1060 THV-1

1060THV-1

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOC
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Blida -1-

Institut des sciences vétérinaires

Projet de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire

THEME :
Enquête sérologique par I.H.A sur la maladie de Newcastle dans la région Est d'Algérie

Présenté par :

M^r SAFIA MASSINISSA **et** M^r LAIB ABDELDJEBBAR

Devant le jury :

M^me YOUSFI.S	maître assistante à l'ISV, de Blida	Président
M^me AIT ISSAD.N	maître assistante à l'ISV, de Blida	Examinateur
M^r LOUNAS.A,	maître assistant à l'ISV, de Blida	Promoteur

*** Promotion 2014/2015 ***

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir aidés et de nous avoir donné la foi et la force pour achever ce modeste travail.

Nous exprimons notre profonde gratitude à notre promoteur M[r] LOUNAS.A, maître assistant à l'ISV, de Blida à l'université de Blida 1, de nous avoir encadrés avec sa cordialité franche et coutumière, nous le remercions pour sa patience et sa gentillesse, pour ses conseils et ses orientations clairvoyantes qui nous ont guidés dans la réalisation de ce travail. Chaleureux remerciement.

Nous tenons à remercier :

M[me] YOUSFI.S de nous avoir fait l'honneur de présider notre travail.

M[me] AIT ISSAD.N de nous avoir accepté d'évaluér et d'examinér notre projet.

Nous saisissons cette occasion pour exprimer notre profonde gratitude à l'ensemble des enseignants de l'institut des sciences vétérinaires.

Nous adressons nos sincères remerciements à tous ceux qui ont participé de prés ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

Aux être les plus chères a mon cœur, mes parent , pour leur amour , pour leur encouragement ,leur patience ,et leur aide continu le long de mon parcours d'étude.

Ainsi qu'a mes adorable sœur unique massiva , aldja et thinhinana et mon frères chirif ainsi que toute la famille , à la mémoire de mon cher grand père et gronde Méré sans oublier mes chères oncles et tantes .

A tout mes cousins et mes cousines spécialement à thiziri et ses enfants .

A tout la famille SAFIA.

A mes amis : djalal , mostafa , farouk, Sid ahmed ,elhadi (bakdad),azdine ,elghetass ,nacer , Naime,zareb karim ,morad , massinissa , hisham ,ka3bouche,hakim ,djamal alawa, ahsen,aissa,mohe ,said,azize amar ghilas sba33 el3amri khalde,hmed .

A tout et tous les membres de l'association de science de la vie BIAV .

Mes meilleures dédicaces à mon promoteur Dr LOUNAS ,A .

Enfin je souhaite tout particulièrement adresser, mes chaleureux remercîments à tous ceux qui m'a aidé de présent de loin, a ceux qui m'on soutenus et encourager, et a ceux qui j'aime.

SAFIA ,MASSINISSA.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À mes chères parents en témoignage de l'amour, du respect et de ma profonde et éternelle gratitude que je leurs porte et ma reconnaissance pour leur soutien et leur encouragements que m'ont prodigués tout au long de ma vie.

À l'âme de mes grand-mères Badra et Nouna

À mon cher frère et mes chères sœurs pour leurs sacrifices et leurs aides illimitées tout le long de ma carrière scolaire et universitaire, et à toute la famille LAIB, Que dieu vous préserve longue vie et prospérité.

À tous ceux qui pensent à moi et que je n'ai pas mentionné.

À mes amis, spécialement Timouh, Kastel, Said, sans oublier les gens qu'ALLAH les a réunis avec moi dans la chambre magique de Djalal (B-108 cité 06)

Abdeldjebbar.

Resume

La Newcastle est une maladie aviaire contagieuse d'étiologie virale ; elle est causée par un *paramyxovirus* de type 1. Elle constitue une véritable contrainte pour l'aviculture. Son incidence économique est difficilement chiffrable, mais vraisemblablement importante chez le poulet de chair vue les taux de mortalités importants observés sur les élevages atteints de la Newcastle. La présente étude s'est inscrite dans cette perspective ; elle a pour but d'apporter une étude rétrospective sur la sérologie par la technique de l'IHA de neufs élevages choisis aléatoirement à partir de quatre wilaya de la région est d'Algérie pour la mise en évidence de la ND, ainsi qu'un recueil d'informations cliniques (symptômes, protocoles de vaccination, suspicion des vétérinaire,...etc.). Les résultats de notre enquête réalisée au niveau de ces wilayas, ont montré que presque la moitié (44.44%) des élevages prélevés ont étés séropositifs dont le taux de mortalité a été trop important (24,41%), pour ce qui concerne les protocoles de vaccination nous avons une variation de quatre protocoles de vaccination suivis par les éleveurs dont le protocoles de vaccination jugé adéquat par de nombreuse études été suivi dans 44,45% des élevages, et malgré la prévention nous avons trouvé la maladie de Newcastle dans des élevages qui sont supposés être protégés. Cela nous a mené à supposer que le non-respect de l'hygiène et la biosécurité été la cause de l'introduction du NDV dans ces élevages. Concernant les suspicions des vétérinaires, nous avons remarqué qu'aucun vétérinaire n'a suspecté la ND malgré sa présence dans 44,44% des exploitations aviaires dont lesquelles notre étude été mené.

Mots clés : maladie de New Castle, vaccination, sérologie, IHA.

Summary

Newcastle is a contagious avian disease of viral etiology; it is caused by a paramyxovirus of the type L. It constitutes a true constraint for poultry farming. Its economic incidence is not easily calculable, but probably important in fowl table seen important death rates observed on the breedings reached of Newcastle. The present study fell under this prospect; the purpose of it is to bring a retrospective study on serology by the technique of the IHA of new breedings chosen by chance starting from four wilaya of the area is of Algeria for the description of ND, as well as a collection of clinical information (symptoms, protocols of vaccination, suspicion of the veterinary surgeon,... etc). The results of our investigation carried out on the level of these wilayas, showed that almost half (44.44%) of the taken breedings have HIV positive summers whose death rate was too important (24,41%), concerning the protocols of vaccination we have a variation of four protocols of vaccination followed by the stockbreeders of which protocols of vaccination considered to be adequate by many studies followed in 44,45% of the breedings, and in spite of the prevention we found the disease of Newcastle in breedings which are supposed to be protected. That has us finely to suppose that the non-observance of hygiene and the biosecurity be the cause of the introduction of the NDV into these breedings. Concerning suspicions of the veterinary surgeons, we noticed that none the veterinary surgeon suspecté ND in spite of its presence in 44,44% of the avian exploitations of which our study be finely.

Key words: disease of New Castle, vaccination, sérolo

ملخص

النيوكاستل مرض دجاج المعدي والمسببات عن طريق نوع 1 (براميك وفيروس) شكل عائقا حقيقيا على الاقتصاد الدواجن لكن نلاحظ ارتفاع معدل الوفيات في مربي الدواجن اللحوم البيضاء المصابة بهذا الفيروس .هذه الدراسة تهدف الى اجراء ابحاث على الامصال بتقنية لتسعة مربيات مختارة عشوائيا من اربع ولايات مختلفة من الشرق الجزائري لغرض تحديد الاصابة بمرض النيوكاسل وجمع معلومات اكلينيكية(الاعراض .التلقيح الاشتباه من طرف البيطري).....الخ

نتائج تحقيقنا على مستوى هاته الولايات اثبتت تقريبا ان نصف المربيات (44.44%) التي درسناها اظهرت نتائج موجبة ونسبة الوفيات فيها كانت مهمة(24.41%). فيما يخص طريقة التلقيح لدينا اربعة طرق للتلقيح متبعة من طرف المربيين و الطريقة التي اثبت انها الاكثر فعالية من طرف العديد من الدراسات قد اتبعت في (44045%) من المربيات ومع وجود الوقاية. وجدنا تفشي مرض نيوكاسل في مربيات كان من المفترض انها محمية هذا ما قادنا الى افتراض عدم احترام النظافة و الحماية البيولوجية كان السبب في دخول فيروس نيوكاسل في هذه المربيات فيما يخص اشتباه الاطباء البيطريين لقد لاحظنا ان لا احد من البيطريين الذين تم استدعائهم لفحص المربيات اشتبه في مرض النيوكاسل مع انه موجود في (44.44%) من مربيات الدواجن التي درسناها

الكلمات الرئيسية. مرض نيوكاسل. التلقيح. الامصال

Liste des schémas

Schéma1 :
Hémagglutination.....13

Schéma2 : Techniques d'agglutination.....14

Schéma3 : Réaction de fixation du complément (RFC).....15

Schéma4 : ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....16

Schéma5 : ELISA C1q en phase solide.....17

Schéma6 : Radio-immunoessai (test classique).....17

Schéma7: Immunoblot (Western-blot).....18

Schéma8: Immunofluorescence..... 19

Schéma9: Southern-blot 21

Schéma10 : Northern-blot..... 21

Schéma11 : -(a) Réaction de polymérase en chaîne (PCR)
-(b) Séquençage de l'ADN..... 23

Liste des figures

Figure1 : Zones hémorragiques punctiformes au niveau du proventricule 8

Figure2 : Localisation des régions d'étude..... 27

Figure3 : Illustration d'un lieu anatomique pratique pour prélever les poulets.....29

Liste des graphes

Graphe1 : Représentation graphique des protocoles de vaccination des élevages de l'étude.... 30

Graphe2 : Représentation graphique des symptômes et lésions des élevages de l'étude..... 31

Graphe3 : Représentation graphique d'effectif des élevages de l'étude..... 32

Graphe4 : Représentation graphique des mortalités des élevages de l'étude..... 33

Graphe5 : Représentation graphique des suspicions des vétérinaires dans les élevages de l'étude.....34

Graphe6 : Représentation graphique des souches des élevages de l'étude..... 35

Graphe7 : Représentation graphique des Résultats séropositifs et séronégatifs des élevages de l'étude..... 36

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de comparaison des déférents tests sérologiques 23

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des protocoles de vaccination des élevages de l'étude 30

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des symptômes et lésions des élevages de l'étude 31

Tableau 4 : Tableau récapitulatif d'effectif des élevages de l'étude 32

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des mortalités des élevages de l'étude 33

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des suspicions des vétérinaires dans les élevages de l'étude..... 33

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des souches des élevages de l'étude 34

Tableau8 : Tableau récapitulatif des Résultats sérologiques des élevages de l'étude 35

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des Résultats séropositifs et séronégatifs des élevages de l'étude.....36

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des protocoles de vaccination des élevages de l'étude en fonction de la sérologie..... 37

Tableau 11 : tableau récapitulatif de la séropositivité en fonction de taux de mortalité..... 38

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

FITC : fluorescéine isothiocyanate.

RFC : Réaction de fixation du complément.

FR : facteur rhumatoïde.

MRC : réaction de polymérase en chaîne.

U.H.A. : unité hémagglutinante.

INMV : Institut National de Médecine Vétérinaire.

ND: Newcastle.

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

HA :Hémagglutination

IHA : Inhibition de l'Hémagglutination

PMV : Paramyxovirus.

HN : Hémagglutinine-Neuraminidase.

OIE : Organisation International des Epizooties Glycoprotéine.

R.T.-P.C.R. Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne après Transcription Inverse.

N.D.V. Newcastle Disease Virus.

TABLEAU DE MATIERE

Introduction.....1
Chapitre I : synthèse Bibliographique sur la Maladie de Newcastle.....2
1. Définition
.....2
2. Historique 2
3. Répartition géographique 2
3.1.CONTINENT EUROPEEN.....3
3.2. CONTINENT AFRICAIN 3
3.3. CONTINENT ASIATIQUE.....3
3.4. CONTINENT AMERICAIN 4
4. Etiologie.....4
4.1.Classification.....4
4.2.Pouvoir pathogène.....4
4.3.Pouvoir antigène et immunogène 5
4.3.1 Pouvoir antigène.....5
4.3.2 Le pouvoir immunogène.....5
4.3.3 Le pouvoir Hémagglutinant.....5
5. Epidémiologie.....6
5.1 Sources de virus.....6
5.2. Résistance.....6
5.3. Transmission.....6
5.4. Sensibilité.....7
6. Symptômes et lésions.....7
6.1 Symptômes.....7
6.2. Lesions.....8
6.2.1. Macroscopiques.....8
6.2.2. Microscopiques.....9
7. Diagnostique.....9

7.1. Epidémio-clinique 9
7.2. De laboratoire 9
7.2.1Sérologique (en 24 heures).....9
7.2.2 Moléculaire, par R.T.-P.CJR.....12
7.2.3 Autres méthodes de détection directe 12

Partie bibliographe II

Chapitre II : étude comparative des méthodes du diagnostic de la MN.....13

1. Réactions antigènes-anticorps 13

1.1.Techniques d'agglutination.....13
1.1.1.Hémagglutination.....13

1.1.2. Agglutination au latex 14
1.1.3.Détection(réaction de Widal).....14

1.1.4. Détection D'antigènes (réaction de Gruber)..... 14

1.2. Réaction de fixation du complément (RFC).....14
1.3. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....15

1.4. ELISA C1q en phase solide.....16

1.5. Radio-immunoessai (test classique).....17

1.6. Immunoblot (Western-blot).....18

1.7. Fluorescence 18

1.8. immunofluorescence 19

1.9. Cytométrie de flux 19

2. Méthodes de biologie moléculaire.....20

2.1. Southern-blot 20

2.2. Northern-blot.....21

2.3. Réaction de polymérase en chaîne (PCR) 22

2.4. Séquençage de l'ADN 22

3. Tableau comparative avantages et les inconvénients des tests sérologique...23

Partie expérimentale

I. Problématique..... 26

II. *Objectif* 26

III. Matériel et méthodes 27

1.1 Résultats des fiches signalétiques 30

2.1.1 protocoles de vaccination 30

2.1.2 Tableau clinique 31

2.1.3 Effectif 32

2.1.4 Taux de mortalité 32

1.1.5 Suspicions des vétérinaires 33

1.1.6.souches de poulet de l'étude.....34

2. Résultats sérologiques 35

2.1 *Séroprévalence de la maladie de Newcastle* 35

2.2 : résultats sérologiques des élevages étudiés 36

2.3. Résultats sérologiques par rapport aux protocoles de vaccination.....37

2.4. la séroprévalence en fonction de mortalité 38

IV.Discussion 39

Introduction

A l'instar de plusieurs pays au monde, le secteur d'élevage avicole joue un rôle significatif dans le développement économique de l'Algérie. En effet, la production des viandes est d'autres produits d'origine animale sont créateurs de revenus d'emplois pour les acteurs de la filière animale peuvent être complexes et s'étendent en générale bien au-delà des impacts immédiats sur les producteurs affectés : pertes de productivité en élevage, pertes de revenus des activités utilisant les ressources animales, bien-être des populations (morbidité, sécurité et qualité alimentaires). Les pertes directes sont ainsi dues à la maladie elle-même, elles peuvent être impressionnantes quand les taux de morbidités et de mortalité sont de 100%. Parmi les maladies qui touchent le poulet de chair, nous nous sommes intéressés particulièrement à la maladie de Newcastle. [1]

La maladie de Newcastle constitue une des principales contraintes au développement de l'aviculture. Elle est causée par un Paramyxovirus de type 1 affectant les volailles, et les oiseaux sauvages et domestique. Elle est caractérisée par une grande variabilité de la morbidité, de la mortalité, des signes cliniques et des lésions. Elle est définie comme maladie de liste A par l'organisation internationale des épizooties (OIE). La vaccination est recommandée comme seul moyen de lutte. [2]

La présente étude est réalisée dans cinq wilayas de la région Est de l'Algérie, elle a pour but d'enquêter sur la sérologie de la maladie de Newcastle chez le poulet chair.

En ce sens, notre étude aura comme objectif de déterminer les causes de propagation de la maladie, malgré la vaccination est proposé des solutions aux problèmes, elle s'articule sur deux partie.

- Une synthèse bibliographique de connaissances sur la maladie.

-Une enquête sérologique a été réalisée sur différent élevage ensuite discuté et enfin les conclusions et les perspectives seront présentées.

Partie bibliographique

I. Synthèse Bibliographique sur la Maladie de Newcastle :

1. Définition :

La maladie de Newcastle est une maladie infectieuse, très contagieuse, affectant surtout les oiseaux et particulièrement les gallinacés, provoquée par toute souche aviaire du paramyxovirus de type 1 (PMV1) de la famille des Paramyxoviridae. D'après Luthgen (1981) le NDV (Newcastle Disease Virus) affecte au moins 117 espèces d'oiseaux appartenant à 17 ordres. [1]

Caractérisée par la diversité de ses formes cliniques, elle associe classiquement une atteinte de l'état général et des troubles digestifs, respiratoires et/ou nerveux, les formes les plus graves évoluant rapidement vers la mort avec des lésions de type congestif ou hémorragique.[2]

2. Historique :

La maladie de Newcastle a été individualisée en 1927 par DOYLE qui a décrit en Grande Bretagne, une maladie très meurtrière des poules d'âges variables dans une ferme voisine de Newcastle où sept cents poules adultes. La mortalité était de 100 pour 100.

Cette maladie ressemble à la peste aviaire décrite par CENTANNI en Italie, en 1901. Mais d'après les constatations de DOYLE en 1927 la maladie de Newcastle diffère de la peste aviaire non seulement par la nature du virus mais aussi par la longueur de la période d'incubation. D'autre part DOYLE précise que la contagion et les signes respiratoires sont beaucoup plus intenses dans la maladie de Newcastle (MN).

Enfin il montre que les poules immunisées contre cette maladie, ne sont pas protégées contre le virus de la peste aviaire. DOYLE, en raison de la région où il a découvert la maladie, la dénomma maladie de Newcastle (Newcastle Disease). Dès lors, cette affection fut signalée par plusieurs auteurs et désignée sous divers noms RAMIKET disease, PHILLIPIN fowl disease, pseudo-fowl-plaque, DOYLE disease, maladie coréenne des poules, pseudo peste aviaire, peste aviaire asiatique.

A l'heure actuelle l'appellation "maladie de Newcastle" est consacrée par l'usage, en raison de la région où elle fut décrite pour la première fois.

"Depuis lors son aire d'expansion ne cesse de s'étendre aux dé- pends de la peste aviaire qui cède du terrain devant cette forme spéciale du contage" [3]

3. Répartition géographique :

Depuis son apparition à Newcastle la maladie s'est très vite répandue dans le monde entier. Elle a été signalée dans tous les continents : Europe, Asie, Afrique, Amérique.

3.1. Continent européen :

Il a été atteint en 1927 à partir de la Grande Bretagne où la maladie a été découverte pour la première fois par DOYLE.

MORNET rapporte que la maladie fut signalée en 1940 en Italie [4]. D'après ROHRER, elle fut décrite en Allemagne en 1941 [5]. HESS rapporte que cette maladie atteint la Suisse en 1946 [6]. Selon ALEGREN, la Suède fut frappée en 1947 [7]. D'après GUILLAUME la France fut atteinte, en 1948 [8].

3.2. Continent africain :

La pseudo-peste aviaire ne tarda pas à atteindre le continent. Elle fut signalée successivement :

En Afrique orientale par HUDSON cité par CURASSON, au Kenya en 1937 [9].

En Afrique centrale : en 1939, au Congo Belge, actuel Zaïre par MALBRANT cité par MOYON [10] et en 1951 au Cameroun méridional d'après THORNE et MACLEOD. [11]

En Afrique du Sud en 1945, rapporté par GAGO. [12]

En Afrique du Nord en. 1947 par BALOZET et Coll. [13]

En Afrique occidentale : selon MORNET et Coll. Cette partie du continent fut atteinte en 1949 à partir de Dakar (Sénégal) où le premier foyer apparut après l'importation des oiseaux reproducteurs en provenance de la France. La maladie va très tôt se répandre dans cette région africaine : en1950 en Côte d'Ivoire et en Haute Volta : 1954 au Dahomey (actuelle République populaire du Bénin) [14].

Selon NOYON, cette maladie a été signalée au Togo en 1950. [10]

D'après THORNE et MACLEOD. Cette maladie apparut en Gambie en 1950, en Gold Coast (Ghana) en 1951 et en 1053 au Nigéria. Elle est signalée en 1953 en Sierra Léone. [11]

3.3.continent asiatique :

La maladie de Newcastle fut décrite en Indonésie presqu'en même temps qu'en Grande Bretagne, en 1926 par KRANVELED [15]. Elle fut très rapidement tâche d'huile dans la zone. Selon ROHRER cette peste asiatique a été identifiée successivement en 1927 aux Indes, en 1928 dans les Iles Philippines,

en 1929 en Corée par KONNO et Coll. cité par ROHRER, en 1932-1934 au Japon, puis un peu plus tard en Chine, en Australie, en Malaisie, en Birmanie, à Ceylan. [5]

3.4.continent américain :

D'après ROHRER le continent nord-américain serait atteint depuis 1935 par cette maladie et vers 1940 l'ensemble du continent était envahi. [5] Selon WALTER la maladie atteint le Canada en 1948. [16]

4. Etiologie

4.1.Classification :

Le NDV est un virus enveloppé qui fait partie du genre récemment décrit des Avulavirus appartenant à la famille des Paramyxoviridae [17]. Cette famille de virus se caractérise par une capside de symétrie hélicoïdale et par un ARN monocaténaire non segmenté de polarité négative. Neuf sérotypes ont été identifiés au sein des paramyxovirus aviaires (APMV- 1 à APMV-9), le NDV appartenant au sérotype 1. Ce virus présente de grandes diversités génétiques, ces dernières étant associées à l'origine spatio-temporelle ainsi qu'à l'espèce hôte des différentes souches. Ainsi, le séquençage du gène de la protéine de fusion F a permis d'identifier au moins six lignées distinctes de NDV (lignées 1 à 6) [18], tandis que l'analyse génétique complète du génome a révélé l'existence de deux divisions majeures, à savoir les classes I et II, la seconde classe pouvant être subdivisée en huit génotypes (génotype I à VIII) [19]. Bien que toutes les souches de NDV appartiennent au même sérotype (APMV-1), ces variations génétiques pourraient avoir un impact sur l'antigénicité et donc sur l'efficacité des campagnes de vaccination. [20]

4.2.Pouvoir pathogène :

Le virus de la MN peut se présenter sous trois formes différentes – lentogénique, mésogénique et vélogénique – selon la souche du virus. La forme vélogénique de la maladie (MNFE) fait l'objet d'une déclaration obligatoire. [21]

Il existe une relation entre la structure de la glycoprotéine de fusion (F) de l'enveloppe virale (protéine permettant notamment la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, donc la pénétration de la nucléocapside dans la cellule) et la virulence. La virulence est généralement conditionnée par la présence d'acides aminés basiques multiples dans la zone de clivage de cette protéine.

Durant la réplication, les particules virales sont produites avec une glycoprotéine de fusion F0 (précurseur) qui doit être clivée pour qu'elles deviennent infectieuses. Ce clivage, en deux protéines F1 et F2, est réalisé par les protéases de la cellule hôte. La facilité de ce clivage est étroitement liée à la virulence. Les souches pathogènes pour le poulet disposent d'une F0 facilement clivable par les protéases

de l'hôte présentes dans de nombreuses variétés de tissus et cellules, ce qui permet une infection systémique grave. La F0 des souches de faible virulence n'est clivable que par certaines enzymes, ce qui restreint leur réplication aux tissus possédant les enzymes correspondants, en particulier les tractus digestifs et respiratoires.

Cette différence est conditionnée par la nature des acides aminés au site de clivage de F0 : les souches virulentes possèdent des AA basiques multiples (au moins trois AA tels que arginine ou lysine) dans la partie C-terminale de la protéine F2 et une phénylalanine dans la partie N-terminale de la protéine F1.[22]

4.3. Pouvoir antigène et immunogène :

4.3.1 Pouvoir antigène :

La multiplication du virus chez l'oiseau provoque l'apparition d'anticorps décelés par les méthodes classiques, notamment test de l'I.H.A. Le pouvoir antigène est unique :

- Malgré quelques différences de détail toutes, les souches appartiennent au même sérotype PMV1.
- Le pouvoir antigène est assez spécifique malgré des réactions croisées avec d'autres PMV. [23]

4.3.2 Le pouvoir immunogène :

Reposant surtout sur une réaction de type humoral. Le degré d'immunité peut être apprécié par titrage des anticorps neutralisants ou, en pratique, par titrage des anticorps. [22]

4.3.3 Le pouvoir Hémagglutinant :

Les spicules de protéine HN peuvent réagir avec des récepteurs de la surface des érythrocytes en provoquant une agglutination. Érythrocytes de poule + virus = Hémagglutination (HA).

Des anticorps spécifiques de ces spicules protéiques provoquent l'inhibition de l'hémagglutination : IHA, c'est le test de l'I.H.A. [23]

5.Epidémiologie :

5.1 Sources de virus :

De nombreux oiseaux domestiques et sauvages sont sensibles. Ils peuvent constituer des sources de virus [24], qu'ils soient malades, porteurs précoces, porteurs chroniques ou porteurs sains. Le virus se dissémine pendant la phase d'incubation, pendant la phase clinique, et pendant une période variable mais limitée de la convalescence (jusqu'à deux mois après guérison) [25]. Il a même été montré que certains Psittacidés excrètent des virus par intermittence pendant plus d'un an. Les animaux vaccinés sont également sources de virus [26].

Les étourneaux, les moineaux, les tourterelles peuvent être considérées comme d'éventuels vecteurs de virus. Ainsi, la caractérisation du virus P.M.V.-1 ayant causé l'épidémie de mai 1996 en Grande-Bretagne sur des faisans a montré de fortes similitudes avec des isolements viraux réalisés sur pigeons et colombes des environs, ce qui laisse supposer une transmission à partir de ces oiseaux sauvages infectés [27]. Le canard Colvert, ainsi que diverses espèces d'Anatidés, peuvent également propager le virus sans présenter de symptômes. Il est d'ailleurs déconseillé d'élever du gibier à plumes et du canard sur le même site. Par ailleurs, certains mammifères, comme les petits rongeurs, joueraient un rôle de transporteur passif du virus [28].

5.2. Résistance :

Le virus résiste 2 à 3 mois sur le sol du poulailler, 7 à 8 mois sur une coquille souillée, plus de 2 ans sur une carcasse congelée. Sa résistance élevée est à l'origine de sa persistance dans les locaux d'élevage, les matières fécales et sur le matériel contaminé ainsi que les produits d'origine aviaire. Il est inactivé à une température de 56°C pendant 3 heures ou à 60°C pendant 30 minutes. De l'alcool à 70°, des solutions de soude à 2 %, de crésyl à 1 %, d'ammonium quaternaire à 0,1 % détruisent le virus en 5 minutes à +20°C. Un pH bas, le formol et le phénol l'inactivent également. Il est aussi sensible à l'éther [29].

5.3. Transmission :

Le virus se propage d'un oiseau à l'autre par la voie respiratoire, ou par la voie digestive.

La contamination au couvoir est possible, lorsque les œufs se cassent, ou par l'intermédiaire des coquilles souillées [25].

La transmission horizontale peut se faire directement (contacts, aérosols...), ou indirectement par les locaux, le matériel, les caisses non désinfectées, les bottes, les vêtements, de l'eau ou de la nourriture contaminée par des oiseaux sauvages tels que des pigeons [27].

5.4. Sensibilité :

La sensibilité au paramyxovirus de type 1 est très variable selon l'espèce envisagée. Les poulets et les dindes sont les espèces aviaires les plus touchées par la maladie de Newcastle mais de nombreuses espèces d'oiseaux sauvages et domestiques peuvent la contracter. Depuis son isolement initial en 1926 en Indonésie, le virus a été isolé dans 117 espèces différentes d'oiseaux. L'âge intervient également sur la sensibilité : les jeunes sont plus sensibles [30]

6. Symptômes et lésions :

6.1 Symptômes :

Variables selon la virulence de la souche (intensité, tropisme), l'espèce hôte et le sujet infecté (immunité résiduelle...)

- Formes suraiguës : symptômes généraux (abattement, inappétence, plumes ébouriffées...) et mort en 24-48 heures.

- Formes aiguës : les plus caractéristiques sont dues à des souches viscérotropes. Elles débutent par une atteinte de l'état général (abattement...) rapidement associée à des symptômes digestifs (diarrhée verdâtre), respiratoires (catarrhe occulonasal, dyspnée, éternuements), nerveux (convulsions, troubles de l'équilibre, paralysies diverses...), cutanés (congestion ou œdème de la crête et des barbillons, hémorragies) diversement associés et à une chute de ponte.

Les symptômes s'aggravent et la mort survient en 3 à 4 jours. Guérison possible avec séquelles nerveuses fréquentes (paralysies...) et anomalies de ponte.

- Formes subaiguës et chroniques : évolution prolongée avec signes généraux discrets et symptômes locaux essentiellement respiratoires (catarrhe oculonasal...) associés à une chute de ponte (avec œufs plus petits, blanchâtres, hémorragies vitellines). Parfois chute de ponte isolée sur des effectifs ayant une immunité vaccinale résiduelle insuffisante (atteinte de la grappe ovarienne). Formes paralytiques possibles, notamment chez certaines espèces (faisans…).

- Formes asymptomatiques : fréquentes. [2]

6.2. LESIONS :

6.2.1. Macroscopiques :

- Lésions ni constantes, ni spécifiques, décrites essentiellement dans les formes aiguës dues à des souches vélogènes viscérotropes :

-Hémorragies localisées au tube digestif (ventricule succenturié, gésier, intestin, en particulier cæcums et cloaque) associées éventuellement à des ulcères recouverts d'un magma fibrinonécrotique, localisés aux formations lymphoïdes (amygdales cæcales...).

-Lésions congestives ou hémorragiques localisées aux séreuses, coeur, trachée, poumon, grappes ovariennes... [2]

Proventricule Peut présenter des zones hémorragiques punctiformes placées au sommet des papilles glandulaires lors de la maladie de Newcastle (figure1).

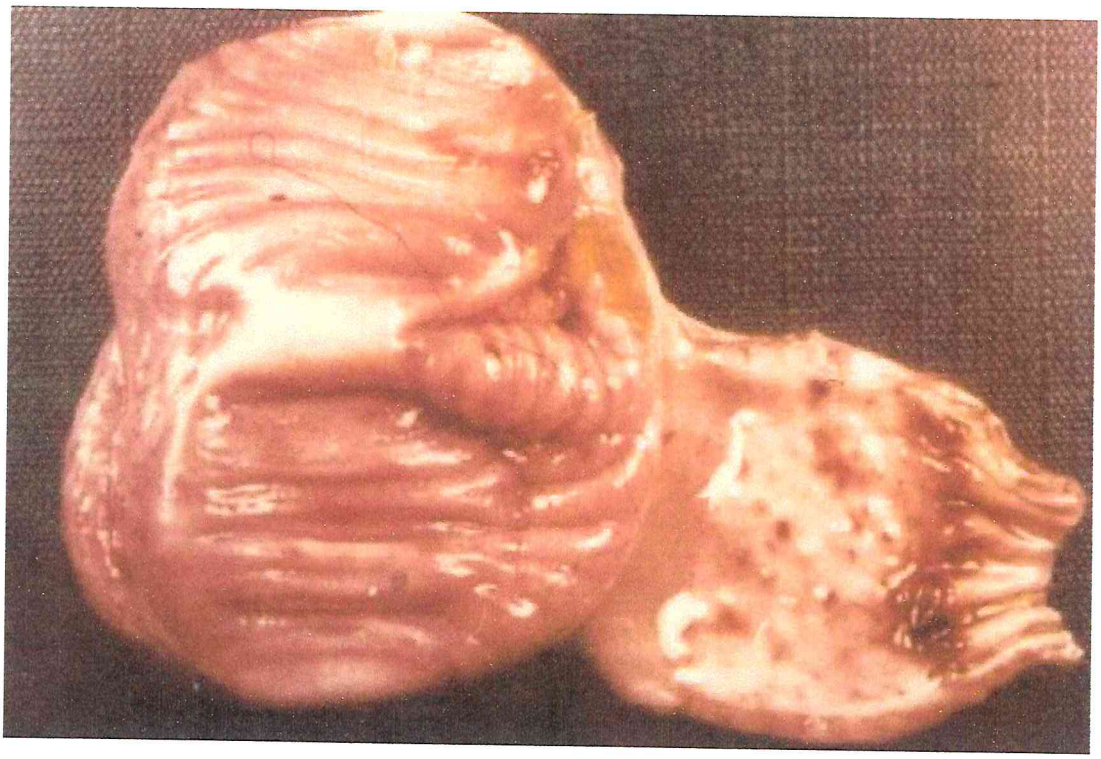


Figure1 : Zones hémorragiques punctiformes au niveau du proventricule. [31]

6.2.2. Microscopiques :

Lésions d'encéphalite virale, nécrose de l'épithélium respiratoire avec inclusions intra-cytoplasmiques, selon la localisation virale. [2]

7. Diagnostique :

7.1. Epidémio-clinique :

La pathogénie des souches de virus de la maladie de Newcastle varie énormément avec l'hôte. Mortalité et morbidité engendrées dépendent aussi du type de souche [32]. Les symptômes sont divers et peuvent concerner tous les appareils (digestif, respiratoire, nerveux). Le tableau lésionnel est évocateur en cas d'atteinte par une souche vélogène viscérotrope, il est plus fruste voire absent dans les autres cas [251. Aucune lésion macroscopique n'est pathognomonique. Le diagnostic doit donc dans tous les cas être confirmé par méthode expérimentale.

7.2. De laboratoire :

7.2.1 Sérologique (en 24 heures) :

Les anticorps ne sont détectables qu'après 7 jours d'infection chez le poulet, ce qui peut poser des problèmes d'interprétation. Ils passent par un pic à 2-3 semaines puis disparaissent en quelques mois [33]. Quinze à vingt prélèvements de sang sont à réaliser sur tube sec. L'analyse se fait par :

a- Recherche des anticorps par inhibition de l'hémagglutination (I.H.A.) [34]

L'I.H.A. permet le diagnostic de la maladie de Newcastle et informe sur la valeur de l'immunité vaccinale [25]. C'est une technique de référence en sérologie.

Cette méthode tire parti du fait que certains virus, comme le paramyxovirus de la maladie de Newcastle, agglutinent les hématies des volailles. Si on ajoute à la préparation virale un sérum anti-virus (donc porteur d'anticorps) l'agglutination est inhibée, parce que les anticorps se sont fixés sur les antigènes viraux.

Pour le test I.H.A. appliqué à la maladie de Newcastle, on utilise une micro-méthode compatible avec la réalisation de grandes séries. On calcule le titre du virus de référence (une U.H.A. = unité hémagglutinante = 1 volume de 0,025 ml). Le sérum est prélevé après coagulation. Il faut un volume au moins égal à 250 µL. Il peut être utilisé frais ou congelé. Virus et sérum sont mis en contact pendant 20

minutes à la température du laboratoire. On introduit des hématies de poulet (suspension à 1 %). La plaque est agitée et la lecture faite 30 minutes plus tard. On utilise des cupules témoins pour pouvoir qualifier l'échantillon testé. Dans la cupule témoin-virus, l'hémagglutination est totale, c'est le témoin positif. Dans les cupules témoins-sérum+hématies, il n'y a pas d'hémagglutination.

On teste des dilutions croissantes de sérum. Le titre obtenu pour le sérum étudié est déterminé par la dilution la plus élevée où est observée l'inhibition complète de Dans le cas par exemple de l'évaluation d'une protection vaccinale, on estime que plus le taux de dilution est élevé, meilleure est la protection, car cela signifie qu'il y a plus d'anticorps au départ. On considère qu'au-delà de 1/16 la protection est bonne. Un échantillon est considéré comme positif s'il y a inhibition de l'hémagglutination à partir d'une dilution 1/16. On doit noter l'utilisation courante de la notation en Log 2 .

- **une souche sauvage** provoque chez les poulets un taux moyen d'anticorps supérieur à 9 Log 2 [35]. Chez les faisans, une étude sérologique sur des oiseaux non vaccinés contre la maladie de Newcastle a montré des positivités de 6 à 8 Log 2 en I.H.A., sans excrétion virale associée, sur des lots présentant des problèmes de grosses têtes ou des troubles de ponte. Ces troubles étaient également associés à des positivités en bronchite infectieuse et rate marbrée [36].

- **un vaccin vivant** permet d'obtenir un taux moyen d'anticorps de 3 à 6 Log 2 [37]. Plus précisément, avec un vaccin vivant administré deux fois à 16 jours d'intervalle par instillation sur des poulets S.P.F., les titres I.H.A. en anticorps sont de 3,3 Log 2 en moyenne avec une souche H.B1, et de 3,2 Log 2 avec la souche VG/GA, 13 jours après la deuxième administration vaccinale [38].

- **un vaccin inactivé** établit un taux moyen > 8 Log 2. Des titres très élevés peuvent être atteints durant plusieurs semaines [25]. Ils sont d'autant plus importants que les animaux ont été pré-exposés à un vaccin vivant atténué moins d'un mois avant injection [39].

Maas et al. Ont établi qu'une valeur minimum de 4 Log 2 était requise pour obtenir plus de 60% de poulets protégés suite à l'inoculation intramusculaire de la souche Herts du paramyxovirus de type 1 [40].

b-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

• L'ELISA indirecte

- Les anticorps du sérum se fixent sur l'antigène fixé sur les cupules. Un conjugué anti-IgY (ou anti-IgG) spécifique d'espèce, marqué par une peroxydase, est ajouté. La distribution d'un substrat de l'enzyme développe une coloration. Elle signifie que l'échantillon est positif . La densité optique de la solution (D.O.), mesurée à 450 nm par un lecteur de microplaques, permet une approche quantitative du titre en anticorps. La méthode est dite indirecte car elle met en évidence les immunoglobulines spécifiques de l'antigène recherché.

- Avec un coefficient de corrélation de 0,7498, la méthode ELIS A classique reste proche des résultats de l'I.H.A. Le laboratoire L.S.I. propose ainsi des tables de correspondance quantitative ELISA indirecte/I.H.A., et établit des groupes de titres de 1 à 14. Différents profils sérologiques sont attendus selon les situations. [41]

• L'ELISA Compétition ou ELISA blocking

Il s'agit d'une méthode ELISA indirecte.

Les échantillons (sérums) se fixent toujours sur l'antigène et occupent les sites antigéniques. En l'absence d'anticorps dans l'échantillon, les sites antigéniques restent libres. Le conjugué (anticorps monoclonal anti-NJD.V. marqué à la péroxydase) ensuite ajouté se fixe cette fois sur les sites antigéniques restés libres. Enfin, le substrat permet de colorer les anticorps anti- paramyxovirus . Cette méthode a l'avantage de détecter indirectement les anticorps du virus de la maladie de Newcastle chez l'ensemble des espèces aviaires puisqu'elle utilise des anticorps révélateurs se fixant sur l'antigène viral, et non sur des anticorps spécifiques d'espèce. Elle révèle tous les types d'anticorps complémentaires du virus. [41]

7.2.2 Moléculaire, par R.T.-P.CJR. :

Il existe d'autres techniques de détection très fiables dont l'utilisation est maintenant mise en œuvre par le L.N.R.. La détection moléculaire par R.T.-P.C.R. est fondée sur la détection de fragments de génome du virus. Les séquences d'acides nucléiques sont ensuite comparées avec celles du virus de la maladie de Newcastle déjà connues au plan international. [42]

7.2.3 Autres méthodes de détection directe :

Des techniques d'immunofluorescence ou d'hybridation in situ permettent de mettre en évidence le virus directement sur tissu ou organe mais ne sont pas accessibles en routine. [43] Des poulets S PP. inoculés oralement avec une souche lentogène non vaccinale ont présenté 6 jours après des retards de croissance associés à des diarrhées et bouchons cloacaux. L'autopsie n'a pas montré de lésions macroscopiques significatives. Par contre, des réactions positives en immunofluorescence ont confirmé la multiplication virale au niveau du duodénum, jéjunum, iléon et pancréas [44].

II. Etude comparative des méthodes du diagnostic de la MN :

1. Réactions antigènes-anticorps :

1.1. Techniques d'agglutination :

1.1.1.Hémagglutination:

Détection d'anticorps agglutinant dans le sérum de patients. Les anticorps complets (naturels) sont des immunoglobulines de la classe IgM qui se lient sous forme de pentamères aux déterminants antigéniques des érythrocytes et peuvent les agglutiner. On les qualifie de « complets » puisque leur structure pentamérique, leur permet d'agglutiner en l'absence de facteurs supplémentaires. Les anticorps contre les groupes sanguins ABO appartiennent à ce groupe. [45]

On trouve aussi des anticorps incomplets (IgG). Ces anticorps se lient aux déterminants antigéniques des érythrocytes mais ne peuvent pas former un pont entre deux cellules. En revanche, une hémagglutination devient possible si l'écart entre les érythrocytes est diminué par l'ajout de supplément (albumine) ou d'une solution de faible concentration ionique ; les anticorps IgG (incomplets) peuvent alors faire le pont entre deux cellules. Les anticorps produits par les patients Rh~ contre les érythrocytes par exemple après une transfusion Rhincompatible) sont un exemple d'anticorps incomplets. [45]

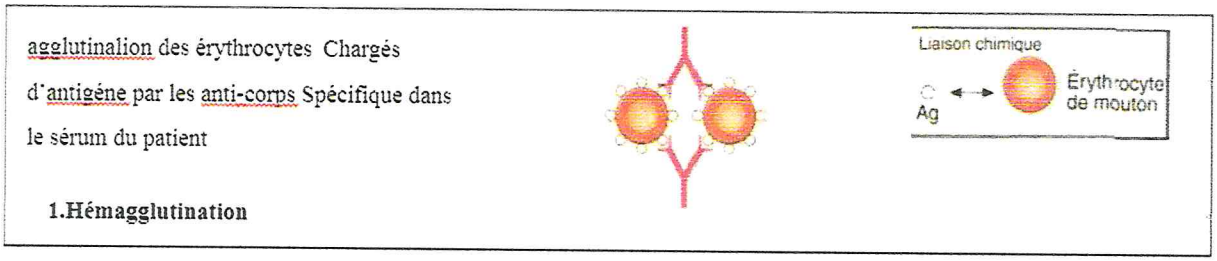
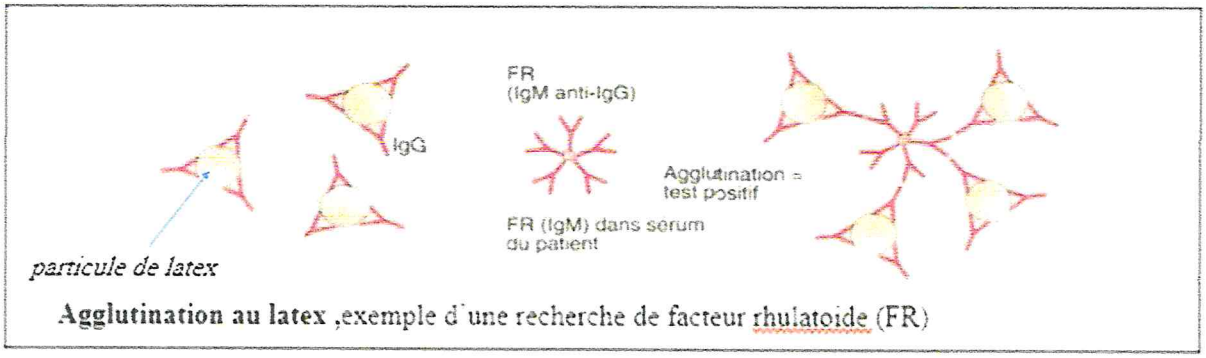


Schéma 1 : Hémagglutination [45]

1.1.2. Agglutination au latex :

l'antigène reconnu par les anticorps recherchés est fixé à des particules de latex. Dans l'exemple montré d'une recherche du facteur rhumatoïde (FR), l'IgG est liée aux particules de latex. Si le sérum analysé contient le FR (= IgM-anti-IgG), les particules sont agglutinées (test positif). [45]



Agglutination au latex ,exemple d'une recherche de facteur rhulatoide (FR)

Schéma 2 : Techniques d'agglutination [45]

1.1.3. Détection *(réaction de Widal) :*

Des suspensions de bactéries (l'antigène) sont incubées avec une dilution sérielle du sérum de patient. Dans le cas d'une agglutination, le sérum contient un anticorps spécifique de l'antigène.

1.1.4. Détection *D'antigènes (réaction de Gruber) :*

Incubation de cultures de bactéries avec des anticorps spécifiques de classes ou types de bactéries. Utile pour typer des bactéries.[45]

1.2. Réaction de fixation du complément (RFC)

Détection d'anticorps dans le sérum ou dans le liquide céphalorachidien de patients par la fixation et l'activation du complément par des complexes antigènes-anticorps. Après inactivation du complément dans le sérum du patient, on lu, ajoute du complément et l'antigène correspon. dant à l'anticorps recherché. Si cet anticorps présent dans le sérum, le complément sera fixp et consommé. On ajoute ensuite des érythrocytes chargés d'anticorps (complexes immuns) le système indicateur. L'absence d'une hémolyse (dépendante du complément) du système indicateur indique la consommation du complément et correspond

à un test positif. En cas de test négatif, le complément ajouté est disponible pour lyser des érythrocytes du système indicateur.

Cette méthode fournit parfois des résultats faux positifs, par exemple à cause de facteurs inhibiteurs dans le sérum (facteur rhumatoïde ou complexe immun). Dans ce cas, la réaction témoin (sans ajout d'antigène) est positive. [45]

De plus, d'autres réactifs peuvent contaminer l'antigène et former des complexes fixant le complément avec des anticorps dans le sérum. Un tel résultat faux positif peut être révélé par une réaction positive obtenue avec un antigène témoin. [45]

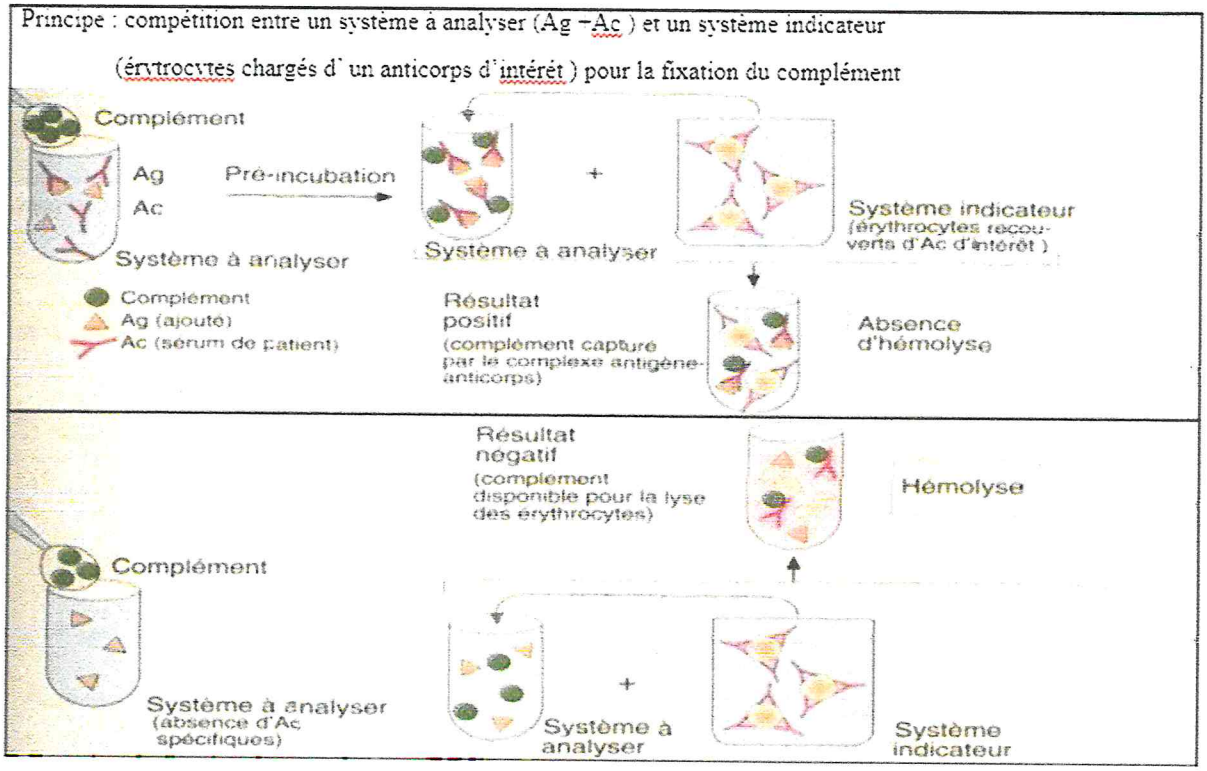


Schéma 3 : Réaction de fixation du complément (RFC). [45]

1.3. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) :

Le test immuno-enzymatique est une méthode analytique quantitative où l'un des partenaires réactifs porte un marqueur enzymatique. L'antigène ou l'anticorps peuvent être marqués. Dans le cas discuté, un support solide (en général une plaque « microtitre ») est recouvert avec l'antigène reconnu par l'anticorps recherché. Si le matériel à analyser (par exemple du sérum) contient ces anticorps, il se lie à l'antigène.

Dans une deuxième étape du test, un anticorps secondaire (par exemple des fragments Fab d'anticorps de mouton contre des IgG humaines), marqué par une enzyme, se lie aux anticorps recherchés. Puis l'enzyme transforme un substrat non colore en un substrat coloré. À l'aide d'une courbe de calibrage obtenue avec un réactif standard, la concentration d'anticorps correspondant à la quantité de substrat coloré produite peut être calculée. Lors de la détection d'un antigène par «sandwich» ELISA, un anticorps reconnaissant V antigène recherché est fixé au support solide.

La quantité de l'antigène contenue dans l'échantillon analysé est déterminée par l'ajout d'un anticorps secondaire qui, en fixant l'antigène, complète la formation d'un «sandwich». [45]

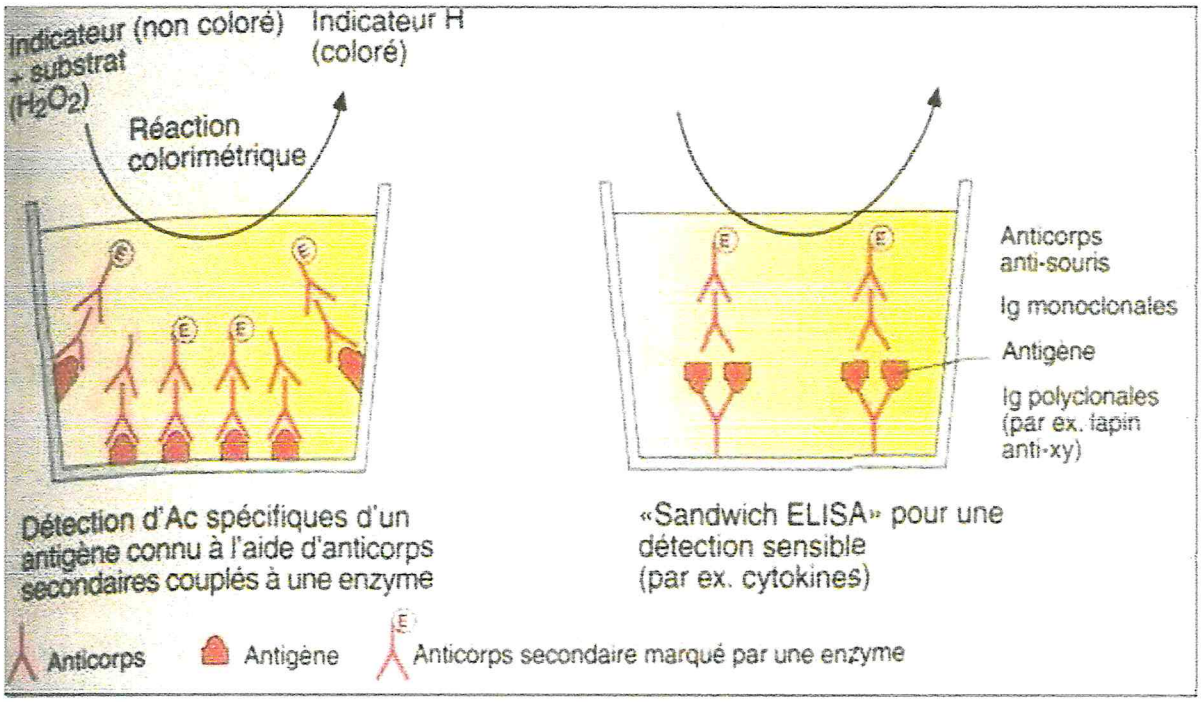


Schéma 4 : ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). [45]

1.4. ELISA C1q en phase solide :

Cette technique utilise des bandes en polystyrène recouvertes de C1q de façon covalente. Les complexes immuns (CI) circulant présents dans l'échantillon se lient à C1q. La détection des complexes immuns se fait à l'aide d'un anticorps anti-IgG humain marqué par une enzyme. Après l'ajout du substrat, un réactif coloré est produit, dont la quantité est proportionnelle à la concentration de complexes immuns circulants. [45]

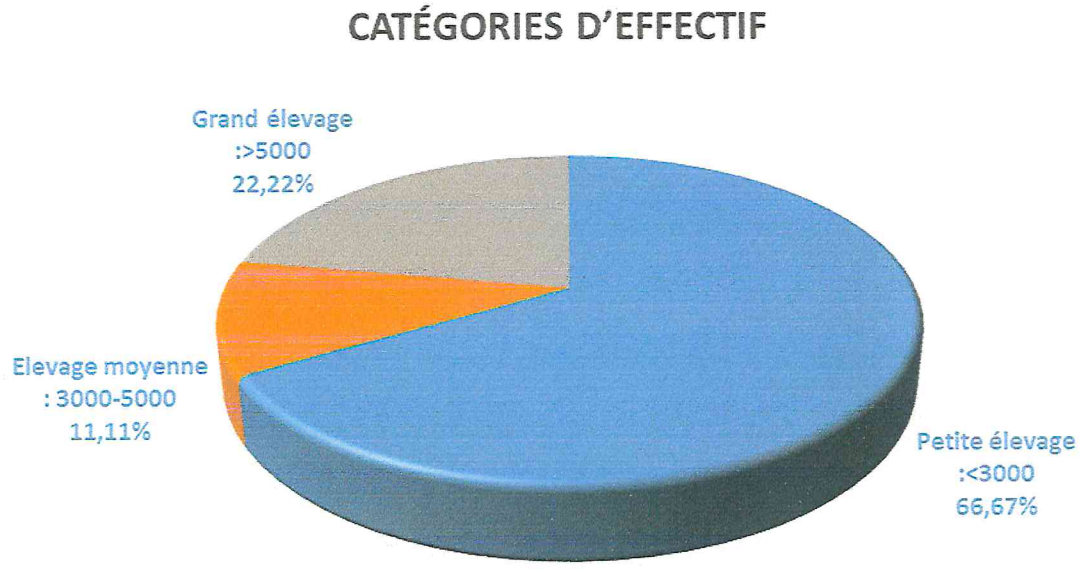
Les signes cliniques (symptômes et lésions) des élevages prélevés allant d'une manifestation respiratoire, rénale et digestive dans 22,22% des cas à une atteinte respiratoire et rénale seulement dans la quasi-totalité des cas avec un pourcentage de 77,78%. (Fig n°02)

2.1.3 Effectif :

Parmi les neufs élevages étudiés nous avons trouvé une variation dans les types d'élevages allant de petits élevages à grands élevages dont la répartition est décrite dans le tableau ci-dessous,

Catégories d'effectif	Nombre d'élevages	%
Petite élevage :<3000	06	66.67
Elevage moyenne : 3000-5000	01	11.11
Grand élevage :>5000	02	22.22

Tableau 4 : Tableau récapitulatif d'effectif des élevages de l'étude.



Graphe n¨°03 : Représentation graphique d'effectif des élevages de l'étude.

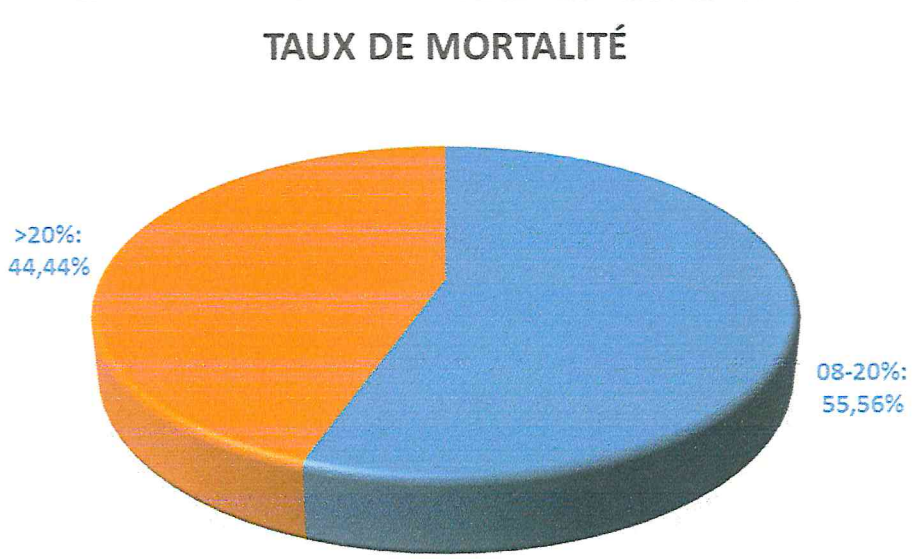
L'analyse de la figure des capacités des élevages prélevés montre que la majorité est de petit effectif (66,67%). Les grands et moyens élevages ne représentent que 22,22 % et 11,11% des élevages de l'étude. Fig n°3

2.1.4 Taux de mortalité :

Les taux des mortalités dans les élevages avicoles sont classés de mortalité dans les normes (0- 8%) a mortalité élevée (8-20%) et mortalité trop élevée (>20%)

Taux de mortalité	Nombre d'élevages	%
08-20%	05	55.56
>20%	04	44.44

Tableau5 : Tableau récapitulatif des mortalités des élevages de l'étude.



Graphe n¨°04 : Représentation graphique des mortalités des élevages de l'étude.

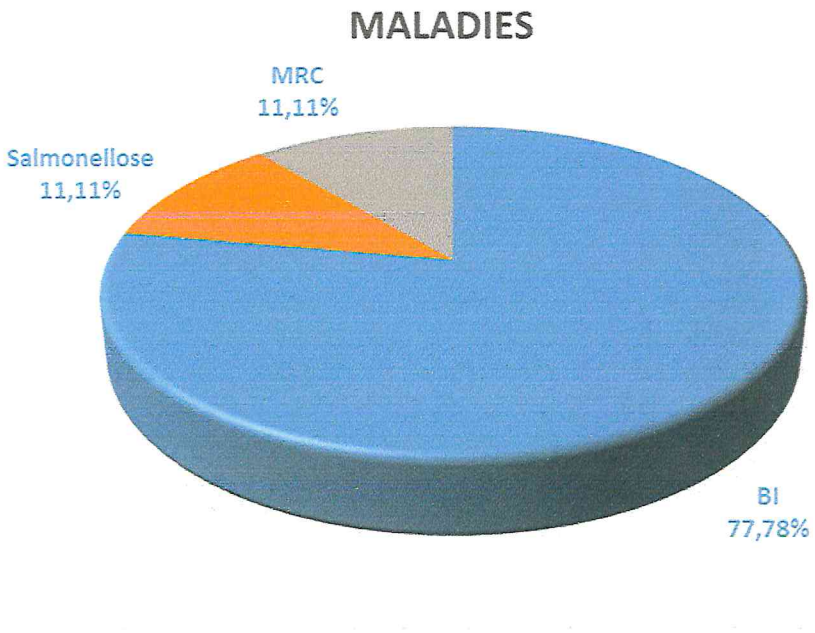
Selon les taux de mortalité, les résultats enregistrés démontrent qu'aucun des élevages étudiés ne présente un taux de mortalité dans les normes (inferieur à 8%). La majorité des élevages présente un taux de mortalité trop fort (44,44%). Un bon pourcentage des élevages présente un taux de mortalité non négligeable (55,56%). Fig n°4

1.1.5 Suspicions des vétérinaires :

Trois maladies ont étés suspectées par les vétérinaires après la manifestation des signes cliniques ces maladies sont citées dans le tableau suivant.

Maladies	Nombre d'élevages	%
BI	07	77,78
Salmonellose	01	11.11
MRC	01	11.11

Tableau6 : Tableau récapitulatif des suspicions des vétérinaires dans les élevages de l'étude.



Graphe n¨°05 : Représentation graphique des suspicions des vétérinaires dans les élevages de l'étude.

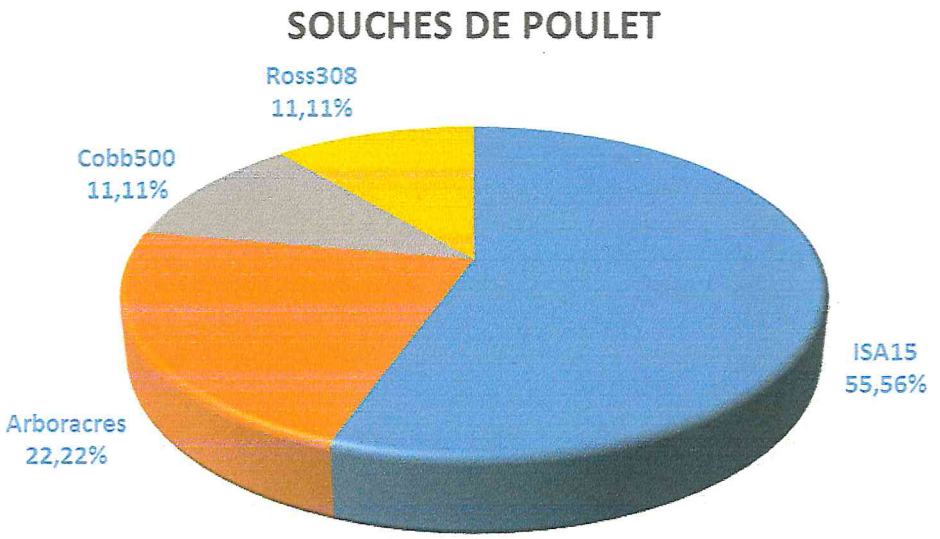
D'après les suspicions des vétérinaires praticiens nous avons trouvé que dans 77,78% des élevages les vétérinaires ont suspecté une bronchite infectieuse. Seulement 11,11% dont la suspicion a été pour la salmonellose et MRC. Au contraire, Nous n'avons pas enregistré des suspicions pour la maladie de Newcastle malgré la présence de tableau clinique similaire. Fig n°5

1.1.6 Souches de poulet de l'étude :

Souches lourdes et légères sont utilisées par les propriétaire des élevages que nous avons étudié,

Souches de poulet		Nombre	%
légères	ISA15	05	55,56
lourdes	Arboracres	02	22,22
	Cobb500	01	11,11
	Poss308	01	11,11

Tableau7 : Tableau récapitulatif des souches des élevages de l'étude.



Graphe n°06 : Représentation graphique des souches des élevages de l'étude.

Pour les souches utilisés dans les élevages dont nous avons mené notre étude ,nous avons trouvé que 55,56% des élevages ont utilisé de la souche ISA15 ,22.22% des élevages qui ont utilisé la souche de l'Arbor acres .par contre les souches de ross308 et cobb500 un pourcentage faible de 11.11% . Fig n°6

2. Résultats sérologiques :

2.1 Séroprévalence de la maladie de Newcastle :

Tous les tests de validité ont été positifs. les calculs des titres par élevage, avec les moyennes.

Les résultats de séropositivité et les moyennes géométriques des titres de la maladie de Newcastle dans les élevages prélevés sont représentés dans le tableau suivant :

Elevages	GMT (log2)	Interprétation
E1	12	+
E2	12	+
E3	12	+
E4	6.90	-
E5	4.50	-
E6	8	+
E7	3.25	-
E8	1.16	-
E9	2	-

Tableau8 : Tableau récapitulatif des Résultats sérologiques des élevages de l'étude.

Apres avoir reçu les résultat des analyses sérologique ,et selon la moyenne des titres de chaque élevage ,on a déduit que les élevages E1,E2,E3,E6, sont séropositifs et les élevages E4,E5,E7,E8 ,E9, sont séronégatif.

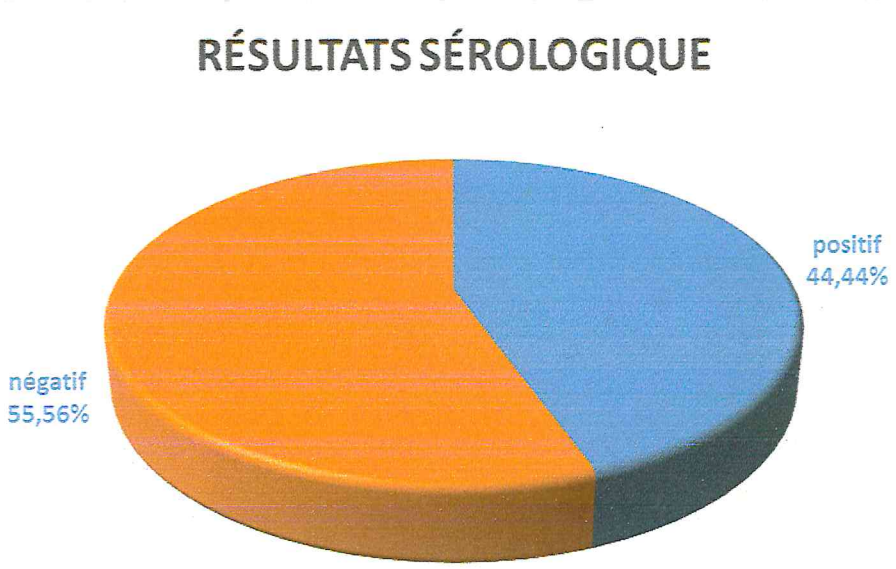
Le nombre d'élevages séropositifs pour la maladie de Newcastle est donc de quatre avec un pourcentage de (44,44%).

2.2 : résultats sérologiques des élevages étudiés :

Le tableau suivant montre une synthèse de nombre d'élevages positifs et négatifs.

Elevages	Nombre d'élevages	%
+	04	44.44
-	05	55.56

Tableau9 : Tableau récapitulatif des Résultats séropositifs et séronégatifs des élevages de l'étude.



Graphe n¨°07 : Représentation graphique des Résultats séropositifs et séronégatifs des élevages de l'étude.

Plus de la moitié (55,56%) des élevages étudiés ont révélé un résultat positif d'apprêt les analyses sérologiques ,et 44,44% ont été séronégatif . Fig n°7

2.3. Résultats sérologiques par rapport aux protocoles de vaccination.

Dans le tableau suivant nous avons combiné les résultats sérologiques avec les quatre protocoles de vaccination suivis par les propriétaires des élevages que nous avons mené notre enquête :

Protocole de vaccination	+		-	
	Nombre	%	Nombre	%
P1	00	00	1	20
P2	1	25	2	40
P3	2	50	2	40
P4	1	25	00	00

Tableau 10: Tableau récapitulatif des protocoles de vaccination des élevages de l'étude en fonction de la sérologie.

D'après les résultats sérologiques des protocoles de vaccination sur le tableau X, nous avons trouvé que les résultats séropositifs varient entre 25% et 50%, mais les résultats séronégatifs sont de 40% pour le p2, p3 et le protocole p1 est de 20% des résultats négatifs.

On observant le tableau X, nous avons deux élevages parmi les quatre élevages séropositifs qui ont été vaccinés en suivant les protocoles de vaccination P3 qui représentent la moitié, l'autre moitié est répartie en égalité sur les protocoles de vaccination P2, P4, avec un pourcentage de 25% chacun. Quant à l'élevage qui n'a pas été vacciné contre la maladie de Newcastle, il a été séronégatif, ce qui veut pas dire sans doute que la séronégativité a été grâce à l'absence de vaccination, mais a l'échantillonnage limité.

2.4. la séroprévalence en fonction de mortalité .

Sérologie	Taux de mortalité
séropositif	24,41%
Séronégatif	17,52%

Tableau 11 : tableau récapitulatif de la séropositivité en fonction de taux de mortalité .

Les résultats des analyses sérologiques de laboratoire comparés aux fiches signalétiques ont démontrés un taux de mortalité important avec un pourcentage de 24,41% pour les élevages qui ont été déclarés séropositifs et un peu moins élevé avec un pourcentage de 17,52% pour les élevages qui ont été déclarés séronégatifs.

IV. Discussion :

1. Echantionnage :

Notre étude sur la prévalence sérologique de la maladie de Newcastle a porté sur un échantillon de 9 élevages, soit 100 sérums, auxquels nous avons fait correspondre leurs fiches de prélèvements respectives.

Cet échantillon est non représentatif de la population d'étude (élevages de poulet de chair de la région Est d'Algérie) du fait de l'absence du tirage au sort et l'introduction dans l'échantillonnage d'une manière aléatoire de 10 élevages de poulet de chair. Cette non représentativité est un handicap majeur pour l'interprétation et l'extrapolation des résultats.

Quant à la précision, elle est tributaire du nombre d'individus à inclure dans l'échantillon. Nous avons pris 9 élevages de poulet de chair parmi X élevages dans cette région.nos résultats sont imprécis du fait de faible nombre d'élevages prélevés. En effet, nous étions limités par des moyens financiers.

2. Choix du test IHA :

La présence des anticorps au virus de la maladie de Newcastle chez les poulets est détectée par l'essai sérologique. Les résultats de ces essais sont employés pour trois buts.

1. Pour évaluer l'efficacité du vaccin de la maladie de Newcastle dans le laboratoire et les essais pratiques.

2. Pour évaluer le niveau des anticorps de virus de la maladie de Newcastle dans le domaine.
3. Le sérum connu pour contenir des anticorps au virus de la maladie de Newcastle est employé pour confirmer la présence du virus de la maladie de Newcastle dans un échantillon d'essai. Serait obtenu pendant l'isolement du virus virulent de la maladie de Newcastle. [54]

Ce test consiste à révéler et à titrer le pouvoir agglutinant des hémagglutinines du virus de Newcastle sur les hématies de poule.

L.IHA, quand elle est réalisée sur des sérums de jeunes poulets (poulettes ou poulet de chair), peut donner des indications sur les anticorps spécifiques de sérotype de l'élevage.[52]

Le test IHA est le test le plus ancien (1964), et le plus utilisé en zone Endémique, détecte IgG et IgM en < 3 h.

La conclusion semblable a été également éditée par Bozorghmehrifardl et Mayahi (2000) qui ont prouvé que le test de l'HI est plus économique que le kit d'ELISA. [53]

3. Résultats de la fiche signalétique :

3.1 Mortalité en fonction des symptômes observés

Parmi les élevages que nous avons étudié, nous avons trouvé sept élevages qui ont manifesté des signes cliniques respiratoires et rénaux dont leurs taux de mortalité est de 20,79%, et deux élevages qui ont manifesté des signes cliniques respiratoires, rénaux et digestifs dont leurs taux de mortalité est légèrement plus élevé (25%), annexe 5

3.2 Mortalité en fonction des suspicions

D'après le tableau (taux de mortalité par rapport à la suspicion du vétérinaire) on a eu un taux de mortalité élevé avec un pourcentage de 33,98% d'effectifs dont la suspicion du vétérinaire a été la bronchite infectieuse, un taux de mortalité moins élevé avec un pourcentage de 25% d'effectifs dont la suspicion du vétérinaire a été la salmonellose et en fin un taux de mortalité trop élevé avec un pourcentage de 48% d'effectifs dont la suspicion du vétérinaire a été les MRC. Annexe 5

3.3 Mortalité en fonction des programmes de vaccination

Nous avons remarqué d'après l'étude que nous avons mené, que le taux de mortalité dans les élevages dont le protocole de vaccination a été P1 est de 25%, les élevages qui ont été vaccinés en suivant le protocole de vaccination P2 et P3 leurs taux de mortalité était dans l'ordre : 24% et 25,15%. Et 9,2% seulement de mortalité dont le protocole de vaccination a été P4. Annxe5

4. Variation de la mortalité en fonction de la séropositivité

Les résultats des analyses sérologiques de laboratoire comparés aux fiches signalétiques ont démontré un taux de mortalité important avec un pourcentage de 24,41% pour les élevages qui ont été déclarés séropositifs et un peu moins élevé avec un pourcentage de 17,52% pour les élevages qui ont été déclarés séronégatifs. (Tableau11)

Conclusion

D'après notre étude clinique et enquête sérologique, la maladie de Newcastle est une maladie qui induit des taux de mortalités importantes (24,41%) dans les élevages séropositifs (4 élevages), par rapport aux taux de mortalités (17,52%) des élevages séronégatifs (5 élevages).

En revenant aux séroprévalence en fonction des protocoles de vaccination, on remarque que deux élevages représentants 50% des élevages séropositifs, ont étés vaccinés contre la ND en suivant les protocoles de vaccination P2 et P4, et d'un autre coté on a deux élevages qui représente 50% des élevages séropositifs, ont étés vacciné en suivant le protocole de vaccination P3 qui est le protocole de vaccination adéquat pour la prévention contre la maladie de Newcastle selon Fabienne Rauw et al, qui propose une primo-vaccination une souche lentogène très atténuée (Hitchner B1, Ulster 2C, Phy-LMV 42), suivie d'une souche plus virulente (La Sota) à quelques semaines d'intervalle, donc on suppose que le problème est le non respect de La biosécurité et l'hygiène qui sont considérées comme les premières lignes de protection contre l'introduction de toute maladie aviaire et en particulier contre la ND.[51]

Ainsi, les mouvements de personnes (éleveurs, vétérinaires, livreurs, etc.) et de véhicules doivent être limités et accompagnés de désinfections et du changement de vêtements et de chaussures et ce, y compris en l'absence de maladie. Il convient également de prévenir le contact direct et indirect des volailles avec les oiseaux sauvages ou les pigeons. En raison des couts qu'elles engendrent, les mesures de filtration d'air et de surpression visant à limiter l'entrée aérienne de virions dans le poulailler sont essentiellement réservées aux élevages de haute valeur génétique et aux volailles reproductrices. [51]

En outre tous les vétérinaires qui ont été appelés pour consulter les élevages que nous avons étudiés ont suspecté des maladies autres que la maladie de Newcastle malgré que nous avons démontré par les analyses sérologiques que presque la moitié des exploitations dans lesquelles notre étude a été mené ont été atteintes du virus de cette maladie, ce qui nous mène à déduire que cette maladie est encore mal connue ou négligée par les vétérinaires.

Annexes

Annexes

ANNEXE1 :

Tableau12 : tableau récapitulatif des fiches signalétiques

	Informations générales		L'élevage					Renseignements cliniques					
	Vétérinaire	Date de prélèvement	Type	Age	Effectif	Souche	Vaccin	Date d'apparition	Signes cliniques		Mortalité %	Suspicion vétérinaire	TRM
Rabah Elcachi	Morad	24/05/2013 organes+sang	Poulet de chair	52 j	2300	ISA	ND:7° j HBI:21 j	10 /05/2013	Respiratoires rénaux	Autres : sur infection a l'autopsie	30.43%	BI	Arrêt de l'intibiothérapie
ZEROUALI	Amine	24/05/2013 Organes+sang	Poulet de chair	51j	2500	Cobb 500	ND:7°j HBI	04/05/2013	Respiratoires rénaux	Autres : sur infection a l'autopsie	48%	MRC	ABT : oilmotil
AID Miloud	Morad	20/06/2013 organes+sang	Poulet de chaire	58j	2000	ISA	ND HBI:J7	02/06/2013	Respiratoires rénaux		15%	BI	Vinaigre + hepabiol
MILOUD		11/02/2013 sang	Poulet de chair	52j	2500	Poss 308	ND:j7 HBI :21j sota	27/01/2013	Respiratoires rénaux		12%	BI	Phosritique + vinaigre
KHARJI	Chabani A	13/07/2013 ; organes 05/08/2013 ; sang	Poulet de chair	42j au moment de prélèvement d'organe	6000	Arboracres	ND HBI :7j Sota :52j	10/07/2013	Respiratoires Digestifs: proventriculi t rénaux		25%	Salmonellose	Vinaigre + vit c
Mahmoud	Chabani A	07/01/2013 Oragenes + sans	Poulet de chaire	49j	2500	ISA 15	ND :7j HBI	27/12/2013	Respiratoires rénaux		7.2%	MRC puis BI après apparition de l'atteinte rénale	Antibiotherapie pdt 4j puis arrêt de TRT et administration de vinaigre + hepabiol
Hakim	Chabani A	05/01/2013 Organe + sang	Poulet de chair	42j	2000	ISA 15	ND: pa de vaccination	25/12/2012	Réspiratoires pdt 3-4j puis rénaux digestifs		25%	MRC puis BI	ATB pdt 5j puis arrêt de TRT ATB Administration de Renyl + vinaigre pdt 3j Pas d'amélioration métabolique
Abdelatif	Chabani A	05/05/2013 ; organes 25/05/2013 ; sang	Poulet de chair	40j au moment de prélèvement d'organe	6000	ISA 15	ND: 7j HBI :21: Sota	26/04/2013	Respiratoires rénaux		26.66%	BI	Vinaigre pdt 3j Toxidren pdt 3j Bicarbonate
DJ Birkhadem	Fathi amine	14/03/2013 ; organes 02/04/2013 ; sang	Poulet de chair	52j au moment de prélèvement d'organe	5000	Arboracre	ND: 7j HBI : 21j Sota : 35j	09/03/2013	Respiratoires rénaux		9.2%	BI	Acide –tonique hépato rénal

Annexe 2 :

Les réactifs :

(Suspension d'hématies, Antigène hémagglutinant, Sérum de contrôle positif, Sérum de contrôle négatif, Eau)

Autoclave, Centrifugeuse, Congélateur assurant une température inférieure ou égale à – 16 °C, Réfrigérateur assurant une température de 5 °C ± 3 °C, Balance de sensibilité adaptée, pH-mètre de sensibilité adaptée, Micropipette(s), Plaques de microtitrage en plastique à usage unique de 96 cupules à fond en V (ou en U, quand ces dernières permettent d'obtenir des résultats équivalents), Cellule de comptage hématimétrique.

Annexe 3 :

Les étapes de technique d'I.H.A :

a)- Verser 0,025 ml de tampon PBS dans chacun des puits d'une plaque de microtitrage en matière plastique,munie d'un fond en V.

b)- Ajouter 0,025 ml de sérum dans le premier puits de la plaque.

c)- Des dilutions au demi de volumes de 0,025 ml du sérum sont effectuées sur l'ensemble de la plaque.

d)- 4 unités hémagglutinantes de virus ou d'antigène dans 0,025 ml sont ajoutées à chaque puits et la plaque est laissée pendant au moins 30 min à température ambiante, c'est-à-dire à environ 20°C, ou pendant 60 min à 4°C.

e)- On ajoute 0,025 ml de suspension d'érythrocytes de poulet à 1 % (v/v) dans chaque puits et, après avoir mélangé doucement, on laisse décanter les érythrocytes pendant une quarantaine de minutes à température ambiante (c'est-à-dire à environ 20°C), ou pendant environ 60 min à 4°C si la température ambiante est élevée ; les érythrocytes témoins doivent alors former un bouton distinct.

f)- Le titre d'inhibition de l'hémagglutination est la dilution sérique la plus poussée qui provoque une inhibition complète de 4 unités hémagglutinantes d'antigène. L'agglutination est évaluée en inclinant les plaques. Seuls les puits dans lesquels les érythrocytes s'écoulent au même rythme que dans les puits témoins (contenant seulement 0,025 ml d'érythrocytes et 0,05 ml de PBS) doivent être considérés comme présentant une inhibition.

g)-La validité des résultats doit être évaluée par rapport à un sérum témoin négatif, ce qui ne devrait pas donner un titre >1/4 (>22 ou >log2 2 en valeur inverse), et par rapport à un sérum témoin positif pour lequel le titre ne devrait pas s'écarter de plus d'une dilution du titre connu.[50]

Annexe4 :

Tableau13 : Tableau des titres individuels des élevages prélevé.

	Titre (log2)								
	E1	E2	E3	E4	5	E6	E7	E8	E9
1	12	12	12	3	7	12	1	1	1
2	12	12	12	12	2	12	4	2	1
3	12	12	12	5	1	6	5	1	3
4	12	12	12	7	10	8	3	1	3
5	12	12	12	12	1	8		1	3
6	12	12	12	7	7	6		1	2
7	12	12	12	6	6	4			1
8	12	12	12	5	8	9			
9	12	12	12	7	2	7			
10	12	12	12	7	1				
11		12		5					
moyennes	12	12	12	6 ,90	4,5	8	3,25	1,16	2

Tableau14 : Tableau récapitulatif des moyennes de chaque élevage de l'étude.

Elevage	MOYENNE
E1	12
E2	12
E3	12
E4	6,909090909
E5	4,5
E6	8
E7	3,25
E8	1,166666667
E9	2

Annexe 5 :

Tableau15 : Tableau récapitulatif de taux de mortalité par rapport les signes cliniques.

symptômes	Taux de mortalité
Respiratoire, rénaux	20,79%
Respiratoire, rénaux, digestif	25%

Tableau16 : Tableau récapitulatif de taux de mortalité par rapport à la suspicion de vétérinaire.

Suspicion	Taux de mortalité
BI	33,98%
Salmonellose	25%
MRC	48%

Tableau17 : tableau récapitulatif de taux de mortalité par apport à la vaccination

Protocoles de vaccination	Taux de mortalité
P1 : Pas de vaccination	25%
P2 : Vaccination j7	24%
P3 : Vaccination j7- j21	25 ,15%
P4 : Vaccination j7- j21- j35	9,2%

Référence :

1.Didier Villate, Docteur vétérinaire, praticien à Samatan (Gers) , manuel pratique –maladies des volailles 2e édition 2001(p 148).

2.Ganière J.-P. et al. Maladies réputées contagieuses et maladies à déclaration obligatoire des oiseaux, Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises, Mérial (Lyon), 2005, (p4)

3.MORNET (P), ORUE (J), BACHIR (S) et KOKE (I).

La peste aviaire (variété maladie de Newcastle en Afrique occidentale française. Bull. des Services de l'Elevage et des industries animales de l'Afrique occidentale française, 1950, 3 (4) : 7-18.

4.MORNET (P), ORUE (J), BACHIR (S) et KOKE (I). La peste aviaire (variété maladie de Newcastle en Afrique occidentale française.Bull. des Services de l'Elevage et des industries animales de l'Afrique occidentale française, 1950, 3 (4) : 7 - 18.

5. ROHRER (H). Traité des maladies à virus des animaux Tome III/1. – Paris : Ed. Vigot, 1971. - 543 p.

6. HESS (H). Prophylaxie de la peste aviaire en Suisse. Bull. O.I.E, 1951. 35 (1-2) : 26 – 28

7. **ALEGREN (A.)** La peste aviaire Bull. O.I.E, 1051, 35 (1- 2) : 27

8. GUILLAUME (Y). Recherches expérimentales et pratiques sur l'immunisation contre la maladie de Newcastle à l'aide d'un virus vaccin buvable, souche Hitchner (B1). Thèse : Méd. Vet. Alfort : 1960

9. CURASSON (G). Traité de pathologie exotique vétérinaire et comparée. - 2ème éd. - 2 vol. Paris : Ed. Vigot. 1942. Vol. 1 : Maladies à virus. - 365 p.

10. MOYON (P) . La maladie de Newcastle. Etat actuel dans les pays d'Afrique noire. Thèse Méd. Vet : Alfort 1967.

11. THORNE (A.L.C) et MACLEOD (A.J). La production et les propriétés du vaccin contre la maladie de Newcastle (Souche Komarou) au Nigéria.Rev. Elev. Med. Vet. pays Trop. 1961, 14 (1) : 93.

12.GAGO de Camara .Les maladies épizootiques des gallinacés.Bull. O.I.E, **1949,** 31 (3 - 4) : 1970

13. **BALOZET (L.) et Coll.** Fowl pest in Tunesia. Vet. Rec. **1947**, 59 : 149.

14. **MORNET (P) - ORUE (j) and BACHIR, (S).**Sur une épizootie de la maladie de Newcastle, à Dakar.Bull. de la Société de Pathologie exotique **1950**, 43 (11-12) : 649.

15. **JANSEN (J).**La peste aviaire et la peste du canard. Paris : l'Expansion, **1971**. -180 p.

16. **WALTER.**La maladie de Newcastle.Bull. O.I.E, **1949**, 31 ,498 - 499.

17. **Alexander D.J.**, 2003.Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif Y.M., ed. Diseases of poultry. Ames, IA, USA: Iowas State University Press, 63-87.

18. **Aldous E.W., Mynn K.K., Banks J. & Alexander D.J., 2003.** A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. Avian Pathol., 32, 239-256.

19.**Czegledi A. et al., 2006.** Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. Virus Res., 120, 36-48.

20. **Miller P.J., King D.J., Afonso C.L. & Suarez D.L., 2007.** Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. Vaccine, 27, 7238-7246.

21.**Dre Isabelle McKenzie.** Avertissement newcastleno49septembre**2008**. RAIZO AVERTISSEMENT VETERINAIRE .Réseau d'Alerte et d'Information Zoosanitaire N° 49, septembre 2008 p 01.

22. **Ganière J.-P. et al.** Maladies réputées contagieuses et maladies à déclaration obligatoire des oiseaux, Polycopié des Unités de maladies contagieuses des Ecoles vétérinaires françaises, Mérial (Lyon), **2005**, 26 p.

23. **Didier Villate.** Manuel pratique maladies des volailles, **2e édition, 2001,** édition France agricole : p 151

24.**AMSTUTZ H.E., ARMOUR J.** ***et al.*** . Manuel vétérinaire Merck : lère Ed. française de la 7ème Ed.-Paris : Editions d'Après, **1996,1397-1398**.

25.ECOLES NATIONALES VETERINAIRES FRANÇAISES/ UNITES DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE : Maladies réputées contagieuses ou à déclaration obligatoire des oiseaux. Ecoles Nationales Vétérinaires Françaises. **2004**, p26.

26.KAPCZYNSKI D.R., KING D.J.: Protection of chickens against over clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California **2002** exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine*, **2005**,23, 3424-3433.

27. ALEXANDER DJ., MANVELL R.J. ***et al.*** : Newcastle disease outbreak in pheasants in Great Britain in May **1996**. *Veterinary Record*, **1997**,140 (1), 20-22.

28. SCHRICKE E. : Faisan de chasse. Elevage et maladies. lere Ed. - Maisons-Alfort : Editions du Point Vétérinaire, **1991**,432 p.

29. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES : Maladie de Newcastle (On line). O.I.E.**2002**.n°A160.Disponible sur internet URL : http://www.oie.int/fr/maladies/fiches/f_A160.htm

30. CONNEFROY D : Etude de la contamination expérimentale du gibier à plumes (faisans, perdrix rouges, perdrix grises) par le virus de la maladie de Newcastle. Th. Méd. Vét. : Toulouse : **1978** ; 62.

31. Villate. D, 2001- Anatomie des oiseaux, Maladies et affections diverses.- Les maladies des volailles, édit. INRA, 18 – 362.

32. ALEXANDER D.J: Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviridae Infections. In : Diseases of Poultry. 10ème Ed. - Ames : Iowa State University Press, **1997**,541-570.

33.VILLATE D. : Maladies des volailles. 2ème Ed. - Paris : Editions France Agricole, **2001**, 399 p.

34. BOCQUET. J : Le diagnostic en pathologie aviaire. 2eme partie. Intervet.

35. BORNE P.M., COMTE S. ***et al***: Vaccines and vaccination in poultry production. Libourne : CE VA Santé Animale, **2001**,139 p.

36. GOUGH R.E., COX WJ. ***et al***: Examination of sera from game birds for antibodies against avian viruses. *Veterinary Record,* **1990**,127 (5), 110-111.

37. L.S.I. : Kit LSI Maladie de Newcastle. LSI. (Guide d'information) Version NDV 009 - 111005.

38. BEARD C.W., VILLEGAS P. ***et al*** : Comparative efficacy of the B-l and VG/GA vaccine strains against velogenic viscerotropic Newcastle Disease Virus in Chickens. *Avian Disease,* 1993, 37(1), 222-225.

39. PENNYCOTT T.W : Vaccination of pheasants against Newcastle disease. *Veterinary Record*, **1998**,142 (5), 119-120.

40. MAASR.A., OEI H.L. ***et al*** : Dose-response effects of inactivated Newcastle disease vaccines : influence of serologic assay, time after vaccination, and type of chickens. *Avian Disease*, **1999**,43 (4), 670-677.

41. CORNATON R: Kits ELISA Newcastle. Applications (power point). L.S.I. Lissieu. **2006**.

42. LETARD S., MIELI L : Un cas de Newcastle en faisans, 38 jours de gestion de crise ! *Filières Avicoles*. **2005**,680,49.

43. BROWN C.C., KING DJ*et al* : Comparison of Pathology-based Techniques for Detection of Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease Virus in Chickens. *Journal of Comparative Pathology*, **1999**,120,383-389.

44. MEULEMANS G., ROELS S. *et al* : Acute pancreatitis in chickens due to non virulent Newcastle disease virus. *Veterinary Record*, **1998**,143 (11), 300-303.

45.atlas de poche d'immunologisite.**G-R.BURMESTER et PEZZUTTO**, En collaboration avec Timo Ulrichs et Alexandra Aicher . Médecine-Sciences Flammarion. site internet : http://www.medecine-flammarion.com

46. Tabidi, M.H., A. Makkawi, E. Mahasin and A.S. Ali, 2004. The serological responses in chicks vaccinated with combined or single infectious bursal disease and Newcastle disease vaccines. J. Anim. Vet., Adv., 3: 9-12.

47.Griffiths, Anthony J.F., Miller, Jeffrey H., Suzuki, David, Lewo ntin, Richard C., Gelbart, William M., An introduction to Genetic analysis, 7/e, 2000, W.H. Freeman.

48. Alexandr, D.J and D.A. Senne. 2008. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. L. D. Zavala,ed.Omnipress. 135-141

49. Robyn Alders et Peter Spradbrow, la maladie de Newcastle dans les élevages avicoles villageois manuel de terrain p11.50

50. 11. ALLAN W.H., LANCASTER J.E. & TOTH B. (1978). Newcastle Disease Vaccines. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

51. Fabienne Rauw (1), Yannick Gardin (2), Thierry van den Berg (1), Bénédicte Lambrecht (1) La vaccination contre la maladie de Newcastle chez le poulet (Gallus gallus). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. **2009** 13(4), 587-596.

52. BRONCHITE INFECTIEUSE AVIAIRE Manuel terrestre de l.OIE 2008 –p486)

53.Bozorghmehrifardl, M.H. and M. Mayahi, 2000.Comparison of enzyme linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition Test for detection of antibodies against ND vaccine in broiler chicks. Ind. J. Anim. Sci., 70: 39-40.

54.Allan and Gough, 1974 a. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines" published by the Office International des epizooties (OIE)

55. SEMMAR K., HAMMOUNI R. (2008). *Contribution à I'etude des deux maladies Gumboro et Newcastle).*thèse PFE.

56. OIE 2004: Chapitre 2.1.15 ; section *2 A.Newcastle ; Avian diseases in list; Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial Animals* (mammals, brids and bees),fifth edition.270-282.

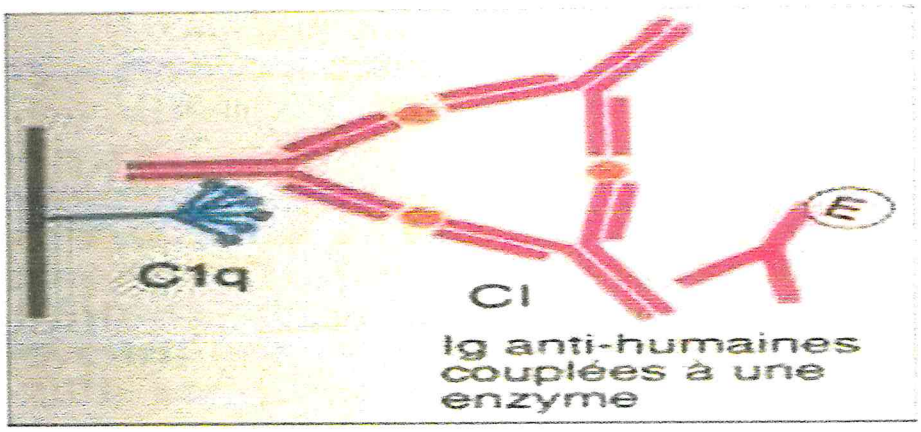


Schéma 5 : ELISA C1q en phase solide. [45]

1.5. Radio-immunoessai (test classique) :

Le radio-immunoessai (ou RIA) classique repose sur le principe d'une liaison compétitive, dans le cas représenté, l'antigène reconnu par l'anticorps recherché est fixé à la phase solide. Les anticorps dans l'échantillon analysé et les anticorps radio marqués ajoutés entrent en compétition pour les déterminants antigéniques disponibles ; les anticorps libres sont ensuite éliminés par un lavage. Plus il y a d'anticorps dans le sérum, moins les anticorps radio marque peuvent lier l'antigène. Une concentration élevée d'anticorps dans le sérum donne donc signal radioactif faible et vice versa. [45]

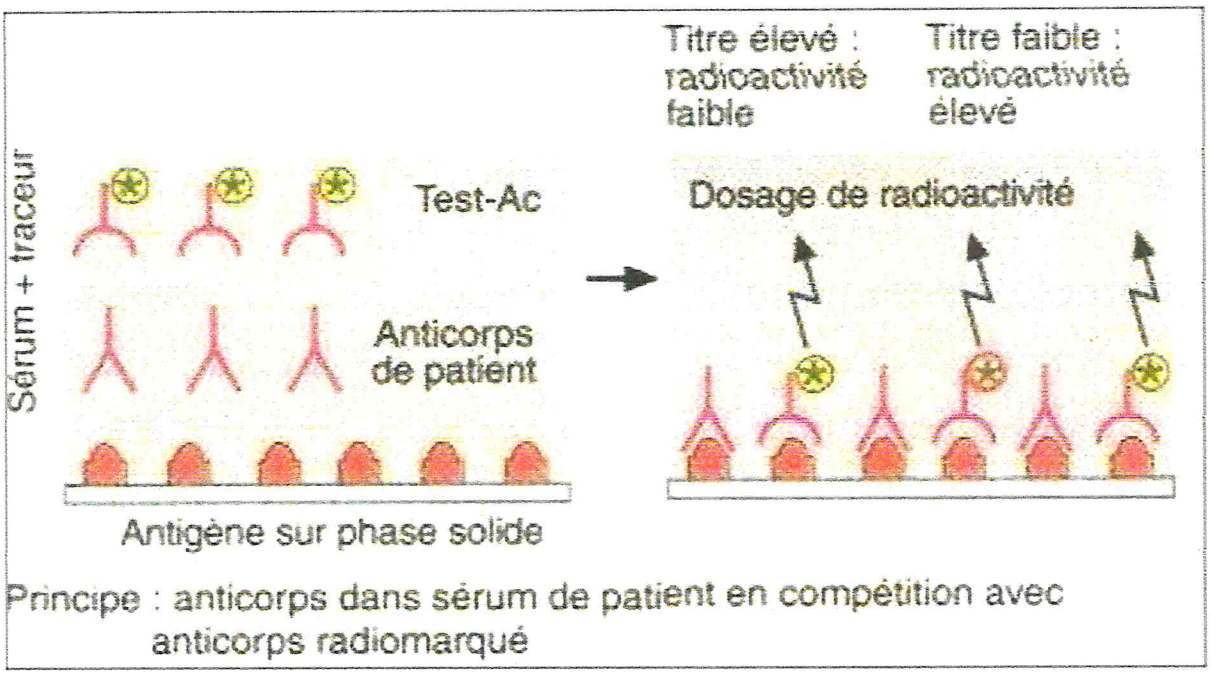


Schéma 6 : Radio-immunoessai (test classique). [45]

1.6. Immunoblot (Western-blot) :

Une électrophorèse en gel de polyacrylamide présence de SDS (SDS-polycrylamide-gel életrophoresis, SDS-PAGE) permet de séparer de protéines selon leur poids moléculaire. En présence de SDS, toutes les protéines portent une charge électrique négative; de plus, l'ajout de 2-mercaptoéthanol réduit les ponts disulfure à l'intérieur ou entre les protéines. Ainsi les paramètres de charge et de forme n'influent-ils plus sur la migration électrophorétique, et la séparation des protéines se fait uniquement selon leur poids moléculaire.

Les protéines sont ensuite transférées (blotting) sur une membrane (en général de nitrocellulose, NC) ; les protéines ainsi immobilisées peuvent ensuite reagir avec des anticorps spécifiques (dans l'exemple, de Borrelia) présents dans le matériel analysé. Cette technique a l'avantage d'identifier les antigènes reconnus par les anticorps, ce qui est possible grâce à la séparation électrophorétique des protéines.[45]

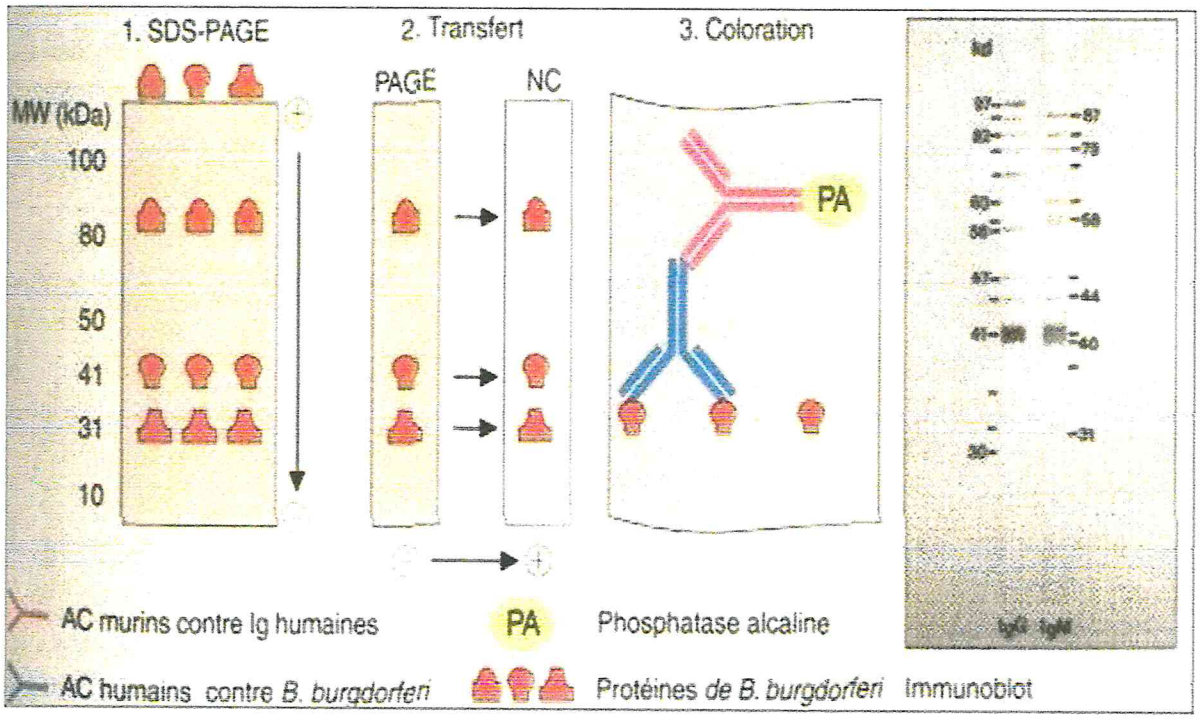


Schéma 7 : Immunoblot (Western-blot). [45]

1.7. Fluorescence :

La luminescence d'une matière excitée par un rayonnement est appelée fluorescence. Lamatière fluorescente n'absorbe qu'une partie de l'énergie du rayonnement, de sorte que la

partie restante peut être émise avec une énergie plus faible, c'est-à-dire une longueur d'ondes plus élevée. La fluorescéine isothiocyanate (FITC) est le réactif le plus souvent utilisé ; la FITC est excitée par la lumière d'une longueur d'ondes entre 450 et 500 nm (bleu) et émet de la lumière fluorescente de plus faible énergie avec une longueur d'ondes entre 500 et 550 nm (jaune-vert). Les microscopes à fluorescence utilisent des filtres sélectifs qui ne laissent passer vers l'échantillon fluorescent que la lumière d'une longueur d'ondes choisie (par exemple 470 nm) ; inversement, un filtre dichromique et un filtre de bande passante ne dirigent vers l'observateur que la lumière d'une longueur d'ondes entre 520 et 550 nm.[45]

1.8. Immunofluorescence

L' immunofluorescence directe se sert d'anticorps marqués par le réactif fluorescent, alors que F immunofluorescence indirecte s'appuie sur un anticorps secondaire marqué par un fluorochrome pour révéler la fixation de l'anticorps primaire spécifique de l'antigène. L'immunofluorescence directe permet de détecter deux antigènes ou plus simultanément. En revanche, l'immunofluorescence indirecte possède une sensibilité supérieure pour la détection d'antigènes faiblement exprimés, puisque plusieurs molécules de l'anticorps secondaire peuvent se lier à une molécule d'anticorps primaire. La membrane cellulaire peut être perméabilisée par fixation afin de permettre la détection d'antigènes cytosoliques. L'immunofluorescence est également utilisée pour l'analyse de cellules en suspension, de sections de tissus ou de préparations obtenues à l'aide de cytocentrifugeuses (B.2.).[45]

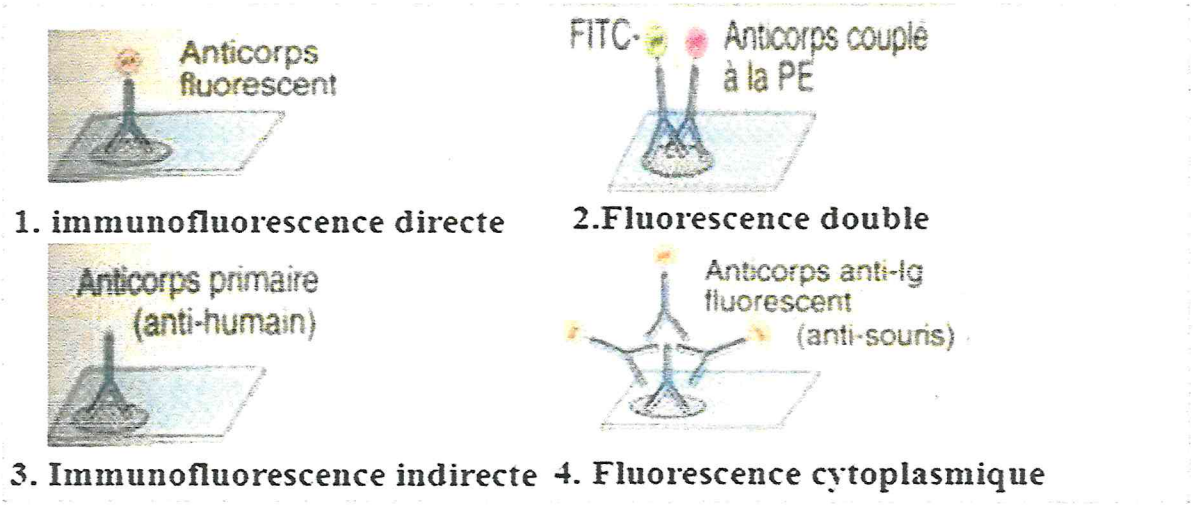


Schéma 8 : Immunofluorescence. [45]

1.9. Cytométrie de flux :

Dans un cytomètre de flux (C.l.), les cellules sont d'abord mises en suspension monocellulaire dans une chambre à flux en vibration, puis passées à travers un rayon laser sous forme de gouttes. La dispersion de la lumière laser est mesurée par des photomultiplicateurs. La dipersion en avant de la lumière est corrélée à |taille des cellules, alors que la dispersion latéle (mesurée dans un angle de 90°) correspond la granulosité et au rapport cytosol/noyau dp cellules. On peut ainsi distinguer les grande cellules avec un rapport cytosol/noyau élevé et un cytoplasme granuleux (granulocytes) des petites cellules ayant un noyau de grande taille (lymphocytes). Les monocytes montrent un phénotype intermédiaire (C.2.). D. Histogramme de cytométrie de flux Au sein des fractions cellulaires ainsi délirai. tées, la fluorescence peut être mesurée ; dans un même échantillon, on peut par exemple évaluer l'immunofluorescence des lymphocytes et des monocytes. L'intensité de la fluorescence est assez bien correlée à la densité de l'antigène à la surface cellulairî et est mesurée par des photomultiplicateurs (D.l.). La méthode xrmet de se servir simultanément de plusieirs anticorps dirigés contre des antigènes diffusants et couplés à des fluorochromes différeits, tels que la FITC et la phycoérythrine (PE). Ces deux reactifs sont excités par une lumière aser d'une longueur d'ondes de 588 nm mais (mettent des lumières fluorescentes de longufurs d'ondes différentes (lumière verte pour BTC, lumière rouge pour PE). Une telle analyse ; permet ainsi de distinguer par exemple les po'ulations cellulaires exprimant les deux antigènis (émettant de la lumière rouge ainsi que verte), de celles exprimant un seul des antigènes (lumiire rouge ou verte) et enfin de celles n'exprimait aucun antigène.[45]

2. Méthodes de biologie moléculaire

2.1. Southern-blot :

Dans un Southern-blot, on sépare des fragments d'ADN par électrophorèse, puis on les transfère par des forces capillaires ou électrophorétiques du gel sur une membrane immobilisant où on peut les hybrider avec des sondes spécifiques. Les fragments d'ADN peuvent être produits à partir d'ADN génomique à l'aide d'une digestion par des enzymes de restriction ou par réaction de polymérase en chaîne (PCR, voir C). La détection des fragments d'ADN se fait à l'aide de sondes marquées (radioactives ou non) qui forment des hybrides avec les séquences complémentaires par des ponts d'hydrogène. L'hybridation des sondes marquées est finalement détectée par une autoradiographie ou à l'aide de chromogènes. [45]

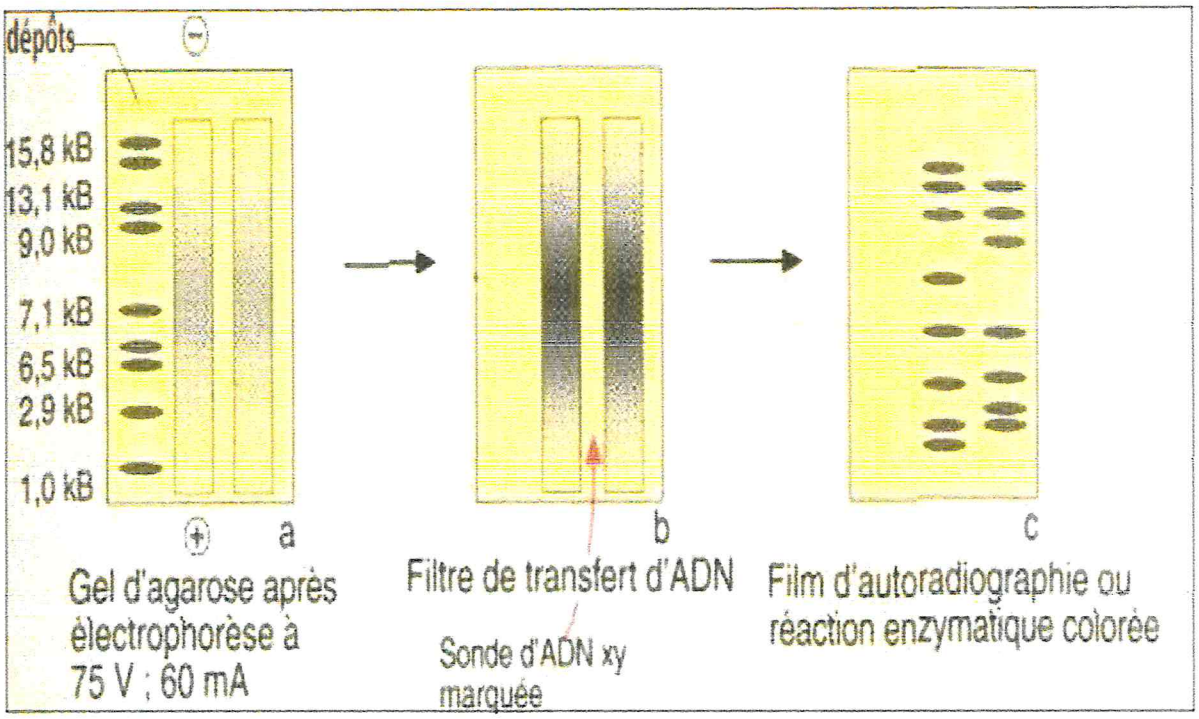


Schéma 9: Southern-blot. [45]

2.2. Northern-blot:

L'hybridation à l'ARN fixé est appelée Northern-blot. On détermine la taille et le nombre de molécules d'ARNm spécifiques dans une préparation d'ARN total ou poly(A). L'ARN est séparé par électrophorèse et transféré sur une membrane. L'ARN d'intérêt est ensuite détecté après hybridation avec une sonde marquée. [45]

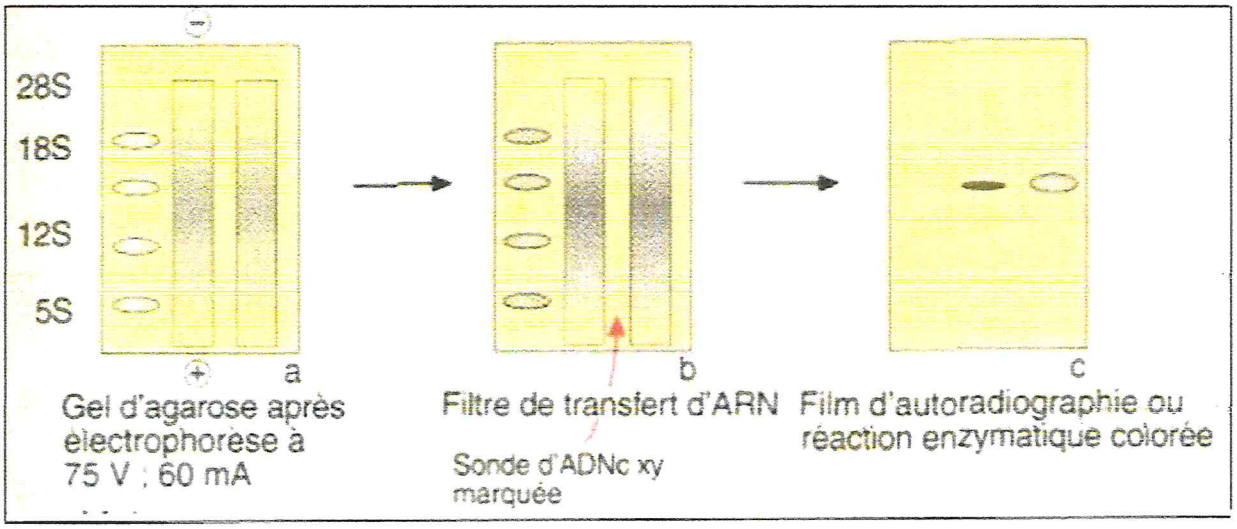


Schéma 10 : Northern-blot. [45]

2.3. Réaction de polymérase en chaîne (PCR) :

La PCR (polymérase chain reaction) permet la multiplication enzymatique des séquences d'intérêt avant leur détection. Le principe de la réaction consiste à répéter un cycle d'amplification dont les étapes individuelles sont effectuées à des températures précises. Tout d'abord, on dénature l'ADN double brin (ou l'ADNc obtenu après transcription inverse d'ARN). Des amorces (primers) spécifiques des séquences recherchées peuvent maintenant s'hybrider aux simples brins produits (annealing).

Dans l'étape suivante, un nouveau brin complémentaire à la matrice est produit à partir du bout 3' de l'amorce par une polymérase thermostable (par exemple Taq-polymérase ; élongation}. Les étapes de dénaturation, d'hybridation et d'élongation sont répétées environ 30 fois. La quantité de la séquence recherchée est ainsi multipliée de façon exponentielle puisque chaque brin nouvellement synthétisé par la polymérase peut servir de matrice dans le cycle d'amplification suivant. Les produits de la PCR sont enfin séparés par électrophorèse et visualisés sous lumière UV a l'aide d'un réactif intercalant, le bromure d'éthidium. [45]

2.4. Séquençage de l'ADN :

La synthèse enzymatique de fragments d'ADN appelée méthode de la terminaison des chaînes est la méthode la plus répandue de séquençage d'ADN. On dispose aujourd'hui de plusieurs systèmes de séquençage automatisé qui se servent d'amorces ou de terminaisons (didésoxynucléotides terminant les chaînes) marqués avec un réactif fluorescent. Les quatre réactifs fluorescents émettent de la lumière de longueurs d'ondes différentes. Les détecteurs d'une machine équipée d'un laser à l'argon enregistrent les signaux émis par les différents réactifs pendant la migration électrophorétique.

Plus récemment, on a développé le séquençage de simples brins à l'aide d'amorces biotinylées. Dans l'exemple présenté, la séquence spécifique est contenue dans l'insert d'un phage (À-gt II). L'amorce biotinylée (forward primer} contient la séquence recherchée et une séquence 5' identique à celle d'une amorce universelle de séquençage. L'amorce non biotinylée (reverse primer) contient la séquence spécifique 3' et une séquence 5' complémentaire d'une amorce universelle inverse. Après amplification par PCR en présence de terminateurs, les produits d'amplification biotinylés peuvent être récupérés à l'aide de billes paramagnétiques couplées à la streptavidine et enfin être élues à un pH alcalin. Les billes peuvent aussi être utilisées pour un séquençage en phase solide. [45]

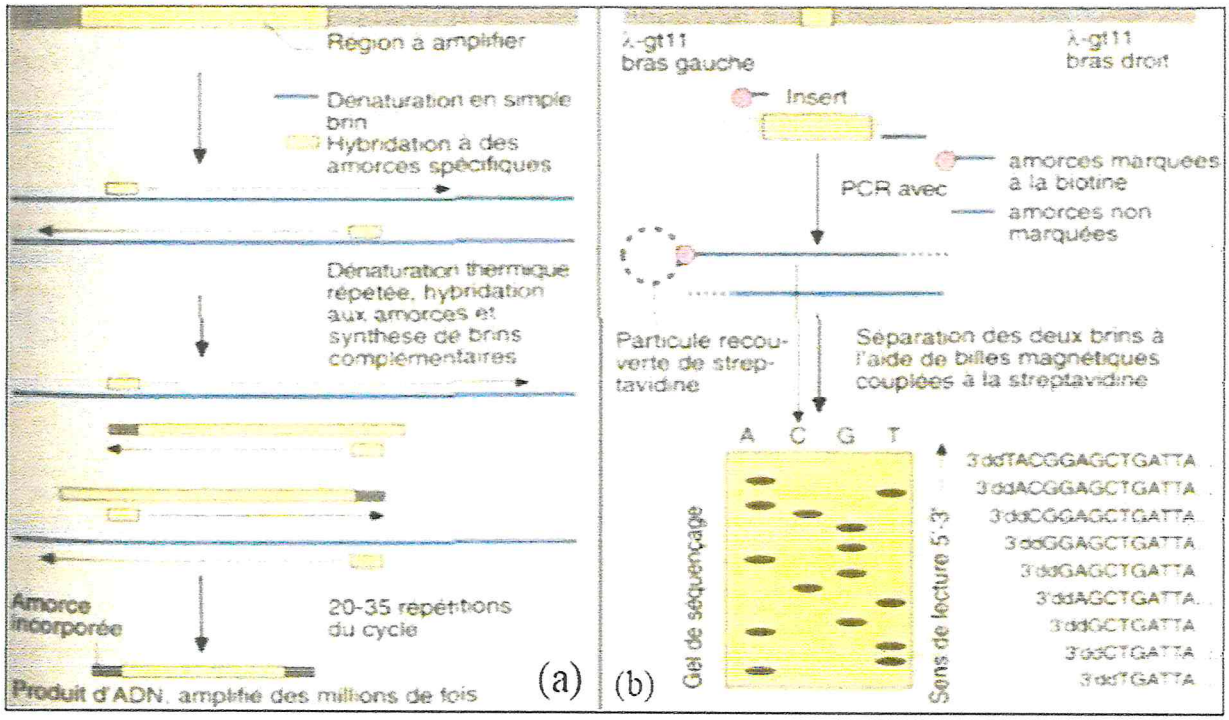


Schéma 11 : -(a) Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

-(b) Séquençage de l'ADN. [45]

3. Tableau comparative avantages et les inconvénients des tests sérologiques.

Tests	Inconvénients	Avantages
Agglutination	-HI peut seulement détecter l'ABS hémagglutinatif. - Exige beaucoup de réactifs (antigènes/antisérums) - Inhibition (stérique) non spécifique Exige du traitement préparatoire du sérum d'éliminer les agglutinines normales de sérum (les négatifs faux)	-HI est plus économique que le kit d'ELISA - Quantitatif (titre) - Rapide (le même jour)
Réaction de *fixation du* complément (RFC)	- Cette méthode fournit parfois *des résultats* faux positifs	-jouer un rôle important dans la *surveillance épidémiologique* - joué un rôle déterminant dans l'éradication de la maladie, spécialement après l'arrêt de la vaccination

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	- Exige l'équipement cher - réactions de positif faux - Les positifs exigent la confirmation	-ELISA peut détecter des niveaux élevés des ABS au virus vaccinique et considéré précis et sensible comparé à l'essai de HI -ELISA peut détecter tous les types fonctionnels d'ABS - Rapid (le même jour) - Peut être semi-automatisé -Très sensible -Permet la quantification des anticorps (semi-quantitatif) -Nécessitent de faibles volumes réactionnels
Radio-immunoessai (test classique)	- Sensibilité modérée (70-80% comparé à VI) - faux Positifs (qualité pauvre d'échantillon) - Basse Sensibilité dans les populations vaccinées	- Rapid (15-20 minutes) - Fortement détail - Aucuns équipements spéciaux exigés - le coût varie ($8-25/test)
Immunoblot (Western-blot)		-Plus spécifique que l'ELISA -Utilisé pour confirmer et distinguer une infection » le VIH1 ou 2 » le HTLV1 ou 2 -Identifier les antigènes reconnus par les anticorps, ce qui est possible grâce à la séparation électrophorétique des protéines.
Immuno-fluorescence	– Manque de Spécificité • interprétations en partie subjective • présence du facteur rhumatoïde dans le sérum des patients. – Absence d'automatisation = réservée au petites séries	-Détection précoce du virus de 24 à 48 h de culture IFI est rapide

Réaction de polymérase en chaîne (PCR)	-Équipement cher -Équipements spéciaux requis - faux Négatifs - variation génétique	-Rapid (2.5 heures) - fortement - sensible/détaillée -différencie le type A, H5, et H7
Séquençage de l'ADN		-l'automatisation et l'utilisation d'une chromatographie au lieu d'une électrophorèse permet un gain de temps appréciable. -Le coût de revient est bien Moindre -permettent de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité, jusqu'à 1000 pour les appareils les plus performants !

Tableau 1 : Tableau récapitulatif de comparaison des déférents tests sérologiques. [46] [47]

Partie pratique

I. Problématique :

La maladie de Newcastle est une maladie infectieuse, très contagieuse, affectant les oiseaux et particulièrement les gallinacés, provoquée par certaines souches de paramyxovirus de type 1 (PMV I) de la famille des paramyxoviridae. [23]

Caractérisée par la diversité de ses formes cliniques, la maladie de Newcastle associe classiquement une atteinte de l'état général et des troubles digestifs, respiratoires et/ou nerveux, les formes les plus graves évoluant rapidement vers la mort avec des lésions de type congestif ou hémorragique.[2]

Ils existent des moyens de prophylaxie sanitaire et surtout médicale. On vaccine autour des foyers infectieux .[23]

Malgré la rigueur des moyens de lutte, l'apparition de la maladie de Newcastle pose un sérieux problème dans les élevages de poulet de chair.

En vue de mettre en évidence un passage viral récent, l'isolement et la caractérisation du virus est le meilleur moyen du diagnostic. Les tests sérologiques sont des outils utiles pour diagnostiquer l'infection. Le HI Test (IHA) est le test le plus couramment utilisé pour mettre en évidence une réponse immunitaire chez des volailles infectées .

Dans cette optique que nous avons décidé de mener une enquête sérologique par IHA dans quelques élevages de poulet de chair. [48]

II. Objectif :

La présente étude conduite par IHA a pour but principal de déterminer la séroprévalence de la maladie de Newcastle dans des élevages de poulet de chair dans la région centre d'Algérie.

Cadre de l'étude :

La présente étude a été menée du 13/07/2013 à 20/06/2015.c'est une enquête sérologique par IHA dans 4 wilaya dans la région Est d'Algérie (Bejaia, Sétif, Bordj bourariridj, Bouira). Le choix des régions était aléatoire. Dans chaque région, les élevages sur lesquels l'enquête a été mené étaient choisis de farçant aléatoire.

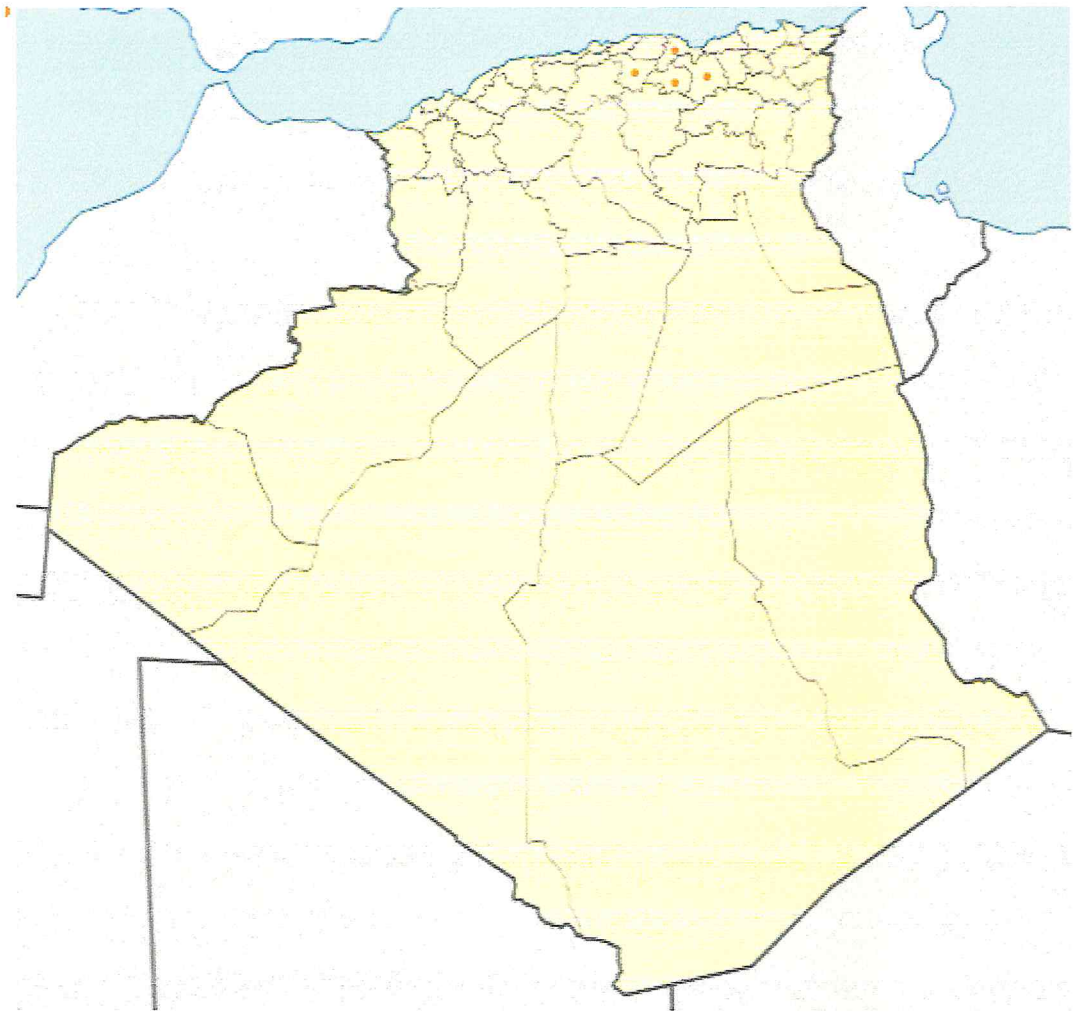


Figure2 : Localisation des régions d'étude.

II. Matériel et méthodes

Matériel de prélèvement, stockage et transport :

Afin de réaliser des prélèvements de sang nous avons besoin du matériel suivant ;

Aiguilles (Une aiguille de 25g (0.50 x16 mm), tube sec, Alcool,

Matériel de laboratoire :

Réactifs : Annexe 1

Matériel biologique :

Elevages de poulet de chair

09 élevages

10 poulets par élevage

Description de la technique du prélèvement :

Lors de la réalisation des prélèvements sanguins nous avons utilisé une aiguille différente pour chaque animal pour éviter le risque de transmission mécanique d'agents infectieux d'un animal à l'autre, et/ou le transfert d'anticorps d'un prélèvement à l'autre.

Pour éviter la contamination des récipients et des bouchons. Le sang et les fèces ont été enlevés avant l'expédition pour limiter le risque de contamination du personnel de laboratoire lors de la manipulation des échantillons.

Quant à la technique de prélèvement de sang, nous avons demandé à un aide de tenir le poulet horizontalement sur son dos. Il utilise une main pour tenir les pattes et l'autre main pour ouvrir l'aile. Nous avons, ensuite, tiré l'aile du poulet pour rendre la veine alaire visible entre le biceps et le triceps, elle forme à ce niveau une bifurcation en V. nous avons enlevé toutes les petites plumes qui obscurcissent la veine puis nous avons désinfecté autour de l'emplacement de la saignée avec de l'alcool (concentré à 70 %). Nous avons inséré l'aiguille sous le tendon et nous l'avons dirigé dans la veine alaire dans la direction de l'écoulement du sang. Une fois le bout de l'aiguille dans la veine, nous avons tiré doucement le plongeur de la seringue. Le sang est coulé dans la seringue. Dans certains cas le sang n'a pas coulé, nous avons libéré le plongeur de façon à avoir fait un ajustement très léger pour replacer la fin de l'aiguille. Dans le cas où un hématome s'est formé, nous avons essayé de saigner de l'autre aile. Après enlèvement de l'aiguille, nous avons appliqué la pression à la veine pendant quelques secondes pour arrêter la saignée. [49]

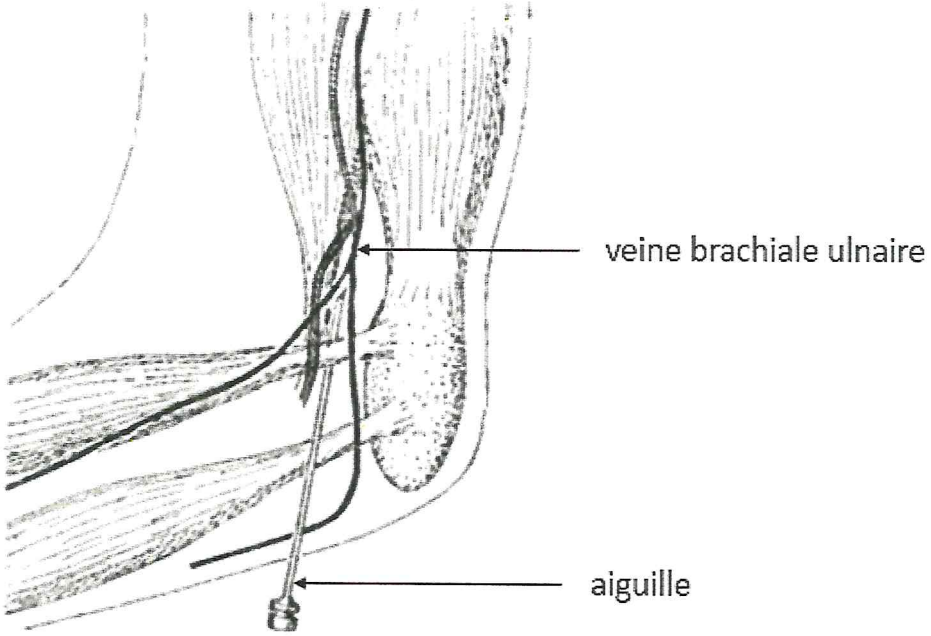


Figure3 : Illustration d'un lieu anatomique pratique pour prélever les poulets. [49]

Etiquetage des prélèvements

Les prélèvements ont été étiquetés en série (par exemple de 1 à 30) à l'aide d'un crayon résistant à l'eau de préférence sur des étiquettes adhésives. Ne pas écrire sur le bouchon du tube car il peut être enlevé pendant l'analyse. Ne pas marquer les tubes avec une encre lavable à l'eau. Ils font des taches quand ils sont humides et peuvent s'effacer si les échantillons sont refroidis ou congelés. Tracer une ligne sous les nombres qui peuvent être mal lus s'ils sont inversés, comme par exemple 18 et 81. La date du prélèvement y compris l'année est mentionnée sur les échantions. Les échantillons sont stockés sous régime de froid,

Une fois le nombre de sérums atteint 100, les échantions ont été envoyé au laboratoire dans une glacière sous régime de froid.

Description de la technique IHA

Pour la réalisation du test I.H.A nous avons suivi les étapes décrites par ALLAN et GOUGH (1974). Les étapes en détaille sont décrite en annexe 2.

1.1 Résultats des fiches signalétiques :

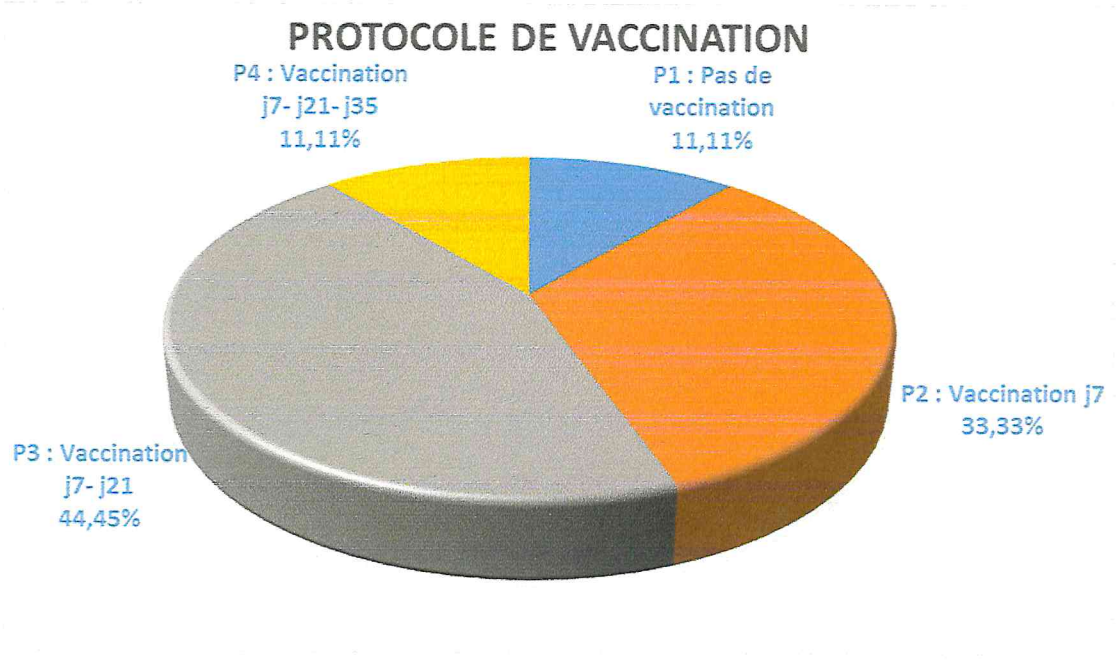
Le tableau présenté en «Annexe1» regroupe les caractéristiques des élevages rentrant dans le cadre des prélèvements sérologiques. Il englobe des informations d'ordre général (Effectif, type d'élevage, souches, programme vaccinal…etc.), et des informations sur le tableau clinique (symptômes, lésions, suspicion du vétérinaire, Taux de mortalité, traitements).

2.1.1 protocoles de vaccination :

Plusieurs protocoles de vaccination on été suivis par les éleveurs cités dans le tableau ci-dessous,

protocole	Nombre élevage	%
P1 : Pas de vaccination	01	11.11
P2 : Vaccination j7	03	33.33
P3 : Vaccination j7- j21	04	44,45
P4 : Vaccination j7- j21- j35	01	11.11

Tableau2 : Tableau récapitulatif des protocoles de vaccination des élevages de l'étude.



Graphe n°°01 : Représentation graphique des protocoles de vaccination des élevages de l'étude.

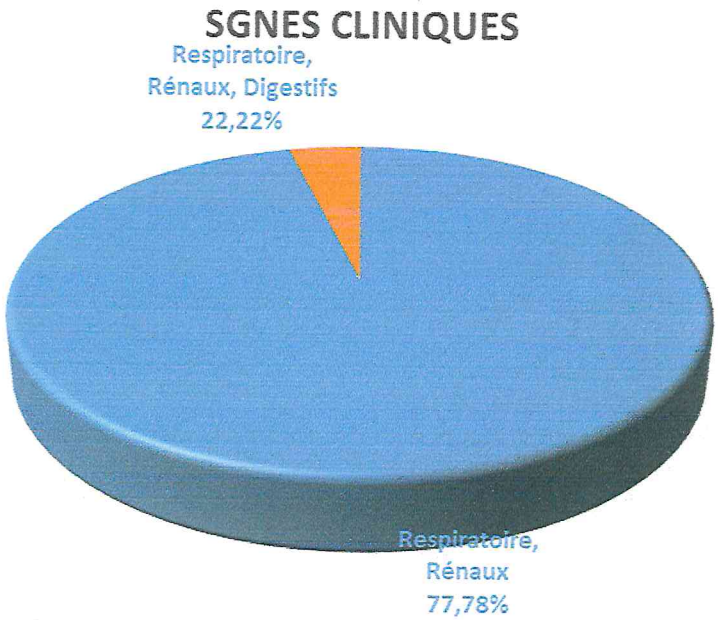
L'analyse des résultats des programmes de vaccination suivis dans les élevages prélevés démontre l'existence de plusieurs protocoles de vaccination pour la maladie de Newcastle. La majorité des élevages prélevés avait comme protocole de vaccination P2 et P3 avec un pourcentage de 44,45% et 33,33% respectivement. Les éleveurs qui ne vaccinent pas (P1) ou ceux qui pratiquent une primo vaccination et deux rappels (P4) sont minoritaire avec un pourcentage de 11,11% chacun. Fig n°1.

2.1.2 Tableau clinique :

Dans le cadre de l'étude clinique nous avons détecté plusieurs formes des signes cliniques regroupés en deux groupes : (respiratoires, rénaux) et (respiratoires, rénaux et digestifs)

Signes cliniques	Nombre d'élevages	%
Respiratoires, Rénaux	07	77.78
Respiratoires, Rénaux, Digestifs	02	22.22

Tableau3 : Tableau récapitulatif des symptômes et lésions des élevages de l'étude.



Graphe n°02 : Représentation graphique des symptômes et lésions des élevages de l'étude.