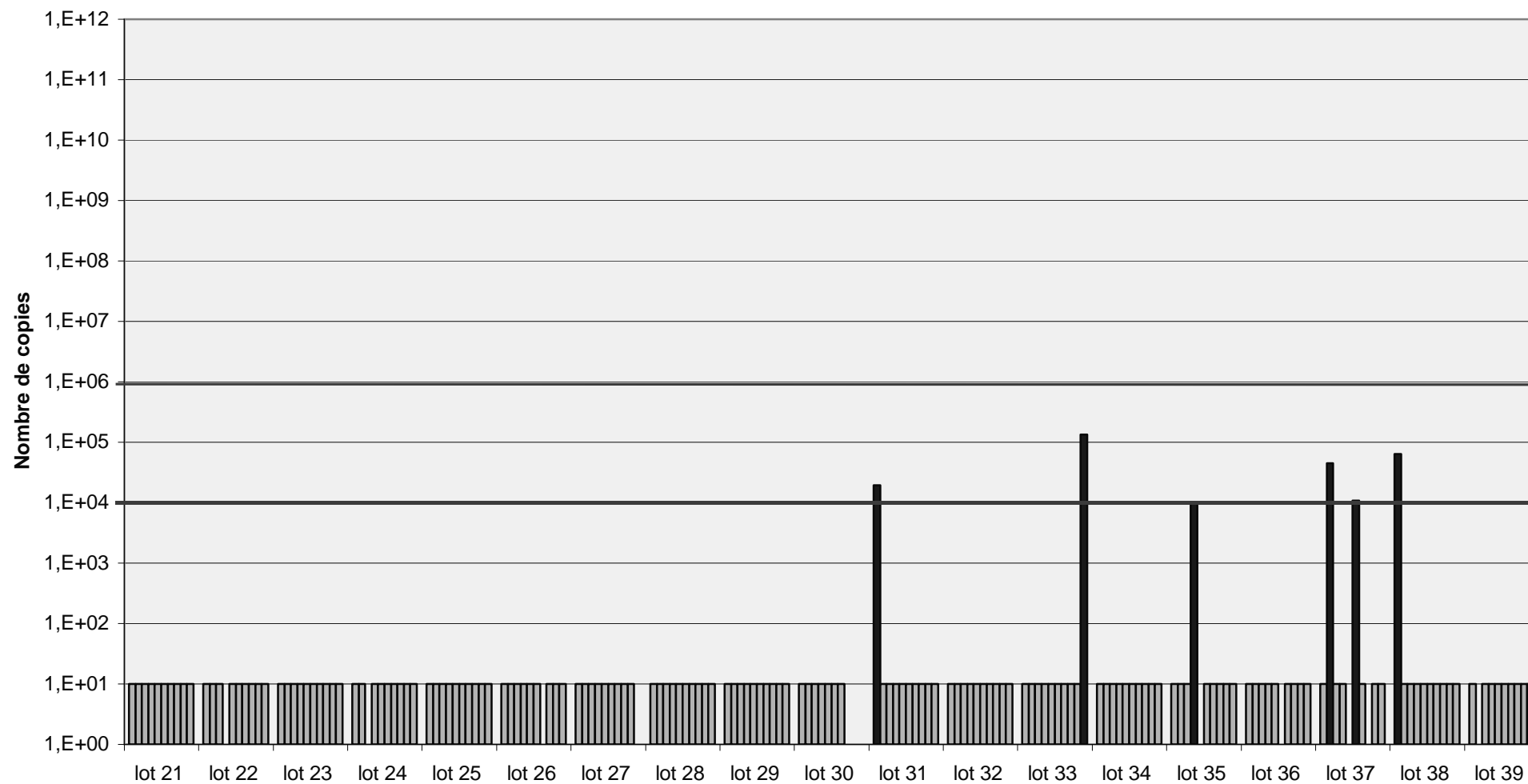


Figure 14 : Quantification de *C. psittaci* sur les écouvillons conjonctivaux ; session de juillet 2002, lots 21 à 39

DECEMBRE ECOUVILLONS CONJONCTIVAUX

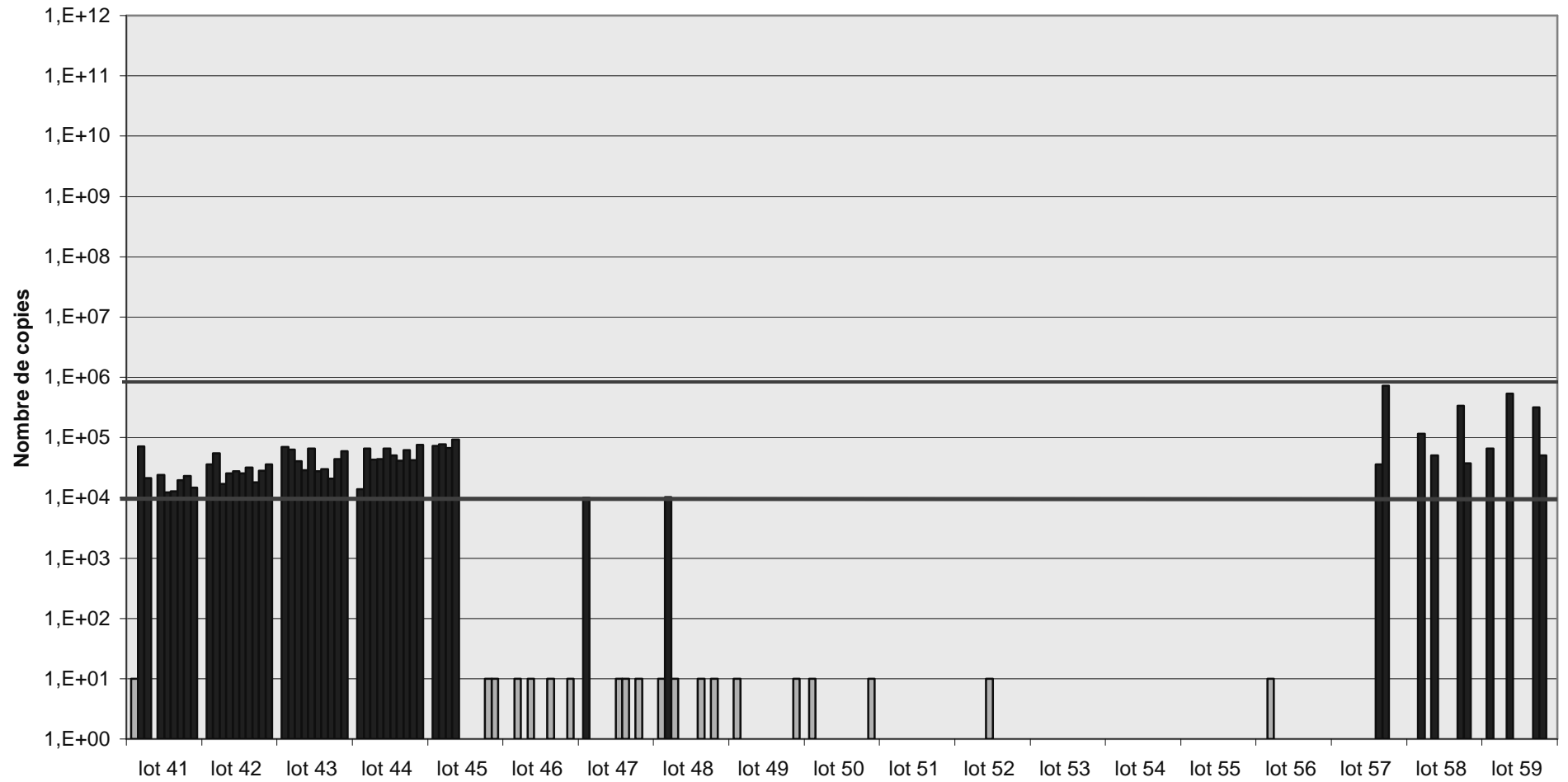


Figure 15 : Quantification de *C. psittaci* sur les écouvillons conjonctivaux ; session de décembre 2002, lots 41 à 59

Légende des graphiques de résultats

- En abscisse est porté le numéro du lot considéré. Les lots d'avril conjonctivaux présentent les résultats de 20 canards, en avril cloacal, en juillet et décembre seulement 10 canards ont été analysés par lot.
- En ordonnée est porté le nombre de génomes de *Chlamydophila psittaci* présents dans l'écouvillon déterminé, par la PCR quantitative.
- Les deux seuils définis, positivité et HEC, sont représentés par les deux traits horizontaux, dessinés respectivement à la hauteur de 10^4 et 10^6 copies.

Les résultats des analyses des canards sont de trois types :

- Un trou dans le diagramme, sans barre, correspond à un canard pour lequel aucune copie du génome recherché n'a pu être amplifiée.
- Une barre verticale claire s'arrêtant à 10 copies correspond aux animaux pour lesquels nous avons obtenu un comptage de *C. psittaci* inférieur au seuil de positivité.
- Une barre verticale foncée dépassant le premier seuil, représente les animaux considérés positifs.
- Une barre verticale foncée dépassant le second seuil, représente les animaux considérés « HEC ».

Description des graphiques

La figure 11 présente les résultats de l'analyse par PCR de 10 écouvillons cloacaux sur chacun des 20 lots d'avril. Les écouvillons analysés ont été choisis aléatoirement parmi les 20 disponibles.

Les lots analysés peuvent être classés en différentes catégories : les lots « 100% sains » (11, 12, 13), les lots « porteurs non quantifiables » (1, 2 et dans une moindre mesure 14, 15, 16, 18 et 20) et les lots positifs (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 17, 19). Aucun animal « HEC » n'est diagnostiqué dans cette série.

Les figures 12 et 13 sont construites d'après l'analyse des écouvillons conjonctivaux de la session d'avril.

Sur la figure 12, nous n'obtenons pas de lot « 100% sain ». Tous les lots sont au moins « faiblement positifs ». Parmi ces lots positifs, il y a de 1 (lots 1 et 3) à 16 (lot 19) canards positifs. De plus, 13 barres dépassent le second seuil, il y a donc 13 canards « HEC ».

Sur la figure 14, il y a moins de résultats positifs. Dans 5 lots, il y a des « porteurs non quantifiables » et seulement 10 canards sont positifs, dont 3 « HEC ».

La figure 14 reprend les résultats de la séquence de prélèvements de juillet, où 10 canards par lot ont été analysés.

Aucun lot n'est « 100% sain », mais 14 lots sont constitués, en quasi-totalité, d'animaux « porteurs non quantifiables ». Seuls 6 animaux, répartis en 5 lots, sont positifs, sur les 190 analysés.

En décembre (figure 15) 4 lots sont « 100% sains » (51, 53, 54, 55) et 5 lots sont constitués de canards « porteurs non quantifiables » ou sains. Parmi ces 5 lots, 4 n'ont qu'1 ou 2 canards « porteurs non quantifiables ». Parmi les 10 autres lots, 6 sont « faiblement positifs » et 4 sont « fortement positifs ».

II.5.8. Analyse du portage conjonctival et cloacal

En bilan, seuls 4 lots sur 58, soit $7\% \pm 6,5\%$ sont négatifs à 100%. Il faut toutefois remarquer que ces lots font partie d'organisations qui supplémentent l'alimentation de la majorité des élevages en Oxytétracycline, pendant une dizaine de jours en fin de bande. De plus, alors que la prévalence globale est plus élevée en décembre, c'est en avril qu'il y a le plus de lots positifs. Les lots positifs représentent en avril $75\% \pm 19\%$, contre $52\% \pm 22\%$ en décembre. Nous ne retrouvons des animaux « HEC » que lors de la session de printemps. D'ailleurs les lots « HEC » comptent pour $35\% \pm 21\%$ des lots de printemps. Il faut tout de même prendre ces résultats de lots avec précaution car les intervalles de confiance sont élevés du fait de la taille restreinte des échantillons par saison. En effet, s'il y a beaucoup de lots « HEC » en avril, les canards « HEC » ne représentent que $4\% \pm 0,5\%$ des animaux analysés à cette époque.

II.6. Comparaison de la sensibilité des techniques de PCR employées et des sites de prélèvement

Afin de choisir le meilleur site de prélèvement pour la détection des génomes de *C. psittaci* par PCR quantitative, nous avons analysé 10 écouvillons cloacaux pour chacun des 20 lots d'avril.

Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus d'après les écouvillons cloacaux et conjonctivaux.

Le résultat global de l'analyse des écouvillons issus de ces 200 canards est porté dans le tableau 4.

ECOUVILLONS		CONJONCTIVAUX		TOTAL
		+	-	
CLOACAUX	+	22	22	44
	-	22	134	156
TOTAL		44	156	200

Tableau 4 : Comparaison des résultats de positivité en fonction du site de prélèvement

Sur 200 canards testés, 44 ont été diagnostiqués infectés d'après chacun des sites d'écouvillonnage. C'est une coïncidence, car les mêmes animaux n'ont pas nécessairement le même statut d'après ces deux analyses. Le taux de concordance entre les deux sites est donc de 78%.

Puis, nous nous sommes intéressés à la capacité de détection d'un lot positif, en fonction du site de prélèvement (tableau 5).

STATUT DES LOTS, D'APRES DES ECOUVILLONS :		CONJONCTIVAUX		TOTAL
		+	-	
CLOACAUX	+	8	2	10
	-	4	6	10
TOTAL		12	8	20

Tableau 5 : Capacité des types de prélèvements à détecter un lot positif

Sur les 20 lots analysés, 14 lots sont positifs en conjuguant les 2 types d'écouvillons, 12/14 sont détectés par les écouvillons conjonctivaux, 10/14 le sont par les écouvillons cloacaux. Le taux de concordance est de 70%, soit 14 lots de même statut.

II.7. Détermination de la prévalence de portage

II.7.1. Prévalence globale

	Valeur absolue	Pourcentage
Nb de canards positifs	148/ 780	19% ± 2,7%
Nb de canards "HEC"	16/ 780	2% ± 1%
Nb de canards négatifs	329/ 780	42% ± 3,4%
Nb de canards non quantifiables	303/ 780	39% ± 3,4%
Nb de lots "non quantifiables"*	28/ 58	48% ± 13%
Nb de lots "100% sains"	4/ 58	7% ± 6,5%
Nb de lots positifs	30/ 58	52% ± 13%
Lots à "HEC"	7	12% ± 8,3%

Tableau 6 : Prévalence globale de *C. psittaci* chez le canard mulard en gavage

* lot "non quantifiable" : lot ne comportant pas de canard dont le nombre de copies de génome de *C. psittaci* dépasse le seuil de quantification.

N.B. : tout lot dont un des canard est "HEC" devient un « lot HEC ».

II.7.2. Prévalence selon la saison

Les niveaux de portage observés en avril, juillet et décembre 2002 ont été comparés pour évaluer l'"effet saison" (tableau 7).

	AVRIL		JUILLET		DECEMBRE	
Canards +	88/400	22%	6/190	3%	54/190	28,4%
Canards -	312/400	78%	184/190	97%	136/190	71,6%
lots " non quantifiables "**	5/20	25%	14/19	73,7%	9/19	47,4%
Faiblement +	12/ 20		5/ 19		6/ 19	
Fortement +	3/ 20		0/ 19		4/ 19	
Lots à "HEC"	7/ 20		0/ 19		0/ 19	
Nb de canards "HEC"	16/ 400		0/ 190		0/ 190	

Tableau 7 : Prévalence de *C. psittaci* chez le canard selon la saison

II.7.3. Prévalence selon l'organisation

Le niveau de portage de *C. psittaci* a également été analysé en fonction de l'organisation de producteurs concernée (tableau 8).

c o d e	Nombre de lots prélevés	Nombre de canards positifs	Pourcentage de canards positifs	Pourcentage de lots positifs	Nombre de "HEC"	Pourcentage de canards "HEC"	Pourcentage de lots "HEC"
A	9	10/120	8,33%	67%	1	0,8%	11,1%
B	1	16/20	80%	ND	3	15%	ND
C	13	59/180	32,8%	76,9%	6	3%	15%
D	9	14/120	11,7%	44%	5	4,2%	22%
E	16	16/210	7,7%	25%	0	0%	0%
F	10	33/130	25,4%	50%	1	0,7%	10%

Tableau 8 : Prévalence de *C. psittaci* chez le canard en fonction des organisations

Un seul lot de l'organisation B ayant été analysé, nous n'avons pas défini de pourcentage de positivité.

II.8. Apports de la sérologie

Les résultats des sérums traités en inhibition de la fixation du complément sont tous négatifs. L'infection par *Chlamydophila psittaci* n'a donc pas pu être mise en évidence par cette technique, y compris sur des sujets nettement positifs en PCR.

II.9. Relations portage / éléments techniques

L'étude des informations récupérées par le biais des fiches de suivi des lots, nous montre quels sont les points qui ne présentent pas de risque quant à la chlamydie. Il s'agit notamment du couvoir et plus généralement de l'origine des canards et du fait que le gaveur élève ou non ses animaux. La taille de la salle et l'utilisation de la gaine, ne semblent pas non plus être des facteurs de risque, de même que la mortalité en première semaine ni l'existence de pic de mortalité en élevage. En gavage, nous ne pouvons non plus nous appuyer sur la mortalité, car celle-ci est généralement plus le fait des risques liés à la technicité de l'acte que des pathologies.

La présence de signes cliniques, c'est-à-dire d'écoulements oculaires ou nasaux, en salle de gavage, n'est pas significativement associée au portage. En effet, selon nos relevés, dans les salles où nous avons observé des signes cliniques, 19%±16% des animaux sont porteurs quantifiables, contre 18%±13% dans les ateliers sans écoulement.

La supplémentation en OTC en fin d'élevage est véritablement l'élément technique le plus corrélé à la prévalence en gavage. En effet, les 20 lots ayant été traités présentent une prévalence moyenne de 9%. Un de ces lots est cependant "atypique" avec 40% de mortalité en élevage et 100% de sujets positifs en *C. psittaci*. La prévalence moyenne des lots non traités est de 22%±13%.

II.10. Description des pratiques de protection mises en place par les gaveurs

En marge de notre enquête épidémiologique, nous nous sommes intéressés à quelques pratiques de protection qui nous semblaient susceptibles de diminuer le risque auquel sont exposés les professionnels du gavage.

Afin de diminuer le risque de contamination humaine par *Chlamydophila psittaci* portée et excrétée par les animaux infectés, des gestes simples et des mesures de protection

peu onéreuses peuvent être mises en place par les professionnels. Nous allons dresser un bilan de ce que l'on rencontre sur le terrain.

II.10.1. Port du masque

Le masque est, comme le montre la figure 16 ci-dessous, très rarement porté. Plus des trois quart des gaveurs n'en portent jamais. Quant à ceux qui en portent parfois, il s'agit de personnes se protégeant de la poussière au cours des trois premiers jours de gavage, généralement avec un modèle anti-poussière, de protection insuffisante. De fait, un seul gaveur portait toujours un masque offrant une bonne protection. Il s'agissait d'une personne ayant été touchée par une psittacose quelques années auparavant et ne souhaitant pas se contaminer à nouveau.

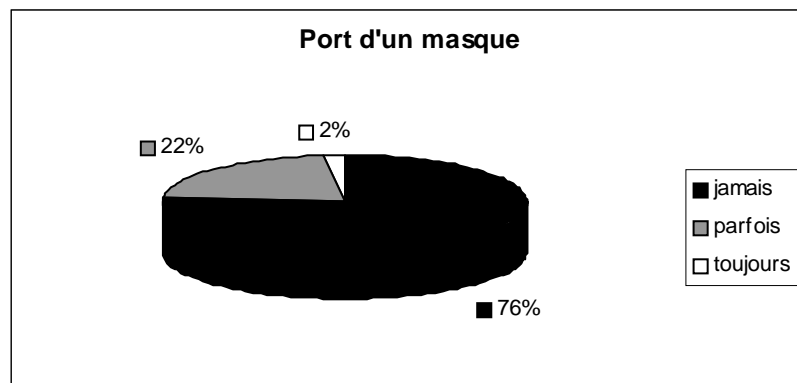


Figure 16 : Port du masque de protection chez les gaveurs visités

II.10.2. Arrêt de la ventilation

Plus de quatre gaveurs sur cinq n'arrêtent pas la ventilation pendant le gavage. Les autres se contentent, pour la plupart, de la diminuer seulement en hiver lorsque la température ressentie ne permet pas de réaliser le gavage dans des conditions supportables.

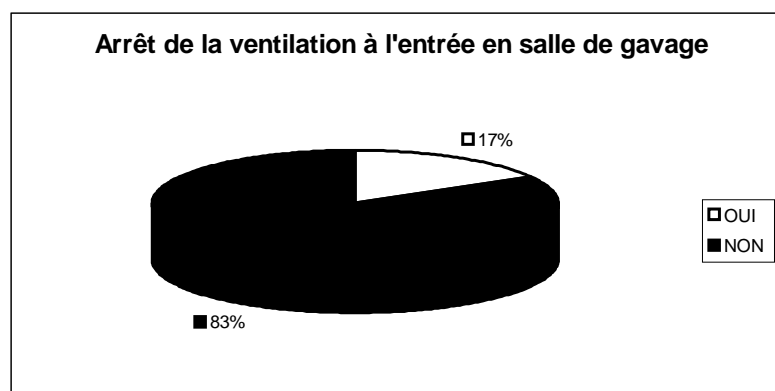


Figure 17 : Arrêt de la ventilation pendant le gavage

II.10.3. Port de gants

Le port de gant n'est pas la plus efficace des protections contre la psittacose. Néanmoins, il participe à la protection contre les sécrétions animales potentiellement contaminantes et c'est peut être l'une des mesures les plus simples à prendre.

Un tiers des gaveurs interrogés a pour habitude de porter des gants en permanence, alors que plus de la moitié préfère travailler à mains nues.

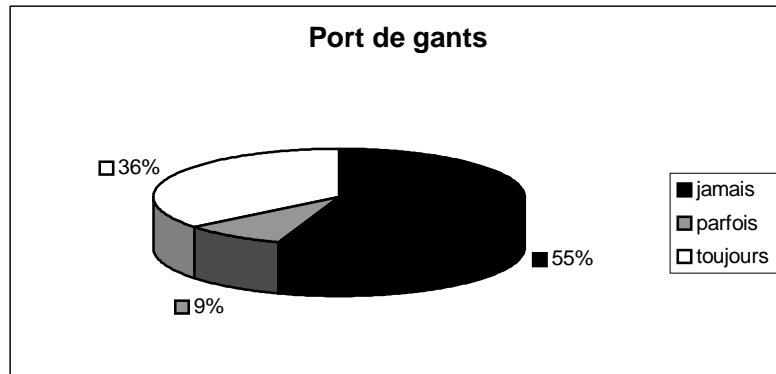


Figure 18: Port de gants par les gaveurs visités

II.10.4. Protection des visiteurs

Le meilleur moyen de protéger les individus extérieurs à la salle de gavage consiste à interdire l'accès de la salle aux visiteurs.

Nous observons au travers de ce relevé, que la grande majorité des salles ne reçoit que la visite occasionnelle du technicien. Cependant, 20% des salles sont visitées quotidiennement par au moins une personne autre que le gaveur et 17% le sont assez souvent par diverses relations du gaveur.

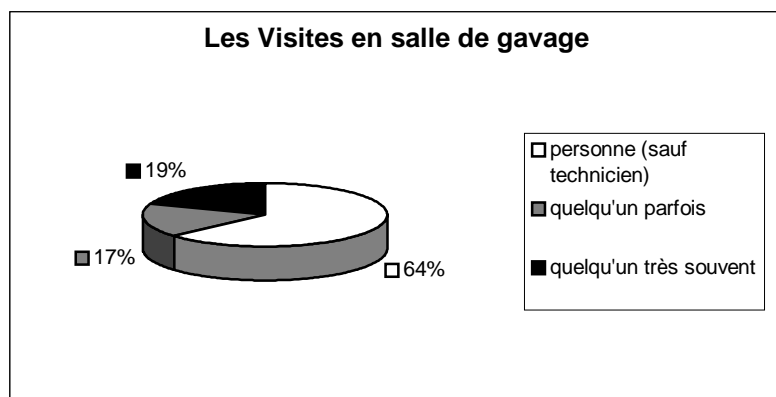


Figure 19 : Répartition des salles de gavage selon leur fréquentation

Dans cette partie, nous avons détaillé la mise au point d'une méthode de PCR quantitative pour la détection de *Chlamydomphila psittaci*. Sensible et spécifique, cet outil nous

a permis d'analyser un grand nombre de prélèvements issus de canards mulards en gavage. Nous avons ainsi pu obtenir la prévalence moyenne de cet agent de zoonose dans cette espèce, en France. De plus, grâce à cette méthode, nous avons pu définir des classes de portage de la bactérie et mettre en évidence le fait qu'il existe d'importantes variations en fonction des lots, des saisons et des organisations.

III. Discussion

Les objectifs de cette étude étaient (i) de mettre au point un protocole de PCR en temps réel permettant la détection du génome de *Chlamydomphila psittaci*, et (ii) d'évaluer le portage de cette bactérie chez le canard mulard en gavage. En parallèle, nous souhaitons profiter du contact avec les professionnels pour (iii) dresser un premier bilan des pratiques de protection.

Nous avons choisi d'analyser le portage de *Chlamydomphila psittaci* à l'aide d'une méthode de PCR quantitative en chimie SYBR[®] Green. Cette technique présente l'intérêt de s'affranchir des contraintes liées à la conservation et à l'état de viabilité de l'organisme recherché. Par ailleurs, elle présente une sensibilité très élevée et surtout permet de quantifier le nombre de génomes cibles dans un échantillon. Ceci est fondamental dans le cadre d'une étude visant à déterminer la prévalence de portage d'une bactérie zoonotique. En effet, il faut pouvoir différencier, parmi les contaminés, les animaux très faiblement porteurs des animaux fortement excréteurs, car ces deux populations ne présentent pas les mêmes risques en terme de santé publique.

Les autres techniques de détection existantes ne permettent pas de faire cette discrimination. Les protocoles basés sur la sérologie apportent une photographie qui ne fait pas la différence entre les infections passées avec persistance des anticorps et les infections nouvelles ou en cours (Evans *et al.*, 1983). De plus, leurs seuils de sensibilité et de spécificité sont variables. Il y a, par ailleurs, des inconnues sur les immunoglobulines de canards et sur leur capacité à fixer efficacement le complément (Higgins, 1996).

Les techniques basées sur l'isolement, outre le problème de biosécurité qu'elles posent pour les personnels de laboratoire, sont tributaires de la conservation du prélèvement qui, mal conduite, diminue la sensibilité de la détection de la bactérie (MacDonald *et al.*, 1998).

Enfin, des expérimentations ont déjà été menées avec la PCR quantitative sur *Chlamydomphila psittaci* (Huang *et al.*, 2001). Les résultats obtenus démontrent que la PCR quantitative en chimie SYBR[®] Green est tout à fait apte à remplacer les méthodes de culture cellulaire pour la détection et la quantification de *C. psittaci*. Cette méthode est par ailleurs 15 fois plus sensible que la culture cellulaire (Huang *et al.*, 2001).

A ce stade, même si la température de dissociation valide la spécificité de l'amplification, des vérifications seront nécessaires. Deux types de travaux doivent notamment être menés : (i) analyser des isolats d'autres espèces de *Chlamydomphila* (*pneumoniae*, *abortus*), pour évaluer la capacité d'amplification de ces génotypes par notre technique et (ii) séquencer quelques produits d'amplification, ou les analyser en RFLP pour préciser le ou les génotype(s) et sérotype(s) au(x)quel(s) nos isolats sont reliés (Sayada *et al.*, 1995 ; Van Loock *et al.*, 2003).

Les animaux ont été prélevés par écouvillonnage pour l'analyse par PCR. Deux sites ont été sélectionnés, et une prise de sang a été effectuée lors de la séquence d'avril en vue d'une analyse sérologique. En première intention, nous nous sommes limités à ces deux sites pour ne pas multiplier les prélèvements sur les animaux ainsi que les analyses au laboratoire. Nous désirions être rapide et répétable, ce qui excluait plus de deux manipulations par canard.

La détection de *C. psittaci* par PCR a été effectuée sur des écouvillons conjonctivaux et cloacaux car les matières virulentes sont principalement les fientes et les sécrétions oculonasales. De plus, ces prélèvements sont faciles à réaliser et très peu invasifs.

Bien que le cloaque reste longtemps porteur de *Chlamydomphila* et soit une des voies d'excrétion de cette bactérie dans le milieu extérieur, nous n'avons pas choisi de récupérer des fientes qui ne permettaient pas d'obtenir des informations individualisées et de qualité

suffisante. L'inconvénient de ce site de prélèvement, dans l'optique d'une analyse par PCR, est la présence fréquente d'inhibiteurs de la réaction dans les matières fécales.

D'autres sites étaient envisageables, comme la trachée, le pharynx ou les choanes (Andersen, 1996). En effet, la glande nasale latérale reste infectée longtemps et ses sécrétions rejoignent la cavité pharyngée. De même, les sécrétions pulmonaires sont expulsées en direction du pharynx. Ces considérations anatomiques et fonctionnelles nous font penser que les prélèvements trachéaux, choanaux ou pharyngés, peuvent constituer une alternative intéressante, méritant d'être évaluée.

Les prélèvements ont été menés sur un échantillon d'animaux réparti au sein de cinq organisations majeures de producteurs de foie gras du Sud-ouest, dont les canards sont issus de 18 couvoirs différents. Ce regroupement des producteurs au sein d'organisations peut créer des divergences de pratiques d'élevage et de prophylaxie, susceptibles d'influer sur le niveau de portage.

Cette collaboration a permis de diversifier l'origine des animaux, nécessaire pour nous affranchir des biais dus à l'origine des canetons et des canards Prêts à Gaver. Nous avons aussi pu espacer nos lieux de collecte. Cela permet d'obtenir une photographie moins cantonnée, au sens littéral, de la prévalence de *C. psittaci*.

Ensuite, dans chaque salle de gavage, nous avons prélevé "aléatoirement" des canards, à raison de 2 ou 3 par rangée, de façon à être représentatif des différentes conditions d'ambiance rencontrées dans la salle.

Par ailleurs, l'objet de notre étude étant d'évaluer le risque pour les gaveurs et les personnels d'abattoir, il était plus judicieux de réaliser nos prélèvements le plus tard possible, c'est-à-dire à partir de 7 jours de gavage. Précisons qu'un prélèvement à l'abattoir nous a paru irréaliste compte tenu des cadences d'abattage et des risques de contaminations croisées.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la saisonnalité du portage de *Chlamydochloa* par le canard. En effet, du fait de son élevage en extérieur, il est soumis aux aléas climatiques qui peuvent être corrélés à des variations du taux de portage. Nous avons donc réalisé trois sessions de prélèvements étalées sur une année.

Quels sont les résultats de cette étude ?

Les résultats démontrent tout d'abord que le portage est largement répandu. En effet, en moyenne $58\% \pm 3,4\%$ des oiseaux sont porteurs *sensu stricto* dont $19\% \pm 2,7\%$ sont « positifs quantifiables » et $39\% \pm 3,4\%$ sont « non quantifiables ». Seuls $42\% \pm 3,4\%$ sont véritablement négatifs. Parmi ces porteurs, rares sont les individus « HEC » qui ne représentent effectivement que $2\% \pm 1\%$ de l'échantillon, soit $11\% \pm 5\%$ des animaux positifs.

La moitié ($52\% \pm 13\%$) des lots de canards mulards en gavage comporte au moins un animal « positif quantifiable ». Il faut cependant considérer que la majorité des lots considérés négatifs compte des sujets « positifs non quantifiables ». En bilan, seuls 4 lots sur 58, soit $7\% \pm 6,5\%$ sont négatifs à 100%. Nous devons séparer ces lots positifs en trois classes :

- les lots faiblement positifs (<50% des sujets « positifs quantifiables »), qui représentent $40\% \pm 12,6\%$ de l'échantillon,
- les lots fortement positifs (>50% des sujets « positifs quantifiables »), qui représentent $12\% \pm 8,3\%$ de l'échantillon,
- les lots « HEC », qui représentent également $12\% \pm 8,3\%$ de l'échantillon.

En terme de risque de contamination humaine, ces deux derniers types de lots sont certainement les plus (les seuls ?) dangereux et représentent $24\% \pm 11\%$ des lots de l'échantillon.

L'effet saison est clairement suggéré par nos résultats. En effet, les taux de prévalence hivernaux sont 10 fois supérieurs au taux estival. Les animaux ayant été élevés sur des

parcours en hiver ou au printemps, comptent plus de portage global et plus de sujets « HEC ». Ce résultat illustre la difficulté particulière que représente la maîtrise sanitaire en élevage de plein air, tributaire des aléas climatiques mais aussi des contacts avec l'avifaune sauvage.

Enfin, les résultats montrent des différences importantes entre organisations. Si toutes ont entre 25 et 77% de lots positifs, le pourcentage de positivité des animaux est très variable. La supplémentation *semble* diminuer le portage global dans notre échantillon. Cet effet mériterait d'être spécifiquement évalué dans le cadre d'essais contrôlés. Ce n'est cependant sans doute pas la meilleure prévention contre *Chlamydophila psittaci* : en effet, le recours quasi systématique à une supplémentation antibiotique de 10 jours est difficilement envisageable dans le cadre de l'utilisation raisonnée des antibiotiques.

Peu d'études font état de la prévalence de *C. psittaci* chez le canard. Certaines établissent que plus de la moitié des sujets sont porteurs. Ainsi, Mousa *et al.*, 1996, annoncent que 69,23% (n=156) des canards testés sont positifs. Trap et Mahe, 1996, quant à eux, présentent des taux de 79,3% (n=29) pour les canetons et 89,3% (n=56) pour les canards analysés. Cependant, ces taux élevés sont obtenus d'après l'analyse d'échantillons d'animaux « cliniquement » suspects de chlamydie. Sur un échantillon d'individus « tout venant », c'est-à-dire dans des conditions à peu près comparables à celles de notre étude, 21% des anatidés testés (n=157) sont positifs, ce qui se rapproche de nos résultats, (Kaleta et Taday, 2003).

Certains événements d'élevage et de gavage peuvent être reliés à des variations du taux de prévalence de *Chlamydophila psittaci* en gavage. Par contre, il n'y a pas de relation entre le portage en gavage et le couvoir d'origine même si la transmission verticale est décrite par Wittenbrink *et al.*, 1993.

De fait, étant donnée l'importance du portage, regroupant les animaux « positifs quantifiables » et les « non quantifiables », deux hypothèses existent : soit l'élevage est le lieu de contamination majoritaire, par la faune sauvage, la résistance de la bactérie sur le parcours, ou d'autres modes de contamination, soit la contamination au couvoir est importante et les animaux arrivent déjà fortement contaminés en élevage.

En élevage, nous ne pourrions qu'avoir des suspicions face à un taux élevé de mortalité.

Nous avons également exploité l'observation de signes d'écoulements en gavage. La présence ou l'absence de signe n'est pas corrélée à une variation du portage. Or, la chlamydie est régulièrement décrite comme agent de conjonctivite (Andersen, Vanrompay, 2000). Deux hypothèses se présentent donc : soit les conjonctivites observées sont dues à d'autres agents, soit notre observation n'était pas de qualité suffisante.

La supplémentation en Oxytétracycline des lots en fin d'élevage est la pratique d'élevage qui modifie le plus le portage en gavage. En effet, la moyenne de portage des lots supplémentés est de 9% et tombe à 4% si l'on enlève un lot sensé avoir été supplémenté mais présentant 40% de mortalité en élevage et 100% de canards positifs.

En bilan, nous pouvons dire qu'il n'y a pas d'élément technique strictement associé à l'infection à *Chlamydophila psittaci*, sur lequel une suspicion puisse être fondée. Certaines pistes sont évocatrices, comme la mortalité en élevage, la saison et l'organisation de producteurs. Le plan de prophylaxie en fin d'élevage est notamment intéressant à consulter pour déceler si des supplémentations, en Oxytétracycline notamment, ont été effectuées.

Par ailleurs, il faudra tout de même prendre des précautions avant de conclure qu'une mortalité anormale est due à une psittacose du fait de la rareté des signes cliniques. L'isolement de la bactérie ne saurait non plus être décisif. Des erreurs de diagnostic ont ainsi été publiées à la suite d'une association trop rapide entre un isolement de *Chlamydophila psittaci* et une entité clinique (Andral *et al.*, 1989).

L'omniprésence de cette bactérie en élevage constitue un risque zoonotique important, contre lequel des mesures de préventions doivent être adoptées. En premier lieu, il convient de se souvenir de l'épidémiologie des contaminations humaines. La voie d'entrée principale de cette bactérie chez l'homme est respiratoire. Afin de se protéger des particules aéroportées, le port d'un masque et l'arrêt de la ventilation pendant le temps que dure le gavage, semblent être deux mesures efficaces.

Le masque est la meilleure des protections, mais est rarement porté car contraignant. En effet, la gêne physique occasionnée par ce système restreint son utilisation aux moments vraiment difficiles, tels que le début de bande, où l'ambiance est très poussiéreuse. Or, seuls les masques à filtre très sélectif sont efficaces mais ils exacerbent la sensation d'étouffement et sont onéreux.

L'arrêt de la ventilation à l'entrée en salle de gavage est rarement pratiquée car les gaveurs sont sensibilisés à l'importance de l'aération de la salle, nécessaire pour de meilleures performances. Or, le gavage dure souvent plus de quatre heures par jour. C'est une durée importante et un risque zootechnique qu'ils ne sont pas prêts à prendre, sauf lorsque les basses températures rendent le travail trop pénible.

En second lieu, la méfiance vis-à-vis des contacts avec les sécrétions oculo-nasales et les fientes est de mise. Il faut éviter de toucher ces matières puis de se frotter les muqueuses buccales et oculaires, portes d'entrées secondaires pour cette bactérie. Le port de gants pour la manutention des canards, des embucs et pour toutes les activités en salle, permet d'éviter le contact direct des matières virulentes avec la peau.

Enfin, la prévention passe par une diminution de l'exposition au risque pour les personnes ne travaillant pas directement avec ces animaux. Ainsi, il n'est pas nécessaire que des visiteurs pénètrent dans la salle, compte tenu du risque induit par une exposition, même de courte durée, aux particules aérosolisées issues de l'élevage. Il faut en particulier éviter les visites inopinées des enfants et des personnes âgées ou malades.

Au final, il est surtout important d'informer les personnels de la filière avicole sur les risques encourus au contact des animaux, notamment pour ceux travaillant avec des canards, qui sont, rappelons le, responsables de la majorité des cas humains de psittacose (Abadia, 2003).

Les techniques de détection de *Chlamydophila psittaci* ont considérablement évolué. Cette évolution s'accompagne d'une élévation de la sensibilité et de la spécificité des différents tests employés. Si nous savons maintenant que l'utilisation de la PCR est performante pour le diagnostic chez l'animal, nous n'avons pas de recul de l'utilisation de cette technique chez l'homme. D'ailleurs, selon Salisch *et al.*, 1996, les principales publications abordant des épisodes humains de psittacose n'ont pas pris en considération le fait que l'infection puisse être due à d'autres espèces de *Chlamydophila*, notamment *C. pneumoniae*. La PCR permettra-t-elle de faire précisément cette distinction chez l'homme ?

Notre analyse apporte un éclairage sur l'importance du portage asymptomatique de *C. psittaci* en gavage. Nous avons déterminé le niveau de portage de cette espèce. Cependant, des études sont à réaliser pour caractériser le type de souche. Il existe, en effet, différents isolats qui sont plus ou moins inféodés à une espèce animale préférentielle. Or, nous ne savons pas si, parmi nos prélèvements, nous sommes en présence d'un génotype ou de plusieurs, se partageant la niche « canard mulard ». Vanrompay *et al.*, 1993, ont réalisé quelques études de typage de souches et ont montré que, chez les Ansériformes, le sérovar C est principalement retrouvé. Cependant, seuls 3 sujets furent testés. La quantité importante de prélèvements collectés pour notre étude, couplée à un typage basé sur une technique PCR, offrira une information plus complète sur les souches de *C. psittaci* infectant le canard. Il faut

préciser que l'utilisation de profils de restriction sur des produits de PCR pour la différenciation des sérovars a été validée par Sayada *et al.*, 1995, et présente une stricte corrélation entre les classifications sérologiques et la cartographie de restriction.

Il restera ensuite à étudier la relation entre les génotypes et le pouvoir pathogène chez l'oiseau et surtout, chez l'homme.

Conclusion

La PCR quantitative, sur écouvillons conjonctivaux, est une technique d'analyse qui permet de quantifier le portage de *C. psittaci* et de classer les animaux selon le risque pour l'homme. D'après nos résultats, l'infection est véritablement endémique. Le nombre de canards testés et les contraintes respectées pour la définition de l'échantillon permettent de considérer cette étude comme l'une des plus ambitieuses réalisées jusqu'à lors, toutes espèces aviaires confondues.

Malgré cela, nous n'avons pu mettre en évidence des facteurs de risque en élevage et gavage. Seule la supplémentation en Oxytétracycline en fin d'élevage est véritablement liée à une diminution du portage en gavage.

Il serait sans doute intéressant de typer les isolats de *C. psittaci*, afin de vérifier s'il existe une spécificité d'hôte. De même, l'évaluation de la transmission verticale et du statut du caneton, ainsi qu'un suivi longitudinal de bandes d'élevage, sont des points qui doivent être éclaircis afin de décrypter l'évolution de la contamination. Ces axes font actuellement l'objet de travaux à L'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Parallèlement, nous avons mis en exergue le fait que la protection des personnels de la filière avicole contre cette zoonose est faible. Bien que de nombreux épisodes de contamination humaine soient recensés, peu de gaveurs se protègent convenablement. Un début de prise de conscience semble néanmoins apparaître depuis quelques années. Malgré cela, les techniques de détection actuelles, chez l'homme, sont trop souvent ciblées sur le genre bactérien et dérivent principalement de la recherche de *C. trachomatis*. L'extension de l'utilisation de la PCR quantitative pourra, à terme, améliorer le diagnostic de psittacose. Il est donc urgent de développer cette méthode pour l'Homme.

Cette problématique devrait profiter d'une collaboration active entre le monde médical et vétérinaire. Nous espérons pouvoir contribuer par cette étude au rapprochement entre nos deux médecines.

Références Bibliographiques

- 1. ABADIA G.**
Psittacose et secteur avicole. Etude sérologique en Bretagne et Pays de Loire.
XXX^{ème} symposium national de médecine agricole, « L'actualité des zoonoses »
Tours, Vendredi 25 Avril 2003
- 2. ABADIA G., N'DIAYE P.S., MASSON P., LAURENS E., DELEMOTTE B.,
CHOUTET P.**
Les chlamydioses d'origine aviaire – Maladies professionnelles.
Med. Mal. Infect ; **31** suppl 2 : 226-232, 2001
- 3. ALAIN S., COLLOT S., DENIS F., RANGER-ROGEZ S.**
Quantification par PCR en Temps Réel, Technologie TaqMan et Applications en
Virologie.
Virologie, **5** : 439-448, 2001
- 4. ALEXANDER D.J., CONZO G., KALETA E., MAGNINO S., SACHSE K.,
VANROMPAY D.**
Avian chlamydiosis as a zoonotic disease and risk reduction strategies.
Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, 16
April 2002.
- 5. ANDERSEN A.A.**
Comparison of pharyngeal, fecal and cloacal samples for the isolation of
Chlamydia psittaci from experimentally infected cockatiels and turkeys.
J. Vet. Diagn. Invest., **8** : 448-450, 1996
- 6. ANDERSEN A.A., GRIMES J.E., WYRICK P.B**
Chlamydiosis (Psittacosis, Ornithosis).
In: Diseases of Poultry, 10th Edit.
Ames : Mosby-Wolfe, 333-349, 1997
- 7. ANDERSEN A.A., VANROMPAY D.**
Avian chlamydiosis.
Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., **19** : 396-404, 2000
- 8. ANDERSEN A.A., VANROMPAY D.**
Avian chlamydiosis.
In: Diseases of Poultry, 11th Edit. : 863-879, 2003
- 9. ANDRAL B., LOUZIS C., GOURREAU J.M.**
Incidence de la chlamydiose sur la pathologie des volailles en France (dindes,
pintades, poulets et canards gras).
Le Point Vétérinaire, **21** (122) : 90-94, juin-juillet 1989

10. **ANDRE J.P.**
Chlamydiose (psittacose-ornithose).
In : Les maladies des oiseaux de cages et de volières. Edition du Point Vétérinaire, Maisons-Alfort : 224-232, 1990

11. **ANDRE J.P.**
La chlamydiose aviaire à *Chlamydia psittaci* chez les oiseaux de cage : revue bibliographique.
Rev. Med. Vet., **145** (12) : 915-929, 1994

12. **ARZEY G.G., ARZEY K.E., REECE R.L.**
Chlamydiosis in commercial ducks.
Aust. Vet. J., **67** (9), September 1990

13. **BEDSON S.P.**
Virus disease acquired from animal.
Lancet, **ii** : 577-579, 1940

14. **BEDSON S.P., BLAND J.O.W.**
A morphological study of psittacosis virus, with the description of a developmental cycle.
Brit. J. Exp. Pathol., **13** : 461-466, 1932

15. **BERCHE P., GAILLARD J.-L., SIMONET M.**
Bactériologie ; Bactéries des infections humaines.
In : Collection 'De la biologie à la clinique', Médecine-Sciences, Flammarion, 660p : p 501, 1988

16. **BRUMPT E.**
Rickettsia intracellulaire stomacale (*Rickettsia culicis* N. sp.) de *Culex fatigans*.
Ann. Parasitol. Hum. Comp., **16** : 153-158, 1938

17. **BRUU A.-L., HAUKENES G., AASEN S., GRAYSTON J.T., WANG S.P., KLAUSEN O.G., MYRMEL H., HASSELTVELDT V.**
Chlamydia pneumoniae infections in Norway 1981-87 earlier diagnosed as ornithosis.
Scand. J. Infect. Dis., **23** : 299-304, 1991

18. **BYROM N.P., WALLS J., MAIR H.J.**
Fulminant psittacosis.
Lancet **i** : 353-356, 1979

19. **CAUL E.O., SILLIS M.**
Chlamydiosis.
In: Zoonoses : Biology, Clinical Practice and Public Health Control. Oxford University Press, Oxford : 53-65, 1998

20. **CHALMERS W.S.K.**
Incidence of chlamydial antibodies in commercial duck flocks.
Vet. Rec., **115** : 651-652, 1984

21. **CHALMERS W.S.K., FARMER H., WOOLCOCK P.R.**
Duck hepatitis virus and *Chlamydia psittaci* outbreak.
Vet.Rec., **116** (8) : 223, 1985

22. **COLLOT S., ALAIN S., DENIS F., RANGER-ROGEZ S.**
Quantification par PCR en temps réel, technologie TaqMan et applications en virologie.
Virologie, **5** (6) : 439-448, 2001

23. **COX R.L., KUO C.-C., GRAYSTON J.T., CAMPBELL L.A.**
Deoxyribonucleic acid relatedness of *Chlamydia* sp. Strain TWAR to *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci*.
Int. J. Syst. Bacteriol., **38** : 265-268, 1988

24. **CROSSE B.A.**
Psittacosis : a clinical review.
J. Infect., **21** : 251-259, 1990

25. **DORRESTEIN G.M., VAN BUUREN C.**
Psittacosis in birds and man.
Second European Symposium on Avian Medicine and Surgery-Utrecht-Dutch Association Of Avian Veterinarians. : 167-175, 1986

26. **DUBOIS P. J., LE MARECHAL P., OLIOSSO G., YESOU P.**
Inventaire des oiseaux de France (Avifaune de la France métropolitaine).
Paris : Ed. NATHAN/Muséum national d'histoire naturelle, 397p., 1992

27. **DURAND M.P., LIMOUZIN C., SCHRICKE E., DAYON J.F.**
Contribution de la méthode ELISA au diagnostic sérologique de la chlamydie aviaire.
Bull. Acad. Vét. de France, **56** : 355-364, 1983

28. **EECKHOUT E., BUYDENS P., VERBRUGGEN L.**
Reactive arthritis and erythema multiforme following ornithosis.
Clin. Rheumatol., **6** : 301-302, 1987

29. **EVANS R.T., CHALMERS W.S.K., WOOLCOCK P.R., FARMER H., TAYLOR-ROBINSON D.**
An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of chlamydial antibody in duck sera.
Avian Pathol., **12** : 117-124, 1983

30. **EVERETT K.D.E., ANDERSEN A.A.**
Identification of nine species of the *Chlamydiaceae* using PCR-RFLP.
Int. J. Syst. Bacteriol., **49** : 803-813, 1999

31. **FARMER H., CHALMERS W.S.K., WOOLCOCK P.R.**
Chlamydia psittaci isolated from the eyes of domestic ducks (*Anas platyrhynchos*) with conjunctivitis and rhinitis.
Vet. Rec. **110** : 59, January 1982

- 32. FEZIA G., LAUZI S., PISA F.P.**
Chlamydia psittaci in Tacchini : Ricerca antigenica da tamponi cloacali.
 Selezione Veterinaria, Agosto-Settembre 1999
- 33. FILSTEIN M.R., LEY A.B., VERNON S.V., GAFFNEY K.A., GLICKMAN L.T.**
 Epidemic of Psittacosis in a College of Veterinary Medicine.
 J. Am. Vet. Med. Assoc., **179** (6) : 569-572, 1981
- 34. FLAMMER K.**
 Treatment of chlamydiosis in exotic birds in the United States.
 J. Am. Vet. Med. Assoc., **195** : 1537-1540, 1989
- 35. FUDGE A.M.**
 Update on chlamydiosis.
 Vet. Clin. North. Am. : Small Animal Practice, **14** : 201-221, 1984
- 36. FUDGE A.M.**
 Clinical observations with avian chlamydial infection.
 Proc. Assoc. Avian Vet. : 48-55, 1992
- 37. FUKUSHI H., HIRAI K.**
 Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants.
 Int. J. Syst. Bacteriol., **42** : 306-308, 1992.
- 38. FUKUSHI H., HIRAI K.**
Chlamydia pecorum- the fourth species of genus *Chlamydia*.
 Microbiol. Immunol., **37** : 516-522, 1993
- 39. GLYN HEWISON R., GRIFFITHS P.C., BEVAN B.J., KIRWAN S.E.S., FIELD M.E., WOODWARD M.J., DAWSON M.**
 Detection of *Chlamydia psittaci* DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction.
 Vet. Microbiol., **54** : 155-166, 1997
- 40. GOSBELL I.B., ROSS A.D., TURNER I.B.**
Chlamydia psittaci infection and reinfection in a veterinarian.
 Aust. Vet. J., **8** : 511-513, august 1999
- 41. GREGG M.B., WEHRLE P.F.**
 Psittacosis.
 Commun. Infect. Dis., **7th** : 495-499, 1972
- 42. GRIMES J.E.**
Chlamydia psittaci latex agglutination antigen for rapid detection of antibody activity in avian sera : comparison with direct complement fixation and isolation results.
 Avian Dis., **29** : 873-877, 1985a

- 43. GRIMES J.E.**
Enigmatic psittacine chlamydiosis : results of serotesting and isolation attempts, 1978 through 1963, and considerations for the future.
J. Am. Vet. Med. Assoc., **186** : 1075-1078, 1985b
- 44. GYLSTORFF I.**
The treatment of chlamydiosis in psittacine birds.
Isr. J. Vet. Med., **43** : 11-19, 1984
- 45. HERMANN B., PETERSSON B., EVERETT K.D.E., MIKKELSEN N.E., KIRSEBOM L.A.**
Characterisation of the *rnp B* gene and Rnase PRNA in the order *Chlamydiales*.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **50** : 149-158, 2000
- 46. HIGGINS, D.A.**
Comparative immunology of avian species.
In Poultry Immunology. Davidon, T.F., Morris, T.R., and Payne, L.N. (eds).
Carfax, Abingdon : pp. 149-205, 1996
- 47. HINES M.P., PAGE P.M., HIRSCHBERG N., MADDRY L.G.**
Ornithosis and leptospirosis survey of a chicken and turkey processing plant and textile mill in North Carolina.
Vet. Med., **52** : 337-338, 356, 1957
- 48. HUANG J., DEGRAVES F.J., GAO D., FENG P., SCHLAPP T., KALTENBOECK B.**
Quantitative Detection of *Chlamydia* spp. by Fluorescent PCR in the LightCycler.
Res. Rep., **30** : 150-157, 2001
- 49. JOHNSON F.W.A., SPENCER W.H.**
Multiantibiotic resistance in *Chlamydia psittaci* from ducks.
Vet. Rec., **208** : February 1983
- 50. KALETA E.F., TADAY E.M.A.**
Avian host range of *Chlamydophila* spp. Based on isolation, antigen detection and serology.
Avian Pathol., **32** (5) : 435-462, 2003
- 51. KEMPF I., TRAP D., MAHE A.M., HAFEZ M., KERMORGANT P., COLIN P.**
La Chlamydie de la dinde en Bretagne : quelques résultats sérologiques.
Sci. Tech. Avicoles, n°**33** : octobre 2000
- 52. KEWITSCH A., BERDEAU W.**
Serologische Untersuchungen mit der Komplementbindungsreaktion auf Ornithose in einem ländlichen Gebiet.
Archiv. Exp. Veterinärmed., **19** : 572-575, 1965

- 53. LEVADITI J.C., ROGER F., DESTOMBES P.**
Tentative de classification des *Chlamydiaceae* (Rake, 1955) tenant compte de leurs affinités tissulaires et de leur épidémiologie.
Ann. Inst. Pasteur, **107** : 656-662, 1964
- 54. LONGBOTTOM D., COULTER L.J.**
Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications.
J. Comp. Path., **128** : 217-244, 2003
- 55. LOUZIS C.**
L'ornithose psittacose ou chlamydie aviaire.
In : BRUGERE-PICOUX, J. ; SILIM, A.
Manuel de Pathologie Aviaire
Maisons Alfort : 199-203, 1992
- 56. MACDONALD M., WILLET B.J., JARRETT O., ADDIE D.D.**
A comparison of DNA amplification, isolation and serology for the detection of *Chlamydia psittaci* infection in cats.
Vet. Rec., **143** : 97-101, 1998
- 57. MAEGAWA N., EMOTO T., MORI H., YAMAGUCHI D., FUGINAGA T., TEZUKA N., SAKAI N., OHTSUKA N., FUKUSE T.**
Two cases of *Chlamydia psittaci* infection occurring in employees of the same pet shop.
Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi, **39** (10) : 753-757, 2001
- 58. MC ELNEA C.L., CROSS G.M.**
Methods of detection of *Chlamydia psittaci* in domesticated and wild birds.
Aust. Vet. J., **77** (8), August 1999
- 59. MEYER K.F., EDDIE B.**
Human carrier of the psittacosis virus.
J. Infect. Dis., **88** : 109-125, 1951
- 60. MILON A., GERAL M.F., PELLERIN J.L., THIESE I., LAUTIE R.**
Enquête sur le portage et l'excrétion de *Chlamydia psittaci* par les pigeons semi-domestiques (*Columba livia*) de l'agglomération Toulousaine.
Rev. Méd. Vét., **134** (10) : 559-565, 1983
- 61. MOUSA H.A.A., EL MONLA A.A., REDA W.W., AHMED M.H.H.**
Detection of Chlamydiosis in Domestic Ducks in Giza Governorate, Egypt.
Vet. Med. J., Giza, **44** (1) : 37-40, 1996
- 62. MORANGE A.**
De la psittacose ou infection spéciale déterminée par des perruches.
Thèse, Académie de Paris, Paris, France, 1895

- 63. OLSON B.J., TREUTING W.L.**
An epidemic of a severe pneumonitis in the Bayou Region of Louisiana. IV. A preliminary note on etiology.
Public Health Rep., **59** : 1299-1311, 1944
- 64. PAGE L.A.**
Revision of the family *Chlamydiaceae* Rake (*Rickettsiales*) : unification of the psittacosis-lymphogranuloma venereum-trachoma group of organisms in the genus *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns, 1945.
Int. J. Syst. Bact., **16** : 223-252, 1966
- 65. PAGE L.A.**
Experimental ornithosis in turkeys.
Avian Dis., **3** : 51-66, 1959
- 66. PAGE L.A.**
Proposal for the recognition of two species in the genus *Chlamydia*.
Int. J. Syst. Bact., **18** : 51-66, 1968
- 67. PAGE L.A.**
Studies on immunity to chlamydiosis in birds with particular reference to turkeys.
Am. J. Vet. Res., **36** : 597-600, 1975
- 68. PAGE L.A.**
Stimulation of cell-mediated immunity to chlamydiosis in turkeys by inoculation of chlamydial bacterin.
Am. J. Vet. Res., **39** : 473-480, 1978
- 69. PAGE L.A.**
Avian chlamydiosis (ornithosis).
In : Diseases of Poultry, **7th Edit.**
Ames : Mosby-Wolfe, 337-366, 1978b
- 70. PAGE L.A., DERIEUX W.T., CUTLIP R.C.**
An epornitic of fatal chlamydiosis (ornithosis) in South Carolina turkeys.
J. Am. Vet. Med. Assoc., **166** : 175-178, 1975
- 71. PEARSON J.E.**
Isolation and identification of *Chlamydia psittaci* from pet birds.
Reports from the Symposium on Avian Chlamydiosis
J. Am. Vet. Med. Assoc., **195** : 1564-1567, 1989
- 72. PEREZ-MARTINEZ J.A., STORZ J.**
Antigenic diversity of *Chlamydia psittaci* of mammalian origin determined by microimmunofluorescence.
Infect. Immun., **50** : 905-910, 1985

- 73. PERSSON K., TREHARNE J.**
 Diagnosis of infection caused by *Chlamydia pneumoniae* (strain TWAR) in patients with 'ornithosis' in Southern Sweden 1981-1987.
 Scand. J. Infect. Dis., **21** : 675-679, 1989
- 74. POTTER M.E., KAUFMANN A.F.**
 Psittacosis in humans in the United States, 1975-1977.
 J. Infect. Dis., **140** : 131-134, 1979
- 75. RODOLAKIS A.**
 Les infections à *Chlamydia psittaci* : acquisitions récentes et applications au diagnostic et à l'épidémiologie des chlamydioses aviaires, canines et félines.
 Prat. Méd. Chir. Anim. Comp., **28** : 321-330, 1993
- 76. SALISCH H., VON MALOTTKI K., RYLL M., HINZ K.-H.**
 Chlamydial infections of poultry and human health.
 Worlds Poult. Sci. J., **52** : 279-308, 1996
- 77. SAYADA C., ANDERSEN A.A., STOREY C., MILON A., EB F., HASHIMOTO N., HIRAI K., ELION J., DENAMUR E.**
 Usefulness of *omp1* restriction mapping for avian *Chlamydia psittaci* isolate differentiation.
 Res. Microbiol., **146** : 155-165, 1995
- 78. SCHACHTER J.**
 Chlamydial infections-past, present, future.
 Reports from the Symposium on Avian Chlamydiosis
 J. Am. Vet. Med. Assoc., **195** : 1501-1505, 1989
- 79. SCHAFFNER W., DRUTZ D.J., DUNCAN G.W., KOENIG M.G.**
 The clinical spectrum of endemic psittacosis.
 Arch. Intern. Med., **119** : 433-443, 1967
- 80. SCHLOSSBERG D.**
Chlamydia psittaci (psittacosis).
 In : Mandell, Douglá and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases,
5th Ed.: p 2004-2006, 2000
- 81. ŠERÝ V., STRAUSS J., FANTOVÁ Z., MAZEL J. VODRÁČEK V.**
 Immunological survey of ornithosis in the population of the Czech region.
 J. Hyg., **5** : 439-443, 1961
- 82. SHEWEN P.E.**
 Chlamydial infection in animals : a review.
 Can. Vet. J., **21** : 2-11, 1980

- 83. SPENCER W.N., JOHNSON F.W.A.**
Simple transport medium for the isolation of *Chlamydia psittaci* from clinical material.
Vet. Rec., **113** : 535-536, 1983
- 84. DE SAINT AUBERT G., FAYET M.T., VALETTE L.**
Microméthode de fixation du complément pour le diagnostic des chlamydioses ovines et applications pratiques.
Rev. Med. Vet., **126** (6) : 787-800, 1975
- 85. ST. J. NEWMAN C.P., PALMER S.R., KIRBY F.D., CAUL E.O.**
A prolonged outbreak of ornithosis in duck processors.
Epidemiol. Infect., **108** : 203-210, 1992
- 86. TAKAHASHI T., TAKASHIMA I, HASHIMOTO N.**
Shedding and transmission of *Chlamydia psittaci* in experimentally infected chickens.
Avian Dis., **32** : 650-658, 1988
- 87. TAPPE J.P., ANDERSEN A.A., CHEVILLE N.F.**
Respiratory and Pericardial Lesions in Turkeys Infected with Avian or Mammalian Strains of *Chlamydia psittaci*.
Vet. Pathol., **26** : 386-395, 1989
- 88. TRAP D., GAUMONT R.**
Méthode modifiée de fixation du complément pour le diagnostic sérologique de l'ornithose chez les oiseaux.
Bull. Lab. Vet., **12** : décembre 1983
- 89. TRAP D., MAHE A.M.**
La Chlamydie aviaire en France, de 1992 à 1995 chez 701 oiseaux appartenant à différents ordres.
Rev. Méd. Vét., **147** (7) : 519-524, 1996
- 90. TRAP D., MAHE A.M., VANDEVELDE J.**
Dépistage de *Chlamydia psittaci* chez les oiseaux. Comparaison du test clearview Chlamydia, de l'immunofluorescence et de l'inoculation aux œufs embryonnés.
Rev. Méd. Vét., **145** (4) : 261-266, 1994
- 91. TULLY T.N., SHANE S.M., GRIMES J.E., POSTON P.P., KEARNEY M.T.**
Comparison of procedures to detect *Chlamydia psittaci* antibodies in cockatiels (*Nymphus hollandicus*).
Avian Dis., **40** : 266-271, 1996
- 92. VAN LOOCK M., VANROMPAY D., HERRMANN B., VANDER STAPPEN J., VOLCKAERT G., GODDEERIS B.M., EVERETT D.E.**
Missing links in the divergence of *Chlamydophila abortus* from *Chlamydophila psittaci*.
Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol., **53** : 761-770, 2003

- 93. VANROMPAY D., ANDERSEN A.A., DUCATELLE R., HAESEBROUCK F.**
Serotyping of European Isolates of *Chlamydophila psittaci* from poultry and other birds.
J. Clin. Microbiol., **31** (1) : 134-137, Jan 1993
- 94. VANROMPAY D., BUTAYE P., VAN NEROM A., DUCATELLE R., HAESEBROUCK F.**
The prevalence of *Chlamydia psittaci* infections in Belgian commercial turkey poult.
Vet. Microbiol., **54** : 85-93, 1997
- 95. VANROMPAY D., COX E., MAST J., GODDEERIS B., VOLCKAERT G.**
High-level expression of *Chlamydia psittaci* major outer membran protein in COS cells and in skeletal muscles of turkeys.
Infect. Immun., **66** : 5494-5500, 1998
- 96. VANROMPAY D., COX E., VANDENBUSSCHE F., VOLCKAERT G., GODDEERIS B.**
Protection of turkeys against *Chlamydia psittaci* challenge by gene gun-based DNA immunizations.
Vaccine, **17** : 2628-2635, 1999a
- 97. VANROMPAY D., COX E., VOLCKAERT G., GODDEERIS B.**
Turkeys are protected from infection with *Chlamydia psittaci* by plasmid DAN vaccination against the major outer membran protein.
Clin. Exp. Immunol., **118** : 49-55, 1999b
- 98. VANROMPAY D., DUCATELLE R., HAESEBROUCK F.**
Chlamydia psittaci infections : a review with emphasis on avian chlamydiosis.
Vet. Microb., **45** (2-3) : 93-119, 1995
- 99. VUILLAUME A., TOURNUT J.**
Une nouvelle technique de prélèvement de sang chez les palmipèdes et les autres volailles.
Bull. Group. Tech. Vét., **4** : 83-87, 1982
- 100. WANG S.P., GRAYSTON J.T.**
Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test.
Am. J. of Ophtalmol., **70** : 367-374, 1970
- 101. WILLIAMS L.P. JR.**
Review of the epidemiology of chlamydiosis in the United States.
Reports from the Symposium on Avian Chlamydiosis
J. Am. Vet. Med. Assoc., **195** : 1518-1521, 1989
- 102. WILSMORE A.J., DAVIDSON I.**
Clearview rapid test compared with other methods to diagnose chlamydial infection.
Vet. Rec., **128** : 503-504, 1991

103. WITTENBRINK M.M., MROZEK M., BISPING W.

Isolation of *Chlamydia psittaci* from a chicken egg : Evidence of egg transmission.
J. Vet. Med., **B 40** : 451-452, 1993

104. WYRICK P.B., RICHMOND S.J.

Biology of *chlamydiae*.
Reports from the Symposium on Avian Chlamydiosis
J. Am. Vet. Med. Assoc., **195** : 1507-1511, 1989

Annexes



FICHE D'ACCOMPAGNEMENT DES PRELEVEMENTS

CODE DU LOT :

DATE : / Avril 2002

ORGANISATION :

IDENTIFICATION GAVEUR :

Nom :

Adresse :

IDENTIFICATION DU LOT EN GAVAGE :

Date d'entrée en gavage :

Nom et coordonnées éleveur PAG :

Date de mise en place en élevage :

Couvoir :

CARACTERISTIQUES DE LA SALLE DE GAVAGE :

Logement : Volume de la salle : L : x l : x h :

Nombre de places :

Cages individuelles

Parcs collectifs

Ventilation :

Cooling

Brumisateurs

Brasseurs

Extracteurs

Marque :

.....

Gaines de ventilation

Capacité d'extraction :

MODE D'ALIMENTATION :

Grain
Hydraulique

APPRECIATION SANITAIRE DES CANARDS :

Mortalité enregistrée en première semaine :

Signes respiratoires : Toux Eternuements Ecoulements

Signes digestifs :

Traitements éventuels :

Observations :

INTERVENANTS EN SALLE DE GAVAGE :

Gaveur(s) :

Extérieur(s) : - Qualité :

- Fréquence :

PORT DE GANTS : Toujours Souvent Parfois Jamais

PORT DE MASQUE : Toujours Souvent Parfois Jamais

Si oui, préciser le type/marque :

ARRET DE LA VENTILATION A L'ENTREE EN SALLE DE GAVAGE : OUI / NON

REALISATION ET SUIVI DES PRELEVEMENTS : REMARQUES

Prises de sang :

Ecouillons conjonctivaux :

Ecouillons cloacaux :

Heure du prélèvement :

Heure du conditionnement en milieu de conservation à 4°C :

Jour-heure de la congélation des milieux SPG :

Jour-heure de la congélation des sérums :

RAPPEL : DOCUMENTS A JOINDRE (à l'intention de Jean-Luc Guérin, ENVT) :

- Fiche d'élevage

- Fiche de gavage

- Résultats techniques d'abattoir.

Détermination du seuil de positivité d'après les calculs des faux positifs et faux négatifs.

Nous avons fixé X et la limite x à 100 car notre mélange réactionnel contenait théoriquement 100 copies du gène. En Y, nous avons reporté les valeurs obtenues par la PCR. La limite Y est le seuil que nous avons fait varier afin de calculer les faux positifs et faux négatifs, point par point.

Nous observons une chute brutale du nombre de faux positifs entre 50 et 60 copies, puis leur absence à partir de 90 copies. Nous commençons à apercevoir des faux négatifs quand nous atteignons un seuil de 120 copies.

X prédit	Y	lim x	lim y	<limx, >limy	% faux +	>limx, <limy	% faux -
100	38,67	100	10	8	72,73%	0	0
	74,43		20	8	72,73%	0	0
	113,65		30	8	72,73%	0	0
	59,86		40	6	54,55%	0	0
	184,52		50	6	54,55%	0	0
	53,61		60	2	18,18%	0	0
	185,9		70	2	18,18%	0	0
	39,95		80	1	9,09%	0	0
	57,82		90	0	0	0	0
	55,65		100	0	0	0	0
	86,37		110	0	0	0	0
			120	0	0	1	9,09%
			130	0	0	1	9,09%
			140	0	0	1	9,09%
			150	0	0	1	9,09%
			160	0	0	1	9,09%
			170	0	0	1	9,09%
			180	0	0	1	9,09%
			190	0	0	3	27,27%
			200	0	0	3	27,27%

Détermination du seuil « HEC » d'après les calculs des faux positifs et faux négatifs.

Ici, X prédict et la limite x sont fixés à 10000, pour les mêmes raisons qu'au tableau 1. Le seuil choisi est ici de 8000 et nous avons une plage étendue de seuils possibles avant de risquer une fausse négativité.

X prédict	Y	lim x	lim y	<limx, >limy	% faux +	>limx, <limy	% faux -
10000	18029	10000	1000	1	8,33%	0	0
	23872		2000	1	8,33%	0	0
	33535		3000	1	8,33%	0	0
	25990		4000	1	8,33%	0	0
	6875		5000	1	8,33%	0	0
	33665		6000	1	8,33%	0	0
	22369		7000	0	0	0	0
	49507		8000	0	0	0	0
	17438		9000	0	0	0	0
	22726		10000	0	0	0	0
	28714		11000	0	0	0	0
	46475		12000	0	0	0	0
			13000	0	0	0	0
			14000	0	0	0	0
			15000	0	0	0	0
			16000	0	0	0	0
			17000	0	0	0	0
			18000	0	0	1	8,33%
			19000	0	0	2	16,67%
			20000	0	0	2	16,67%