REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de Yahia Fares MEDEA
Faculté Science de la nature et de la vie

Projet de fin d'études en vue de l'obtention du de MASTER
Filière : Science de la nature et de la vie
Option : Immunologie et maladies infectieuses

ETUDE SEROLOGIQUE DE LA MALADIE DE MAREK

Présenté par :

AMEUR KAWTHER

Devant le jury :

Président(e) :	BACHENE MOHAMED	MCB	UYFM
Examinateur :	MESSAI C R	MCA	ENSV
Promoteur :	SALHI O	MCB	UYFM
CO-Promoteur :	RAHAL B	MCB	UYFM

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, pour m'avoir donné la force, la patience et la santé durant toutes ces années d'étude.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à :

Mon promoteur Mr SALHI omar, d'avoir accepté de diriger ce travail avec patience et compétence et pour ses précieux conseils

Je remercie vivement les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont à toute personne qui a participé de prés ou de loin dans la réalisation de mon travail.

DR. AMEUR KAWTHER

Dédicace

je dédie ce travail dont le grand plaisir a l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis, à toi mon père

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à tous mon frères et ma sœurs

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis et collègues d'étude ; En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

DR. Ameur Kawther

Résumé :

Au cours de notre travail nous sommes intéressé a faire ressortir les différents facettes concernant la maladie de Marek, a savoir, son étiologie ; son impact sur la filaire avicole, surtout la serologie de cette maladie. au bout du compte nous proposons des recommandation pour palier aux désordres que ce type de maladie virale peut provoquer .

La partie pratique a était réalisé au niveau de l'institue pasteur Algérie, ou nous sommes inities à la seule technique de diagnostic existant au Algérie (technique de ELISA) deux élevage ont été pris comme échantillon pour la réalisation de ce travail (élevage de poult de chair, dinde chair)

Mots clé : maladie de Marek, diagnostic.

Summary:

During our work we are interested in highlighting the various facets on Marek's disease, namely its etiology; its impact on the poultry wire, especially the serology of this disease. After the count we offer recommendations to remedy the disorders that this type of virus can cause disease. The practical part was done was at the Institut Pasteur (Algeria), or we are insiders has the only existing technique of diagnosis Algeria (technical of elisa) two farms were taken as sample for the realization of this work (farming broiler, turkey meat)

Keywords: Marek's disease, diagnostic.

ملخص

وتأثيرها على شعبة الدواجن و .خلال عملنا ونحن مهتمون في تسليط الضوء حول مرض ماريك، ومن بينها المسببات لها ، أو أننا لا المطلعين)الجزائر(خصوصا الجانب التشخيص لهذا المرض وقد تم الجزء العملي كان في معهد باستور التربية الدواجن ، الديك (والتقنية الوحيدة لتشخيص في الجزائر اتخذت مزرعتين مثل ا عينة من أجل تحقيق هذا العمل الرومي

التشخيص.كلمات مفتاحية مرض ماريك

Liste des figures

Figure 1: Schéma des différentes phases de la pathogénie de la maladie de Marek (& Nair, 2008).

Figure 2: Posture caractéristique de la paralysie des pattes chez une poule (cliché Stéphanie Maeder - LDA 22 / Jeanne Brugère-picoux 2011)

Figure 3: Hypertrophie unilatérale du plexus sciatique droit (en haut), à comparer avec le plexus sciatique gauche d'aspect normal (en bas) (cliché Jeanne Brugère-Pico

Figure 4: lymphome du rate

Figure 5: tumeur et hypertrophie du foie

Figure 6: Localisation des régions d'étude.

Figure 7: Les types des bâtiments d'élevages.

Figure 8: Technique de prélèvement

Figure 9: Les étapes de décantation du sérum

Figure 10: Kit ELISA utilisé

Liste des tableaux

Tableau 1: études sur des troupeaux de poules pondeuse (par Heier et Jarp 1999)

Tableau 2: Les vaccins utilisés (souche vaccinale, type de vaccin et mode d'administration)

liste d’abréviation

1-la MM : la maladie de marek 2-GAHV2 :Gallid herpesvirus 2

3-MEHV1 :meleagrid herpesvirus 1 4-HVT :herpes virus turkey

5-V: very virulent

6-L’EFP:l’épithélium des follicules plumeux

7-REV :réticuloendothéliose virus 8-ALV :virus de la leucose aviaire 9-IBD : infectious bursal disease

10-OIE : organisation international d’enzootie

11-RT-PCR : futura sciences réaction enchaîne par polymérase 12-MDV : Marek disease viral

13-SPGA: sucrose -phosphate-glutamate et albumine 14-EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

Sommaire :

1- partie bibliographique :

Chapitre 1 : maladie de marek

1-introduction 1

1-1.introduction et définition 2

1-2.le virus de la maladie …….....2

1-3 Historique de la maladie 2

1-4 Importance economique ……..3

2-étiologie .....……3

2-1.infection naturelle 4

2-2.Infection expérimental 5

2-3- la réceptivité 5

2-3-1.facteurs intrinsèques 5

2-3-2.facteurs extrinsèques 6

2-4.les voies d'infection..... 6

2-5.mode de transition 7

2-5-1.transition par contactou horizontal.....7

2-5-2.transmission par l'œuf.....7

3- épidémiologie 7

4- pathogénie 9

5- symptomatologie.....10

5-1.la forme chronique..... 10

5-1-1.type flasque 11

5-1-2.type convulsif 11

5-2.la forme aiguë 12

6-lésions 13

6-1.lésions macroscopique 13

6-1-1.forme classique 13

6-1-2 forme aiguë 14

6-2.lésions microscopiques 15

7-diagnostic 16

7-2. Épreuve sérologique 17

7-2-1 . immunodiffusion en gélose 17

7-3.lésions 18

8-pronostic 19

9-traitement 19

10-prophylaxie 20

10-1.prophylaxie sanitaire et hygiénique 20

10-2.prophylaxie médicale 20

10-2-1.protocole vaccinal 20

10-2-2 .protection 20

Chapitre 2 : CHAPITRE II : IMMUNOLOGIE

1-Rappel sur le système immunitaire des oiseaux 22

2-La réponse immunitaire 23

2-1. Immunité active 23

2-2 Immunité passive 24

2-3 Immunité collective……24

2- Partie experimentale

1- introduction..... 25
2- matériels et méthodes 26

conclusion ……..…..36

Références bibliographiques ……..……37

Partie bibliographique

Introduction

Le secteur avicole constitue l'une des activités les plus dynamique en Algérie, compte tenu des leurs prix relativement bas par rapport aux autres denrées animales, les produits avicoles sont largement consommés et constituent un apport protéiné des choix pour l'amélioration de la sécurité alimentaire. En médecine vétérinaire, un certain nombre de maladies à virus des oiseaux sont dues à des *herpèsvirus.* Les plus importantes se manifestent par des signes variés : signes respiratoires (laryngotrachéite infectieuse et coryza du pigeon), signes digestifs (« peste » ou hépatite des palmipèdes), tumeurs (maladie de Marek)
(L. Cauchy et F. Coudert, 1984).

La maladie de Marek est une maladie contagieuse, transmissible aux volailles due à la multiplication d'un herpèsvirus (genre Mardivirus), provoquant la formation des tumeurs dans différents organes ou tissus mais surtout dans les nerfs périphériques. Elle sévit dans le monde entier avec des formes cliniques très diverses **(Didier, 2011).** C'est un des plus grands dangers économiques pour les élevages de poules, non seulement à cause de sa diffusion dans le monde entier, mais surtout parce qu'elle frappe les jeunes adultes prêts à la production de viande ou d'œufs, supprimant ainsi la rentabilité de l'élevage atteint. Le danger est permanent puisque *l'herpèsvirus* est excrété par les oiseaux sains aussi bien que par les malades. Les pertes économiques, qui ont été évaluées dans certains pays, justifient l'extension d'une vaccination coûteuse mais heureusement assez efficace, à tous les troupeaux de grande taille **(L. Cauchy et F. Coudert, 1984).**

Notre travail à comme objectifs d'étudié la maladie de Marek en élevage de poule pondeuse et de chercher quelles sont les mesures pratiquées pour lutter contre cette dernière.

Notre étude comporte:

- Partie bibliographique : qui restitue les connaissances actuelles concernant la maladie et l'immunité chez la volaille.
- Partie expérimentale comporte l'étude sérologique de la maladie.

CHAPITRE I : LA MALADIE DE MAREK

I. Introduction et définition

La maladie de Marek (MD) est une maladie infectieuse contagieuse, associée à une immunosuppression transitoire et à des lymphomes T mortels chez la poule. La MD est à l'origine de pertes économiques importantes dans le monde, estimées à plus d'un milliard de dollars par an elle se déclare vers la troisième semaine et les troubles se manifestent vers la sixième semaine (Morrow et al, 2004)

Globalement, elle se caractérise par une altération de l'état général, se traduisant par des formes nerveuses (paralysie), respiratoires (dyspnée), digestives (diarrhée), cutanées (poulet de chair), et en fin des formes oculaires (œil de verre).l'incidence sur la ponte est désastreuse et le pronostic sur la survie des sujets est sombre. (Fontaine et al, 1995).

I.1 Le virus de la maladie

Une particule infectieuse d'herpesvirus est constituée d'une capside centrale contenant le génome viral, d'une couche protéique complexe (plus de 15 protéines) appelée tégument, et d'une bicouche lipidique aussi appelée enveloppe virale, dans laquelle sont ancrées une dizaine de glycoprotéines d'enveloppe. Le génome du MDV est un ADN double brin linéaire d'environ 175 kb (Hicks JA et al,. 2013).

I.2 Historique de la maladie

Bien que la maladie de MAREK a été décrite en 1907 par Joszef Marek, le virus responsable de cette maladie, nommé virus de la maladie de Marek (MDV) ou Gallid herpesvirus de type 2 (GaHV-2) (Churchill AE et al,.)

Avant les années 60, la maladie de MAREK était la plus souvent caractérisée cliniquement par une paralysie unilatérale de l'aile ou d'une patte d'où la dénomination de «paralysie de la poule». Cependant l'intensification de la production avicole, associée à une réduction de la diversité génétique chez les volailles commercialisées ainsi que les modifications de leur

environnement pourraient avoir favorisé le développement de nouvelles souches virales présentant une virulence accrue. (Avian dis 2002 46 :14-21)

Le premier vaccin efficace contre la maladie de MAREK a été obtenu en 1969, époque à laquelle cette maladie induisait une forte mortalité et morbidité (Okazaki W et al,.)

il s'agissait du 1er vaccin efficace contre le développement de tumeurs viro-induites. Une importante vaccination, pratiquée dans les élevages aviaires dès 1971, a permis l'essor de la production industrielle d'œufs et de viande de poulet. Trois types de vaccins sont actuellement utilisés, tous «vivants » : une souche atténuée de GaHV-2 (CVI988/Rispens) (Rispens BH et al) une souche de GaHV-3 (SB-1) ou une souche de HVT (Schat KA).

I.3 IMPORTANCE ÉCONOMIQUE

Le taux de morbidité est très élevé, il est variable et dépend de la résistance individuelle des sujets et des conditions générales des élevages. La morbidité peut atteindre 60 à 70 % et même plus. En général l'évolution de la maladie dans un élevage est chronique et la mortalité est d'habitude faible, rarement supérieure à 10 ou 15 %. On a signalé cependant des formes très meurtrières et d'évolutions rapides connues sous le nom de « maladie aigue de Marek », où la mortalité est beaucoup plus élevée et peut couramment atteindre 30 % d'un élevage, ou bien l'épizootie peut frapper 80 % d'un effectif. (Anonyme).

II. Etiologie

Le virus GaHV-2 est associé aux cellules et appartient à l'ordre des Herpesvirals (sous-famille Alpha herpesviridae et genre Mardivirus). Ce virus, oncogène et à l'origine de la maladie de Marek, doit être différencié des Gallidherpesvirus 3 ouGaHV-3, anciennement virus de la MM- sérotype 2, non oncogènes et communs chez les poulets. Les isolats de MeHV-1 (ancien sérotype3) sont considérés comme ubiquitaires chez les dindes et ne sont pas oncogènes. On note des réactions croisées entre GaHV-2, GaHV-3 et MeHV-1.Les souches virales de GaHV-2 peuvent être divisées en quatre groupes en fonction de leur virulence et de la capacité des différentes préparations vaccinales à prévenir la formation de tumeurs chez les poulets sensibles. Les souches faiblement virulentes (mildy virulent ou mGaHV-2) causent des lésions minimes à des souches de poulets sensibles. Les souches virulentes (vGaHV-2)

provoquent des lésions plus sévères, mais on note une protection efficace avec le vaccin hétérologue contenant MeHV-1. Les souches très virulentes (very virulent ou vvGaHV-2) causent des lésions encore plus importantes et la protection est efficace avec les vaccins bivalents comportant aussi une souche homologue, tels que MeHV-1/SB-1. Enfin, les souches très virulentes « plus » (very virulent + ou vv+GaHV-2) sont les plus pathogènes. La vaccination avec MeHV-1/CVI988offre une meilleure protection contre les souches vv+GaHV-2.Le virus GaHV-2 se multiplie habituellement au laboratoire sur cultures cellulaires, sur œufs embryonnés ou sur de jeunes poussins. Les meilleures cultures cellulaires permettant l'isolement et la propagation de nouvelles souches virales sont préparées à partir des reins de poussins âgés de1 à 2 semaines ou de fibroblastes d'embryon de canard. Les cultures infectées développent des lésions focales discrètes, constituées de foyers de cellules dégénérées arrondies. Les virions sont fréquemment observés dans le noyau (et parfois dans le cytoplasme) des cellules infectées. Les nucléocapsides hexagonales (85 à 100 nm de diamètre) et les particules virales enveloppées (150-160 nm de diamètre) peuvent être observées dans des coupes ultrafines de cultures cellulaires infectées.Le virus GaHV-2 se réplique dans des cellules vivantes et ilest très instable dans sa forme associée aux cellules. Enrevanche, la forme libre du virus (virus enveloppé), libéré au niveau de l'épithélium des follicules plumeux (EFP) est relativement résistant dans l'environnement. Les deux formes du virus (associé aux cellules ou libre) sont sensibles à la plupart des désinfectants courants.. Cette maladie s'extériorise presque sur tous les animaux jeunes peu avant ou après la maturité sexuelle, elle est introduite dans les élevages sains par des , des poulets porteurs de virus .(an evoluving problèmes 2004 elsevieramesterdam 32-48)

II.1 INFECTION NATURELLE

Cette infection réussit par contact des animaux malades et des animaux sains. Le virus est libre dans les épithéliums des follicules plumeux. (Belbech tarek 2016)

II.2 INFECTION EXPERIMENTALE

L'infection expérimentale a pu être réalisée par injection d'extraits de foie, de rate, de nerfs, de poumon, et de sang des animaux récemment malades à des individus sains. (Anonyme in BELBECH TAREK 2016)

II.3 RECEPTIVITE

Seule les gallinacés sont réceptifs à cette affection, plus les animaux sont jeunes, plus ils la contractent facilement. Les poulets âgés de 1 à 2 mois sont réceptifs, au-delà de 8 à 14 semaines les oiseaux ne sont sensibles qu'exceptionnellement, chez les plus âgés elle est rare. De plus la réceptivité reconnaît des facteurs intrinsèques e des facteurs extrinsèques.

(Belbech tarek 2016)

II.3.1 FACTEURS INTRINSEQUES

- **La race**

Toutes les races des gallinacés sont sensibles à cette affection. Surtout le poulet de chair qui est plus touchés. (AMMIMEUR 2016)

- **L'âge** :

Surtout les poulets âgés de 1 à 2 mois, les animaux de 20 semaines ne sont atteints qu'exceptionnellement de la forme classique (la forme nerveuse ; paralysie des ailes et des pattes). L'incubation est plus longue, ils ont remarqué, que le temps de latence qui sépare l'infection et l'apparition des symptômes sur des poulets atteints à l'âge de 7 semaines, est de 122 jours, alors que chez les poussins d'une semaine, élevés de la même manière et de la même race, la période de latence est de 33 jours. (Ammimeur ishek 2016)

- **Le sexe :**

Des chercheurs ont montré que le sexe n'influe pas sur la réceptivité et que l'atteinte était généralisée aux mâles comme aux femelles. Des injections d'oestrogènes à fortes doses n'ont pas modifié la réceptivité au virus chez le mâle. (Anonyme in AMMIMEUR ISHEK 2016)

II.3.2 FACTEURS EXTRINSEQUES

- **La saison** :

L'affection est beaucoup plus fréquente à la fin de l'été que de l'automne, sur des animaux nés au printemps âgés de 4 à 6 semaines. (Anonyme in AMMIMEUR ISHEK 2016)

- **Le milieu :**

Les poussières véhiculent le virus, donc les mesures hygiéniques traditionnelles ne suffisent pas pour préserver les troupeaux de l'atteinte du virus. (Anonyme in AMMIMEUR ISHEK 2016)

- **Le stress :**

Les oiseaux recevant une nourriture équilibrée et élevés dans des bâtiments convenables résistent mieux l'infection virale. De plus agressions physiologiques tel que le transport, vaccinations etc prédisposent les oiseaux à l'infection (Saidi, 1982).

II.4 LES VOIES D'INFECTION

La voie d'infection naturelle est la voie respiratoire, ce qui ne permet pas d'exclure les autres voies puisque les plumes et les cellules desquamées vont souiller la litière et répondre le virus un peu par tout. La voie d'infection la plus certaine est la voie intra-abdominale qui donne les meilleurs résultats. Les voies intra-dermiques, sous-cutanées, intra-oculaires, ne donnent aucun résultat positif. (Anonyme in Saber Beghoul 2006)

II.5 MODE DE TRANSMISSION

- **TRANSMISSION PAR CONTACT OU HORIZONTALE**

Les animaux sains peuvent contracter la maladie s' ils sont en contact avec des poussins infectés et présenteraient des symptômes de la maladie. (Anonyme in Saber Beghoul 2006)

- **TRANSMISSION PAR L'OEUF**

Les études portant sur la transmission par l'œuf ont été nombreuses, ont vainement cherché à mettre en évidence le virus dans les embryons de poussins issus de poules infectées et ont conclu qu'il semble bien établi que le virus ne peut se transmettre par l'œuf, mais la souillure de la coquille est une éventualité à ne pas méconnaître . (SALOMON, COLL 1973)

III ÉPIDÉMIOLGIE

De nombreux facteurs peuvent agir sur l'incidence de la MM. Ils comprennent l'âge au moment de l'exposition, la constitution génétique, le niveau des anticorps maternels, la virulence de la souche virale, le sexe de l'hôte et des facteurs de complication comme une infection avec d'autres agents immunosuppresseurs. L'infection initiale et la propagation dans l'hôte se produisent par contact direct de cellule à cellule. La voie d'entrée du virus est respiratoire, puis celui-ci atteint les organes lymphoïdes principaux (rate, thymus et bourse de Fabricius). Le mécanisme du transfert des voies respiratoires vers les organes lymphoïdes n'est pas bien connu, mais les macrophages semblent être impliqués. Trois jours après l'inoculation, une «infection productive-restrictive» peut être détectée dans les organes lymphoïdes. Le terme d'«infection productive-restrictive» est utilisé car l'infection est strictement associée aux cellules. Le début de l'infection cytolytique se produit principalement dans les cellules B in vivo et dans la plupart des cellules en culture, où les virions produits sont non enveloppés et donc non infectieux. L'infection cytolytique stimule une réponse inflammatoire chez l'hôte, conduisant à l'activation des cellules T. Dans les organes lymphoïdes primaires, l'«infection productive restrictive» est caractérisée comme un réticulite aigue avec infiltration par des macrophages et des granulocytes. Une hyperplasie des cellules

réticulaires peut se produire, d'où une splénomégalie. Après une primo-infection, les herpèsvirus changent généralement vers une forme latente de l'infection et peuvent être réactivés périodiquement tout au long de la vie de l'hôteaprès4 à 5 jourd'infectionparleGaHV2,on observe ce changement dans les lymphocytes.

Bien que l'infection cytolytique, simplement des cellules B avec quelques cellules T, l'infection latente se produit principalement dans les lymphocytes T. Ces cellules T infectées de façon latente portent l'antigène Ia, indiquant qu'il s'agit de lymphocytes T activés. Dans la phase latente de la MM, il est difficile de mettre en évidence l'antigène viral ou des particules virales in vivo, mais le virus peut être retrouvé in vitro. L'expression du génome viral est limitée à quelques transcriptions, transcrite à partir des régions répétées du génome. Chez les poulets sensibles, une deuxième vague d'infection cytolytique peut se produire dans les deux à trois semaines suivant l'infection, aboutissant à une immunosuppression permanente. Cette «infection productive restrictive» conduit à la formation de corps d'inclusion intranucléaire, à la destruction des cellules et à la formation de lésions nécrotiques dans les tissus épithéliaux, y compris les reins, le proventricule et l'EFP. A ces sites on observe la cytolyse des lymphocytes infectés comme dans les organes lymphoïdes primaires.L'infection complètement productive, qui a lieu dans l'EFP, permet le développement des virus infectieux enveloppés. La plus grande concentration de virions dans l'EFP peut être trouvée dans les échantillons prélevés sur les poulets dans les trois à cinq semaines suivant l'inoculation.La transformation de l'infection se produit dans les lymphocytes T CD4 + des poulets et n'a été observée qu'avec les souches virulentes de GaHV-2.

Les recherches actuelles indiquent qu'une (ou plusieurs) partie du génome du GaHV-2 peut agir de concert avec des facteurs cellulaires pour induire la transformation. L'analyse de la transcription du gène du virus GaHV-2 dans les lymphomes induits et dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes transformées par ce virus a démontré que cette transcription du gène viral est limitée aux répétitions accompagnant une seule séquence longue et une seule séquence courte. Ainsi, une grande attention a été portée sur l'identification et la caractérisation des transcriptases virales codées dans ces régions. Les candidats viraux impliqués dans la transformation comprennent Meq, VIL-8, pp38et deux petits cadres ouverts de lecture, pp14 et P7. L'infection pleinement productive résulte de l'excrétion du virus présent dans les follicules plumeux. La desquamation de ces follicules contenant le virus GaHV-2 enveloppé permet la contamination des autres volailles. Les oiseaux infectés présentent ou non les signes cliniques de la maladie et peuvent excréter le virus de façon

sporadique durant toute leur vie. Les squames infectieuses des follicules plumeux peuvent être propagées sur de longues distances et sont très contagieuses. Il n'y a pas de transmission verticale par l'œuf. Une transmission horizontale dans les couvoirs par la contamination de la coquille est peu probable en raison des conditions environnementales défavorables.(Didier, 2001 ,poultrydisease 2008)

IV PATHOGÉNIE

Le virus n'est pathogène que s'il est intracellulaire et de là, les chercheurs ont pu démonter qu'il y ait dissémination hématogène ou lymphohématogène de ce virus à travers tout l'organisme, il est pris en charge et véhiculé par le sang, il va se fixer sur les leucocytes, particulièrement sur :

-Les cellules mononuclées des organes lymphoïdes situés dans la bourse de Fabricius, la rate et le thymus.

-Les cellules mononuclées dans les foyers d'infiltrations lymphoïdes.

-Sur un grand nombre de cellules épithéliales des follicules plumeux et des tubules rénaux.

Le virus a une affinité pour les centres nerveux, peut être à l'origine des tumeurs de types lymphomateux. (pathologicalresposes to infection an evoluvingproblem 2004)

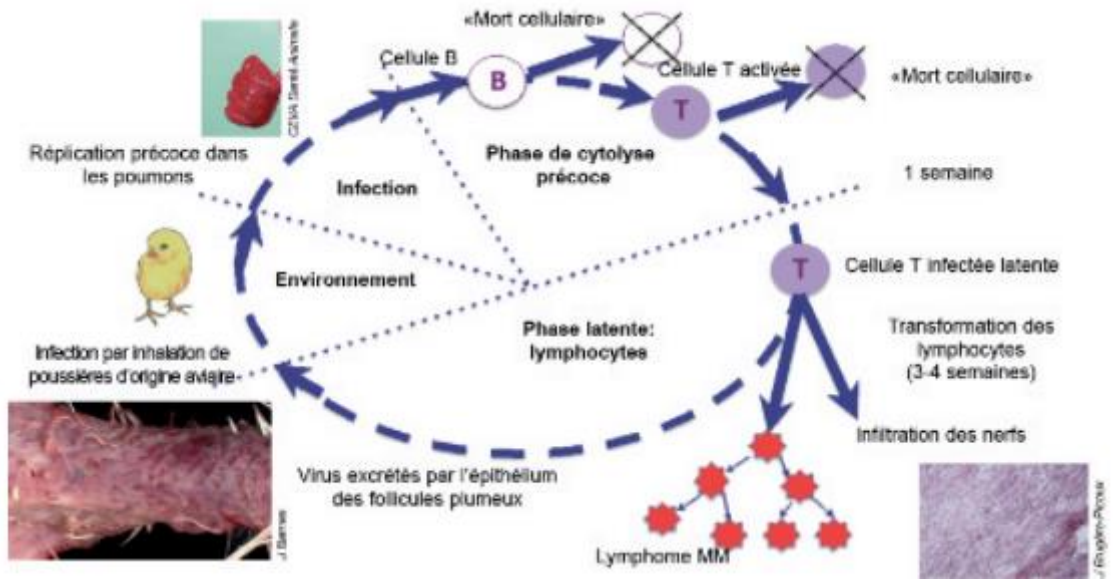


Figure 1 : Schéma des différentes phases de la pathogénie de la maladie de Marek (& Nair, 2008).

V . SYMPTOMATOLOGIE

Cette maladie a presque toujours une forme subaigüe ou chronique se traduisant par une accumulation de lymphocytes surtout au sein du tissu nerveux et accessoirement dans certains organes où elle prend souvent la forme tumorale de lymphocytose. Elle apparaît, en général, chez les oiseaux âgés de 4 à 8 mois. Une forme aigue, évoluant en 15 jours et se traduisant par de la faiblesse, de paralysie progressive des pattes, des ailes, du cou et se terminant par la mort. (Gordon, 1979).

V.1 LA FORME CHRONIQUE

La neuro lymphomatose chronique ne se présente pas toujours sous le même aspect clinique : celui-ci dépend de la localisation de l'infiltration lymphocytaire : système nerveux central, moelle, système nerveux périphérique, système nerveux végétatif, divers organes et tissus.

Après une période d'incubation généralement longue chez l'oiseau et d'une durée variable. Il présente de la faiblesse musculaire plus souvent au niveau des pâtes et des ailes ; il se tient le dos voussé, la démarche devient incertaine, chancelante, parfois subitement ataxique ou sautillante ; quelques jours plus tard, une boiterie apparaît sur l'un des membres. La paralysie, généralement asymétrique s'accentue et revêt tantôt le type flasque, tantôt le type convulsif.

V.1.1 TYPE FLASQUE

Le malade traîne son membre interne, ou, si les pattes sont atteintes il s'accroupit, les ailes étendues en position de «grand écart» ; parfois les pattes sont rejetées en arrière , ou bien l'une est étendue en avant et l'autre en arrière ; ou encore la patte paralysée, déviée en dedans, repose sur le sol au niveau du jarret ; dans de telles conditions, l'oiseau est incapable de se déplacer. Lorsque la paralysie frappe les membres antérieures, il est habituel d'observer qu'une aile est plus atteinte que l'autre, l'animal est incapable de se servir de son aile ; lorsque les deux membres antérieures sont paralysés, les ailes traînent sur le sol en « départ de vol ». (Poultry diseases, 2008)

V.1.2 TYPE CONVULSIF

Le type convulsif apparaît parfois d'emblée, plus souvent après quelques jours de la paralysie flasque , parfois des contractions clonique. La paralysie affectant surtout les muscles extenseurs, il en résulte un recroquevillement des doigts, une raideur des articulations qui rappellent « l'attitude du griffer ». Dans le cas d'infiltration du nerf spinale accessoire ou du cervelet, il y a des contractions des muscles du cou. La paralysie flasque ou convulsive des muscles du cou entraîne des déviations diverses de cet organe : du torticolis.

Dans tous les cas, la sensibilité au toucher est diminuée ; les réflexes sont amoindris, l'émaciation musculaire est d'autant plus marquée que la paralysie est plus étendue.

Les troubles de la vision, sont dus tantôt à des lésions du nerf optique, tantôt à une irido-cyclochoroïdite , dans le premier cas, la diminution, la perte de la vision, l'amaurose sont

produites par des troubles surtout rétiniens , dans le second, par des lésions de tractus uvéal, apparaissant principalement au niveau de l'iris , on voit cet organe tuméfié, épaissi , la pupille rétrécie est ovale ou de forme irrégulière et elle est incapable d'accommodation , l'iris offre une décoloration caractéristique ; puis plus ou moins rapidement et régulièrement, l'iris est entièrement atteint, et par ses décolorations et ses tâches blanchâtres, donne l'impression

« d'un œil de verre ». Ces lésions oculaires sont unies ou, plus souvent bilatérales et entraînent presque toujours la cécité. Lors de lésions du système sympathique, on peut observer des bâillements, de la stase intestinale, de la paralysie du cloaque, de la dyspnée, des troubles cardiaques. (Poultry diseases, 2008)

V.2 LA FORME AIGUË

Cette forme se différencie du classique par le pourcentage de mortalité qui est élevé et qu'un grand nombre d'animaux sont atteints en même temps et rapidement. Elle atteint les sujets jeunes dès l'âge de 4 à 20 semaines, on peut voir un amaigrissement, de la prostration et une anémie (la crête devient pâle). Le tableau clinique est surtout dominé par l'apparition de tumeurs sur différents organes, tel que gonades, foie, reins, rate et l'abdomen se distend souvent à cause de ces tumeurs. On peut observer des lésions cutanées autour des follicules plumeux, qui se traduisent par une hypertrophie des follicules plumeux. Les animaux meurent très souvent dans un état d'épuisement total, parfois après avoir présenté une évacuation involontaire de matières fécales et parfois même avant que le stade de paralysie des ailes et des pattes soit atteint (Gordon, 1979 , Lesbouyries, 1965).



Figure 2 : Posture caractéristique de la paralysie des pattes chez une poule (cliché Stéphanie Maeder - LDA 22 / Jeanne Brugère-picoux 2011)

VI. LESIONS

VI. 1 LESIONS MACROSCOPIQUES

VI.1.1 FORME CLASSIQUE

La lésion typique est la nette hypertrophie d'un ou plusieurs nerfs périphériques, dont le diamètre peut souvent doubler ou tripler (le diamètre peut atteindre 9 mm) et qui perdent leur aspect normalement brillant et strié en prenant une apparence grisâtre et œdémateuse. Les plus fréquemment atteints et les mieux visibles à l'autopsie sont ceux du plexus brachial, du plexus lombaire et du plexus sciatique. A ces lésions nerveuses s'ajoutent occasionnellement des lymphomes ; le plus souvent ces tumeurs portent sur l'ovaire qu'on trouve parfois petit mou et grisâtre ou plus rarement gros, jaunâtre et lobulé, mais elles peuvent aussi se rencontrer au niveau des poumons, des reins, du cœur et du foie).



Figure 3: Hypertrophie unilatérale du plexus sciatique droit (en haut), à comparer avec le plexus sciatique gauche d'aspect normal (en bas) (cliché Jeanne Brugère-Pico

VI.1.2 FORME AIGUË

Cette forme se caractérise par ses lymphomes diffus et par l'augmentation du volume d'un ou plusieurs organes ou tissus, dont le plus souvent le foie, les gonades, la rate, les reins, les poumons, le proventricule et le cœur, plus rarement la peau et ses follicules ou le tissu musculaire. Chez les jeunes sujets l'hypertrophie hépatique est d'habitude modérée ; chez les adultes elle est très remarquée et comparable à celle provoquée par la leucose lymphoïde. A l'exception de quelques adultes, tous les malades montrent une plus ou moins forte infiltration lymphoïde des filets nerveux (Lesbouyries, 1965).

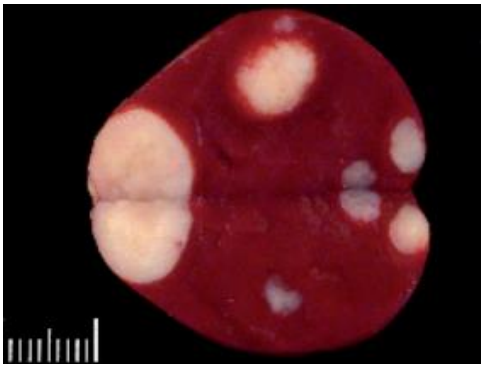


Figure 4 : lymphome du rate

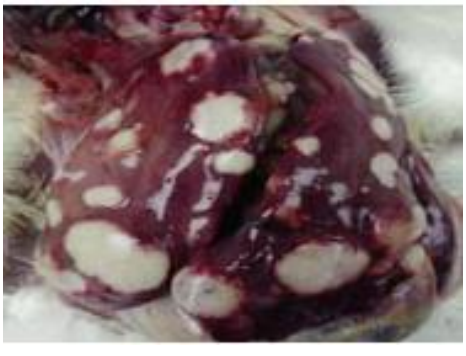


figure 5 : tumeur et hypertrophie du foie

VI.2 LESIONS MICROSCOPIQUES

La lésion essentielle provoquée par herpesvirus de la maladie de Marek, est une névrite interstitielle chronique au niveau des nerfs périphériques, qui sont suivie d'un processus inflammatoires entraînant la formation d'amas diffus ou en foyers. En coupe histologique on retrouve les mêmes cellules anormales dans les infiltrations tissulaires, des lymphocytes mûrs à noyaux petits et ronds, cellules proches de lymphoblastes, des histiocytes à noyaux allongés, des plasmocytes caractéristiques, cellules à cytoplasme basophile, leucocytes polynucléaires à granulation hétérophile et des mastocytes à grosses granulations. Des œdèmes et une dégénérescence des fibres nerveuses sont observés. Le liquide céphalo-rachidien est abondant et contient des lymphocytes. Au niveau du cerveau, du cervelet, du bulbe, les lésions, très fréquentes, se présentent généralement sous l'aspect d'infiltration péri-vasculaire de petites cellules lymphoïdes, de nodules miliaires, des lymphocytes et de débits gliaux, plus rarement d'infiltration diffuse. Les lésions qui intéressent la vision se voient surtout dans les couches optiques, le nerf optique, la rétine, dans le tractus uvéal. La dilatation des capillaires et l'infiltration lymphocytaire entraînent la tuméfaction des procès ciliaires ; ces altérations, associé à la dégénérescence de la fibre musculaire, entraînent la déformation pupillaire.

Parfois, peu développé, compact, blanc ou pourpre, montre des déformations jaunes, de la grosseur d'une tête d'épingle. Biely, Palmer, estiment que 20 p. 100 des poules atteintes de la paralysie de Marek présentent des lymphomes de l'ovaire, tumeurs grisâtres, molles, plus ou moins volumineuses ; histologiquement, ces néoplasies sont constituées de petites cellules rondes, souvent en mitose, et séparée par un stroma réticulé. Dans les organes tels que le foie, le rein, l'hyperplasie débute par un amas de lymphocytes, ordinairement péri-vasculaire ; ces cellules envahissent le parenchyme, le compriment, le privent de sa nutrition et détermine sa nécrobiose et sa disparition. Le thymus est hypertrophié dans 50 p. 100 des cas environ. Enfin, il ressort que les lésions microscopiques consistent en la présence anormale de cellules mononuclées de la lignée lymphocytaire, essentiellement des thymocytes ou cellules T. on considère la maladie de Marek comme une néoplasie de cellules T . (Belbeche Tarek2016)

VII DIAGNOSTIC

L'âge des animaux est très important pour porter un bon diagnostic chez les poulets atteints pour la première fois, il se base surtout sur les constatations cliniques. Si dans un élevage les animaux âgés, de 3 à 6 mois présentent des paralysies avec les symptômes décrits précédemment, et si la mortalité croit progressivement, la suspicion de la maladie de Marek devient certitude surtout si le tableau clinique est complété par l'atteinte oculaire (qui est souvent tardive), le diagnostic est plus sûr. La maladie de Marek est caractérisée par une infiltration de cellules mononuclées dans les nerfs périphériques, les gonades, divers viscères, l'iris, le muscle et/ou la peau. Bien que l'hypertrophie des nerfs périphériques et les lymphomes viscéraux soient courants dans la MM, aucune lésion n'est observée de façon constante. Des critères tels que l'âge (4-20) semaines, sauf chez les reproductrices et les pondeuses lorsque les tumeurs dues au GaHV-2 augmentent au début dela ponte), la distribution des lésions et l'absence d'autres tumeurs dues à d'autres virus comme celui de la leucose aviaire (ALV) ou le virus de la réticuloendothéliose (REV)doivent être aussi considérés.

L'examen histologique est utile pour le diagnostic différentiel la leucose lymphoïde et la MM. Les tumeurs de la MM présentent une population très diverse de petits et grands lymphocytes. Des lymphoblastes et des plasmocytes peuvent être observés. Les tumeurs lymphoïdes causées par l'ALV, survenant fréquemment dans la bourse de Fabricius, sont typiquement constituées de lymphoblastes de taille similaire contenant un nucléole important et concernent habituellement les poulets âgés de plus de 20 semaines. Les tumeurs causées parle GaHV-2 et le REV peuvent apparaître similaires à l'examen macroscopique comme à l'examen histologique. Ainsi, le diagnostic étiologique d'une néoplasie chronique chez un poulet où l'on n'observe pas de tumeur dans la bourse de Fabricius mais avec une période latente trop courte pour suspecter un ALV, nécessite l'utilisation de tests virologiques ou sérologiques. La maladie clinique est beaucoup plus fréquente avec le GaHV-2 qu'avec le REV. C'est pourquoi le REV n'est pas considéré comme un problème économique majeur de l'industrie avicole.

Au départ, le virus peut être isolé dès un ou deux jours après son inoculation à des poulets, cinq jours après une exposition par contact puis par la suite tout au long de la vie de l'oiseau. Le virus peut être obtenu à partir d'échantillons infectés de sang entier hépariné, de suspensions de lymphocytes, des cellules tumorales isolées, ainsi que des préparations non cellulaires de la peau, des follicules plumeux ou de la base des plumes des poulets infectés.

Les cultures sur cellules rénales de poulet et fibroblastes d'embryon de canard sont habituellement utilisées pour l'isolement du GaHV-2. Les fibroblastes d'embryon de poulet sont généralement utilisés comme substrats pour les virus GaHV-3 et MeHV-1. Les cultures développent des plaques typiques en 4 à 14 jours. L'identité du sérotype peut être déterminée par immunofluorescence avec les anticorps monoclonaux spécifiques des sérotypes.

Actuellement, le diagnostic du pathotype du GaHV-2 exige des expériences par une épreuve in vivo. (diseases of poultry 11 thed 2003 iowa state universitypressaamesia 407-465)

VII. 1. Epreuves sérologiques :

La présence d'anticorps spécifiques du MDV chez des poulets non-vaccinés ,âgés de 4 semaines est révélatrice d'une infection par le MDV. Avant cette limite d'âge, les anticorps peuvent être la trace d'anticorps maternels transmis par le jaune d'œuf. Pour les différentes épreuves décrites ci-après, les virus antigènes et sérum peuvent être obtenus auprès des Laboratoires de référence de l'OIE spécialisés dans la MD (se reporter à la liste de la partie 3 de ce Manuel Terrestre). Cependant, des réactifs internationaux de référence n'ont pas encore été produits. (Poultry diseases, 2008)

VII.1.1 Immunodiffusion en gélose

Bien qu'elle ne soit pas prescrite pour les échanges internationaux, l'épreuve d'immuno-diffusion en gélose (IDG) est la plus utilisée pour la détection des anticorps envers le MDV.

L’épreuve est réalisée sur des lames porte-objet recouvertes d’une solution saline tamponnée par du phosphate à 1 % d’agarose et 8 % de chlorure de sodium. Les puits adjacents sont remplis alternativement avec des sérums et de l’antigène viral. Une incubation de 24 h en atmosphère humide donne le temps à la diffusion de se produire. Les sérums positifs exhibent une réaction similaire à celle des témoins positifs. L’antigène utilisé peut être de trois types , soit il provient de culture de cellules infectées, soit il est extrait de hampes plumifères, soit il est obtenu à partir de biopsies cutanées contenant les follicules plumeux de poulets infectés.

L’antigène en culture de cellules est obtenu par multiplication du MDV sur des cellules rénales de poulet ou sur des fibroblastes embryonnaires de poulets. Les cellules sont détachées et suspendues dans le milieu lorsque L’ECP a atteint sa confluence à une concentration proche de 1 × 107 cellules/ml. Il faut que le milieu de resuspension soit dépourvu de tryptose phosphate (ce dernier pourrait produire des lignes non spécifiques de précipitine). La suspension cellulaire

doit subir trois cycles de congélation-décongélation pour pouvoir être utilisée comme antigène. (Manuel terrestre de l’OIE 2008-622)

VII LESIONS

Les lésions sont considérées parmi les critères les plus évidents de la maladie. L'épaississement des faisceaux de fibres nerveuses ne s'accompagne pas toujours les lésions anatomo- pathologiques, ainsi on doit procéder non seulement à l'examen des nerfs brachiaux et sciatiques mais aussi à celui de la moelle et l'encéphale. Pour les lésions oculaires, on recherche l'atteinte de la pupille et l'aspect décoloré des marges de l'œil appelé « œil de verre » ou « œil de chat ». Cependant il ne faut pas oublier que les variations de la couleur de l'iris pourraient être dues à l'automne, à la fin de période de ponte et la mue. L'examen histologique des lésions par un laboratoire spécialisé reste un excellent moyen diagnostique. (Ammimeur Ishek 2016)

IIX PRONOSTIC

Le pronostic est défavorable en toute circonstance des guérisons spontanées mais incomplètes ont été signalées. Mais on n'aura aucun intérêt à garder dans un élevage des sujets qui sont sources de virus. (Ammimeur Ishek 2016)

IX TRAITEMENT

La lutte contre la maladie de Marek devra s'appuyer sur une bonne prophylaxie. Toute la pharmacopée anti tumorale a eu ses petits succès momentanés mais en pratique tout traitement est illusoire. Dans les cas bénins on pourrait essayer le traitement à la vitamine B1 mais alors on crée des porteurs et excréteurs de virus qui seront un danger pour l'élevage.

X . PROPHYLAXIE

X.1. PROPHYLAXIE SANITAIRE ET HYGIENIQUE

MALADIE DE MAREK : **Mesures de biosécurité à privilégier**	**Effets des mesures de biosécurité et explications**
☑ Éviter de mélanger les troupeaux d'âges différents ☑ Favoriser un élevage de poules pondeuses en cage ☑ Favoriser ≤ 3 oiseaux par cage	L'étude démontre que les risques de maladie de Marek diminuent de 90% et la mortalité de 30% dans les troupeaux d'oiseaux du même âge comparativement aux fermes multi-âge. Les chances de maladie de Marek augmentent de 4,3 lorsque les oiseaux sont élevés sur le sol comparativement aux oiseaux élevés en cage. Les chances de maladie de Marek augmentent de 3,7 lorsque l'on compte plus de 3 oiseaux par cage, comparativement à 1,2 ou 3 oiseaux.

Tableau 1 : études sur des troupeaux de poules pondeuse (par Heier et Jarp 1999)

X.2 PROPHYLAXIE MÉDICALE

X.2 .1 la vaccination :

La prévention repose essentiellement sur la vaccination des reproductrices et des jeunes poulets. L'hyper immunisation des reproductrices confère une immunité passive aux jeunes poulets et permet de protéger les poussins vis-àvis des infections précoces immunodépressives. Cependant, cette immunité passive ne peut pas les protéger plus tard dans leur vie, une immunisation active est nécessaire pour prendre le relai à la protection conférée par les anticorps maternels. Cette immunisation consiste à bien cibler la période critique où l'inhibition maternelle disparaît car les poulets sont alors susceptibles de développer la maladie (Perrenot, 2007).

X.2.2. La détermination du temps optimal de vaccination :

Qui évite une rupture entre la protection passive maternelle et la protection active vaccinale [La vaccination ne devrait pas être faite trop tôt pour éviter l'interférence avec les anticorps maternels, ni trop tard pour éviter une infection à l'IBDV qui peut survenir à n'importe quel moment.

La protection passive diminue au fur et à mesure que le poussin vieillit et élimine les anticorps maternels. La durée de la protection passive dépend donc à la fois de la quantité initiale d'anticorps transmise et de la vitesse à laquelle le poussin élimine les anticorps reçus.

- la quantité initiale d'anticorps maternels transmis (mesurée par des sérologies ELISA effectuées sur 20 poussins prélevés le jour de la mise en place).

- l'estimation de la cinétique de décroissance des anticorps maternels : le temps de demi-vie plasmatique des anticorps maternels est d'environ 3 jours pour les souches à croissance rapide et de 5 jours chez les souches à croissance lente.

Cette différence est attribuée à la vitesse de croissance qui entraine une rapide déclinaison des anticorps maternels par effet de dilution.

- taux d'anticorps maternels résiduels susceptibles d'interférer avec la prise vaccinale. Les titres neutralisants dépendent du vaccin : 1/100pour les vaccins intermédiaires et 1/500epour les vaccins très atténués, 1/250e pour les vaccins invasifs (Christopher et al., 2009)

La vaccination empêche la formation des tumeurs et des lésions nerveuses dues au virus pathogène de la maladie de Marek. Elle ne prévient cependant pas l'infection des volailles par ce virus. Les résultats de la vaccination dépendent largement du respect de la technique de vaccination. La vaccination doit obligatoirement être pratiquée à l'âge d'un jour, au couvoir, afin de protéger les poussins durant les quatre premières semaines de vie, période critique durant laquelle une infection par le virus de la maladie de Marek engendre la formation ultérieure de tumeurs spécifiques.

Cette maladie est à déclaration obligatoire. La vaccination doit toujours être effectuée en présence du vétérinaire responsable du couvoir. (Ammimeur Ishek 2016)

CHAPITRE II : IMMUNOLOGIE

I. Rappel sur le système immunitaire des oiseaux :

Pour assurer la défense de l'organisme contre les infections ; le système immunitaire fait intervenir les trois caractères de la réponse immunitaire : la reconnaissance des antigènes comme corps étrangers, sa spécificité et sa faculté de mémorisation. Cette mémoire est mise à profit par la vaccination.

Cette vaccination induit une réponse immunitaire, qui se déroule dans le tissu lymphoïde, qui possède chez les oiseaux un certain nombre de particularités anatomiques :

• Le thymus, organe de maturation des lymphocytes T. Cet organe plurilobé, réparti le long des veines jugulaires, est fonctionnel à l'éclosion et évolue avec l'âge en organe lymphoïde secondaire.

• La Bourse de Fabricius, organe lymphoïde primaire, impair et médian rencontré uniquement chez les oiseaux. Elle présente également certaines propriétés des organes lymphoïdes secondaires (Perrenot, 2007).

C'est un organe creux situé dorsalement au cloaque.C'est l'actrice principale dans la formation et maturation des lymphocytes B. il est également fonctionnel à l'éclosion et continue de se développer jusqu'à l'âge de 10 semaines, période où débute son involution, qui aboutit à l'âge de 22 semaines à la disparition complète de ce tissu chez le poulet.

Durant ces 22 semaines, une migration des lymphocytes B émanant de cette bourse, permet de peupler les organes lymphoïdes périphériques, qui deviendront des réservoirs de lymphocytes B. Cette migration permet d'expliquer la présence de lymphocytes B, chez des individus ne possédant plus de bourse de Fabricius.

• Le système immunitaire des oiseaux ne possède pas de nœuds lymphatiques anatomiquement organisés mais ils sont munis d'un grand nombre de nodules ou amas lymphatique pariétaux et viscéraux.

• Le reste est un tissu lymphoïde diffus abondant, associé principalement aux muqueuses respiratoires et digestives, mais présent dans presque tous les organes, y compris les nerfs (Abdelaziz, 2010).

II. La réponse immunitaire :

Le système immunitaire des oiseaux est fort semblable à celui des mammifères, il met en jeu deux processus qui sont étroitement intriqués chez les vertébrés : l'immunité innée et l'immunité acquise (Morgulis, 2002).

II.1. Immunité active :

Elle correspond la réponse immunitaire cellulaire ou humorale à un antigène.

Elle repose sur l'activation du système immunitaire et aboutit à la production d'anticorps circulant, de cellule mémoire qui vivent pendant des années .c'est sur elle que repose la prévention médicale par la vaccination.

- **Immunoglobulines aviaires :**

Les anticorps des oiseaux sont regroupés en 3 classes, IgM, IgA et IgY(IgG).

Immunoglobuline Y (IgY), principale immunoglobuline chez les oiseaux dont la fonction est similaire à celle des IgG des mammifères. C'est l'anticorps systémique, il est retrouvé dans le sérum. Il est retrouvé au niveau du jaune d'œuf et il est responsable de l'immunité passive. Cette Ig est produite après IgM dans la réponse primaire humorale et l'isotype principale produit dans la réaction secondaire et reste actifs pendant plusieurs semaines.

Immunoglobuline (IgM), est structurellement et fonctionnellement similaire à ceux des mammifères. Il est prédominant du récepteur de l'antigène des cellules B et l'isotype prédominant produite après l'exposition initiale à un antigène.

Immunoglobuline (IgA) : Il a été démontré la présence d'une forme structurellement et fonctionnellement homologue d'IgA mammifère dans les sécrétions de poulet, en particulier

la bile. IgA et IgM sont transférés dans le blanc d'oeuf et sont très faible (Juliarena et al., 2007).

II.2. Immunité passive :

Le poussin nait avec un système immunitaire immature. La poule lui transmet par contre des anticorps par l'intermédiaire de son oeuf, à la manière de ce qui est observé chez les mammifères avec le colostrum, il s'agit pour l'essentiel de l'immunité materno-foetale ou bien par l'administration de serum hyper immune.

La pluparts des anticorps protégeant le poussin dès l'éclosion, sont les IgG. On retrouve aussi des anticorps locaux hérités du passage du l'oeuf dans l'oviducte, ce sont les IgM et IgA que l'on retrouve aussi dans le liquide amniotique (Ladjel, 2015).

II.3. Immunité collective :

Le premier résultat attendu de l'administration d'un vaccin, c'est que les oiseaux développent une immunité contre un pathogène, donc, par conséquent, réduisent sa sensibilité à un agent infectieux. La protection contre la forme clinique de la maladie est efficace à un titre individuel, tandis que la réduction à la fois de la susceptibilité et infectiosité profite aussi à l'ensemble de la population de volaille dans le troupeau vacciné/région.

L'effet positif sur une population vaccinée connu sous le nom immunité troupeau peut être défini comme la probabilité réduite d'une infection individuelle à chaque fois qu'il fait partie d'une population vaccinée (Ladjel, 2015).

I. Objectif :

Notre travail est consacré à une étude sérologique de la maladie de Marek en élevage de poule pondeuse, en utilisant la méthode ELISA et d'évaluer l'influence de certains facteurs de risque associés à cette maladie. Dans la perspective est l'amélioration de la productivité à travers l'amélioration de la santé. Sur un plan plus spécifique, il s'agit de relever la présence des contraintes pathologiques d'origine virale en appréciant le statut immunitaire des oiseaux afin de mettre en place une prise en charge adéquate de ces pathologies.

Pour ce faire notre démarche est la suivante :

- ✓ La recherche d'une éventuelle circulation des virus de la maladie de Marek à travers la mise en évidence d'anticorps dans le sérum de poules (enquête sérologique) en utilisant la méthode ELISA**.**

- ✓ Identification des facteurs de risque liés à cette maladie virale.

II. Matériels et méthodes :

III.1. Région et durée d'étude :

Notre expérimentation a été réalisée dans des fermes commerciales de poulet de chair situées à MEDEA (Figure 8).

L'étude s'étend sur une période qui s'étale de Septembre 2019 jusqu'à Mars 2020.

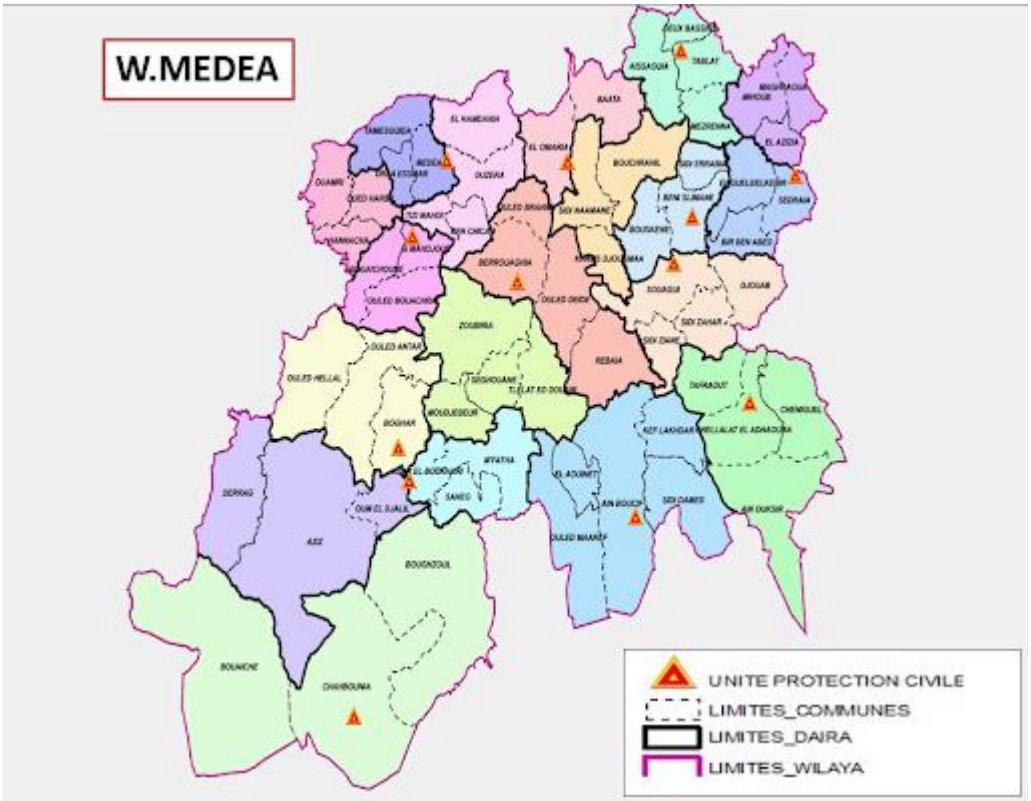


Figure 6 : Localisation des régions d'étude.

III.3. Animal :

Notre étude a porté sur 10 élevages commerciaux de poules pondeuses de différentes souches (ISA Brown, Tetra-SL, Lohman Tradition, Hy-line) en Algérie (36° de longitude et 3° de latitude). Les poules pondeuses étaient âgées de 22 à 65 semaines et les élevages contenaient entre 5 000 et 50 000 sujet/élevage.



Figure 7 : Les types des bâtiments d'élevages.

Les élevages étudiés ont été initialement vaccinés contre la maladie de MAREK avec des vaccins vivants selon différents protocoles (Tableau 2, Figure 10).

Les élevages analysés ont été suspectés d'être atteints d'une maladie virale (MAREK) après avoir présenté des signes cliniques et nécrosiques caractéristiques.

III.4. Echantillonnage (Prélèvements) :

Les échantillons ont été prélevés à partir des poulets de chair suspectés cliniquement affectés d'une des maladies virales tel que : la maladie de Marek et montrant des lésions caractéristiques à l'examen nécropsique (autopsie).

Un total de 400 échantillons a été soumis aux analyses sérologiques au sein du laboratoire de recherche de Biotechnologies liées à la Reproduction Animale (LBRA) situé à l'Institut des Sciences Vétérinaires / Université de Blida.

Après le signalement d'un cas suspect par l'un des vétérinaires chargé du suivi, nous nous sommes déplacés dans un délai de 1-2 jours pour effectuer la première série de prélèvements et remplir la fiche de prélèvement.

Concernant le protocole de prélèvement, pour chaque élevage, nous avons fait deux séries de prélèvements, une dite prélèvement précoce faite dès le début de l'infection (l'apparition des premiers signes cliniques), 1 à 2 jours au maximum, et l'autre tardive se fera 2-3 semaines plus tard (pour mettre en évidence une éventuelle séroconversion).

Les prélèvements ont été effectués au niveau de la veine alaire et réalisés directement dans l'élevage (20 échantillons/élevage) (Figure 11), afin de garantir la représentativité des échantillons, les prélèvements de sang ont été réalisés au sein d'un lot.

Une fois les prélèvements sanguins récoltés dans des tubes secs préalablement identifiés (environ 3 ml/sujet afin de pouvoir exécuter les différentes analyses à partir du même sérum), ils ont été directement acheminés au laboratoire où ils ont subi le jour même une centrifugation (5000 tours/mn pendant 10 mn) en vue de récupérer les sérums qui ont été par la suite conservés dans des tubes Eppendorf identifiés et congelés à -20 °C (Figure 12).

Une fois le nombre de sérums prévus atteint (1200 Sérums), les prélèvements on fait l'objet des examens sérologiques.



Figure 8 : Technique de prélèvement.



Sang avant centrifugation | Sang après centrifugation | Sérum dans des Eppendorf identifiés

Figure 9 : Les étapes de décantation du sérum**.**

III.5. Méthode de laboratoire (Sérologie) :

Une technique Elisa indirecte a été effectuée en utilisant des kits de la société ID.vet Innovative Diagnostics (Montpellier, France) : ID Screen® Marek Virus Indirect (Figure 13).

Les groupes de prélèvements effectués à différentes dates et provenant des différents bâtiments d'élevages ont été simultanément analysés avec le même kit afin d'assurer la comparabilité des résultats fournis par le test et de bien interpréter la cinétique des anticorps (Ac) ; les sérums ont été dilués au 1/500e puis chargés sur des plaques ELISA pour commencer la réaction immuno-absorbante comme indiqué dans les manuels du fabricant.

La lecture des plaques Elisa a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre ELx800 (DIALAB GmbH, Wiener Neudorf, Autriche) muni d'un filtre de 450 nm. La densité optique (DO) obtenue a été transformée en titre d'anticorps (Figure 14).

La transformation des DO, les tests de validité, les titres moyens, et le coefficient de variation (CV) ont été calculés automatiquement par bande et par série de prélèvements à l'aide d'un logiciel fourni par le laboratoire (IDSoft^{TM}, Montpellier, France).



Figure 10: Kit ELISA utilisé.



Figure 11 : Lecteur ELISA**.**

- **Information générale :**

Ce kit de diagnostic est destiné à la mise en évidence d'anticorps dirigés contre le virus de la maladie de Marek.

Il permet d'apprécier la quantité d'anticorps spécifique présents dans les sérums de poules.

- **Description et principe :**

- Les cupules sont sensibilisées avec l'antigène Marek purifié.
- Les échantillons à tester et les contrôles sont distribués dans les cupules. Les anticorps spécifiques des virus, Marek, s'ils sont présents, forment un complexe antigène-anticorps.
- Un conjugué anti-poule marqué à la peroxydase (HRP) est distribué dans les cupules. Il se fixe aux anticorps anti- Marek, formant un complexe antigène-anticorps-conjugué-HRP.
- Après élimination du conjugué en excès par lavage, la réaction est révélée par une solution de révélation (TMB)
- La coloration qui en résulte est liée à la quantité d'anticorps spécifiques présents dans l'échantillon à tester :
- En présence d'anticorps dans l'échantillon, il apparait une coloration bleue qui devient jaune après blocage.
- En l'absence d'anticorps dans l'échantillon, il n'apparait pas de coloration.
- La lecture est réalisée à 450 nm.

- **Composants du kit**

- **Réactifs :**

- Microplaques sensibilisées avec l'antigène Marek purifié
- Contrôle positif
- Contrôle négatif
- Tampon de dilution 14
- Conjugué concentré (10X)
- Tampon de dilution 3
- Solution de lavage concentrée (20X)

- Solution de révélation
- Solution d'arrêt (0.5M).

1. Le conjugué, les contrôles, et la solution de révélation doivent être stockés à 5°C (+/- 3°C)

2. Les autres réactifs peuvent être stockés entre +2°C et +26 °C.

3. Les composants portant la même dénomination (solution de lavage, diluants) peuvent être utilisés dans l'ensemble de la gamme IDvet.

- **Matériel nécessaire :**

1. Pipettes de précision mono ou multi-canaux capables de délivrer des volumes de 5µl, 10µl, 100µl, 200µl.

2. Embout de pipette à usage unique.

3. Lecteur de microplaque à 96 puits.

4. Eau distillée ou désionisée.

5. Système de lavage manuel ou automatique.

- **Préparation des échantillons :**

Pour réduire la différence des temps d'incubation entre les échantillons, il est possible de préparer une microplaque de 96 puits contenant les échantillons à tester et les échantillons de contrôle, puis de les transfère dans la plaque ELISA avec pipette multicanaux.

- **Préparation de la Solution de lavage :**

Si nécessaire, ramener la solution de lavage concentrée **(20X)** à température ambiante (21°C + /-5°C) et bien agiter pour assurer la dissolution des cristaux.

Préparer la solution de lavage **(1X)** par dilution de la solution de lavage **(20X)** dans de l'eau distillée /désionisée.

- **Mode opératoire :**

Ramener tous les réactifs à température ambiante (21°C +/- 5°C) avant l'emploi et les homogénéiser par retournement ou au vortex.

1. Les échantillons sont dilués au 1/500 en **Tampon de dilution 14.** Dans une pré-plaque de pré-dilution, ajouter

- 245 µl de **Tampon de dilution 14** dans chacun des puits.
- 5 µl du **Contrôle Négatif** dans les cupules A1 et B1.
- 5 µl du **Contrôle Positif** dans les cupules C1 et D1.
- 5 µl d'échantillons à tester dans les cupules restantes

2. Dans la plaque ELISA, ajouter

- 90 µl de **Tampon de dilution 14.**
- 10 µl des **échantillons pré-dilués** ci-dessus.

3. Couvrir la plaque et incuber **30 minutes (+/-3min)** à température ambiante (21°C+/-5°C).
4. Préparer le **Conjugué 1X** en diluant **conjugué concentré 10X** au 1/10^{éme} en **Tampon de dilution 3.**
5. Laver 3 fois chaque cupule avec environs 300 µl de solution **de lavage 1X.** Eviter le dessèchement des cupules entre les lavages.
6. Distribuer 100 µl de **Conjugué anti-poule-HRP 1X** dans chaque cupule.
7. Couvrir la plaque et incuber **30 minutes (+/-3 min)** à température ambiante (21°C +/-5°C).
8. Laver 3 fois chaque cupule avec environ 300µl de solution **de lavage 1X.** Eviter le dessèchement des cupules entre lavages.
9. Distribuer 100 µl de **Solution de révélation** dans chaque cupule.
10. Incuber **15 min (+/- 2 min)** à température ambiante (21°C +/- 5°C) à l'obscurité.
11. Distribuer 100 µl de Solution d'arrêt dans chaque cupule pour arrêter la réaction. Ajouter la solution d'arrêt dans le même ordre qu'en étape #9.
12. Mesurer et enregistre les densités optiques à 450nm.

- **Validation :**

Le test est validé si :

- ✓ La valeur moyenne de densité optique des contrôles positifs (DO_{CP}) est supérieure à 0.250.

$$\mathbf{DO_{CP} > 0.250}$$

- ✓ Le rapport entre la moyenne des Contrôles Positifs (DO_{CP}) et la moyenne des Contrôles Négatifs (DO_{CN}) est supérieure à 3.

$$\mathbf{DO_{CP} / DO_{CN} > 3}$$

- **Interprétation**

Pour chaque échantillons, calculer le S/P et le titre en anticorps ;

1-Calcul du rapport S/P

$$S/P = \frac{DO_{\text{échantillon}} - DO_{CN}}{DO_{CP} - DO_{CN}}$$

2- Calcul du titre en anticorps

$$\mathbf{Log_{10}}(\text{titre}) = 0.97 \times \mathbf{log_{10}}(s/p) + 3.449 \quad \text{titre} = 10^{\log_{10}(\text{titre})}$$

III.6. Facteurs de risque :

A chaque prélèvements, les données zootechniques et sanitaires sont relevées, soit en interrogeant l'éleveur, soit le vétérinaire chargé du suivi d'élevage, soit par l'observation directe. Les informations collectées donnent lieu à une fiche signalétique identifiant l'élevage et une fiche de suivi caractérisant l'évolution de l'état général de l'élevage.

A côté des données précédentes, l'éleveur indique si la maladie s'est manifestée sur les bandes en présence ou sur les bandes précédentes. Cet élément est un indicateur de la pression virale sauvage propre à l'élevage.

Lors de notre enquête, les paramètres qui sont pris en considération : la région, le climat, la saison, l'âge d'apparition, la densité, la souche, l'hygiène, le protocole de vaccination qui a été relevé (âge de vaccination, type de vaccin et mode d'administration du vaccin) (Tableau 4).

III.7. Analyses statistiques :

Tout d'abord, des statistiques descriptives ont été utilisées pour caractériser les élevages selon les différents facteurs. Ainsi, des analyses statistiques ont été effectuées avec SAS (version 9.1.3 ; SAS Institute Inc., Cary, NC).

Avant d'ajuster l'analyse statistique, l'examen des distributions des titres en anticorps par l'utilisation de (PROC UNIVARIATE, Shapiro-Wilk test) a indiqué que la plupart d'entre eux ne pouvaient pas être considérés comme normalement distribués. Si la variable ne correspond pas à la distribution normale, des ajustements tels que les transformations logarithmique, carrée, racine carrée sont des outils possibles.

Le titre en anticorps de chaque maladie à travers le temps a été analysé en ajustant un modèle linéaire général mixte utilisant la procédure MIXTE du SAS pour évaluer la séropositivité entre le premier et le second prélèvement de sérum.

Ensuite, l'effet de la probabilité de la séropositivité a été évalué à l'aide de modèles multivariables à effets mixtes (PROC GENMOD), en utilisant une distribution normale et des fonctions de liaison logarithmique, et les élevages comme un effet aléatoire.

Les variables offertes au modèle comprenaient la région, le protocole de vaccination, la saison, la souche, le climat, l'hygiène, la densité et l'âge. Les variables âge, densité, saison, climat et hygiène ont été dichotomisées sur : ≤ vs.>30 jours pour les groupes d'âge ; ≤ vs. >10 sujets/m2 groupes pour la densité ; automne vs. été et printemps pour la saison et groupes sec vs. humide pour le climat.

Avant l'inclusion dans le modèle mixte, la sélection initiale des variables a été effectuée à l'aide d'une procédure manuelle par étapes, les variables significatives ($P < 0,1$) restant dans le modèle. Cette procédure a été répétée pour chaque maladie.

La sensibilité et la spécificité de la détection des maladies en fonction des signes cliniques et nécrosiques a été calculée à l'aide de l'évaluation du test de diagnostic de Win Episcope 2.0.

Enfin, Un tracé de lignes empilées de changements de titre en anticorps (graphes) a été généré en utilisant Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA USA).

Conclusion

L’usage des vaccins inactivés pourrait aussi renforcer la capacité de défense des organismes sensibles. Pour éviter que les élevages avicoles ne subissent en permanence des effets de nombreuses maladies virales, des efforts dans la surveillance épidémiologique devraient être entrepris.

En fin, l'aviculture joue un rôle socio-économique important dans l'économie des pays en développement. En revanche, elle se pratique dans des conditions d'élevage sommaires, constituant le lit des infections, ceci, est à l'origine de la faible productivité. Un meilleur contrôle et une meilleure conduite de cet élevage permet une optimisation de ce secteur d'activité.

Références Bibliographiques

1. (diseases of poultry 11 thed 2003 iowa state universitypressaamesia 407-465)
2. (Fontaine et al, 1995).
3. (Gordon, 1979 , Lesbouyries, 1965).
4. (Gordon, 1979).
5. (Manuel terrestre de l'OIE 2008-621)
6. (Poultry diseases, 2008)
7. (Poultry diseases, 2008)
8. (SALOMON, COLL 1973)
9. (TRAN Ngoc Bich 20 octobre 2008 thése de doctorat de l'université de Toulouse)
10. . (pathologicalresposes to infection an evoluvingproblem 2004 elsevieramesterdam 78-87)
11. . (Poultry diseases, 2008)
12. . Rispens BH, van Vloten H, Mastenbroek N, Maas HJ, Schat KA. Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials. Avian Dis 1972 ; 16 : 108-25.
13. .(an evoluving problèmes 2004 elsevieramesterdam 32-48)
14. .(Didier, 2001 ,poultrydisease 2008 saunderselsevieredinburgh 258-275)
15. Morgan RW, Xie Q, Cantello JL, et al. Marek's disease virus latency.
16. Churchill AE, Payne LN, Chubb RC. Immunization against Marek's disease using a live attenuated virus. Nature 1969 ; 221 : 744-7.
17. Okazaki W, Purchase HG, Burmester BR. Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys. Avian Dis 1970 ; 14 : 413-29
18. Anonyme
19. Churchill AE, Biggs PM. Agent of Marek's disease in tissue culture.
20. Curr Top Microbiol Immunol 2001 ; 255 : 223-43.

21. Hicks JA, Liu HC. Current state of Marek's disease virus microRNA research. Avian Dis 2013 ; 57 : 332-9.
22. Lesbouyries, 1965).
23. Morrow C, Fehler F. Marek's disease: a worldwide problem. In : Davison F, Nair V, eds. Marek's disease: an evolving problem. London : Elsevier Academic Press, 2004 [49-61].
24. Nature 1967 ; 215 : 528-30.
25. Saidi, 1982
26. Schat KA, Calnek BW. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. J Natl Cancer Inst 1978 ; 60 : 1075-82