

Risques sanitaires liés à la présence du virus *Influenza* aviaire dans les eaux

Virus *Influenza* aviaires hautement pathogènes de sous-type H5N1 : stratégies d'échantillonnage dans les milieux aquatiques

- Avis de l'Afsset
- Rapport d'expertise collective



Le Directeur général

Maisons-Alfort, le 18 mars 2009

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

Relatif à la saisine « *Virus Influenza* aviaries hautement pathogènes de sous-type H5N1 : stratégies d'échantillonnage dans les milieux aquatiques »

Avenant à la saisine n° 2005/011

L'Afsset a pour mission de contribuer à assurer la sécurité sanitaire, en évaluant les risques sanitaires dans le domaine de l'environnement et du travail. L'Agence fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques, ainsi que l'expertise et l'appui technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque.

Présentation de la question posée

L'Afsset a été chargée le 5 juillet 2007 par le Délégué interministériel en charge de la lutte contre la grippe aviaire (DILGA) de définir une stratégie d'échantillonnage, de prélèvements et d'analyses pour détecter les virus *Influenza* aviaries hautement pathogènes (VIAHP) dans les eaux de surface, les eaux usées et les supports solides en relation avec ces milieux.

Contexte

Le 31 octobre 2005, le DILGA a saisi l'Afsset afin d'évaluer les risques sanitaires pour la population générale et les travailleurs, liés à la présence du VIAHP dans les effluents aqueux et les eaux superficielles. L'Afsset a remis ses conclusions dans un rapport rendu public le 8 février 2007 (« Risques sanitaires liés à la présence de virus *Influenza* dans les eaux »). L'une des recommandations concernait « le renforcement de la collecte et la diffusion de données relatives à la contamination de l'eau dans les zones du territoire français où des oiseaux sauvages seraient retrouvés morts ».

A la suite de la découverte de cygnes morts, contaminés par le VIAHP de sous-type H5N1 dans deux étangs du département de la Moselle en juillet 2007, le DILGA a saisi l'Afsset en urgence pour lui demander d'élaborer un protocole de prélèvements et d'analyses adapté à la recherche de ces virus dans les milieux aquatiques. L'Afsset a adressé au DILGA le 5 juillet 2007 une note méthodologique, laquelle a été immédiatement exploitée par l'Institut Pasteur de Lille pour réaliser les prélèvements et les analyses d'eau sur le lieu de

découverte des oiseaux morts. A la réception de cette note, le DILGA a sollicité de nouveau l'Afsset, par courrier électronique en date du 5 juillet 2007, pour lui demander d'approfondir ses travaux et proposer un protocole plus complet.

Organisation de l'expertise

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (mai 2003) » avec pour objectif le respect des points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.

L'Afsset a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Évaluation des risques liés aux eaux et agents biologiques » l'instruction de cette saisine. Ce dernier a mandaté le groupe de travail « Virus *Influenza* aviaires hautement pathogènes : stratégies d'échantillonnage » pour la réalisation des travaux d'expertise.

Les travaux du groupe d'experts ont été soumis régulièrement au CES, tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Le groupe de travail s'est réuni à 5 reprises entre 2007 et 2008 et a présenté ses résultats devant le CES lors des séances du 7 avril 2008, du 1^{er} septembre 2008 et du 6 octobre 2008. Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

Le présent avis se base, pour les aspects scientifiques, sur le rapport final issu de cette expertise collective, adopté par le CES lors de sa séance du 3 novembre 2008.

Objectifs de la demande

Ce travail d'expertise a pour objectif d'aider les autorités compétentes à réaliser en situation d'urgence, les prélèvements et les analyses dans les milieux aquatiques en cas de découverte d'oiseaux contaminés par le VIAHP (H5N1). Il a été élaboré en tenant compte :

- de la note méthodologique adressée au DILGA le 5 juillet 2007 ;
- du retour d'expérience de l'Institut Pasteur Lille, chargé de mettre en application la-dite note ;
- des éléments contenus dans le rapport de l'Afsset publié en février 2007¹ ;
- d'une revue exhaustive de la bibliographie.

Le rapport contient en outre, des propositions d'axes de recherche, en dehors de tout contexte d'urgence sanitaire, afin d'améliorer les connaissances sur le VIAHP (H5N1) et son comportement dans l'environnement.

Avis et recommandations

L'Afsset est en accord avec l'ensemble des recommandations proposées par le groupe de travail et le Comité d'Experts Spécialisés « Évaluation des risques liés aux eaux et agents biologiques », concernant la stratégie d'échantillonnage et d'analyse du VIAHP(H5N1) dans les eaux de surface, les eaux usées et les supports solides en relation avec ces milieux.

Les données scientifiques et techniques relatives au VIAHP(H5N1) sont trop peu nombreuses et parcellaires, pour pouvoir établir une procédure détaillée décrivant les différentes étapes de recherche de ce virus dans les milieux aquatiques. De fait, le protocole joint en annexe est une aide à la réalisation des prélèvements et des analyses dans les eaux

¹ « Risques sanitaires liés à la présence de virus *Influenza* aviaires dans les eaux », AFSSET, février 2007.

de surface, en cas de découverte de cadavres d'oiseaux sur lesquels la contamination par le VIAHP (H5N1) aura été confirmée ou très fortement suspectée. Il complète la note méthodologique adressée par l'Agence au DILGA le 5 juillet 2007, notamment sur les points suivants :

- organisation de la campagne de prélèvements, préalablement à la survenue d'une alerte sanitaire ;
- modalités pratiques de prélèvement, de transport des échantillons et de décontamination du site ;
- choix des techniques de concentration, d'extraction et de détection adaptées à la problématique VIAHP(H5N1) ;
- modalités d'interprétation, de restitution et de diffusion des résultats.

En outre, sur la base du rapport d'expertise, l'Afsset recommande de :

- profiter des campagnes de prélèvements réalisées en situation d'urgence sanitaire pour mener des travaux de recherche sur les VIAHP, les épisodes d'influenza aviaire étant rares sur le territoire français ;
- soutenir la recherche sur les techniques de prélèvement, les stratégies d'échantillonnage et les techniques analytiques en lien avec les VIAHP, dans les eaux usées et les supports solides en rapport avec le milieu aquatique.
- permettre aux laboratoires implantés sur le territoire national d'effectuer des prélèvements d'eau dans les pays touchés par les VIAHP et réciproquement par le biais d'accords internationaux ;
- déterminer systématiquement le statut sérologique des personnes ayant été exposées aux VIAHP ;
- mener des études expérimentales portant sur les virus Influenza faiblement pathogènes dans diverses matrices environnementales (sables, boues, sédiments, etc.), en vue de l'acquisition et de l'amélioration des techniques de concentration et de détection ;
- diffuser au sein de la communauté scientifique internationale les données relatives aux virus Influenza, issues des observations humaines, animales et environnementales ;
- mettre en place un centre de ressources biologiques national, et international, regroupant l'ensemble des prélèvements humains, animaux et environnementaux ;
- réactualiser le protocole proposé dans le rapport en fonction des nouvelles connaissances qui seront obtenues sur le VIAHP(H5N1) ou tout autre sous-type de VIAHP.

Enfin, dans le but de poursuivre une veille scientifique sur le sujet, l'Afsset recommande que lui soient transmises par ses tutelles toutes nouvelles données relatives à la surveillance des VIAHP(H5N1), jugées pertinentes. Par précaution, il serait souhaitable que le groupe de travail de l'Afsset « Virus *Influenza* aviaires hautement pathogènes : stratégies d'échantillonnage » demeure actif, afin de pouvoir à nouveau le réunir au regard de l'actualité relative à la grippe aviaire.

Annexe

Protocole de prélèvements et d'analyses pour la recherche du VIAHP (H5N1) en cas d'urgence sanitaire

Considérations générales

Le présent protocole vise à permettre la réalisation de prélèvements et d'analyses pour la recherche du VIAHP(H5N1) dans les eaux de surface, en cas de découverte de cadavres d'oiseaux sur lesquels la contamination par ce virus aura été confirmée ou très fortement suspectée.

Compte tenu des nombreuses incertitudes scientifiques et techniques relatives au virus *Influenza* aviaire hautement pathogène de sous-type H5N1 actuellement observé, ce protocole décrit de façon globale et non de manière détaillée, les étapes allant de la préparation de la campagne jusqu'à la détection de ce virus. Aussi, ce protocole devra être actualisé dès que de nouvelles données sur le virus seront disponibles.

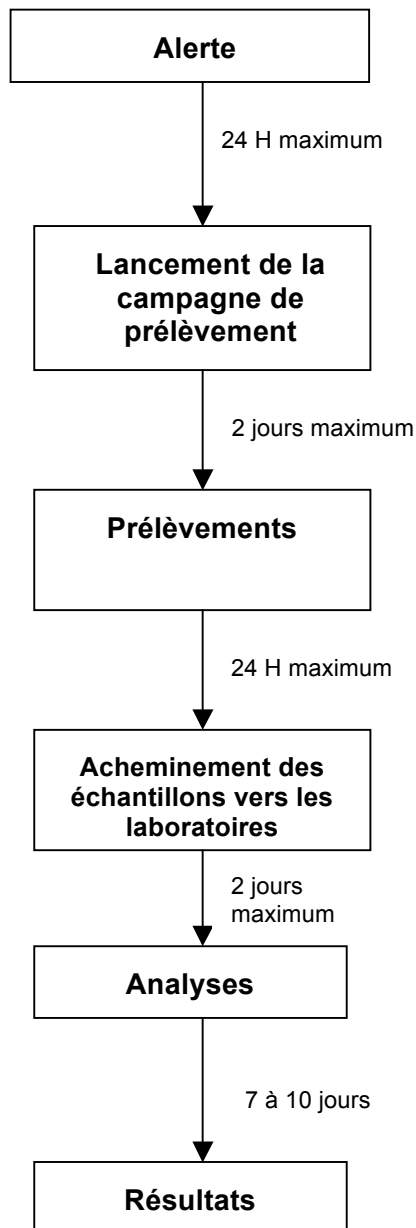
Préparation de la campagne

La mise en œuvre de la campagne de détection du virus en situation d'urgence nécessite une organisation parfaitement rodée. Aussi, les autorités sanitaires devront veiller à sélectionner préalablement des équipes qualifiées pour effectuer les prélèvements. Le nombre et la localisation de telles équipes seront fonction de l'évolution de la situation sanitaire sur le territoire, au regard de la présence du VIAHP (H5N1). Les équipes habilitées à réaliser les prélèvements devront appliquer les règles de bonnes pratiques ou les référentiels lorsqu'ils existent. Elles veilleront particulièrement au respect de la confidentialité et de la traçabilité de toutes les étapes de leur intervention.

Délai de mise en œuvre et calendrier

Le délai entre le moment où les autorités sanitaires sont informées de la présence possible du VIAHP(H5N1) dans un milieu aquatique et la réalisation des prélèvements destinés à la mise en évidence de ce virus, devra être le plus court possible. La pertinence des résultats des analyses en dépend. De plus, une réponse rapide aux autorités sanitaires est essentielle pour que celles-ci puissent prendre les mesures de gestion des risques qui s'imposent pour la population générale et pour les travailleurs.

Il convient de hiérarchiser les opérations de la campagne de prélèvement, afin qu'elles se déroulent dans les meilleures conditions:



1. Dans les 24 heures suivant l'alerte (cadavres d'oiseaux sur lesquels la contamination par le VIAHP(H5N1) aura été confirmée ou très fortement suspectée) : décision par les autorités sanitaires de réaliser une campagne de prélèvements et mandatement d'une équipe habilitée à effectuer les prélèvements disponible la plus proche du site ;

2. Un à deux jours (fonction du moment de l'alerte et de la distance du site) : préparation et réalisation des prélèvements par l'équipe de prélèvement mandatée ;

3. Dans les 24 heures : acheminement des prélèvements vers le(s) laboratoire(s) d'analyse ;

4. Deux jours après réception des échantillons : premières analyses et résultats des analyses pour « orientation » ;

5. Sept à dix jours après réception des échantillons (dans les meilleures conditions) : confirmation du résultat des analyses et de l'éventuel caractère pathogène du virus.

Les informations à réunir préalablement au lancement de la campagne

Les autorités concernées veilleront à fournir aux équipes de prélèvement les renseignements suivants :

- localisation précise du secteur géographique où auront lieu les prélèvements : relevé des coordonnées géographiques (GPS) ; cartes au 1/25000, cadastre, etc. ;
- nombre et superficie du ou des plan(s) d'eau du secteur ;
- cartographie détaillée du ou des plan(s) d'eau ;
- typologie du site ;
- si possible, dans des délais compatibles avec l'urgence : informations relatives à l'hydrodynamique des masses d'eau concernées (vitesse et débit, temps de séjour,

- zone d'influence amont, avale ou latérale, etc.) et éventuellement relative à leur gestion (présence de barrage, vannes, écluses, etc.) ;
- usages à risques des milieux aquatiques concernés et leur localisation (fréquentation, accès) ;
 - concernant les cadavres d'oiseaux : lieu exact du décès, nombre, espèce, si possible, niveau de maturité (juvénile ou adulte) ;
 - photos du secteur où les oiseaux morts ont été retrouvés ;
 - contact avec la personne responsable du site ou le connaissant bien.

Sans ces informations, la campagne de prélèvement serait très aléatoire, sinon vaine.

L'équipe en charge de la réalisation des prélèvements, appréciera ses besoins en matériels spécifiques, en fonction des éléments fournis par les autorités concernées.

La mobilisation des acteurs concernés

Une telle campagne entrant dans le cadre d'une aide à la décision en urgence, les autorités compétentes doivent s'adresser au Préfet pour :

- obtenir le soutien logistique et les autorisations nécessaires à l'équipe en charge de la réalisation de ces prélèvements ;
- veiller à l'information de tous les acteurs concernés et du public si besoin ;
- assurer la coordination des différentes actions.

Afin de raccourcir au maximum les délais entre l'alerte et le lancement de la campagne de prélèvements, les acteurs concernés doivent être préalablement identifiés et leurs rôles définis avec précision:

- l'organisme pilotant la campagne. Le lancement de la campagne de prélèvement devra faire l'objet d'un mandatement écrit missionnant officiellement l'organisme effectuant le(s) prélèvement(s) sur site ;
- le personnel d'astreinte (équipes de prélèvement et personnels de laboratoire) devra être identifié au sein des équipes habilitées.

Matériel à tenir à disposition

Le matériel et les véhicules devront être identifiés et répertoriés par l'équipe habilitée, vérifiés et prêt à embarquer. Cependant ce matériel ne sera pas nécessairement fourni par l'équipe habilitée. Une « check-list » est indispensable. A titre d'exemple, il est recommandé :

- que le commanditaire mette à disposition de l'équipe habilitée, l'équipement et le matériel indispensable pour le balisage, l'alimentation énergétique et les moyens permettant d'accéder aux points de prélèvements. A ce titre, l'équipe devra pouvoir disposer d'un équipement de navigation et des équipements de protection individuelle. La décontamination biologique ultérieure de ces matériels incombera au propriétaire. L'Afsset propose que le matériel flottable soit mis à disposition par des services compétents en matière de risques biologiques (pompiers par exemple) ;
- pour les équipes de prélèvement, que tout le matériel nécessaire pour réaliser les prélèvements et les premières concentrations sur site soit disponible (bâches, équipements de prélèvement et de concentration avec leurs modes opératoires, équipements de sécurité et de décontamination des déchets, etc.).

Transport, arrivée sur site et mesures de sécurité

Les virus *Influenza* sont actuellement classés sans distinction dans le groupe 2 défini par le décret relatif à la protection des travailleurs contre les risques résultant de leur exposition à des agents biologiques². Cependant, compte tenu du caractère pathogène du VIAHP (H5N1) pour l'homme, l'Afsset recommande d'appliquer à ce virus les mesures de prévention relatives aux agents biologiques de groupe 3³.

Un périmètre de sécurité interdisant la zone à toute personne ne disposant pas d'une autorisation d'accès sera mis en place conformément aux recommandations relatives aux risques biologiques.

Seules les équipes habilitées à réaliser les prélèvements, munies d'une autorisation d'accès délivrée par le Préfet sous la forme de mandatement, pourront pénétrer à l'intérieur de ce périmètre de sécurité. L'ensemble du matériel nécessaire à la mise en œuvre des prélèvements, ainsi que les équipements de protection des personnes auront fait l'objet de listes préétablies. Ils seront tous amenés au plus près de la zone de prélèvement.

Les personnes habilitées à effectuer les prélèvements doivent être équipées de protections individuelles adaptées, définies dans les documents de référence, mentionnés ci-dessous :

- « Grippe aviaire et risques professionnels », dossier de l'Institut National de Recherche et de Sécurité pour la Prévention des Accidents du Travail et des Maladies Professionnelles (INRS), avril 2007 ;
- « Prévenir les risques liés à l'influenza aviaire », dossier interministériel (Agriculture et pêche ; Emploi, cohésion sociale et logement ; Transports, équipement, tourisme et mer), janvier 2006 ;
- « Influenza aviaire : Guide des mesures de protections individuelles dans la filière avicole en cas de suspicion ou de foyer avéré », dossier diffusé par la DRAF de Bretagne et par la CNAMTS, fiche non datée.

Au-delà du risque biologique, les équipes devront également respecter les conditions générales de sécurité physique, telles que le port d'un gilet de sauvetage sur les bateaux.

De plus, il est proposé que les équipes soient accompagnées sur site par un représentant de l'État, afin de veiller à leur sécurité au regard des risques d'agression vis-à-vis des préleveurs et pour veiller parallèlement au respect de la propriété individuelle, si celle-ci est concernée par l'intervention.

Stratégie d'échantillonnage

Compte tenu des techniques de détection disponibles, il est recommandé de n'effectuer que des prélèvements d'eau, bien que l'opportunité d'une recherche du virus dans les sédiments ne soit pas à exclure. Après concertations avec les autorités sanitaires et leurs représentants locaux, les prélèvements seront réalisés :

1. Dans le cas d'une contamination de l'avifaune sauvage :
 - à proximité immédiate de la zone où ont été trouvés les cadavres d'oiseaux sauvages confirmés ou suspectés d'être contaminés par VIAHP (H5N1) ;

2 Décret n° 94-352 du 4 mai 1994 relatif à la protection des travailleurs contre les risques résultant de leur exposition à des agents biologiques (J.O., 6 mai 1994)

3 Note de service DGFAR/SDTE/N2006-5001DGAL/SDSPA/N2006-8015 du 18 janvier 2006 relatif à la prévention des risques professionnels concernant les travailleurs susceptibles d'être exposés à des volailles ou d'autres oiseaux, vivants ou morts, suspects d'être atteints ou atteints d'influenza aviaire à virus hautement pathogène, ou à tout produit ou sous-produit susceptible d'être contaminé, ou contaminé.

- en plusieurs points de la masse d'eau, susceptible d'être concernée par la contamination.

La définition précise des points de prélèvements ne pourra être faite *a priori* : elle sera totalement liée au site lui-même. Elle devra donc être faite sur la base d'un avis d'experts, en tenant compte de la localisation des points d'usage humains de la masse d'eau et des conditions hydrologiques locales. De même, la profondeur à laquelle le prélèvement d'eau devra être réalisé, sera déterminée en fonction des usages à risques et des caractéristiques de la masse d'eau.

2. Dans le cas du dépeuplement d'un élevage contaminé :

- directement dans les eaux de lavage issues de l'opération de dépeuplement, au plus près de leur production, en tenant compte des produits de désinfection utilisés et de leurs modalités de mise en œuvre, l'objectif étant de vérifier l'absence du virus avant rejet ;
- dans les eaux de ruissellement pluvial issues de l'aire de l'élevage contaminé, si nécessaire. Dans ce cas, le choix des points et des modalités de prélèvement sera réalisé sur avis d'experts, en tenant compte des risques de contamination humaine.

Le nombre d'échantillons à prélever sera déterminé au cas par cas en fonction des situations environnementales et des capacités de traitement par le(s) laboratoire(s). Actuellement, les laboratoires ne peuvent prendre en charge que 4 échantillons par semaine.

Il est important de noter que, compte tenu du peu de laboratoires sur le territoire français, pouvant à ce jour prendre en charge l'analyse des échantillons, en cas d'apparition de plusieurs sites contaminés, il semble difficile de mettre en œuvre simultanément plusieurs campagnes de prélèvements.

Cependant, si ce cas se présentait, il appartient aux autorités compétentes de définir les sites sur lesquels elles souhaiteraient prioritairement voir effectuer des prélèvements d'eau. A titre indicatif, les situations exposantes les plus à risque pour la santé de la population générale et des travailleurs sont décrites et hiérarchisées dans le rapport de l'Afsset⁴.

Protocole de prélèvement

La qualité des prélèvements conditionne en grande partie la validité des analyses et donc l'interprétation des résultats. L'opérateur doit tout mettre en œuvre pour réaliser un prélèvement représentatif, conforme aux objectifs de la mesure demandée.

Si un protocole de prélèvement « guide » peut être mis en œuvre dans un grand nombre de situations, l'opérateur devra parfois s'adapter aux conditions du moment.

Protocole pour les prélèvements d'eau et étape de concentration sur site

Afin d'éviter le transport de grands volumes d'eau dans des conditions incompatibles avec la réglementation en vigueur⁵, il est préconisé d'opérer l'étape de concentration primaire directement sur site, avec l'appareillage adapté. L'équipe réalisant les prélèvements devra fournir un document détaillant la méthodologie employée et relatant toutes les étapes de prélèvement ainsi que les incidents éventuellement survenus.

⁴ « Risques sanitaires liés à la présence de virus *Influenza* aviaires dans les eaux », AFSSET, février 2007.

⁵ Arrêté du 22 décembre 2006 modifiant l'arrêté du 1er juin 2001 modifié relatif au transport des marchandises dangereuses par route (dit « arrêté ADR »)

■ Prélèvements

Le volume minimal d'eau de surface ainsi que les modalités de réalisation des prélèvements dépendront de chaque situation d'intervention. Ce volume devra scrupuleusement être noté. Il est préconisé le recueil d'un volume de l'ordre de 30 litres par échantillon, afin d'augmenter la probabilité de trouver les virus, sans augmenter les difficultés de la première étape de concentration *in situ*. La hauteur de la lame d'eau prélevée, ainsi que les coordonnées précises de ce prélèvement seront définis, sur place, sur avis d'expert.

Les techniques de prélèvements dépendront du volume à collecter et du point de prélèvement. Il pourra s'agir d'un prélèvement au moyen d'un seau ou par le biais d'une pompe péristaltique, selon qu'il soit effectué de la berge, dans une buse d'écoulement, d'un pont ou d'un bateau. Ce volume sera ensuite transféré dans des jerricans adaptés, puis acheminés jusqu'au point où sera effectuée l'étape de concentration.

■ Concentration primaire

En l'état actuel des connaissances, il est recommandé que la concentration sur site se fasse en utilisant un carter rempli de laine de verre, suivant la norme AFNOR XPT 90-451.

Si l'étape de concentration primaire n'est pas possible sur site, il devra être prévu de faire transporter les échantillons dans des conditions adaptées (cf. paragraphe 4.2).

Ces opérations de prélèvement d'eau doivent être accompagnées de mesures physico-chimiques, telles que températures de l'eau et de l'air, conductivité (salinité), pH, oxygène dissous, turbidité, etc.

Eu égard au niveau de risque biologique pour l'opérateur et le personnel environnant, l'opération de concentration primaire devra s'effectuer sur site, à l'aide du matériel adapté, dans le respect des mesures de sécurité prévues à cet effet.

Emballage et transport des échantillons vers le laboratoire

Suivant la réglementation européenne⁶, les prélèvements suspectés de contenir des matières infectieuses pour l'homme doivent être transportés en triple emballage de sécurité de type ONU n°2814 classe 6-2-2⁷, composé :

- d'un récipient primaire contenant l'échantillon prélevé ;
- d'un emballage secondaire étanche contenant une mousse absorbante ;
- d'un emballage extérieur suffisamment résistant dont la plus petite dimension extérieure ne doit pas être inférieure à 10 cm.

Les échantillons seront acheminés dans un délai maximum de 24 heures vers les laboratoires d'analyses habilités, à une température de 4°C et à un pH voisin de la neutralité.

Décontamination du matériel sur site

La décontamination du matériel et des déchets sera prise en charge par l'équipe de prélèvement. Le matériel fourni par les autorités publiques sera décontaminé sous leur responsabilité.

6 Directive 2006/89/CE de la Commission du 3 novembre 2006 portant sixième adaptation au progrès technique de la directive 94/55/CE du Conseil relative au rapprochement des législations des États membres concernant le transport des marchandises dangereuses par route

7 Guide pratique sur l'application du règlement relatif au transport des matières infectieuses 2007-2008, WHO/CDS/EPR/2007.2 http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EPR_2007_2_FRc.pdf

Il convient de choisir les produits de désinfection les moins dangereux pour l'homme, en évitant notamment ceux qui contiennent du formaldéhyde, reconnu comme cancérigène avéré par le centre international de recherche pour le cancer (CIRC)⁸.

Méthodes d'analyses

Il est recommandé que les échantillons soient traités en laboratoire de niveau de sécurité biologique 3. Les recommandations suivantes sont émises en l'état actuel des connaissances et sont limitées aux grands principes analytiques. Les laboratoires en charge de la mise en œuvre des analyses devront harmoniser leur protocole analytique.

Suite à la concentration primaire, une élution fractionnée sera réalisée sur les échantillons. Une concentration secondaire sera ensuite réalisée par une précipitation au PEG⁹. Le volume obtenu après concentration secondaire sera réparti comme suit pour mise en œuvre des techniques correspondantes :

- Un aliquot servira pour l'analyse en retro-transcription et amplification par polymérisation en chaine (RT-PCR) temps-réel

Les acides ribonucléiques seront extraits à l'aide d'un kit commercial et analysés par RT-PCR selon une méthodologie harmonisée entre les laboratoires habilités. Compte tenu de l'évolution épidémiologique du virus, la séquence spécifique des amorces sera définie par des laboratoires de référence (communautaire ou de l'Organisation mondiale de la santé animale). En cas de suspicion d'infection par le VIAHP(H5N1), la détection spécifique des gènes codant pour la protéine H5 sera faite en priorité. Si possible, la protéine N1 sera également effectuée par RT-PCR en temps réel. Si le résultat est positif (c'est-à-dire la mise en évidence au minimum du gène H5), un séquençage du gène H5 incluant la zone du site de clivage sera nécessaire, afin de déterminer le pouvoir pathogène et de confirmer le sous-type du virus.

- Un aliquot servira pour l'amplification virale, soit par ovoculture, soit sur culture cellulaire.

Cette étape permettra de démontrer la présence de particules virales infectieuses.

- Amplification par ovoculture

L'aliquot sera préalablement clarifié par centrifugation, traité par un mélange d'antibiotiques à large spectre, puis inoculé par voie allantoïdienne à 5 œufs embryonnés de poules. Après plusieurs jours d'incubation, les liquides allantoïdiens des embryons morts et des embryons survivants feront l'objet d'une recherche d'activité hémagglutinante (hématies de poule). En cas de résultat positif et en l'absence de contamination bactérienne ou fongique, le liquide allantoïdien constituera la solution de virus à identifier. Deux à trois passages sur œufs seront nécessaires avant de conclure négativement.

⁸ Les produits figurant sur la liste des désinfectants agréés au titre de l'arrêté du 28 février 1957 relatif à la désinfection dans le cas de maladies contagieuses des animaux sont efficaces contre le virus de l'influenza aviaire hautement pathogène. Ils figurent sur le site public du ministère de l'agriculture et de la pêche. www.e-phy-agriculture.gouv

Note de service du ministère de l'agriculture sur la prévention des risques professionnels (DGFAR/SDTE/N2006-5001 du 18 janvier 2006)

⁹ Compte-tenu des contraintes technologiques et humaines, seuls 4 échantillons pourront être traités par jour et par laboratoire (élution, concentration secondaire et extraction).

- Amplification par culture cellulaire

L'aliquot sera inoculé après traitement adéquat pour éliminer les bactéries et les fungi, à des cellules de rein de chien (MDCK-F25), utilisées pour mettre en évidence la présence de particules infectieuses de VIAHP(H5N1).

- Un aliquot servira pour l'amplification par culture cellulaire suivie de RT-PCR

L'aliquot sera inoculé après traitement adéquat pour éliminer les bactéries et les fungi, soit sur tapis cellulaire, soit sur œufs embryonnés. La mesure de génome par RT-PCR sera effectuée à T0 et T+1 ou T+ 2 jours de culture.

- Un aliquot sera conservé à - 80°C pour des analyses complémentaires ou contre-expertise

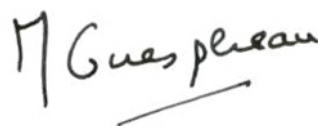
Diffusion des résultats

Le laboratoire ayant réalisé les analyses devra remettre les résultats, dès que ceux-ci auront été confirmés, aux autorités sanitaires, seules destinataires des résultats.

Seules les autorités sanitaires décideront des informations à diffuser durant la phase de gestion de la situation d'urgence.

Il convient d'assurer une diffusion large de ces résultats, une fois l'urgence sanitaire passée, en particulier auprès des scientifiques et experts impliqués dans les réflexions sur la préparation des plans de prévention de la pandémie grippale.

Le Directeur général



Martin GUESPEREAU

**Virus *Influenza* aviaires hautement pathogènes
de sous-type H5N1 :
Stratégies d'échantillonnage dans les milieux aquatiques**

Avenant à la saisine n° 2005/011

**RAPPORT
d'expertise collective**

« Comité d'experts spécialisés « Évaluation des risques liés aux eaux et aux agents biologiques » »

Groupe de travail « Virus *Influenza* aviaires hautement pathogènes (VIAHP)- Eaux :
Stratégies d'échantillonnage »

Décembre 2008

Mots clés

virus influenza aviaire hautement pathogène ; VIAHP ; H5N1 ; pouvoir pathogène ; influenza aviaire ; grippe aviaire ; épizootie ; oiseau sauvage ; risque eau contamination ; milieu aquatique ; eau ; eau de surface ; eau usée ; sédiment ; protocole ; campagne de prélèvement ; étude échantillon ; méthode analytique.

AFSSET

Coordination scientifique

Mme Nathalie DUCLOVEL-PAME - Chef de projets scientifiques - Unité eaux et agents biologiques – Département expertises en santé environnement travail.

Mme Paulina CERVANTES - Chef d'unité - Unité eaux et agents biologiques – Département expertises en santé environnement travail jusqu'au 17 juin 2008.

Mme Sylvie ZINI - Chef d'unité - Unité eaux et agents biologiques – Département expertises en santé environnement travail à partir du 18 juin 2008.

Secrétariat administratif

Mme Séverine BOIX - Assistante administrative

GRUPE DE TRAVAIL « VIAHP(H5N1) : STRATÉGIES D'ÉCHANTILLONNAGE DANS LES MILIEUX AQUATIQUES »

Président

Mme Michèle LEGEAS. Professeur, spécialiste de la gestion des situations à risques microbiologiques. École des Hautes Études en Santé Publique (EHESP).

Membres

Mme Jeanne BRUGÈRE-PICOUX. Professeur, spécialiste de pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour. École Nationale Vétérinaire d'Alfort.

M. Benoît GASSILLOUD. Responsable d'unité microbiologie des eaux au laboratoire d'études et de recherches d'hydrologie. AFSSA-LERH, site de Nancy.

M. Jean-Loup LAHEURTE. Retraité. Anciennement ingénieur spécialiste du traitement des eaux usées. Centre international de l'eau, Nancy.

M. Patrick MARCHANDISE. Chargé de mission à la section sciences et techniques du Conseil général de l'environnement et du développement durable. Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de l'aménagement du territoire.

M. Laurent MOULIN. Responsable du département recherche biologie. CRECEP.

M. Jean-Paul PICAULT. Responsable adjoint du laboratoire national de référence *Influenza* aviaire. AFSSA-LERAPP, site de Ploufragan-Plouzané.

Mme Monique POMMEPUY. Directrice du département environnement, microbiologie, phycotoxines. IFREMER.

Mme Michèle VIALETTE. Chef de service unité de sécurité microbiologique, Institut Pasteur de Lille.

ADOPTION DU RAPPORT PAR LE(S) COMITE(S) D'EXPERTS SPÉCIALISES

Ce rapport a été soumis pour commentaires au CES :

■ «Évaluation des risques liés aux eaux et aux agents biologiques »

Président

Mme Sylvie RAUZY. Directeur de la prospective. CRECEP

Membres

M. Rafik ABSI. Responsable de recherche en modélisation et mécanique des fluides. École de Biologie Industrielle, laboratoire Roberval, Université de technologie de Compiègne.

M. Jean-Jacques BALLET. Médecin immunologiste. Professeur à l'université et au CHU de Caen et au Laboratoire d'Immunologie et Immunopathologie – Immunopathologie, infections.

M. Jean-Marc BERJEAUD. Maître de conférences. Université de Poitiers et laboratoire de microbiologie fondamentale et appliquée.

M. Jean-Luc BOUDENNE. Maître de conférences. Université de Provence, Chef de l'équipe chimie et métrologie des eaux au Laboratoire de Chimie Environnement - Métrologie des eaux, chimie et qualité des eaux.

Mme Jeanne BRUGÈRE-PICOUX. Professeur, spécialiste de pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour. École Nationale Vétérinaire d'Alfort.

M. Pierre-Jean CABILLIC. Ingénieur ENGEES et Ingénieur du Génie Sanitaire. Chef du département «Santé Environnement» de la DDASS du Morbihan - Qualité des eaux, assainissement, baignades et process de traitement.

M. Patrick CAMUS. Cadre de Recherche, Chef de laboratoire à l'IFREMER - Écologie, hydrologie, pollution et surveillance des eaux marines.

M. Edmond CREPPY. Professeur à l'Université de Bordeaux 2, Directeur du Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée -Modes d'action des toxiques de l'environnement.

M. Christophe CUDENNEC. Ingénieur agronome et Docteur en Hydrologie, Maître de Conférences à l'Agrocampus de Rennes - Hydrologie, ressources en eau, aménagement du territoire, modélisation.

M. Christophe DAGOT. Professeur, Responsable Eau et Environnement de l'Université de LIMOGES (ENSIL) - Génie des procédés, traitement des eaux.

M. Sam DUKAN. Docteur en Microbiologie, Responsable d'équipe au Laboratoire de Chimie Bactérienne au CNRS de Marseille - Chimie bactérienne, mécanismes de survie bactérienne.

M. Jean-François GEHANNO. Médecin du travail. Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier au CHU de Rouen au Service Médecine du Travail et Pathologie Professionnelle - Risques professionnels en particulier biologiques et toxiques.

M. Éric GILLI .Docteur en géologie, Professeur à l'Université Paris 8 au Département de géographie - Hydrogéologie, eaux karstiques.

M. Jean-Pierre GUT. Professeur hospitalo-universitaire. Directeur de l'Institut de virologie. Université Louis Pasteur. Strasbourg.

M. Didier HILAIRE. Docteur, expert en microbiologie, Expert décontamination à la DGA - Désinfection des agents du risque biologique et stabilité des agents biologiques dans l'environnement.

M. Jean-François HUMBERT. Docteur, Directeur de Recherche à l'INRA de Thonon-les-Bains - Écologie microbienne.

M. Abdel LAKEL. Ingénieur de recherche, Co-responsable du domaine Air/Eau-Pollution Santé, Pilote du département «Climatologie aérodynamique pollution épuration» au CSTB - Dépollution des eaux usées.

Mme Colette LE BACLE. Médecin du travail, Conseiller médical en Santé au Travail, Chef de projet «Risques Biologiques» à l'INRS - Risques biologiques professionnels.

M. Éric LEDRU. Médecin biologiste, Médecin coordinateur à l'ANAEM - Santé publique et médecine tropicale.

M. Patrick MARCHANDISE. Chargé de mission à la section sciences et techniques du Conseil général de l'environnement et du développement durable. Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de l'aménagement du territoire ; spécialiste de l'eau, de l'assainissement et des risques sanitaires.

Mme Laurence MATHIEU. Docteur es Sciences, Enseignant Chercheur, Maître de Conférence à la Faculté de médecine de Vandœuvre-lès-Nancy, École Pratique des Hautes Études dans le département Environnement et Santé - Exposition aux contaminants biologiques.

M. Gérard MOGUEDET. Professeur, Hydrogéologue agréée en matière d'hygiène publique, Vice Président de l'Université d'Angers - Hydrologie, hydrogéologie et pollution des eaux.

Mme Anne MORIN. Docteur d'université, Coordinatrice du programme «Qualité des Eaux» à l'INERIS - Analyses chimiques, physico-chimiques des eaux, métrologie.

Mme Catherine MOUNEYRAC. Professeur en écotoxicologie aquatique, Directrice de l'Institut de Biologie et d'Écologie Appliquée à l'Université Catholique de l'Ouest - Ecotoxicologie, biomarqueurs.

Mme Alessandra OCCHIALINI-CANTET. Maître de conférence, Docteur es Sciences, Enseignant chercheur au CNRS dans l'équipe «Microbiologie des Infections bactériennes chroniques et stratégies anti-infectieuses» - Microbiologie, pathogénie des agents infectieux.

Mme Anne-Marie POURCHER. Maître de conférences, enseignant - Chercheur au CEMAGREF de Rennes dans l'Unité «Gestion Environnementale et Traitement biologique des déchets» - Aspect sanitaire des traitements biologiques des déchets liquides et solides, survie bactérienne.

Mme Renée RUNIGO-MAGIS. Ingénieur CNAM en Sécurité au Travail, Ingénieur Sécurité à l'APHP - Hygiène et sécurité professionnelle.

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT. Professeur de santé publique, Chef de service à l'Université d'Auvergne au Laboratoire Santé publique et Environnement - Santé publique et épidémiologie.

Mme Nicole TANDEAU DE MARSAC. Docteur es Science, Responsable d'unité de recherche à l'Institut Pasteur de Paris - Microbiologie, cyanobactéries.

Mme Michèle TREMBLAY. Médecin en santé communautaire, Médecin conseil en maladies infectieuses et en santé au travail à l'INSPQ à la Direction de la santé publique de Montréal - Risques biologiques professionnels liés aux eaux.

M. Bernard TRIBOLLET. Ingénieur de l'École Supérieure d'Électricité, Docteur d'État, Directeur de Recherches à l'Université de Jussieu au Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques - Biofilms, entartrage, corrosion des matériaux en milieux naturels.

Mme Isabelle VILLENA. Médecin biologiste, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier au CHU de Reims au Laboratoire de Parasitologie et Mycologie - Parasitologie et mycologie, diagnostic et traitement de zoonoses.

Après prise en compte des commentaires, le rapport a été approuvé par les membres du groupe de travail.

Il a été adopté par le CES «Évaluation des risques liés aux eaux et aux agents biologiques » le 3 novembre 2008.

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

AFSSA – site de Ploufragan

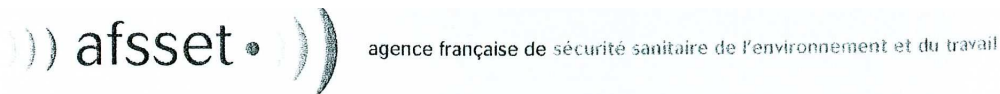
M. Gilles SALVAT. Directeur du laboratoire d'études et de recherches avicoles, porcines et piscicoles (LERAPP)

SOMMAIRE

Expertise collective : synthèse et conclusions	9
Abréviations	15
Liste des tableaux.....	16
1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine.....	17
1.1 Contexte et objet de la saisine	17
1.2 Modalités de traitement de la saisine	17
2 Méthode de réponse à la saisine.....	19
3 Synthèse du retour d'expérience relatif à la mise en œuvre et la réalisation des prélèvements dans les étangs de Moselle	20
4 Objectifs d'une demande de prélèvements dans les milieux aquatiques..	21
5 Synthèse bibliographique relative au traitement des échantillons	23
5.1 Concentration et extraction du virus dans les matrices environnementales	24
5.1.1 Méthodes de concentration des virus pour les eaux naturelles décrites dans la littérature	24
5.1.1.1 Méthode de concentration primaire.....	24
5.1.1.2 Méthodes de concentration secondaire.....	27
5.1.2 Méthodes d'extraction des virus dans les sédiments	28
5.2 Méthodes de détection et d'analyse des virus.....	29
5.2.1 Isolement et amplification sur cellules en culture ou œufs embryonnés	29
5.2.2 Détection par la technique de <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i> (RT-PCR).....	30
5.2.3 Détection par le technique ICC-RT-PCR.....	31
5.3 Interprétation des résultats	31
6 Propositions concernant les prélèvements et les analyses pour la recherche du VIAHP (H5N1) en cas d'urgence sanitaire	33
6.1 Considérations générales.....	33
6.2 Préparation de la campagne.....	34
6.2.1 Délai de mise en œuvre et calendrier	34
6.2.2 Les informations à réunir préalablement	34
6.2.3 La mobilisation des acteurs concernés.....	35
6.2.4 Matériel à tenir à disposition	36
6.2.5 Transport, arrivée sur les lieux et mesures de sécurité	36
6.3 Stratégie d'échantillonnage.....	38
6.4 Protocoles de prélèvement.....	39
6.4.1 Protocole pour les prélèvements d'eau et étape de concentration sur site.....	40
6.4.2 Protocole pour le prélèvement de sédiments	41
6.4.3 Emballage et transport des échantillons vers le laboratoire	41
6.4.4 Décontamination du matériel sur site	42

6.5	Méthodes d'analyses	42
6.6	Diffusion des résultats.....	43
7	Propositions en vue de l'amélioration des connaissances sur le VIAHP(H5N1).....	45
7.1	Protocole de prélèvements et d'analyses.....	45
7.2	Choix de la nature des échantillons.....	46
7.3	Optimisation des techniques de détection et d'analyses du VIAHP (H5N1)	47
7.4	Diffusions des résultats.....	48
8	Conclusions et recommandations du groupe de travail.....	49
9	Bibliographie.....	51
9.1	Publications.....	51
9.2	Normes.....	52
9.3	Législation et réglementation.....	52
ANNEXES	53
Annexe 1	: Note adressée au DILGA, relative à la définition d'un protocole de prélèvement dans les milieux aquatiques (Juillet 2007).....	54
Annexe 2	: Méthodologie européenne pour la détection et la caractérisation des infections dues au virus <i>Influenza aviaire</i> dans des prélèvements d'origine aviaire...58	58
Annexe 3	: Isolement de virus <i>Influenza aviaire</i> par ovoculture.....	60
Annexe 4	: Laboratoires d'analyses agréés pour le diagnostic sérologique et virologique.....	61
Annexe 5	: Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine	66

Expertise collective : synthèse et conclusions



EXPERTISE COLLECTIVE : SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS

Relatif à la saisine « *Virus Influenza aviaires hautement pathogènes : stratégies d'échantillonnage* »

Avenant à la saisine n° 2005/011

Ce document synthétise les travaux du groupe de travail et présente les éventuels compléments du Comité d'Experts Spécialisés « Évaluation des risques liés aux eaux et agents biologiques »

Présentation de la question posée

L'AFSSET a été saisie le 5 juillet 2007 par le délégué interministériel en charge de la lutte contre la grippe aviaire (DILGA), afin de définir les stratégies d'échantillonnage, les protocoles de prélèvement dans les eaux de surface, les eaux usées et les supports solides en relation avec ces milieux (sable, sédiments, boues, etc.) et les méthodes analytiques appropriées pour détecter les virus *Influenza* aviaires hautement pathogènes, en particulier le sous-type H5N1, nommé VIAHP (H5N1).

Contexte

Le 31 octobre 2005, le DILGA a saisi l'AFSSET afin d'évaluer les risques sanitaires pour la population générale et les travailleurs, liés à la présence de VIAHP (H5N1) dans les effluents aqueux et les eaux superficielles. L'AFSSET a remis ses conclusions dans un rapport rendu public le 8 février 2007 ; l'une des recommandations portait sur « *le renforcement de la collecte et la diffusion de données relatives à la contamination de l'eau dans les zones du territoire français où des oiseaux sauvages seraient retrouvés morts.* »

A la suite de la découverte de cygnes morts et contaminés par le VIAHP (H5N1) dans deux étangs du département de la Moselle en juillet 2007, le DILGA a saisi l'AFSSET pour élaborer un protocole adapté à la recherche des VIAHP (H5N1) dans les plans d'eau. L'AFSSET a adressé au DILGA le 5 juillet 2007 un protocole qui a été appliqué par l'Institut

1 / 6

Pasteur de Lille, pour réaliser les prélèvements et analyses d'eau, sur le lieu de découverte des cygnes morts.

Aussitôt après réception du protocole le 5 juillet 2007, le DILGA a demandé par courrier électronique à l'AFSSET de poursuivre ses travaux, afin de définir une stratégie d'échantillonnage, un protocole de prélèvement dans les eaux de surface, les eaux usées et les supports solides en relation avec ces milieux (sable, sédiments, boues, etc.) et les méthodes analytiques pour détecter le VIAHP (H5N1).

Objectifs de la demande

Ce protocole constitue un outil d'aide à la gestion des risques sanitaires, au service des autorités compétentes. Il est destiné à permettre au gestionnaire de risque d'organiser et de réaliser en situation d'urgence les prélèvements et analyses d'eau, rapidement et efficacement, en cas de découverte d'oiseaux morts contaminés par le VIAHP (H5N1) dans les milieux aquatiques.

En dehors du contexte d'urgence sanitaire, des programmes de recherche peuvent être mis en place afin d'améliorer les connaissances liées au virus.

Organisation de l'expertise

L'AFSSET a confié au Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Évaluation des risques liés aux eaux et agents biologiques » l'instruction de cette saisine. Ce dernier a mandaté le groupe de travail « Virus *Influenza* aviaires hautement pathogènes : stratégies d'échantillonnage », pour la réalisation des travaux d'expertise.

Ces travaux d'expertise ont été soumis régulièrement au CES tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires proposés par les membres du CES.

Ces travaux d'expertise sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. Ils ont été réalisés dans le respect de la norme NF X 50-110 « qualité en expertise », avec pour objectif le respect des points suivants : compétence, indépendance, transparence, traçabilité.



Description de la méthode de travail

Le groupe de travail s'est attaché à définir les motifs, circonstances et objectifs pour lesquels les autorités sanitaires pourraient être amenées à demander la réalisation de prélèvements d'eau pour détecter le VIAHP (H5N1).

Le protocole a été élaboré sur les bases suivantes :

1. le rapport de l'AFSSET publié le 8 février 2007¹, qui préconise d'effectuer des prélèvements et des analyses dans les milieux aquatiques sur les lieux de découverte d'oiseaux sauvages morts contaminés par le VIAHP (H5N1) ou en cas d'abattage d'élevage contaminé par ce virus ;
2. de la note méthodologique envoyée par l'AFSSET au DILGA le 5 juillet 2007 ;
3. de l'analyse des conditions dans lesquelles les prélèvements d'eau ont été réalisés par l'Institut Pasteur de Lille, lors de l'épisode d'influenza aviaire survenu dans les étangs du département de la Moselle en juillet 2007 ;
4. d'une réflexion sur les raisons et objectifs pour lesquels des prélèvements d'eau pourraient être demandés à l'avenir par les autorités sanitaires ;
5. une revue de la littérature internationale et des travaux en cours concernant la recherche des VIAHP(H5N1) dans les milieux aquatiques.

Conclusions issues de l'expertise collective

Il est proposé dans le présent rapport une stratégie globale pouvant servir de support à la coordination d'une campagne de prélèvements. Compte tenu des données scientifiques et techniques relatives aux VIAHP (H5N1) encore très peu nombreuses et parcellaires, le groupe de travail n'a pu aller jusqu'à la rédaction d'un « guide méthodologique » décrivant de façon détaillée la procédure à suivre pour réaliser une telle campagne de prélèvements dans les milieux naturels.

Cette stratégie s'adresse aux deux situations suivantes :

- en cas d'urgence sanitaire ;
- dans un contexte de veille sanitaire et en vue de l'amélioration des connaissances sur le VIAHP (H5N1).

¹ « Évaluation des risques pour la population générale et les travailleurs liés à la présence de VIAHP de sous-type H5N1 ou d'un virus pandémique dérivé de celui-ci dans divers effluents aqueux et eaux superficielles »



- Dans le cas d'une urgence sanitaire, les instructions et les recommandations proposées par le groupe de travail portent notamment sur :
 - la préparation en amont de la campagne de prélèvement, en termes organisationnels ;
 - les principaux acteurs à mobiliser ;
 - les modalités pratiques de prélèvement et de transport des échantillons ;
 - les techniques de concentration, d'extraction et d'analyse adaptées à la problématique du VIAHP (H5N1) ;
 - l'interprétation et la restitution des résultats.

Le rapport souligne que la qualité des actions de gestion des risques sanitaires à mener par les autorités compétentes dépendra de la rapidité et de la qualité de la mise en œuvre d'une telle campagne de prélèvements et d'analyses et de la fiabilité des résultats. Pour cela, seule une organisation préparée, renforcée et qualifiée des ressources humaines, matérielles et logistiques, permettra d'optimiser les chances de réussite de cette campagne.

- Dans un contexte de veille sanitaire et d'amélioration des connaissances sur le VIAHP (H5N1), une campagne de recherche pourra être commanditée par les autorités sanitaires ou la communauté scientifique, afin d'étudier la survie ou la dissémination du VIAHP(H5N1) dans les milieux environnementaux. Compte tenu de la rareté des épisodes d'influenza aviaire sur le territoire français, cette campagne ne pourra intervenir qu'une fois passée l'urgence sanitaire. Cette campagne de recherche aura également pour but d'optimiser les techniques d'identification du virus en laboratoire.

Le Comité d'Experts Spécialisés (CES) « Évaluation des risques liés aux eaux et agents biologiques » adopte les travaux d'expertise collective lors des séances du 3 novembre du 1^{er} décembre 2008 et fait part de cette adoption à la direction générale de l'AFSSET.



Recommandations issues de l'expertise collective

Au-delà de la proposition d'une telle stratégie, le groupe de travail a identifié un certain nombre de points ayant donné lieu aux recommandations suivantes, dont l'intégralité est présentée dans le rapport :

- Recommandations relatives à l'objet de la saisine :
 - Rechercher systématiquement le virus *Influenza* aviaire dans les eaux (masses d'eau naturelle, eaux de lavage et eaux de ruissellement pluvial), dès la découverte d'oiseaux morts contaminés par le VIAHP(H5N1) ;
 - Mettre en œuvre des études expérimentales sur les virus *Influenza* faiblement pathogènes dans diverses matrices environnementales (sables, boues, sédiments, etc.), en vue de l'acquisition et de l'amélioration des techniques de concentration et de détection.
- Recommandations en complément de la saisine :
 - Faciliter et promouvoir la diffusion des données relatives aux virus *Influenza* issues des observations humaines, animales et environnementales au sein de la communauté scientifique internationale ;
 - Permettre aux laboratoires implantés sur le territoire national d'effectuer des prélèvements d'eau dans les pays touchés par le VIAHP (H5N1) et réciproquement, grâce à des accords internationaux ;
 - Déterminer systématiquement le statut sérologique des personnes ayant été exposées au VIAHP(H5N1) ;
 - Mettre en place un centre de ressources biologiques national, voire international regroupant l'ensemble des prélèvements humains, animaux et environnementaux.

Le groupe de travail recommande enfin que toutes nouvelles données soient transmises à l'AFSSET par ses tutelles, au fur et à mesure de l'acquisition de celles-ci, afin que ce présent document fasse l'objet de révision périodique.



Expertise collective : synthèse et conclusions

Avenant à la saisine n° 2005/011

Maisons-Alfort, le 1^{er} décembre 2008

Au nom des experts du CES « Évaluation des risques liés aux eaux et agents biologiques »

Madame Sylvie Rauzy,

Présidente du CES



Note de synthèse version finale



6 / 6

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADR : Accord européen relatif au transport international des marchandises dangereuses par route

AFNOR : Association française de normalisation

AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

AFSSET : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

ANAEM : Agence nationale d'accueil des étrangers et des migrations

ARN : Acide ribonucléique

CES : Comité d'experts spécialisés

CHSPH : Conseil supérieur d'hygiène publique de France

CHU : Centre hospitalo-universitaire

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

CNAMTS : Caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés

CNR : Centre national de référence

CSTB : Centre scientifique et technique du bâtiment

CRECEP : Centre de recherche d'expertise et de contrôle des eaux de Paris

DDASS : Direction départementale des affaires sanitaires et sociales

DGA : Délégation générale pour l'armement

DGFAR : Direction générale de la forêt et des affaires rurales

DILGA : Délégué interministériel à la lutte contre la grippe aviaire

DRAF : Direction régionale de l'agriculture et de la forêt

EHESP : École des hautes études en santé publique

ENGEES : École nationale du génie de l'eau et de l'environnement de Strasbourg

GPS : *Global Positioning System*, géo-positionnement par satellite

ICC-RT-PCR : *Integrated Cell Culture- RT-PCR*, amplification par culture cellulaire, suivie de RT-PCR

IFREMER : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer

INRS : Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles

INSPQ : Institut national de santé publique du Québec

IPL : Institut Pasteur de Lille

LERAPP : Laboratoire d'étude et de recherche avicole porcine et piscicole

LERH : Laboratoire d'étude et de recherche en hydrologie

MDCK : *Madin-Darby Canine Kidney Cells*, cellules épithéliales de rein de chien

OIE : Organisation mondiale de la santé animale

OMS : Organisation mondiale de la santé

ONU : Organisation des nations unies

PBS : Solution phosphate tamponnée

PCR : *Polymerase Chain Reaction*, amplification par polymérisation en chaîne

PEG: Polyethylene glycol

pI : Point isoélectrique

RIVERS : *Resistance of Influenza viruses in environmental reservoirs and systems*

RT-PCR : Reverse Transcriptase-PCR

SDS: Sodium dodécyl sulfate

VIAHP (H5N1) : Virus *Influenza* aviaire hautement pathogène de sous-type H5N1

Liste des tableaux

Tableau 1 : Bilan des principales méthodes de concentration primaire validées pour les virus entériques dans les milieux hydriques naturels _____ 27

Tableau 2 : Bilan des principales méthodes de concentration secondaire _____ 28

1 Contexte, objet et modalités de traitement de la saisine

1.1 Contexte et objet de la saisine

Le délégué interministériel en charge de la lutte contre la grippe aviaire (DILGA) a saisi l'AFSSET, en octobre 2005, afin d'évaluer les risques pour la population générale et les travailleurs, liés à la présence de virus *Influenza* aviaries hautement pathogènes de sous-type H5N1 (VIAHP (H5N1)), dans les effluents aqueux et les eaux superficielles. L'AFSSET a rendu ses conclusions en février 2007, dans un rapport qui a été rendu public.

L'une des recommandations émises par le groupe de travail était « le renforcement de la collecte et la diffusion de données relatives à la contamination de l'eau dans les zones du territoire français où des oiseaux sauvages seraient retrouvés morts ».

Suite à la confirmation de cygnes morts contaminés par le VIAHP (H5N1), trouvés dans des étangs du département de la Moselle en juillet 2007, le DILGA a de nouveau saisi l'AFSSET, afin que soit proposée une stratégie de prélèvements et d'analyse d'eau pour la recherche de VIAHP (H5N1). Une note rédigée par l'AFSSET a donc été adressée au DILGA le 5 juillet 2007, dans ce sens (annexe 1) et des prélèvements et analyses d'eau ont été immédiatement réalisés par l'Institut Pasteur de Lille (IPL) sur le lieu même où les cygnes avaient été retrouvés morts.

Ce même jour, le DILGA a jugé nécessaire de pérenniser ce premier travail et a chargé l'AFSSET par courrier électronique, de définir une stratégie d'échantillonnage, un protocole de prélèvement dans les eaux de surface, les eaux usées et les supports solides en relation avec ces milieux hydriques (sable, sédiments, boues, etc.) et des méthodes analytiques appropriées pour la détection des VIAHP, en général et pour le sous type H5N1, en particulier.

1.2 Modalités de traitement de la saisine

Conformément à la procédure d'expertise collective de l'Agence s'appuyant sur l'utilisation de la norme NF X 50-110 relative à la qualité en expertise, la saisine a été présentée au comité d'experts spécialisés « Évaluation des risques liés aux eaux et aux agents biologiques » lequel lors de sa séance du 1^{er} octobre 2007, a accepté de prendre en charge le suivi de son instruction et a décidé qu'un groupe de travail soit constitué à cette fin.

Ce groupe de travail, nommé « VIAHP-Eaux : Stratégies d'échantillonnage », est composé de 10 experts, dont certains ont été mobilisés au sein du CES « Évaluations des risques liés aux eaux et aux agents biologiques ».

Le groupe de travail a pour mandat de :

- 1- définir une stratégie d'échantillonnage et de prélèvements ;
- 2- définir les méthodes analytiques les plus appropriées pour rechercher les VIAHP, en particulier de sous-type H5N1, dans les eaux de surface et autres supports environnementaux.

Pour mener à bien cette saisine, le groupe de travail s'est réuni 5¹ fois en formation plénière, entre octobre 2007 et octobre 2008. Deux réunions téléphoniques² ont également eu lieu au cours de l'instruction de cette saisine.

Les travaux des experts, tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques, ont été rapportés devant le CES « Évaluations des risques liés aux eaux et aux agents biologiques » par Madame Michèle LEGEAS, présidente du groupe de travail. Ainsi, le rapport produit tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres du CES.

Le rapport final a été adopté par le CES « Évaluations des risques liés aux eaux et aux agents biologiques », lors de la séance du 3 novembre 2008.

1 15 octobre 2007, 10 décembre 2007, 11 février 2008, 6 juin 2008, 12 septembre 2008

2 21 janvier 2008, 1er avril 2008

2 Méthode de réponse à la saisine

Le protocole défini ci-après a été rédigé en tenant compte :

- de la note méthodologique adressée par l'AFSSET le 5 juillet 2007 au DILGA, relative à la définition d'un protocole de prélèvement dans les milieux aquatiques à la suite de la découverte de 3 cygnes morts dans un étang en Moselle ;
- de l'analyse du retour d'expérience concernant la mise en œuvre et la réalisation des prélèvements d'eau effectués dans cet étang, suite à cette note ;
- d'une réflexion sur les raisons et les objectifs pour lesquels de tels prélèvements pourraient à l'avenir être demandés par les autorités sanitaires ;
- de l'état actuel des connaissances et des travaux en cours, concernant la recherche de ces virus dans les milieux aquatiques.

Ont également été inclus dans la réflexion les éléments de bibliographie et d'analyse des situations à risques, issus du rapport de l'AFSSET publié en février 2007 « Risques sanitaires liés à la présence de virus *Influenza* dans les eaux »

A partir de ces informations, le groupe de travail a élaboré ses recommandations concernant la mise en place d'une campagne de recherche du VIAHP (H5N1) :

- 1) en cas d'urgence sanitaire ;
- 2) en vue de l'amélioration des connaissances relatives à ce virus.

3 Synthèse du retour d'expérience relatif à la mise en œuvre et la réalisation des prélèvements dans les étangs de Moselle

L'analyse des conditions de réalisation de la précédente campagne de prélèvements ayant eu lieu dans les étangs de Moselle, a mis en évidence un certain nombre de points qui devront être préalablement précisés et formalisés, en cas d'une urgence telle que vécue lors de l'été 2007 :

1. Pour la préparation en amont de la campagne de prélèvements :
 - objectifs de la demande ;
 - lieu et typologie des sites de prélèvement ;
 - conditions de prélèvements ;
 - mesures de sécurité.

2. Pour la réalisation des prélèvements :
 - préparation du matériel ;
 - choix des techniques de prélèvement ;
 - choix des points de prélèvement ;
 - méthode de prélèvement et de première concentration *in situ*.

3. Pour le transport des échantillons :
 - modes de conditionnement des échantillons ;
 - conditions de transport des échantillons.

4. Pour l'analyse des échantillons :
 - laboratoires habilités ;
 - protocole d'analyse approprié ;
 - harmonisation des méthodes utilisées par les différents laboratoires habilités à traiter de tels échantillons en France et en Europe ;
 - définition des conditions de diffusion et de mise à disposition des résultats.

4 Objectifs d'une demande de prélèvements dans les milieux aquatiques

Le groupe de travail s'est interrogé sur les événements qui pourraient conduire à la mise en place de nouvelles campagnes de prélèvements et d'analyses du VIAHP(H5N1) sur le territoire français. En effet, la décision de mettre en œuvre de telles campagnes doit répondre à des objectifs clairs, dans la mesure où les stratégies de prélèvements et d'analyses vont en dépendre directement.

Il circule actuellement sur le territoire français, en Europe et plus généralement dans le monde, plusieurs sous-types de virus *Influenza* aviaires hautement pathogènes pour l'avifaune. Il s'agit des sous-types H5N1, H7N3 au Canada³, H7 en Bulgarie⁴ et H7N7 récemment découvert au Royaume-Uni⁵. Seul le sous-type H5N1 est actuellement responsable de cas graves de grippe aviaire dans la population humaine⁶. A ce jour, le niveau de risque pandémique pour le VIAHP (H5N1), défini par l'OMS est toujours de niveau 3 à savoir : pas ou très peu de transmission interhumaine⁷.

Les autorités sanitaires pourraient être conduites à faire une demande de recherche du virus dans les milieux aquatiques dans le but d'obtenir :

- une aide rapide à la décision afin de prendre toutes les mesures nécessaires pour réglementer l'accès de la population aux alentours des plans d'eau dans lesquels la présence du virus a été confirmée ;
- un accroissement des connaissances scientifiques afin d'améliorer la prévention du risque d'exposition de la population au virus.

Deux situations particulières nécessitent de rechercher des VIAHP (H5N1) dans le milieu aquatique ou les supports solides en relation avec ce milieu⁸ :

3 http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=weekly_report_index&admin=0; volume 20, 42-43, octobre 2007

4 http://www.oie.int/wahid-prod/reports/fr_imm_0000006752_20080201_180500.pdf

5 http://www.oie.int/wahid-prod/reports/fr_imm_0000007095_20080605_164926.pdf

6 http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/index.html

7 L'OMS définit 6 phases d'alerte internationales dans son plan mondial de préparation à une pandémie de grippe.

8 Le groupe de travail considère que la situation actuelle lui permet d'exclure tous les autres scénarii évoqués dans le rapport publié en 2007 : en l'absence d'élevage contaminé, les filières associées ne peuvent être concernées ; en l'absence de cas humain sur le territoire, les eaux résiduaires humaines ne peuvent être concernées.

- Lorsque des oiseaux sont morts contaminés par le VIAHP (H5N1).

Dans ce cas, les prélèvements seraient réalisés prioritairement dans l'eau et aurait pour but de répondre à la question suivante :

« Le virus est-il présent sous forme infectieuse dans les eaux naturelles proches des lieux où les oiseaux sont morts et dont les usages peuvent représenter un risque pour l'Homme ? »

La réponse à cette question doit permettre aux autorités sanitaires de réglementer ces usages et/ou les accès aux masses d'eaux.

- Lorsqu'une contamination par le VIAHP (H5N1) a lieu dans un élevage avicole.

Dans ce cas, l'eau à surveiller prioritairement en termes de probabilité de contamination serait celles issues de la destruction de l'élevage et les eaux de ruissellement pluvial sur l'aire de celui-ci.

La réalisation de la campagne de prélèvements et d'analyses aurait pour but de répondre à la question suivante :

« Le virus peut-il disséminer dans l'environnement via les milieux aquatiques ? »

La réponse à cette question doit permettre aux autorités sanitaires de décider d'étendre le périmètre de sécurité autour de l'élevage incriminé et de réglementer les usages des eaux naturelles à l'aval hydraulique de l'élevage concerné.

5 Synthèse bibliographique relative au traitement des échantillons

A ce jour, il n'existe pas de méthodologie universelle de détection alliant rapidité, sensibilité, spécificité, mise en évidence du pouvoir infectieux, qui permettrait l'analyse de matrices hydriques d'origines distinctes telles que les eaux de surface, de ruissellement ou chargées en sédiment.

Afin de choisir la méthodologie adaptée, il convient de réaliser un état des connaissances relatif à la recherche et la mise en évidence des VIAHP (H5N1) dans les milieux aquatiques.

Leur détection va se heurter principalement à deux problématiques :

1- La faible concentration des VIAHP (H5N1) dans les milieux hydriques :

La faible concentration des virus dans l'eau pourrait constituer un facteur limitant leur mise en évidence. De plus, l'état complexé ou adsorbé des particules virales sur les matières en suspension pourront, selon leurs tailles, la composition de la matrice et les courants hydriques, décanter au niveau des sédiments. Pour détecter ces particules virales dans un tel milieu complexe, des techniques suffisamment sensibles et adaptées devront être mises en œuvre.

2- L'action de facteurs environnementaux sur les virus :

Une fois excrétés dans le milieu hydrique, les virus seront soumis à l'action de différents facteurs naturels physiques (température, rayonnement ultra-violet, etc.), chimiques (pH, force ionique, etc.), ou biologiques (micro-organismes, métabolites microbiens, etc.), lesquels pourront accélérer ou ralentir leur inactivation. L'adsorption des particules virales sur les matières en suspension ou leur agrégation pourraient également avoir un effet protecteur sur les virus, tel que cela a déjà été montré pour les virus entériques (Espinoza *et al.*, 2008). Ces différents phénomènes interagissent entre eux de sorte que leur importance relative dans un milieu donné devrait être évaluée. En effet, ces phénomènes peuvent conduire à des faux négatifs (sous estimation du nombre de particules, problème de répétabilité et reproductibilité des résultats) qui auront un impact direct sur la qualité des résultats.

Dans ces conditions, pour détecter les VIAHP (H5N1) dans milieux variés, une ou plusieurs étape(s) de concentration des particules virales devront être mises en œuvre avant leur détection et/ou leur quantification au moyen de techniques suffisamment sensibles. Concernant les

sédiments, une extraction des virus adsorbés sur les particules solides devra être réalisée avant l'étape de concentration.

5.1 Concentration et extraction du virus dans les matrices environnementales

Ce chapitre a été rédigé en tenant compte des connaissances relatives aux virus *Influenza*, dont les caractéristiques ont fait l'objet d'une description détaillée dans le rapport de l'AFSSET « Risques sanitaires liés à la présence de virus *Influenza* aviaires dans les eaux » publié en février 2007.

5.1.1 Méthodes de concentration des virus pour les eaux naturelles décrites dans la littérature

L'étape de concentration a pour objectif d'obtenir sous un faible volume tous les virus présents dans l'échantillon à analyser. En raison de la concentration supposée faible des virus aviaires dans les eaux naturelles, de grands volumes d'eau doivent être filtrés, ce qui nécessite deux étapes successives, dites de concentration primaire et secondaire.

Les méthodologies employées lors de ces deux opérations de concentration sont très semblables, mais pour la clarté de l'exposé, elles seront détaillées successivement.

5.1.1.1 Méthode de concentration primaire

Différentes méthodes ont été employées pour la mise en évidence des virus *Influenza* aviaires dans les eaux de surface ou d'alimentation. Celles-ci reposent sur des principes de précipitation chimique (Markwell et Shortridge, 1982), d'adsorption sur érythrocytes (Ito et *al.*, 1995 ; Kalenkov et *al.*, 2008) ou d'adsorption-élution sur filtres (Roepke et *al.*, 1989 ; Sivanandan et *al.*, 1991).

Parmi ces méthodes, seules les techniques de concentration par adsorption-élution semblent adaptées à l'analyse de grands volumes d'eau. A l'origine, ces techniques furent principalement développées pour détecter les virus entériques dans les eaux environnementales (virus nus, entourés d'une simple capsid leur conférant une grande résistance aux conditions dénaturantes de l'environnement).

Elles permettent de concentrer les particules virales présentes dans 20 à 1000 litres d'eau sous un volume final d'une centaine de millilitres. Ces méthodes reposent sur la capacité des virus à se

fixer sur divers supports puis d'en être décrochés en faisant varier leurs propriétés de surface. D'une manière générale, la composition chimique des supports, leurs structures, les conditions de force ionique du milieu ou de la solution d'élution, ainsi que le pH, la présence de matière organique ou de protéines jouent un rôle fondamental dans l'adsorption et l'élution des virus.

Pour répondre à ces spécificités, différents supports présentant des charges de surfaces négatives, positives ou mixtes sont disponibles, tels que des membranes plates, des cartouches filtres de porosités distinctes ou carters remplis de laine ou de poudre de verre (Tableau 1).

- Supports électronégatifs : poudre de verre, membranes électronégatives

Ils permettent de retenir les virus chargés positivement mais leur usage est limitée et peu aisée. En effet, ils nécessitent pour être efficaces d'acidifier au préalable l'échantillon d'eau à concentrer. Pour qu'il y ait adsorption, les virus doivent être placés dans un milieu dont le pH est inférieur à leur point isoélectrique (pI) afin qu'ils se chargent positivement.

Cependant, l'acidification du milieu peut inactiver les VIAHP (H5N1) qui possèdent une enveloppe phospholipidique moins résistante aux conditions dénaturantes. Les virus *Influenza* aviaires H5 et H7 sont en effet sensibles aux pH acides (Webster et al., 1978 ; Scholtissek, 1984).

- Supports électropositifs ou mixtes : laine de verre, membranes électropositives

A l'inverse les méthodes fondées sur l'adsorption des virus sur des supports chargés positivement ou à charges mixtes, nécessitent des milieux de pH voisins de la neutralité. Il n'est donc pas nécessaire de traiter au préalable l'échantillon. La simplicité de l'utilisation de cette méthode, l'absence de traitement préalable de l'échantillon et les rendements satisfaisants obtenus notamment sur les virus entériques expliquent que la concentration sur ces supports ait été largement utilisée pour la détection de ces virus dans divers milieux hydriques. A titre indicatif, la technique de concentration sur laine de verre est recommandée par la norme AFNOR XP T90-451. Ces techniques ont été employées avec succès par différents laboratoires, lors d'études scientifiques ou de diagnostics spécifiques sur des eaux de surface ou de consommation artificiellement contaminées, pour détecter des virus aviaires de type H4N2, H13N2 ou H5N7 (Roepke et al., 1989 ; Sivanandan et al., 1991 ; IPL com pers, 2008). Ces techniques seraient donc à recommander dans le cas des VIAHP (H5N1).

Les virus fixés sur les filtres ou les membranes peuvent ensuite être élués par déstabilisation de leurs interactions avec le support :

- soit par augmentation du pH à l'aide d'une solution alcaline, jusqu'à une valeur n'inactivant pas le virus (généralement pH 9,5), dans le cas des supports chargés négativement. (Vilaginès et *al.*, 1998 ; norme AFNOR XP T90 451) ;
- soit par compétition avec des protéines ajoutées à la solution éluante comme les extraits de bœuf, (Vilaginès et *al.*, 1998 ; norme AFNOR XP T90 451), ou par ajout d'agents chaotropes, tels que le trichloracétate de sodium, dans le cas des supports chargés positivement (Vilaginès et *al.*, 1988).

Cependant pour les VIAHP (H5N1), il n'existe pas à ce jour d'étude permettant de comparer les rendements de concentration de ces méthodes dans différents types d'échantillons hydriques. Dans ce contexte et compte tenu de l'état actuel des connaissances il est difficile de prescrire une méthodologie plus précise. Cependant, il faut souligner que les supports sur laine de verre permettent sur des eaux relativement chargées en matières en suspension, de filtrer de plus grands volumes d'eau ; alors que les filtres se colmateront plus rapidement.

Notons enfin l'ultrafiltration tangentielle, qui est un procédé de séparation des particules en fonction de leur masse moléculaire au travers de membranes spécialement adaptées à cet usage. Cette méthode, applicable à tous types d'eaux, tous types de virus et tous types de volumes, ne nécessite pas d'étape d'éluion spécifique. Cependant, à ce jour, il n'existe pas d'études démontrant l'efficacité de la filtration tangentielle pour détecter les virus aviaires.

Le tableau ci-dessous présente un bilan des principales méthodes de concentrations primaires utilisées et validées pour les virus entériques, en précisant leurs avantages et leurs inconvénients dans le cas de prélèvements hydriques dans des espaces naturels. Elles constituent l'arsenal de base de méthodes disponibles pour la recherche des virus *Influenza* aviaires sous réserve d'être au préalable testées et évaluées.

Tableau 1 : Bilan des principales méthodes de concentration primaire validées pour les virus entériques dans les milieux hydriques naturels

Techniques	Avantages	Inconvénients
Adsorption-élution sur poudre de verre	<ul style="list-style-type: none"> • Ne se colmate pas donc applicable aux eaux chargées • Faible volume d'élution donc pas de concentration secondaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Non applicable sur le terrain • Virus doit supporter pH acide (nécessité d'acidifier l'eau)
Adsorption-élution sur laine de verre (norme AFNOR XP T90-451) (laine de verre borosilicatée type Bourre 725- Saint Gobain)	<ul style="list-style-type: none"> • Réalisation facile • Très faible colmatage • Pas de traitement préalable de l'eau (pas de modification du pH) • Applicable sur le terrain 	<ul style="list-style-type: none"> • Bien maîtriser la fabrication des cartouches de laine de verre
Adsorption-élution sur filtres électro négatifs (Filterite – DUO-FINE Pall) (Millipore filtre 0.45µ)	<ul style="list-style-type: none"> • Applicable sur le terrain • Pour faibles et grands volumes • Pour tous types d'eaux 	<ul style="list-style-type: none"> • Virus doit supporter pH acide (nécessité d'acidifier l'eau) • Traitement préalable de l'échantillon • Phénomène de colmatage du filtre (filtration frontale)
Adsorption-élution sur filtres électro positifs (Zetaplus – virosorb 1MDS CUNO) (ARGONIDE)	<ul style="list-style-type: none"> • Applicable sur le terrain • Pour faibles et grands volumes • filtration à pH neutre • Pour tous types d'eaux 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût élevé des membranes et des cartouches
Ultrafiltration tangentielle (VIVASCIENCES Vivaflow 50/200) (Millipore Pellicon 2) (SARTORIUS ultrasart-micro)	<ul style="list-style-type: none"> • Concentre rapidement de grands volumes • Membrane réutilisable 	<ul style="list-style-type: none"> • Technique sous pression • Problème colmatage • (débit faible)

5.1.1.2 Méthodes de concentration secondaire

La plupart des techniques de concentration primaire citées ci-dessus pourraient être utilisées pour l'étape de concentration secondaire, mais d'autres plus spécifiques sont préconisées à ce stade, telles que la floculation organique ou la précipitation au PEG.

- Floculation organique : elle s'obtient par acidification du concentrat primaire lorsque l'échantillon est de nature protéique. Cette technique est à proscrire dans le cas des virus aviaires, en raison de leur sensibilité aux pH acides.

- Précipitation au PEG : elle est réalisée par addition d'agents chimiques, tels que le chlorure d'aluminium ou de fer, le sulfate d'ammonium, l'hydroxyde de magnésium ou le polyéthylène glycol (PEG). Le PEG a montré son efficacité pour concentrer directement des souches de virus aviaires (Markwell et Shortridge, 1982).

Les techniques d'adsorption-centrifugation sur des érythrocytes de poulet (Roepke et *al.*, 1989, Sivanandan et *al.*, 1991), ainsi que celles basées sur le principe de l'immunocapture sont citées pour mémoire.

Le tableau ci-dessous présente un bilan des principales méthodes de concentrations secondaires essentiellement validées dans le cas des virus entériques, en précisant leurs avantages et leurs inconvénients dans le cas de prélèvements hydriques dans des espaces naturels (Tableau 2).

Tableau 2 : Bilan des principales méthodes de concentration secondaire

Techniques	Avantages	Inconvénients
Floculation organique	<ul style="list-style-type: none"> • Simple, économique et rapide 	<ul style="list-style-type: none"> • Résultats varient énormément selon le type de virus (sensibilité de certains virus au pH) • Rendement faible • Problème lors de la PCR (sensibilité diminuée)
Précipitation au PEG	<ul style="list-style-type: none"> • Simple, économique • Rendement très correct 	<ul style="list-style-type: none"> • Précipitation non spécifique
Hémadsorption	<ul style="list-style-type: none"> • Facile • Peu onéreux 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de la PCR
Immunocapture	<ul style="list-style-type: none"> • Spécificité 	<ul style="list-style-type: none"> • Coût élevé des Anticorps

5.1.2 Méthodes d'extraction des virus dans les sédiments

Dans le cas particulier des virus associés aux sédiments, il n'existe pas actuellement de données scientifiques concernant les méthodes d'extraction. Il n'existe donc pas de norme spécifique à la recherche des virus *Influenza* dans les sédiments. Néanmoins, un protocole pour la détection des entérovirus dans les boues résiduaires de station d'épuration est proposé dans la circulaire n°97/655 du 30 septembre 1997. Cette circulaire est relative aux recommandations sanitaires vis-à-vis des risques liés à l'épandage des boues résiduaires des stations d'épurations urbaines. Cette méthode n'a pas été appliquée à d'autre type de virus.

Pour les sédiments, il semble nécessaire d'éluer au préalable les virus adsorbés sur les matières en suspension avant de les concentrer. Pour ce faire, des méthodes d'élution reposant sur l'emploi de solutions à pH alcalin, contenant des protéines animales (extrait de bœuf, albumine, sérum de veau foetal) ou des tensio-actifs, combinées ou non à des traitements mécaniques (agitation) ou

physiques (ultra-sons), pourraient être envisagées. L'éluat obtenu serait ensuite concentré au moyen de l'une des techniques de concentration secondaire citées ci-dessus.

5.2 Méthodes de détection et d'analyse des virus

Seules les techniques suffisamment sensibles pour détecter un faible nombre de particules virales sont applicables dans le cas d'une recherche de virus dans des eaux naturelles.

Ces techniques visent soit :

- à détecter les virus après leur multiplication sur des lignées cellulaires adaptées (culture cellulaire *in vitro*) ou des œufs embryonnés (ovoculture) ;
- à détecter directement le génome après transcription inverse et amplification par réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) ;
- à détecter le génome viral par RT-PCR après multiplication dans les cellules ou les œufs embryonnés (ICC-RT-PCR).

5.2.1 Isolement et amplification sur cellules en culture ou œufs embryonnés

La multiplication des virus sur cellules ou sur œufs embryonnés constitue la seule technique sensible, spécifique⁹ et quantitative, permettant de témoigner du caractère infectieux des virus isolés (Annexe 2).

Concernant la mise en évidence des particules virales au travers de lignées cellulaires, il est indispensable de sélectionner plusieurs lignées, car elles ne présentent pas toutes la même sensibilité aux virus.

L'ovoculture, est utilisée pour la détection et la caractérisation des infections aviaires à virus *Influenza* (annexe 3). Elle consiste à faire se multiplier le virus au sein d'œufs embryonnés et à confirmer sa présence par un test d'hémagglutination. C'est également la technique de choix pour la recherche de virus *Influenza* dans les concentrats d'échantillons environnementaux de diverses provenances : eaux de surface (Markwell et Shortridge 1982 ; Sivanandan et *al.*, 1991 ; Ito et *al.*, 1995) ou d'eaux d'alimentation (Roepke et *al.*, 1989). Cependant, cette technique est relativement lente puisque le temps d'analyse est compris entre 2 jours (cas où les virus se sont multipliés rapidement) et 12 jours (multiplication virale lente ou nulle).

⁹ Sensibilité : capacité d'un test à identifier correctement les vrais positifs

Spécificité : capacité d'un test à identifier correctement les vrais négatifs

De manière générale, le temps de réponse de ces méthodes peut être gênant notamment en cas d'urgence sanitaire. En outre, ces techniques nécessitent un personnel spécialisé.

Les échantillons environnementaux concentrés peuvent contenir des micro-organismes, tels que des bactéries ou des *fungi* et contaminer des lignées cellulaires ou des œufs et donc les altérer. Une étape de décontamination préalable du concentrat sera nécessaire, soit par ajout d'antibiotiques ou d'antifongiques, soit par une centrifugation clarifiante, éventuellement suivie d'une filtration stérilisante du surnageant, si le traitement antibiotique devait échouer.

5.2.2 Détection par la technique de *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR)

Cette technique consiste à faire une rétro-transcription de l'ARN viral en ADN, puis à l'amplifier par réaction en chaîne. C'est une technique bien adaptée à la mise en évidence du génome des virus dans des échantillons hydriques environnementaux. A ce jour, de nombreux protocoles de RT-PCR qualitative ou quantitative, ont été mis au point par différents auteurs pour détecter des virus aviaires (Yuen et *al.*, 1998 ; Cooper et Subbarao, 2000 ; Tran et *al.*, 2004 ; Spackman et *al.*, 2002 ; Ward et *al.*, 2004 ; Ng et *al.*, 2005). Une étape préalable d'extraction de l'ARN viral est indispensable.

De nombreux systèmes d'extraction chimiques, physiques, enzymatiques ou combinés existent et pourraient être employés, après évaluation de leurs performances sur les virus *Influenza* aviaires.

La technique de détection par RT-PCR temps réel est très rapide (résultats en moins de 4 heures), sensible et spécifique. C'est l'outil de choix à préconiser en cas d'urgence sanitaire. Par ailleurs, les techniques moléculaires sont susceptibles de pouvoir mettre en évidence la présence de gènes de particules virales ne pouvant plus être détectées par culture cellulaire ou ovoculture telles que les particules virales agrégées ou inactivées, donc non infectieuses. L'utilisation de cette technique pourrait permettre de suivre une pollution virale plus ou moins ancienne, sans toutefois attester de la présence d'un risque infectieux. En effet, il semble très aléatoire dans l'état actuel des connaissances de vouloir relier la détection du génome viral à la présence du virus infectieux. En revanche, la présence de génome viral peut être considérée comme preuve d'une pollution virale, surtout dans le cas de virus « rares » comme les VIAHP(H5N1).

L'utilisation des techniques de RT-PCR nécessite cependant la prise en compte d'éventuels faux négatifs ou faux positifs qui pourraient conduire à l'obtention de résultats erronés :

- concernant les faux négatifs : la matrice environnementale est susceptible de renfermer des substances pouvant inhiber les enzymes intervenant dans la rétro-transcription ou dans l'amplification génique, aboutissant à un défaut d'amplification du gène. Ces

molécules inhibitrices sont de natures très diverses : polysaccharides (glycogène) et lypopolysaccharides, matière organique (acides fulviques, acides humiques, acides tanniques, etc.), ions (Ca^{2+} , Fe^{3+} , etc.), protéines, métaux lourds, détergents, urée, hémine, bilirubine, qui peuvent varier selon les matrices. Afin de limiter leurs actions, ces composés peuvent être éliminés ou masqués par un traitement adapté. Les faux négatifs peuvent être mis en évidence en additionnant au sein du mélange réactionnel des marqueurs internes (ADN exogène).

- inversement, la grande sensibilité de ces techniques peut être à l'origine de réponses faussement positives résultant d'une contamination inter-échantillon ou d'une diffusion de matrice ADN dans l'environnement du laboratoire après amplification.

5.2.3 Détection par le technique ICC-RT-PCR

La détection du génome viral par RT-PCR ne permet pas de témoigner du caractère infectieux du virus isolé. Il sera donc difficile d'interpréter des résultats issus de cette seule technique, en termes de gestion du risque pour la santé publique, lié à la présence de virus infectieux.

Afin de résoudre ce problème il est possible de combiner les deux approches décrites précédemment : multiplication du virus sur culture cellulaire puis détection et quantification du génome viral dans le surnageant de la culture, par RT-PCR quantitative. La multiplication des virus au sein des cellules infectées se traduira par une augmentation de la quantité de génome mesurée par RT-PCR quantitative, signant ainsi la présence de virus intacts et infectants dans l'échantillon analysé. Cette technique, déjà utilisée, notamment pour la recherche de virus entériques dans les eaux de surface, permet d'augmenter la sensibilité de la détection *via* l'intermédiaire de l'étape de multiplication intracellulaire. Par rapport à la culture cellulaire seule, elle offre l'avantage d'obtenir une réponse dans un délai plus court (12 à 24 heures). Cette méthodologie très prometteuse, présente cependant des inconvénients relatifs aux deux techniques couplées, à savoir : inhibiteurs de RT-PCR, faux positifs, nécessité de décontaminer les concentrats, sélection des cellules les plus adaptées, standardisation, etc.

Il est à noter que le résultat final est exprimé en termes qualitatifs attestant de la présence ou de l'absence de virus infectieux dans l'environnement.

5.3 Interprétation des résultats

Dans les échantillons environnementaux, les virus excrétés sont souvent en très faible nombre, peuvent se retrouver sous formes infectieuse, inactivées, agrégées ou adsorbées à des matières

en suspension. L'interprétation des résultats nécessite donc une prudence supplémentaire comparée à la détection des virus sur un animal malade ou mort.

Par ailleurs, comme mentionné plus haut, les virus étant au sein de matrices complexes, il y a des risques de faux positifs ou négatifs. Les points suivants devront être rappelés lors de la remise de résultats :

- ces méthodes ne sont pas standardisées ;
- elles permettent de mettre en évidence, soit la présence de virus infectieux (œuf embryonné, culture sur lignée cellulaire, ICC-RT-PCR), soit la présence de génome viral (RT-PCR) ;
- le génome viral mis en évidence peut provenir de virus non infectant ayant subi une dégradation plus ou moins importante. Cette présence peut découler d'une pollution virale plus ou moins ancienne et ne pas signifier la présence d'un risque sanitaire. Seule la présence de virus infectieux peut être interprétée en termes de gestion du risque pour la santé publique ;
- la quantité de virus infectieux présent dans un échantillon environnemental peut être sous-estimée en présence d'agrégat de particules virales ;
- les échantillons environnementaux, en particulier les sédiments, peuvent contenir des substances inhibitrices entraînant, soit une toxicité pour les cellules, soit un défaut d'amplification du gène. Les résultats obtenus seront d'autant plus fiables que ces composés auront été éliminés ou masqués préalablement par un traitement adapté.

A l'inverse, la grande sensibilité de ces techniques, notamment la RT-PCR, peut être à l'origine de réponses faussement positives, notamment lors de la contamination inter-échantillon ou par diffusion de matrice ADN dans l'environnement du laboratoire après amplification. En tout état de cause, le résultat issu de la RT-PCR devra systématiquement être confirmé par le séquençage du gène amplifié.

Les différentes étapes de concentration primaire, secondaire et extraction étant complexes, la perte de virus ou d'ARN viral au cours des différentes phases d'analyse peut être importante. L'efficacité de ces méthodes, en termes d'extraction des virus ou des ARN, ne pouvant à l'heure actuelle être mesurée de manière satisfaisante, les résultats ne pourront être exprimés qu'en termes de présence-absence ou en terme semi-quantitatif.

6 Propositions concernant les prélèvements et les analyses pour la recherche du VIAHP (H5N1) en cas d'urgence sanitaire

Compte-tenu du manque de données relatives aux caractéristiques du VIAHP(H5N1), le groupe de travail estime que la rédaction d'un guide « universel » n'est pas possible, pour un certain nombre d'étapes allant de la recherche du point de prélèvement au résultat de la détection virale. Néanmoins, les autorités sanitaires devront veiller à définir et à sélectionner des équipes qualifiées pour effectuer les prélèvements, notamment ceux destinés à la gestion d'une situation d'urgence. En effet, les prélèvements en situation d'urgence nécessitent une organisation parfaitement rodée. Le nombre et la localisation de telles équipes seront fonction de l'évolution de la situation sanitaire sur le territoire, au regard de la présence du VIAHP (H5N1).

6.1 Considérations générales

La campagne de détection du VIAHP(H5N1) dans les eaux de surface, ne sera mise en place qu'en cas de découverte de cadavres d'oiseaux chez lesquels la contamination par le VIAHP(H5N1) aura été confirmée ou très fortement suspectée.

Compte tenu des techniques de détection disponibles, le groupe de travail préconise de n'effectuer que des prélèvements d'eau, bien que l'opportunité d'une recherche du virus dans les sédiments ne soit pas à exclure. (cf. paragraphe 6.4.2).

L'objectif des prélèvements étant d'identifier une urgence sanitaire possible, les points de prélèvements se situeront entre la zone où ont été découverts des oiseaux morts et les points d'usages identifiés. Ces points d'usage ne peuvent faire l'objet d'une recommandation précise dans le présent rapport. Il s'agira d'appliquer, à partir d'une analyse par jugement d'expert, une méthodologie de prélèvement, faisant l'objet d'un suivi qualité et de réserver à des équipes qualifiées l'intervention sur le site.

Les enjeux de la commande de prélèvements et d'analyse devront être définis précisément, en fonction du niveau de risque pour les personnes éventuellement exposées.

6.2 Préparation de la campagne

6.2.1 Délai de mise en œuvre et calendrier

Le délai s'écoulant entre le moment où les autorités sanitaires seront informées de la présence possible du VIAHP(H5N1) dans un milieu aquatique et la réalisation des prélèvements destinés à la mise en évidence de ce virus, devra être le plus court possible, la pertinence des résultats en dépendant. De plus, une réponse rapide aux autorités sanitaires est essentielle pour que celles-ci puissent prendre les mesures de gestion des risques qui s'imposent pour la population générale et pour les travailleurs.

Afin que les opérations se déroulent dans les meilleures conditions, il convient de les hiérarchiser :

1. dans les 24 heures suivant l'alerte (oiseaux morts confirmés porteurs d'un VIAHP) : décision par les autorités sanitaires de lancer une campagne de prélèvements et mandatement de l'équipe habilitée disponible la plus proche du site ;
2. 1 à 2 jours (fonction du moment de l'alerte et de la distance du site) : préparation et réalisation des prélèvements par l'équipe de prélèvement mandatée ;
3. 2 jours après réception des échantillons : premières analyses et résultats pour « orientation » ;
4. 7 à 10 jours après réception des échantillons (dans les meilleures conditions) : confirmation du résultat et de l'éventuel caractère pathogène.

6.2.2 Les informations à réunir préalablement

Avant de déclencher la campagne de prélèvements, un certain nombre d'informations devront être réunies par les autorités concernées et les équipes en charge des prélèvements.

- Les autorités concernées veilleront à fournir les renseignements suivants aux équipes de prélèvement :
 - localisation précise du secteur où auront lieu les prélèvements : relevé des coordonnées géographiques (GPS) ; cartes au 1/25000, cadastre, etc. ;
 - nombre et superficie des plans d'eau du secteur ;
 - cartographie détaillée du plan d'eau ;
 - typologie du site ;

- si possible, dans des délais compatibles avec l'urgence, informations relatives à l'hydrodynamique des masses d'eau concernées (vitesse et débit, temps de séjour, zone d'influence amont, avale ou latérale, etc.) et éventuellement relative à leur gestion (présence de barrage, de vannes, d'écluses, etc.) ;
- usages à risques des milieux aquatiques concernés et leur localisation (fréquentation, accès) ;
- concernant les oiseaux morts : lieu exact du décès, nombre, espèce, si possible, niveau de maturité (juvénile ou adulte) ;
- photos du secteur où les oiseaux morts ont été retrouvés ;
- contact avec la personne responsable du site ou le connaissant bien.

Sans ces informations, la campagne de prélèvement serait très aléatoire, sinon vaine.

- l'équipe en charge de la réalisation des prélèvements, appréciera ses besoins en matériels spécifiques, en fonction des éléments fournis par les autorités concernées.

6.2.3 La mobilisation des acteurs concernés

Une telle campagne entrant dans le cadre d'une aide à la décision en urgence, les autorités compétentes doivent s'adresser au Préfet pour :

- obtenir le soutien logistique et les autorisations nécessaires à l'équipe en charge de la réalisation de ces prélèvements ;
- veiller à l'information de tous les acteurs concernés et du public si besoin ;
- assurer la coordination des différentes actions.

Afin de raccourcir au maximum les délais entre l'alerte et le lancement de la campagne de prélèvements, le groupe de travail recommande que les acteurs aient été préalablement identifiés, au moins dans les secteurs géographiques les plus à risques, afin de définir clairement leurs rôles :

- veiller à ce que l'organisme pilotant la campagne ait été clairement identifié. Le lancement de la campagne de prélèvement devra faire l'objet d'un mandat écrit missionnant officiellement l'organisme effectuant le prélèvement sur site ;

- le personnel d'astreinte (équipes de prélèvement et personnels de laboratoire) devra être identifié au sein des équipes habilitées.

Les équipes habilitées à réaliser les prélèvements devront appliquer les règles de bonnes pratiques ou les référentiels lorsqu'ils existent. Elles veilleront particulièrement au respect de la confidentialité et de la traçabilité de toutes les étapes de leur intervention.

6.2.4 Matériel à tenir à disposition

Le matériel et les véhicules devront être identifiés et répertoriés par l'équipe habilitée, vérifiés et prêt à embarquer. Cependant ce matériel ne sera pas nécessairement fourni par l'équipe habilitée. Une check-list est obligatoire. A titre d'exemple, le groupe de travail recommande :

- que le commanditaire mette à disposition l'équipement et le matériel indispensable pour le balisage, l'alimentation énergétique et les moyens permettant d'accéder aux points de prélèvements. A ce titre, il faudra pouvoir disposer d'un équipement de navigation et des équipements de protection des équipes. La décontamination biologique ultérieure de ces matériels incombera au propriétaire. Le groupe de travail propose que le matériel flottable soit mis à disposition par des services compétents en matière de risques biologiques (pompiers par exemple) ;
- pour les équipes de prélèvement, que tout le matériel nécessaire pour réaliser les prélèvements et les premières concentrations sur site soit disponible (bâches, équipements de prélèvement et de concentration avec leurs modes opératoires, équipements de sécurité et de décontamination des déchets, etc.).

6.2.5 Transport, arrivée sur les lieux et mesures de sécurité

Un périmètre de sécurité interdisant la zone à toute personne ne disposant pas d'une autorisation d'accès sera mis en place conformément aux recommandations relatives aux risques biologiques.

Seules les équipes habilitées à réaliser les prélèvements, munies d'une autorisation d'accès délivrée par le Préfet sous la forme de leur mandatement, pourront pénétrer à l'intérieur de ce périmètre de sécurité. L'ensemble du matériel nécessaire à la mise en œuvre des prélèvements, ainsi que les équipements de protection des personnes auront fait l'objet de listes préétablies. Ils seront tous amenés au plus près de la zone de prélèvement.

Actuellement, les virus *Influenza* sont classés sans distinction dans le groupe 2 défini par le décret relatif à la protection des travailleurs contre les risques résultant de leur exposition à des agents biologiques.¹⁰ Cependant, compte tenu de la pathogénicité du VIAHP (H5N1) pour l'Homme, il est recommandé d'appliquer à ce virus les mesures de prévention relatives aux agents biologiques de groupe 3.¹¹ Chaque équipe habilitée devra avoir réalisé au préalable la check-list du matériel de protection nécessaire et vérifier sa disponibilité avant toute intervention.

Les personnes habilitées à effectuer les prélèvements doivent donc être équipées des protections individuelles adéquates et valides définies dans les documents de référence, mentionnés ci-dessous :

- « Grippe aviaire et risques professionnels », dossier de l'Institut National de Recherche et de Sécurité pour la Prévention des Accidents du Travail et des Maladies Professionnelles (INRS), avril 2007 ;
- « Prévenir les risques liés à l'influenza aviaire », dossier interministériel (Agriculture et pêche ; Emploi, cohésion sociale et logement ; Transports, équipement, tourisme et mer), janvier 2006 ;
- « Influenza aviaire : Guide des mesures de protections individuelles dans la filière avicole en cas de suspicion ou de foyer avéré », dossier diffusé par la DRAF de Bretagne et par la CNAMTS, fiche non datée.

Au-delà du risque biologique, les équipes devront également respecter les conditions générales de sécurité physique, telles que le port d'un gilet de sauvetage sur les bateaux.

Enfin, le groupe de travail propose que les équipes soient accompagnées sur le site par un représentant de l'État, pour veiller à leur sécurité au regard de risques d'agression des préleveurs et pour veiller parallèlement au respect de la propriété individuelle, si celle-ci est concernée par l'intervention.

Bien que la probabilité d'exposition des travailleurs en France, à un VIAHP(H5N1), *via* les eaux de surface, ait été qualifiée de nulle à négligeable¹², le groupe de travail recommande qu'un suivi

10 Décret n°94-352 du 4 mai 1994 relatif à la protection des travailleurs contre les risques résultant de leur exposition à des agents biologiques (J.O., 6 mai 1994)

11 Note de service DGFAR/SDTE/N2006-5001DGAL/SDSPA/N2006-8015 du 18 janvier 2006 relatif à la prévention des risques professionnels concernant les travailleurs susceptibles d'être exposés à des volailles ou d'autres oiseaux, vivants ou morts, suspects d'être atteints ou atteints d'influenza aviaire à virus hautement pathogène, ou à tout produit ou sous-produit susceptible d'être contaminé, ou contaminé.

12 Rapport « Risques sanitaires liés à la présence de virus Influenza aviaries dans les eaux », AFSSET, février 2007

sérologique et clinique des travailleurs susceptibles d'avoir été exposés au VIAHP(H5N1), soit systématiquement effectué.

En effet, si aucun cas de contamination au VIAHP (H5N1) n'a jamais été montré chez des travailleurs exposés au virus du fait d'un métier exposant à l'eau, il n'en reste pas moins que des séroconversions sans symptômes cliniques restent possible. Il est alors important de pouvoir mesurer l'importance de ces formes chez les personnes susceptibles d'avoir été exposées au VIAHP(H5N1) et éventuellement d'analyser rétrospectivement leurs modalités de contamination. En outre, effectuer un suivi sérologique des travailleurs pourrait permettre de vérifier que les mesures de prévention qui ont été prises sont adéquates et de les revoir, le cas échéant.

6.3 Stratégie d'échantillonnage

En cas d'urgence sanitaire, les prélèvements dans les milieux aquatiques auront pour seul objectif de répondre à la question de la présence de virus dans l'eau.

Après concertations avec les autorités sanitaires et leurs représentants locaux, le groupe de travail préconise que les prélèvements soient réalisés :

1. Dans le cas d'une contamination de l'avifaune sauvage :
 - à proximité immédiate de la zone où les oiseaux sauvages confirmés ou suspectés d'être contaminés par VIAHP (H5N1) ;
 - en plusieurs points de la masse d'eau, susceptible d'être touchée par la contamination.

La définition précise de points de prélèvements ne pourra être faite *a priori* : elle sera totalement liée au site lui-même. Elle devra donc être faite sur la base d'un avis d'expert, en tenant compte de la localisation de points d'usage humains de la masse d'eau et des conditions hydrologiques locales. De même, pour la profondeur à laquelle le prélèvement sera réalisé, celle-ci sera déterminée en fonction des usages à risques et des caractéristiques de la masse d'eau.

2. Dans le cas du dépeuplement d'un élevage contaminé :
 - directement dans les eaux de lavage issues de l'opération de dépeuplement, au plus près de leur production, en tenant compte des produits de désinfection utilisés et de leurs modalités de mise en œuvre, l'objectif étant de vérifier l'absence du virus avant rejet ;
 - dans les eaux de ruissellement pluvial issues de l'aire de l'élevage contaminé, si nécessaire. Dans ce cas, le choix des points et des modalités de prélèvement sera réalisé sur avis d'expert, en tenant compte des risques de contamination humaine.

Le nombre d'échantillons à prélever sera déterminé au cas par cas en fonction des situations environnementales et des capacités de traitement par les laboratoires. Actuellement, les laboratoires ne peuvent prendre en charge que 4 échantillons par jour.

Il est important de noter que compte tenu du peu de laboratoires sur le territoire français, capables à ce jour de réaliser de telles analyses, il apparaîtrait impossible, en cas d'apparition de plusieurs sites contaminés, de mettre en œuvre de manière simultanée, plusieurs campagnes de prélèvement.

Toutefois, l'analyse des données de surveillance des foyers d'*Influenza* aviaire fournies par l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE), conduit à supposer que la probabilité d'apparition de plusieurs sites contaminés sur des portions de territoire non adjacentes, au même moment, est très faible voire nulle.

Cependant, si un tel cas devait se réaliser, il appartient aux autorités compétentes de définir les sites sur lesquels elles souhaiteraient prioritairement voir effectuer des prélèvements d'eau. A titre indicatif, les situations exposantes les plus à risque pour la santé des populations et des travailleurs sont décrites et hiérarchisées dans le rapport de l'AFSSET, publié en février 2007.

Le groupe de travail s'est interrogé, comme demandé dans la saisine, sur l'opportunité et la faisabilité de prélèvements de produits autres que l'eau. Au vu des limites analytiques actuelles pour ce type de virus, et dans le cadre de la stricte aide à la décision en situation d'urgence, il ne semble pas pertinent d'analyser d'autres produits que l'eau, en particulier des sédiments ou des boues. Leur prélèvement ne peut donc être envisagé que pour un éventuel stockage, en l'attente d'avancées analytiques (voir paragraphe 6.4.2). Toutefois, au moment de la rédaction du présent rapport, les conditions optimales pour un tel stockage restent à définir.

6.4 Protocoles de prélèvement

La qualité des prélèvements conditionne en grande partie la validité des analyses et donc l'interprétation des résultats. L'opérateur doit tout mettre en œuvre pour réaliser un prélèvement représentatif, conforme aux objectifs de la mesure demandée.

Si un protocole de prélèvement « guide » peut être mis en œuvre dans un grand nombre de situations, l'opérateur devra parfois s'adapter aux conditions du moment.

6.4.1 Protocole pour les prélèvements d'eau et étape de concentration sur site

Afin d'éviter le transport de grands volumes d'eau dans des conditions incompatibles avec la réglementation en vigueur¹³, notamment l'exigence d'un triple emballage de l'échantillon, il est préconisé d'opérer l'étape de concentration primaire directement sur site avec l'appareillage adapté. L'équipe réalisant les prélèvements devra fournir un document détaillant la méthodologie employée et relatant toutes les étapes de prélèvement ainsi que les incidents éventuellement survenus.

- Prélèvement

Le volume minimal d'eau de surface ainsi que les modalités de réalisation des prélèvements dépendront de chaque situation d'intervention. Ce volume devra scrupuleusement être noté. Le groupe de travail préconise un volume de l'ordre de 30 L par échantillon, afin d'augmenter la probabilité de trouver les virus, sans augmenter les difficultés de la première étape de concentration *in situ*. La hauteur de la lame d'eau prélevée, ainsi que les coordonnées précises de ce prélèvement seront définis, sur place, sur avis d'expert.

Les techniques de prélèvements dépendront du volume à collecter et du point de prélèvement. Il pourra s'agir d'un prélèvement au moyen d'un seau ou par le biais d'une pompe péristaltique, selon qu'il soit effectué de la berge, dans une buse d'écoulement, d'un pont ou d'un bateau.

Ce volume sera ensuite transféré dans des jerricans adaptés, puis acheminés jusqu'au point où sera effectuée l'étape de concentration.

- concentration primaire

En l'état actuel des connaissances, le groupe de travail recommande que la concentration sur site se fasse en utilisant un carter rempli de laine de verre, suivant la norme AFNOR XPT 90-451.

Si l'étape de concentration primaire n'est pas possible sur site, il devra être prévu de faire transporter les échantillons dans des conditions adaptées (cf. paragraphe 6.4.3).

Il est important de signaler que, eu égard au niveau de risque biologique pour l'opérateur et le personnel environnant, l'opération de concentration primaire devra s'effectuer sur site à l'aide du matériel adapté dans le respect des mesures de sécurité prévues à cet effet. Le transport des filtres contenant les échantillons concentrés en vue de la seconde partie analytique au laboratoire se fera selon les règles de sécurité en vigueur et en conditions réfrigérées.

¹³ Arrêté du 22 décembre 2006 modifiant l'arrêté du 1er juin 2001 modifié relatif au transport des marchandises dangereuses par route (dit « arrêté ADR »)

Ces opérations de prélèvement d'eau doivent être accompagnées de mesures physico-chimiques, telles que températures de l'eau et de l'air, conductivité (salinité), pH, oxygène dissous, turbidité, etc.

6.4.2 Protocole pour le prélèvement de sédiments

Le groupe de travail insiste sur le fait qu'en cas d'urgence sanitaire, le prélèvement de sédiments n'est pas prioritaire, car il existe peu de publications faisant état des modalités d'analyses de ce type d'échantillon. Cependant, si ces prélèvements sont techniquement possibles, ils doivent être réalisés. Ils seront ultérieurement étudiés en vue d'une amélioration des connaissances.

Il est à noter que dans le cadre du projet européen RIVERS SSPE-CT-2006-44405 « *Resistance of Influenza viruses in environmental reservoirs and systems* », l'Institut Pasteur de Lille doit évaluer les possibilités de transfert des méthodes existantes sur les virus entériques aux virus Influenza aviaires pour ce type d'échantillon¹⁴.

6.4.3 Emballage et transport des échantillons vers le laboratoire

Suivant la réglementation européenne¹⁵, les prélèvements suspectés de contenir des matières infectieuses pour l'homme doivent être transportés en triple emballage de sécurité de type ONU n°2814 classe 6-2-2.¹⁶ Ce triple emballage devra être constitué :

- d'un récipient primaire contenant l'échantillon prélevé ;
- d'un emballage secondaire étanche contenant une mousse absorbante ;
- d'un emballage extérieur suffisamment résistant dont la plus petite dimension extérieure ne doit pas être inférieure à 10 cm.

Les échantillons seront acheminés dans un délai maximal de 24 heures vers les laboratoires d'analyses habilités, à une température de 4°C et à un pH voisin de la neutralité.

14 Site de la commission européenne, http://ec.europa.eu/research/health/poverty-diseases/doc/influenza-research_en.pdf . Consulté en décembre 2008.

15 Directive 2006/89/CE de la Commission du 3 novembre 2006 portant sixième adaptation au progrès technique de la directive 94/55/CE du Conseil relative au rapprochement des législations des États membres concernant le transport des marchandises dangereuses par route.

16 Guide pratique sur l'application du règlement relatif au transport des matières infectieuses 2007-2008, WHO/CDS/EPR/2007.2
http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_EPR_2007_2_FRc.pdf. Consulté en décembre 2008

6.4.4 Décontamination du matériel sur site

La décontamination du matériel et des déchets sera prise en charge par l'équipe de prélèvement. Le matériel fourni par les autorités publiques sera décontaminé sous leur responsabilité.

Il convient de choisir les produits de désinfection les moins dangereux pour l'homme, en évitant notamment ceux qui contiennent du formaldéhyde, reconnu comme cancérigène avéré par le centre international de recherche pour le cancer (CIRC).¹⁷

6.5 Méthodes d'analyses

Le groupe d'experts recommande que les échantillons soient traités en laboratoire de niveau de sécurité biologique 3.

Les recommandations suivantes sont émises en l'état actuel des connaissances et sont limitées aux grands principes analytiques. Ces recommandations s'appuient également sur la méthodologie européenne de détection des virus *Influenza* aviaires à partir d'échantillons d'organes, d'écouvillons cloacaux ou d'écouvillons oropharyngés ou trachéaux d'oiseaux (annexe 2).

Les laboratoires en charge de la mise en œuvre des analyses devront harmoniser leur protocole analytique.

Suite à la concentration primaire les carters subissent une élution fractionnée. Une concentration secondaire est ensuite réalisée par une précipitation au PEG.¹⁸

Le volume obtenu après concentration secondaire sera réparti comme suit pour mise en œuvre des techniques correspondantes :

- 1 aliquot servira pour l'analyse en RT-PCR temps-réel

L'aliquot sera extrait à l'aide d'un kit commercial. Les extraits d'ARN seront analysés par RT-PCR selon la méthodologie harmonisée entre les laboratoires habilités.

17 Les produits figurant sur la liste des désinfectants agréés au titre de l'arrêté du 28 février 1957 relatif à la désinfection dans le cas de maladies contagieuses des animaux sont efficaces contre le virus de l'influenza aviaire hautement pathogène. Ils figurent sur le site public du ministère de l'agriculture et de la pêche.
www.e-phy-agriculture.gouv

Note de service du ministère de l'agriculture sur la prévention des risques professionnels (DGFAR/SDTE/N2006-5001 du 18 janvier 2006)

18 Compte-tenu des contraintes technologiques et humaines, seuls 4 échantillons pourront être traités par jour et par laboratoire (élution, concentration secondaire et extraction).

Compte tenu de l'évolution épidémiologique du virus, la séquence spécifique des amorces sera définie par des laboratoires de référence (communautaire ou de l'OIE). En cas de suspicion d'infection par le VIAHP(H5N1), la détection spécifique des gènes codant pour la protéine H5 sera faite en priorité. Si possible, la protéine N1 sera également effectuée par RT-PCR en temps réel. Si le résultat est positif (c'est-à-dire la mise en évidence au minimum du gène H5), un séquençage du gène H5 incluant la zone du site de clivage sera nécessaire, afin de déterminer le pouvoir pathogène et de confirmer le sous-type du virus.

- 1 aliquot servira pour l'amplification, soit par ovoculture, soit sur culture cellulaire

Cette étape permettra de démontrer la présence de particules virales infectieuses.

- Amplification par ovoculture

L'aliquot sera préalablement clarifié par centrifugation, traité par un mélange d'antibiotiques à large spectre, puis inoculé par voie allantoïdienne à 5 œufs embryonnés de poules. Après plusieurs jours d'incubation, les liquides allantoïdiens des embryons morts et des embryons survivants feront l'objet d'une recherche d'activité hémagglutinante (hématies de poule). En cas de résultat positif et en l'absence de contamination bactérienne ou fongique, le liquide allantoïdien constituera la solution de virus à identifier. Deux à trois passages sur œufs seront nécessaires avant de conclure négativement.

- Amplification par culture cellulaire

L'aliquot sera inoculé après traitement adéquat pour éliminer les bactéries et les fungi, à des cellules de rein de chien (MDCK-F25), utilisées pour mettre en évidence la présence de particules infectieuses de VIAHP(H5N1).

- 1 aliquot pour l'ICC-RT-PCR

L'aliquot sera inoculé après traitement adéquat pour éliminer les bactéries et les fungi, soit sur tapis cellulaire, soit sur œufs embryonnés. La mesure de génome sera effectué à T0 et T+1 ou 2 jours.

- 1 aliquot pour conservation à - 80°C pour analyse complémentaire ou contre-expertise

6.6 Diffusion des résultats

La demande de prélèvements dans les milieux hydriques émanant des autorités sanitaires, celles-ci seront obligatoirement seules destinataires des résultats. Le laboratoire ayant réalisé les analyses devra remettre les résultats dès que ceux-ci auront été confirmés.

Seules les autorités sanitaires décideront des informations à diffuser durant la phase de gestion de la situation d'urgence.

Le groupe de travail attire l'attention sur l'intérêt d'une diffusion élargie de ces résultats, une fois l'urgence sanitaire passée, en particulier auprès des scientifiques et experts impliqués dans les réflexions sur la préparation de la pandémie grippale.

7 Propositions en vue de l'amélioration des connaissances sur le VIAHP(H5N1)

Les objectifs du groupe de travail sont de faire progresser les connaissances scientifiques concernant les VIAHP (H5N1) afin de 1) faciliter la mise en place d'une veille sanitaire et 2) d'améliorer la gestion des risques.

Des recherches concernant la survie, dispersion, conservation du pouvoir pathogène dans le milieu naturel sont actuellement en cours de développement dans le cadre de programmes européens.¹⁹ Les propositions suivantes en tiennent compte.

Les épisodes d'influenza aviaires étant rares sur le territoire français, il serait souhaitable de profiter de la campagne de prélèvement réalisée lors d'une urgence sanitaire pour effectuer des prélèvements qui serviront dans le cadre du programme de recherche.

Le groupe de travail recommande que les études portent sur les trois domaines suivants :

- les modalités de recherche VIAHP(H5N1) dans les eaux et les matrices naturelles ;
- les conditions de survie et de conservation du pouvoir pathogène des VIAHP (H5N1) dans l'environnement aquatique ;
- les possibilités de transfert et de diffusion de ces virus *via* les milieux aquatiques et les produits associés : boues, sables, sédiments, etc.

Ces études seront réalisées selon une stratégie d'échantillonnage tenant compte de la spécificité du site, de l'emplacement des oiseaux contaminés et des conditions supposées de la dissémination des virus dans l'environnement (survie de plusieurs semaines dans le milieu, conditions hydrologiques, météorologiques, topographie, etc.)

7.1 Protocole de prélèvements et d'analyses

Le même protocole que décrit précédemment pour une situation d'urgence peut convenir, cependant celui-ci diffère sur quatre aspects :

- le contexte n'est plus celui de l'information pour l'aide à la prise de décision ;
- tout désordre lié à la situation d'urgence devra être évité ;

¹⁹ http://ec.europa.eu/research/health/poverty-diseases/doc/influenza-research_en.pdf

- le protocole devra être validé scientifiquement et correspondra à des objectifs précis.
- les résultats ne pourront être disponibles que dans des délais compatibles avec le rythme de la recherche.

Lors des campagnes de prélèvement, il serait souhaitable de constituer un dossier de suivi du site comportant les informations suivantes :

- historique du plan d'eau, usages ;
- mode de gestion (hydraulique et hydrologique) ;
- gestion halieutique ;
- contexte écologique général et spécifique (eutrophisation, etc.) ;
- données concernant la bathymétrie, la stratification, la courantologie ;
- caractérisation physico-chimique, bactériologique et virologique du milieu.

La responsabilité du choix du point de prélèvement incombera aux scientifiques, sauf exception justifiée, celui-ci devant respecter les règles établies au chapitre 6.3.

7.2 Choix de la nature des échantillons

Il apparaît important de prendre en compte la représentativité du prélèvement en fonction de l'aptitude du virus à se localiser à la surface des particules (complexes argilo-humiques, matières organiques, etc.).

Les prélèvements devront être réalisés dans le même périmètre que celui choisi pour effectuer les prélèvements en situation d'urgence sanitaire.

Ces prélèvements concerneront prioritairement les masses d'eau, mais pourront également, au fur et à mesure de l'avancée des techniques analytiques, concerner des fientes d'oiseaux, des sédiments, de l'herbe, ainsi que des mollusques filtreurs, lesquels sont des bio-concentrateurs naturels.

Ainsi, au moment du prélèvement il serait souhaitable :

- de récolter des fientes ou des plumes d'oiseaux contaminés, ce qui permettrait de réaliser ultérieurement des mesures de leur titre viral et des essais contrôlés de survie en laboratoire (étude en aquarium). Ces échantillons seront conditionnés pour être stockés au surgélateur pour des études ultérieures ;
- de mesurer certains paramètres physico-chimiques de l'eau (température, turbidité, teneur en chlorophylle laquelle est un indicateur de l'état trophique de la masse d'eau).

Le virus pouvant survivre plusieurs semaines comme indiqué dans le rapport de l'AFSSET « Risques sanitaires liées à la présence de virus *Influenza* dans les eaux », les campagnes de

prélèvement pourraient être répétées par exemple à J+15 et J+45, aux mêmes points que prélevés à J0.

7.3 Optimisation des techniques de détection et d'analyses du VIAHP (H5N1)

Actuellement, aucune méthode de détection optimisée et standardisée ne peut être préconisée. Dès qu'un protocole adapté aura été élaboré par un laboratoire pilote, il devra être diffusé à l'ensemble des laboratoires habilités.

Le groupe de travail a identifié deux axes de recherche principaux, sur la base des connaissances actuelles et des programmes de recherche initiés au niveau national et international.

- Optimisation des techniques de concentration, d'extraction et d'élution des virus

Ces techniques devront être mises au point et validées sur différents types d'eaux (eaux de pluies, eaux résiduelles, etc.), ainsi qu'à partir d'échantillons plus complexes tels que les boues, sédiments, sables, etc.

Le groupe de travail suggère de tester différentes méthodes de concentration des virus, directement dans le milieu aquatique, soit à l'aide de technique de piégeage adaptée aux caractéristiques du virus (en particulier les propriétés amphotères de son enveloppe), soit par l'utilisation d'organismes bio-accumulateurs, telles que les moules d'eau douce (*Unionidae*) ou d'eau de mer (*Mytilus edulis*). (Le Guyader et al., 2000 ; Le Guyader et al., 2003 ; Minier et al., 2006 ; Plusquellec et al., 1986)

De plus, il semble pertinent de rechercher ce virus dans des coquillages retrouvés sur le site, leur contamination étant moins fluctuante et plus persistante que dans les eaux surnageantes.

L'introduction de moules dans un étang contaminé pourrait être également envisagée, après une étude de faisabilité incluant l'impact de cette introduction sur l'équilibre de l'écosystème. En effet ces mollusques étant invasifs, il y a lieu de réfléchir au bénéfice d'une telle introduction.

- Optimisation des techniques de détection et d'identification des VIAHP(H5N1)

Les méthodes utilisées par les laboratoires habilités à traiter de tels échantillons devront être harmonisées. Il est à noter qu'en matière de santé animale, l'harmonisation des techniques de détection et d'identification des virus *Influenza* aviaires est déjà réalisée au niveau européen (annexe 2).

7.4 Diffusions des résultats

De telles campagnes de prélèvements et d'analyse supposent un budget important, donc un financement spécifique, sur appel d'offre. Les travaux étant produits après la phase de clôture de la situation d'urgence, il convient que les données recueillies lors de ces campagnes soient communiquées aux financeurs des travaux, à l'ensemble de la communauté scientifique, française et internationale, afin de faire progresser les connaissances. Il est probable, si le financement de ces campagnes est un financement supporté par un organisme public d'incitation à la recherche, qu'il soit exigé la production de publications scientifiques de haut niveau, dans des revues internationales. Cependant, compte tenu des retombées de santé publique, il pourra également être recommandé que les conclusions opérationnelles issues de ces programmes de recherche fassent l'objet d'une communication plus générale dans des revues professionnelles en langue française.

Par ailleurs, toutes les personnes pouvant être ultérieurement en contact avec les masses d'eau dont la contamination aurait été prouvée (intervenants, personnels d'entretien des plans d'eau, étudiants, personnels des laboratoires, etc.) devront être informées.

8 Conclusions et recommandations du groupe de travail

Les propositions faites par le groupe de travail ont été formulées sur la base du retour d'expériences de la campagne de prélèvements et d'analyses réalisée en 2007, dans les étangs de la Moselle.

Le groupe de travail souligne que ces propositions tiennent compte des limites des connaissances actuelles concernant les virus *Influenza* aviaires. Pour cette raison, la rédaction d'un « guide méthodologique détaillé » n'est pas possible. Un tel guide ne pourra pas voir le jour avant, au mieux, publication des résultats des grands programmes de recherche internationaux de type « RIVERS ».

La décision de mettre en œuvre des campagnes de prélèvements doit répondre à des objectifs clairement définis, dans la mesure où les stratégies de prélèvements et d'analyse vont en dépendre directement.

A l'issue de ce travail et des conclusions de l'expertise collective, compte-tenu :

- de la rareté des VIAHP(H5N1) d'origine environnementale, qui complique le travail de laboratoire de mise au point méthodologique,
- du défaut de mise en commun des données entre les laboratoires nationaux, européens et internationaux, relatives au VIAHP(H5N1).

Le groupe de travail recommande :

concernant la saisine initiale :

- une recherche systématique du virus *Influenza* aviaire dans l'eau, dès la découverte de cadavres d'oiseaux chez lesquels la contamination par VIAHP(H5N1) aura été confirmée ou fortement suspectée, selon les modalités définies dans le présent document ;
- la réalisation d'études expérimentales en laboratoire avec des virus *Influenza* faiblement pathogènes dans diverses matrices environnementales, en vue de l'acquisition et de l'amélioration des techniques de concentration et de détection des virus *Influenza* dans ces milieux.

en complément du contenu de la saisine initiale :

- la mise en commun au sein de la communauté scientifique nationale et internationale des données relatives aux VIAHP(H5N1) ;
- la rédaction d'un protocole d'accord entre pays pour que des équipes européennes aient l'autorisation d'effectuer des prélèvements d'eau dans les pays touchés par de l'*Influenza* aviaire hautement pathogène et réciproquement ;
- la mise au point d'une souchothèque nationale et internationale regroupant l'ensemble des prélèvements humains, animaux et environnementaux ;
- la transmission de nouvelles données à l'AFSSET par ses tutelles, au fur et à mesure de l'acquisition de celles-ci, afin que le groupe de travail puisse réactualiser le présent rapport.

9 Bibliographie

9.1 Publications

Cooper LA, Subbarao K. (2000). **A simple restriction fragment length polymorphism-based strategy that can distinguish the internal genes of human H1N1, H3N2, and H5N1 influenza A viruses.** *Journal of Clinical Microbiology*. 38 (7):2579-2583.

Espinosa AC, Mazari-Hiriart M, Espinosa R, Maruri-Avidal L, Méndez E, Arias CF. (2008). **Infectivity and genome persistence of rotavirus and astrovirus in groundwater and surface water.** *Water Research*. 42(10-11):2618-2628.

Ito T, Okazaki, K, Kawaoka, Y, Takada, A, Webster, R.G & Kida, H (1995). **Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs.** *Archives of Virology* 140 (7):1163-1172.

Khalenkov A, Laverb WG, Webster R G. (2008). **Detection and isolation of H5N1 influenza virus from large volumes of natural water.** *Journal of Virological Methods*. 149:180–183.

Le Guyader F, Haugarreau L, Miossec L, Dubois E, Pommepuy M, (2000). **Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish.** *Applied and Environmental Microbiology*. 66:3241-3248.

Le Guyader F, Neill FH, Dubois E, Bon F, Loisy F, Kohli E, Pommepuy M, Atmar R. (2003). **A semi-quantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak.** *International Journal of Food Microbiology*. 87: 107-112.

Markwell DD, Shortridge KF. (1982). **Possible waterborne transmission and maintenance of influenza viruses in domestic ducks.** *Applied and Environmental Microbiology*. 43 (1):110-115.

Minier C, Abarnou A, Jaouen-Madoulet, Le Guellec AM, Tutundjian R, Bocquene G, Leboulenger F.(2006). **A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*).** *Environmental. Toxicology and Chemistry*. 25 :12-119.

Ng EKO, Cheng PKC, Ng AYY, Hoang TL, Lim WWL. (2005). **Influenza A H5N1 detection.** *Emerging Infectious Diseases*. 11 : 1303-1305.

Plusquellec A, Beucher M, Le Gal Y. Bivalves : indicateurs de pollution microbienne des eaux littorales. GERBAM. Deuxième colloque international de bactériologie marine, CNRS. Brest, 1-5 octobre 1984. Ifremer. Actes de colloques, 3. 541-548.

<http://www.ifremer.fr/docelec/doc/1984/acte-1005.pdf>

Roepke DC, Halvorson DA, Goyal SM, Kelleher CJ. (1989). **An adsorption-elution technique for the recovery of influenza virus from water.** *Avian Diseases*. 33 (4): 649-653.

Scholtissek C. (1984). **Stability of infectious Influenza A viruses to treatment at low pH and Heating.** *Archives of Virology*. 85(1-2):1-11.

Sivanandan V, Halvorson DA, Laudert E, Senne DA, Kumar MC. (1991). **Isolation of H13N2 influenza A virus from turkeys and surface water.** *Avian Diseases*. 35 (4):974-977.

Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML. (2002). **Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes.** *Journal of Clinical Microbiology*. 40 :3256-3260.

Vilagines P, Sarrette B, Vilagines R. (1988). **Détection en continu du Poliovirus dans des eaux de distribution publique.** *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 307:171-176.

Ward CL, Dempsey MH, Ring CJA, Kempson RE, Zhang L, Gor D. (2004). **Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement.** *Journal of Clinical Virology*. 29: 179-188.

Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Murti KG. (1978). **Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks.** *Virology*. 84 (2): 268-278.

Yuen KY, Chan PK, Peiris M, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF. (1998). **Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza AH5N1 virus.** *The Lancet*. 351 : 467-471.

9.2 Normes

Norme AFNOR XPT 90-451 : **Essais des eaux - Recherche des entérovirus - Méthode par concentration sur laine de verre et détection par culture cellulaire.**

Norme AFNOR NF U47-210 : **Isolement des myxovirus aviaires hémagglutinants et recherche de leur activité hémagglutinante.** (En cours de finalisation).

9.3 Législation et réglementation

Note de service DGAL/SDSPA/N°2007-8162 du 5 juillet 2007 relative aux laboratoires d'analyses pour le diagnostic sérologique et virologique.

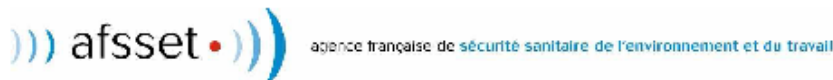
Circulaire n°97/655 du 30 septembre 1997 portant publication de recommandations sanitaires de la section des eaux du CSHPF vis-à-vis des risques liés à l'épandage des boues résiduelles des stations d'épurations urbaines.

ANNEXES

Annexe 1 : Note adressée au DILGA, relative à la définition d'un protocole de prélèvement dans les milieux aquatiques (Juillet 2007)

GT « VIA HP_eaux »

AFSSET, juillet 2007



Note relative à la définition d'un protocole de prélèvement dans les milieux aquatiques à la suite de la découverte de 3 cygnes morts en Moselle, étang de Villers, commune d'Assenoncourt.

Préambule :

Le prélèvement d'échantillons d'eau éventuellement contaminée par le VIA HP (H5N1) sur le territoire français a été recommandé par le groupe de travail de l'Afsset intitulé « Virus *Influenza* aviaires hautement pathogènes – Eaux » (avis de l'Afsset relatif au risque pour la population générale et les travailleurs lié à la présence de virus *Influenza* aviaires hautement pathogènes de sous-type H5N1 du 8 février 2007).

Suite à la confirmation de trois cygnes morts contaminées par le VIAHP (H5N1) le 4 juillet 2007, le 5 juillet, le DILGA a demandé à l'AFSSET de proposer une « stratégie d'échantillonnage d'eau pour la recherche de VIA HP (H5N1) dans le plan d'eau où des cygnes ont été retrouvés morts »

Faisant suite à cette demande, l'Afsset a réuni téléphoniquement et en urgence les experts le plus compétentes dans ce champ parmi les membres de son groupe de travail VIAHP – eaux, la présidente de son CES Eaux et Agents biologiques et un spécialiste de l'analyse microbiologique des eaux. Les experts participants à la réunion téléphonique d'urgence du 5 juillet 2007 à 16h30 étaient M. Kodjo, Mme Brugère-Picoux, Mme Rauzy, M. Moulin, Mme Legeas.

Recommandations des experts.

Après discussion sur les attentes avec les représentants du DILGA, les experts soulignent que :

- l'objectif de cette recommandation est l'amélioration des connaissances scientifiques sur l'excrétion du virus par l'avifaune sauvage, sa dissémination et sa survie, afin d'optimiser les recommandations de gestion des risques liés aux usages de milieux aquatiques éventuellement contaminés ;
- ces recommandations ont été faites sur la base des connaissances du moment, sur la base du rapport de l'avis de l'AFSSA de mars 2006 et sur la base des compétences des membres du groupe de travail ;
- la demande à laquelle répond la présente note est considérée comme une opportunité de progrès scientifique par les experts. Ils tiennent cependant à signaler qu'elle dépasse cependant leur mission à l'origine du groupe, dans la mesure où il s'agit de définir la mise en œuvre d'une opération et non seulement d'un point sur les connaissances.

et considérant :

- les informations communiquées lors du deuxième temps de réunion téléphonique, en présence de Mrs Perez et Tricard, de la DILGA (17h30 à 18h) concernant le lieu et les circonstances dans lesquels les oiseaux positifs au VIA HP (H5N1) ont été découverts : groupés dans l'étang de Villers, étang de près de 10 ha, situé sur la commune de Assenoncourt, réserve naturelle, sans usage récréatif autorisé ;

GT « VIA HP_eaux »

AFSSET, juillet 2007

- les nombreuses interrogations techniques, à ce jour, concernant la réalisation des prélèvements, de concentration des échantillons, d'éluion, de détection du virus, dans des échantillons d'eau, malgré les recommandations figurant dans l'annexe 2 de l'avis de l'Afssa de mars 2006 ;
- considérant le faible nombre de laboratoires disposant d'une autorisation « P3 » sur le territoire et l'obligation de biosécurité concernant la préparation, le transport et l'analyse d'échantillons contaminés par un virus hautement pathogène ;
- la méconnaissance des experts consultés concernant le plan d'eau et les modalités de son occupation par l'avifaune sauvage, qui peuvent conduire à une très forte dilution des virus dans l'eau, ou au contraire à permettre leur concentration dans une faible poche d'eau et/ou de sédiments ;
- les besoins de connaissances à l'origine de la recommandation sus-citée ;

les experts proposent que soit appliqué le protocole suivant :

- un point principal de prélèvement sera retenu : il s'agira du lieu où se trouvent concentrés le plus d'oiseaux (cygnes en particulier) à proximité immédiate du lieu où les oiseaux ont été trouvés morts; l'hypothèse servant de base à ce choix est que le virus a pu être émis là par les oiseaux morts, mais peut également continuer à être émis par d'autres membres de la colonie, porteurs asymptomatiques ou faiblement symptomatiques ; ce lieu est donc, a priori, celui où la probabilité de trouver le virus est la plus élevée ;
- des échantillons des sols où se trouvaient les cadavres d'oiseaux, ainsi que des échantillons de sédiments du site seront également collectés ; le volume prélevé dépendra des demandes des laboratoires chargés ensuite de l'analyse ;
- plusieurs techniques de prélèvement et de préparation des échantillons prélevés en ce point devront être appliquées : (i) concentration sur place sur cartouche de fibre de verre, précipitation, suivi d'une éluion et précipitation au PEG au laboratoire. (ii) filtration sur membrane sur place ; des dispositions devront être prises avec les ressources locales ou de proximité afin de rendre disponible sur le site un groupe de pompage ; les volumes d'eau traités dépendront de la technique (au moins un litre); il est recommandé qu'ils soient les plus importants possibles ;
- les cartouches ou filtres ainsi produits seront ensuite amenés dans des laboratoires de type P3 pour y être élués, concentrés et/ou analysés directement ;
- l'analyse sera réalisée par RT-PCR, l'objectif étant, non le dosage du titre viral, mais la mise en évidence de la présence du virus ;
- afin d'augmenter les chances de trouver le virus et de suivre son évolution dans le milieu, d'autres modes de prélèvement peuvent être envisagés ; la pertinence et la faisabilité d'accumulation du virus par piégeage, par des systèmes de type « gazes flottées », pour un virus comme le VIA HP (H5N1) devra être étudiée par des spécialistes.

Liste des laboratoires susceptibles de réaliser la détection du virus à partir des éluas concentrés : en annexe 1. Le laboratoire de type P3 mobilisable pour le prélèvement, la préparation et l'analyse du virus : laboratoire Pasteur de Lille, Pr. Delattre

L'annexe 2 présente la méthode de concentration et détection des virus entériques selon la norme XP T90-431

ANNEXE 1

Laboratoires agréés pour la recherche virologique de l'influenza aviaire par la méthode rRT-PCR

(cette liste sera élargie au fur et à mesure des nouveaux agréments)

LDAV de recherche virologique de criblage	Adresse
LDA 01	Site santé animale Chemin de la Mîche Cénord 01012 Bourg en Bresse Cedex, Tel : 04 74 45 58 00, fax : 04 74 23 60 35
LDA 21	2 ter, rue Hoche B.P. 678 - 21017 Dijon Cedex Tél : 03 80 63 67 70, fax : 03 80 43 54 52
LDA 22	5-7 rue du Sabot B.P. 54 - 22400 Ploufragan tel : 02 96 01 37 22, fax : 02 96 01 37 50
Laboratoire de Touraine	BP 67357 Le Bas Champigné Parçay Meslay 37073 Tours Cedex Tél : 02 47 49 44 47, fax : 02 47 49 44 00
LD 40	1 rue Marcel David - B.P. 219 - 40004 Mont de Marsan Cedex tel 05 58 06 0808 fax : 05 58 06 15 47
IDAC 44	Route de Gachet BP 80603 44306 Nantes cedex 03 Tel : 02 51 85 44 44, fax : 02 51 85 44 50

Annexe 2

Concentration et détection des virus entériques selon la norme XP T90-431

La concentration des virus entériques se fait par filtration de l'échantillon sur cartouche de laine de verre (norme XP T90-431). La préparation de la laine de verre se fait comme suit et est applicable pour tout type d'eau, mais sous certaines conditions, définies dans le tableau ci-dessous :

Echantillon	Cartouche de laine de verre		Stérilisation du filtre par traitement séquentiel				Conditions d'utilisation	
	Cartier	Laine de verre	Traitement acide (ml HCl 1M)	Rinçage eau distillée (ml)	Traitement basique (ml de NaOH 1M)	Rinçage eau distillée stérile	Débit maximum (l/h)	Volumes analysables (l)
Eaux Traitées /Eaux de Surface	42 mm	50g à 0.5g/cm2	200	1 000	200	Jusqu'à neutralité	50/100	100/10 à 100
Eaux Résiduaires								de 5 à 20

3.2.2.2- Récupération des virus fixés

Cette étape est subdivisée en plusieurs parties :

- **Elution sous un flux d'air** : Se fait avec 150mL de solution de glycine à 0,05M pH 9,5 additionné de 1,5mL d'antibiotique et 1,5 mL d'antifongique. Le pH de l'éluat est ramené à neutralité avec du Hcl à 1N.

- **Précipitation au PEG 6 000** : On ajoute à l'éluat 11,25g de PEG 6 000 et de 3,75g de NaCl, de manière à obtenir une concentration finale de 7.5% en PEG et de 2.5% en NaCl. On agite ce mélange pendant au minimum 1h à température ambiante, puis il est réparti dans des tubes stériles de 50ml à fond conique pour une centrifugation à raison d'environ 50ml par tube, et on les équilibre. La centrifugation se fait à 10900g, 90 minutes à 4°C. On élimine le surnageant de chaque tube. Les culots de virus sont repris par une solution Tris-HCl, EDTA (10,1mM) pH7 à raison de 150µl par tube.

- **2° Concentration** : par précipitation au PEG 6000, 24h à 4°C avant centrifugation à 15 000g, 1h. de l'ensemble des concentrats précédents. Le culot est dissous dans le tampon d'extraction ARN. Une fois les ARN extrait ils sont conservés à -20°C.

Annexe 2 : Méthodologie européenne pour la détection et la caractérisation des infections dues au virus *Influenza aviaire* dans des prélèvements d'origine aviaire

La détection des virus *Influenza*, dans le cadre de la santé animale, fait appel à des méthodes standardisées au niveau européen, la Commission européenne appuyant ce souci d'harmonisation.

Les méthodes et techniques standardisées sont proposées et validées sur la base de tests comparatifs associant des laboratoires nationaux de référence (LNR) pilotes. Elles sont ensuite mises à jour sur proposition des LNR par le laboratoire communautaire de référence (CRL), situé à Weybridge, au Royaume-Uni.²⁰

La Direction Générale "Santé et protection des consommateurs" (DG SANCO) de la Commission européenne a publié en 2006 après consultation des experts des États membres, un manuel de diagnostic européen pour l'influenza aviaire. (Décision n°2006/437/CE de la Commission²¹)

Les laboratoires nationaux des états membres se doivent d'appliquer les techniques standardisées figurant dans ce manuel européen pour toute étude ou diagnostic officiels. Elles peuvent également utiliser d'autres techniques, à condition d'avoir fait la preuve qu'elles sont de qualité au minimum équivalente.

La stratégie de détection des virus *Influenza* H5 et H7 chez les oiseaux est la suivante :

- Isolement viral sur œuf embryonné de poule : il est effectué à partir d'organes, mais aussi à partir d'écouvillons (trachéaux, oropharyngés) et cloacaux. Cette méthode est indiquée en première intention dans toutes les situations où l'on peut craindre un défaut des techniques moléculaires (nouveau foyer sans lien épidémiologique avec d'autres et pouvant donc impliquer un virus d'origine inconnue), car elle reste la méthode de référence.
- Détection moléculaire : elle est réalisée à partir des ARN extraits des écouvillons trachéaux ou oropharyngés et cloacaux, mais aussi des organes. Les techniques de RT-PCR quantitatives sont privilégiées en raison de leur très grande rapidité et de leur spécificité. Des techniques de RT-PCR-séquençage sont aussi mises en œuvre. Ces tests sont les suivants :

A- Par RT-PCR quantitative :

20 VLA Weybridge, Avian Virology, New Haw, Addlestone, Surrey KT15 3 NB, United Kingdom

21 http://www.defra.gov.uk/vla/science/sci_ai_reflab_prot.htm

- 1- détection du gène M (séquence très conservée du gène de la matrice) des virus *Influenza* de type A.
- 2- détection du gène H5 ou du gène H7 des virus *Influenza* aviaires H5 ou H7 de lignées eurasiennes (1 protocole par sous-type HA).
- 3- détection du gène H5 du virus H5N1 HP de la lignée Qinghaï (clade 2.2).
- 4- détection du gène N1 du virus H5N1 HP de la lignée Qinghaï (clade 2.2).

B- Par RT-PCR-séquençage (mis en œuvre en fonction des résultats des tests précédents)

- 5- détermination de la séquence du site de clivage de l'hémagglutinine pour connaître le pathotype de la souche correspondante (1 protocole par sous-type HA).

Avant que le manuel de diagnostic européen ne soit disponible, l'étape de travail 1 ainsi que l'étape 2 limitée aux virus H5 ont été délocalisées sur une base très précise par le LNR du fait de son implication très amont dans la validation de protocoles européens correspondants en tant que laboratoire pilote. Ces deux tests peuvent ainsi être réalisés par une douzaine de laboratoires d'analyses vétérinaires agréés par le Ministère de l'Agriculture français (annexe 4). Les autres essais sont réalisés exclusivement par le LNR, certains des protocoles étant mis en œuvre dans un cadre européen de mise au point et d'évolution des techniques (tests n°3 et 4 par exemple).

Il convient de noter que les LNR européens sont soumis annuellement à des essais inter-laboratoires organisés par le LCR et concernant toutes les étapes de détection, sous-typage et détermination du pouvoir pathogène. Le LNR français, quant à lui, organise annuellement des essais inter-laboratoires destinés à démontrer les aptitudes des laboratoires agréés pour la réalisation des étapes 1 et 2 précitées.

Annexe 3 : Isolement de virus *Influenza* aviaire par ovoculture

Dans le cadre de la santé animale, l'essai d'isolement de virus *Influenza* aviaire par ovoculture est réalisé par des laboratoires agréés (annexe 4). La méthodologie mise en œuvre est conforme au référentiel de bonnes pratiques de l'AFNOR ²² .

Une norme plus ciblée et plus précise que ce guide est en cours de finalisation à l'AFNOR. Elle devrait être soumise à enquête probatoire au cours du 2^e semestre 2008. Ses références seront : *Norme AFNOR NF U47-210 : Isolement des myxovirus aviaires hémagglutinants et recherche de leur activité hémagglutinante.*

Les prélèvements analysés doivent provenir d'oiseaux malades ou fraîchement morts et consistent en une liste bien définie d'organes broyés ou en des liquides d'écouvillonnage (écouvillons trachéaux ou oropharyngés, écouvillons cloacaux) clarifiés par centrifugation et préalablement soumis à l'action d'antibiotiques.

Chaque échantillon pour essai est inoculé par voie allantoïdienne à 5 œufs embryonnés provenant de poules exemptes d'anticorps anti-virus influenza, les embryons devant être âgés de 9 à 11 jours au moment de l'inoculation. Les œufs sont ensuite incubés à 37°C pendant 6 jours, période pendant laquelle ils sont mirés quotidiennement pour détecter une éventuelle mortalité embryonnaire. Les liquides allantoïdiens (LA) des embryons morts et des embryons survivants à l'issue de cette période font l'objet d'une recherche d'activité hémagglutinante (hématies de poule). En cas de résultat positif, et en l'absence de contamination bactérienne ou fongique, ce LA constitue la solution de virus à identifier. En cas de résultat négatif, ce même LA fait l'objet d'un second et dernier passage sur œufs embryonnés de poules dans les mêmes conditions que précédemment.

Une petite variante méthodologique, autorisée en France, porte sur le délai d'incubation des œufs après inoculation (3 à 4 jours au lieu de 6) et sur le nombre de passages (3 au lieu de 2).

²² « Guide de bonne pratique, ovoculture virale », référencé BP U47-555 .

Annexe 4 : Laboratoires d'analyses agréés pour le diagnostic sérologique et virologique



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE
ET DE LA PÊCHE

<p>Direction générale de l'alimentation</p> <p>Sous-direction de la santé et de la protection animales Bureau santé animale Adresse : 251, rue de Vaugirard 75 732 PARIS CEDEX 15</p> <p>Dossier suivi par : Hélène SADONES Tél. : 01 49 55 80 18</p> <p>Réf. interne : BSA/ 07 04 060</p>	<p>NOTE DE SERVICE</p> <p>DGAL/SDSPA/N2007-8162</p> <p>Date: 05 juillet 2007</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date de mise en application : **immédiate**

Nombre d'annexes : **2**

Objet : PESTES AVIAIRES : laboratoires d'analyses pour le diagnostic sérologique et virologique

Références :

Note de service DGAL/SDSPA/N°2007-8002 du 2 janvier 2007

Mots-clefs : plans d'urgence, maladie de Newcastle, influenza aviaire, laboratoires d'analyses

Résumé :

La présente note de service précise la liste des laboratoires agréés pour la réalisation des analyses **sérologiques** et **virologiques** relatives aux pestes aviaires. Elle abroge et remplace la note de service DGAL/SDSPA/N°2007-8002 du 2 janvier 2007.

DESTINATAIRES	
<p>Pour exécution :</p> <ul style="list-style-type: none">- Directeurs des Services vétérinaires- Laboratoires Vétérinaires Départementaux- AFSSA Ploufragan LNR pestes aviaires	<p>Pour information :</p> <ul style="list-style-type: none">- Préfets- DRAF/DAF- DDAF- Contrôleurs Généraux des Services Vétérinaires- Brigade Nationale d'Enquêtes Vétérinaires- Directeurs des Ecoles Nationales Vétérinaires- Directeur de l'Ecole Nationale des Services Vétérinaires- Directeur de l'INFOMA

La présente note de service précise la liste des laboratoires agréés pour la réalisation des analyses **sérologiques** et **virologiques** relatives aux pestes aviaires (cf annexes). Elle abroge et remplace la note de service DGAL/SDSPA/N°2007-8002 du 2 janvier 2007.

Ces laboratoires agréés sont notamment sollicités dans le cadre du dispositif de surveillance influenza aviaire mis en place sur l'ensemble du territoire pour des analyses sérologiques (IHA ou IDG) et virologiques (PCR).

En cas de suspicion clinique de pestes aviaires, sont sollicités en priorité les deux laboratoires agréés pour l'ovoculture (LDA22 et LDV01).

Vous voudrez bien me faire part des difficultés que vous pourriez rencontrer dans l'application de ces instructions.

Le sous-directeur de la santé et de la protection animales
Olivier FAUGERE

ANNEXE 1
Liste des laboratoires agréés

LABORATOIRES AGREES POUR LA RECHERCHE D'INFLUENZA AVIAIRE ET DE MALADIE DE NEWCASTLE		SEROLOGIES			VIROLOGIE	
		Newcastle	Influenza aviaire		Influenza aviaire	Newcastle et Influenza aviaire
Laboratoire	Nom	IHA	IDG	IHA	RT-PCR	ovoculture
AFSSA	AFSSA, Ploufragan – unité VIPAC	LABORATOIRE NATIONAL DE REFERENCE				
LVD 01	Laboratoire Vétérinaire Départemental de l'Ain	agréé	agréé	agréé	agréé	agréé
LVD 14	Laboratoire départemental Franck Duncombe				agréé	
LVD 21	Laboratoire départemental de la Côte d'Or				agréé	
LDA 22	Laboratoire de Développement et d'Analyses	agréé	agréé	agréé	agréé	agréé
LDA 24	Laboratoire Départemental d'Analyse et de recherche		agréé	agréé	agréé	
LVD 29	IDHESA Bretagne Océane	agréé				
LVD 30	Laboratoire départemental d'analyses				agréé	
LVD 31	Laboratoire Vétérinaire Départemental d'Aucamville	agréé		agréé	agréé	
LVD 37	Laboratoire de Touraine				agréé	
LVD 40	Laboratoire Vétérinaire Départemental des Landes	agréé	agréé	agréé	agréé	
IDAC 44	IDAC Nantes	agréé	agréé	agréé	agréé	
LVD 49	Laboratoire Vétérinaire Départemental d'Angers	agréé	agréé	agréé		
LVD 62	Laboratoire Départemental d'Analyses		agréé			
LVD 67	Laboratoire vétérinaire départemental de Strasbourg				agréé	
LVD 72	Laboratoire Vétérinaire Départemental du Mans	agréé	agréé	agréé		
LVD 79	Laboratoire d'Analyses et de Sécurité Alimentaire				agréé	
	Bio Chêne Vert	agréé				

ANNEXE 2
 Coordonnées des laboratoires cités en annexe 1

Laboratoire	Nom	Adresse	Contacts
AFSSA	AFSSA, Ploufragan Unité VIPAC	Les Croix BP 53 22440 PLOUFRAGAN	Tel : 02.96.01.62.22 Fax : 02.96.01.62.53 v.jestin@ploufragan.afssa.fr jp.picault@ploufragan.afssa.fr
LVD 01	Laboratoire Vétérinaire Départemental de l'Ain	Chemin de la Miche CENORD 01012 BOURG EN BRESSE	Tel : 04.74.45.58.00 Fax : 04 74 23 60 35 lda01@cg01.fr daniel.baroux@cg01.fr
LVD 14	Laboratoire départemental Franck Duncombe	1 route de Rosel 14280 SAINT CONTEST	Tel : 02 31 47 19 19 fax : 02 31 47 19 00 ou 02 31 95 36 15 f.dorey@cg14.fr g.fortier@cg14.fr
LVD 21	Laboratoire départemental de la Côte d'Or	2 ter, rue Hoche B.P. 878 - 21017 DIJON Cedex	Tél : 03 80 63 67 70 Fax : 03 80 43 54 52 ldco@cg21.fr
LDA 22	Laboratoire de Développement et d'Analyses	7, rue du Sabot BP 54 22440 PLOUFRAGAN	Tel : 02.96.01.37.22 Fax : 02 36 01 37 50 JBUFFEREAU@lda22.com NVASSALO@lda22.com LMIELI@lda22.com
LDA 24	Laboratoire Départemental d'Analyse et de recherche	161 Av. W. Churchill 24880 COULOUNIEIX- CHAMIERIS	Tel : 05.53.09.56.71 ou 05 53 06 80 00 Fax : 05.53.09.88.22 cg24.lidar.direction@dordogne.fr
LVD 29	IDHESA Bretagne Océane	ZA de Créac'h-Gwen 22, av. de la plage des Gueux 29334 QUIMPER Cedex	Tel : 02.98.10.28.88 Fax : 02.98.10.28.60 eric.laporte@idhesa.fr laurent.caquineau@idhesa.fr
LVD 30	Laboratoire Départemental d'Analyse	ZAC du Mas des abeilles 970, route de Saint Gilles 30000 Nîmes	Tel: 04.66.04.30.70 Fax: 04.66.04.30.90 allamigeon_m@cg30.fr
LVD 31	Laboratoire Vétérinaire Départemental d'Aucamville	76, chemin Boudou BP 87 31140 LAUNAGUET	Tel : 05.62.79.94.20 Fax : 05.62.79.94.30 lvd31@cg31.fr viviane.moquay@cg31.fr
LVD 37	Laboratoire de Touraine	Le Bas Champeigné Parcoay Meslay 37082 TOURS Cedex 2	Tél : 02 47 49 50 80 ou 02.47.29.44.30 Fax : 02 47 49 50 81 ou 02.47.29.44.00 jbind@cg37.fr
LVD 40	Laboratoire Vétérinaire Départemental des Landes	1 rue Marcel David BP 219 40004 MONT DE MARSAN Cedex	Tel : 05.58.06.08.08 Fax : 05.58.06.15.47 labo.depart40@cg40.fr alain.mesplede@cg40.fr
IDAC 44	IDAC Nantes	Route de Gachet La chantrerie BP 80603 44306 NANTES Cedex 03	Tel : 02.51.85.44.44 Fax : 02.51.85.44.50 idac@cg44.fr jcheval@cg44.fr
LVD 49	Laboratoire Vétérinaire Départemental d'Angers	18, bd Lavoisier BP 20943 49009 ANGERS Cedex 01	Tel : 02.41.22.68.00 Fax : 02.41.22.68.10 regie.lvd@cg49.fr y.portejoie@cg49.fr

Laboratoire	Nom	Adresse	Contacts
LVD 62	Laboratoire Départemental d'Analyses	Parc des Bonnettes 2, rue du Genévrier SP18 62022 ARRAS Cedex	Tel : 03 21 51 46 54 Fax : 03 21 71 48 55 lda62@cg62.fr
LVD 67	Laboratoire vétérinaire départemental de Strasbourg	2 place de l'Abattoir 67200 STRASBOURG	Tel : 03 90 20 65 20 Fax : 03 90 20 65 36 lvd.67@cg67.fr norchen.chenoufi@cg67.fr
LVD 72	Laboratoire Vétérinaire Départemental du Mans	128, rue de Beaugé 72018 LE MANS Cedex 2	Tel : 02.43.39.95.70 Fax : 02.43.39.95.80 jean-marie.berthion@cg72.fr laboratoire@cg72.fr
LVD 79	Laboratoire d'Analyses et de Sécurité Alimentaire	ZI Montplaisir 79220 CHAMPDENIERS SAINT DENIS	Tel : 05 49 25 31 10 Fax : 05 49 25 31 12 p.charollais@cg79.fr
	Bio Chêne Vert	ZI de Bellevue II - BP 82101 35221 CHATEAUBOURG Cedex	Tel : 02 99 00 33 43 biochenevert@chene-vert.com secretariat@chene-vert.com

Annexe 5 : Synthèse des déclarations publiques d'intérêts des experts par rapport au champ de la saisine

RAPPEL DES RUBRIQUES DE LA DÉCLARATION PUBLIQUE D'INTÉRÊTS

IP-A	Interventions ponctuelles : autres
IP-AC	Interventions ponctuelles : activités de conseil
IP-CC	Interventions ponctuelles : conférences, colloques, actions de formation
IP-RE	Interventions ponctuelles : rapports d'expertise
IP-SC	Interventions ponctuelles : travaux scientifiques, essais, etc.
LD	Liens durables ou permanents (Contrat de travail, rémunération régulière ...)
PF	Participation financière dans le capital d'une entreprise
SR	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Parents salariés dans des entreprises visées précédemment)
SR-A	Autres liens sans rémunération ponctuelle (Participation à conseils d'administration, scientifiques d'une firme, société ou organisme professionnel)
VB	Activités donnant lieu à un versement au budget d'un organisme

SYNTHÈSE DES DÉCLARATIONS PUBLIQUES D'INTÉRÊTS DES MEMBRES DU CES PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

NOM	Prénom <i>Rubrique de la DPI</i> Description de l'intérêt <i>en cas de lien déclaré</i>	Date de déclaration des intérêts
Analyse Afsset :		

ABSI Rafik		21 juin 2007 09 juillet 2008
Analyse Afsset : /	Aucun lien déclaré	
BALLET Jean-Jacques		20 juin 2007
Analyse Afsset : /	Aucun lien déclaré	

BERJEAUD Jean-Marc	20 juin 2007 09 juin 2008
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
BOUDENNE Jean-Luc	05 juillet 2007 13 juin 2008 19 octobre 2008
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
BRUGÈRE-PICOUX Jeanne	04 juillet 2007
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
CABILLIC Pierre-Jean	25 juin 2007 16 novembre 2008
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
CAMUS Patrick	04 mai 2007 20 juin 2008 25 novembre 2008
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
CREPPY Edmond E.	21 juin 2007 14 octobre 2008
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
CUDENNEC Christophe	04 mai 2007 16 octobre 2008
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	
DAGOT Christophe	03 mai 2007 15 octobre 2008 16 octobre 2008
Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset : /	

DUKAN Sam	03 juillet 2007 30 novembre 2008
Aucun lien déclaré Analyse Afsset : /	
GEHANNO Jean-François	04 mai 2007 16 juin 2008
Aucun lien déclaré Analyse Afsset : /	
GILLI Éric	02 juillet 2007
Aucun lien déclaré Analyse Afsset : /	
GUT Jean-Pierre	04 mai 2007 06 juin 2008
Aucun lien déclaré Analyse Afsset : /	
HILAIRE Didier	04 mai 2007
Aucun lien déclaré Analyse Afsset : /	
HUMBERT Jean-François	10 juillet 2007
Aucun lien déclaré Analyse Afsset : /	
LAKEL Abdel	04 mai 2007 22 octobre 2008 30 novembre 2008
Aucun lien déclaré Analyse Afsset : /	
LE BÂCLE Colette	04 mai 2007
Aucun lien déclaré Analyse Afsset : /	
LEDRU Éric	04 mai 2007

	Aucun lien déclaré	
Analyse Afsset :	/	
MARCHANDISE	Patrick	03 juillet 2007 17 octobre 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
MATHIEU	Laurence	03 juillet 2007 08 juillet 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
MOGUEDET	Gérard	1 ^{er} octobre 2007
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
MORIN	Anne	04 mai 2007
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
MOUNEYRAC	Catherine	04 mai 2007 13 juin 2008 26 novembre 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
OCCHIALINI-CANTET	Alessandra	19 juillet 2007
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
POURCHER	Anne-Marie	03 juillet 2007 18 juin 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
RAUZY	Sylvie	02 juillet 2007 10 juin 2008
	LD	
	Directeur de la Prospective et des Relations Extérieures au CRECEP (Centre de recherche,	

Analyse Afsset :	d'expertise et de contrôle des eaux de Paris) depuis 2006 Pas de risque de conflits d'intérêts majeur.	
RUNIGO-MAGIS	Renée	03 juillet 2007 13 juin 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
SAUVANT-ROCHAT	Marie-Pierre	05 juillet 2007 11 juin 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
TANDEAU DE MARSAC	Nicole	03 juillet 2007
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
TREMBLAY	Michèle	04 juillet 2007 16 juin 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
TRIBOLLET	Bernard	04 mai 2007 20 septembre 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	
VILLENA	Isabelle	19 juillet 2007 10 juin 2008
Analyse Afsset :	Aucun lien déclaré /	

SYNTHÈSE DES DÉCLARATIONS PUBLIQUES D'INTÉRÊTS DES MEMBRES DU GT PAR RAPPORT AU CHAMP DE LA SAISINE

NOM	Prénom <i>Rubrique de la DPI</i> Description de l'intérêt	Date de déclaration des intérêts
Analyse Afsset :		
BRUGÈRE-PICOUX	Jeanne Aucun lien déclaré	04 juillet 2007
Analyse Afsset :	/	
LAHEURTE	Jean-Loup <i>LD</i> Directeur général adjoint de IRH Environnement jusqu'au 1 ^{er} avril 2008	23 janvier 2007
Analyse Afsset :	Compétences indispensables pour les travaux d'expertise*. Pas de risque de conflits d'intérêts majeur.	
LEGEAS	Michèle Aucun lien déclaré	29 novembre 2005 15 septembre 2008
Analyse Afsset :	/	
MARCHANDISE	Patrick Aucun lien déclaré	03 juillet 2007 17 octobre 2008
Analyse Afsset :	/	
MOULIN	Laurent	19 septembre 2007 24 juillet 2008

* Afin de prendre en compte les travaux réalisés par d'autres organismes (à activité commerciale ou non) dans le domaine des protocoles de prélèvement dans les milieux aquatiques et des méthodes analytiques pour la détection des virus *Influenza* aviaires dans les eaux, une information a été faite à ces structures pour leur demander si elles souhaitaient participer aux travaux.

<p>LD</p> <p>Responsable R&D Biologie au CRECEP (Centre de recherche, d'expertise et de contrôle des eaux de Paris) depuis 2007</p> <p>Analyse Afsset : Compétences indispensables pour les travaux d'expertise*. Pas de risque de conflits d'intérêts majeur.</p>		
<p>POMMEPUY Monique</p> <p>Analyse Afsset : /</p> <p>Aucun lien déclaré</p>		<p>18 novembre 2005</p> <p>24 juillet 2008</p>
<p>VIALETTE Michèle</p> <p>LD</p> <p>Chef de Service à l'Institut Pasteur de Lille</p> <p>Analyse Afsset : Compétences indispensables pour les travaux d'expertise*. Pas de risque de conflits d'intérêts majeur.</p>		<p>13 septembre 2007</p> <p>16 juillet 2008</p>

ORGANISME-EXPERT PARTICIPANT

L'AFSSA, représentée par MM. Benoît GASSILOUD et Jean-Paul PICAULT, a signé une attestation, le 09 janvier 2009, garantissant l'absence de liens de nature à présenter un conflit d'intérêt avec le champ de la saisine.

Notes



))) **afsset** .)))
agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

253, avenue du Général Leclerc
94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél. +33 1 56 29 19 30
afsset@afsset.fr
www.afsset.fr

ISBN 978-2-11-098499-9

