

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE Blida-1

Institut des Sciences Vétérinaires

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Épidémiologie appliquée à la santé animale

**EVALUATION DES SOUCHES VARIANTES DE
LA BRONCHITE INFECTIEUSE AVIAIRE EN
ALGERIE**

Par

Abdelaziz LOUNAS

Devant le jury composé de :

R.KAIDI	Professeur, U. de BLIDA 1	Président
N.SAHRAOUI	Professeur, U. de BLIDA 1	Examinatrice
D.KHELLEF	Professeur, ENSV ALGER	Examineur
M. OUMOUNA	Professeur, U. de MEDEA	Promoteur
K.BENACHOUR	Professeur, U. de MEDEA	Co-promotrice

Blida, Janvier 2020

RESUME

Les affections rénales est une problématique émergente en élevages de poulet de chair. Leurs étiologies probables sont très variées les plus fréquentes sont les toxicoses, la déshydratation, les infections bactériennes systémiques et les infections virales d'importance capitale dont la bronchite infectieuse (BI).

Ce travail a pour objectifs d'une part, d'explicitier à l'aide d'une enquête descriptive par questionnaire le syndrome « affection rénale », déterminer la part de la BI dans l'apparition des affections rénales et d'en décrire cette maladie et d'autre part, la mise en évidence d'une éventuelle circulation des variants de la BI à travers une étude sérologique par le Test IHA et histopathologique des lésions rénales et trachéales. Enfin, une étude de biologie moléculaire a été mise en place dont le but est l'identification moléculaire des variants de la BI (RT-PCR et séquençage).

Les résultats du questionnaire montrent que les affections rénales en élevages avicoles sont très répandues (86%), elles sont associées dans la majorité des cas avec d'autres symptômes et de la mortalité (mortalité entre 5-10% dans 26% des cas). Leur diagnostic clinique est difficile dans la plupart des cas suspectés (85%).

L'étude histopathologique a confirmé la présence des lésions microscopiques pathognomoniques de la bronchite infectieuse au niveau trachéale et rénale. Ces lésions comprennent, au niveau trachéale une réaction inflammatoire caractérisée par une déciliation (100%), des dégénérescences vacuolaires de quelques cellules épithéliales (81%), une desquamation (59%), diminution du nombre des cellules caliciformes et des glandes (63%) avec un œdème, une congestion et une infiltration des hétérophiles dans la lamina propria (72%), une hyperplasie de l'épithélium muqueux (20%), une infiltration des hétérophiles, des lymphocytes et un faible nombre de macrophages dans la lamina propria, absence des cellules caliciformes et les glandes alvéolaires à mucus (63%). Les lésions rénales observées sont la dégénérescence tubulaire (65%), la congestion et l'œdème (88%), l'infiltration des cellules inflammatoires dans le tissu interstitiel (de néphrite interstitielle ducto-tubulaire) (100%) et dans la lumière tubulaire (61%), la dilatation et l'hypertrophie tubulaire (40%) et la prolifération fibroblastique (46%).

Les sérotypes d'IBV les plus fréquemment détectés dans les élevages de poulet de chair souffrant de néphrites sont IB-QX (100%) et IB 4/91 (60%), qui ont été détectés pour la première fois en Algérie par notre équipe.

L'étude moléculaire a pu identifier une nouvelle souche IBDZ13a, un variant d'IB 4/91 néphropathogène et ceci pour la première fois dans les élevages Algériens de poulet de chair. Son isolement à partir des élevages vaccinés indique une faible protection des poulets contre les nouveaux variants de la bronchite infectieuse générée par les programmes de vaccinations actuels.

Mots clés : Affections rénales, bronchite infectieuse, poulet de chair, Algérie, Test IHA, RT-PCR, histopathologie, IBDZ13a.

ABSTRACT

Kidney affection is an emerging issue in broiler flocks. Their probable etiologies includes variety of agents, the most common are toxicosis, dehydration, systemic bacterial infections and viral infections of major importance, especially infectious bronchitis (IB).

The purpose of this work is to explain, using a descriptive survey, the syndrome "kidney affection", to determine the part of IB in that syndrome, and also, the demonstration of a possible circulation of IB variants through a serological study conducted by H.I test and histopathological test of renal and tracheal lesions. Finally, a molecular biology study has been set up whose goal is the molecular identification of IB variants (RT-PCR and sequencing).

The results of the questionnaire show that kidney affection in poultry farms are very widespread (86%), they are associated in the majority of cases with other symptoms and mortality (mortality between 5-10% in 26% of cases) . Their clinical diagnosis is difficult in most suspected cases (85%).

The histopathological study confirmed the presence of microscopic pathognomonic lesions of infectious bronchitis at the tracheal and renal tissue. These lesions include, at the tracheal tissue, an inflammatory reaction characterized by deciliation (100%), vacuolar degeneration of some epithelial cells (81%), desquamation (59%), decrease in the number of goblet cells and glands (63%) with edema, congestion and infiltration of heterophils in the lamina propria (72%), mucosal epithelial hyperplasia (20%), infiltration of heterophils, lymphocytes and a low number of macrophages in the lamina propria , absence of goblet cells and alveolar mucus glands (63%). The renal lesions observed are tubular degeneration (65%), congestion and edema (88%), infiltration of inflammatory cells into the interstitial tissue (duct-tubular interstitial nephritis) (100%) and into the tubular lumen (61%), dilatation and tubular hypertrophy (40%) and fibroblastic proliferation (46%).

The most frequently detected IBV serotypes in nephritic broiler flocks are IB-QX (100%) and IB 4/91 (60%), which were detected for the first time in Algeria by our team.

The molecular study was able to identify a new strain IBDZ13a, a variant of IB 4/91 nephropathogenic and this for the first time in Algerian broiler farms. Its isolation from the vaccinated farms indicates a weak protection of the chickens against the new variants of the infectious bronchitis generated by the current vaccination programs.

Key words: kidney affection, infectious bronchitis, broiler, Algeria, H.I Test, RT-PCR, histopathology, IBDZ13a.

ملخص

يعتبر مرض الكلى مشكلة ناشئة في قطعان الدواجن. تتنوع مسبباتها المحتملة للغاية ، والأكثر شيوعًا هو التسمم ، والجفاف ، والالتهابات البكتيرية الجهازية والالتهابات الفيروسية ذات الأهمية الكبرى ، بما في ذلك التهاب الشعب الهوائية المعدية (IB).

الغرض من هذا العمل هو شرح ، باستخدام مسح استبيان وصفي، متلازمة "المرض الكلوي"، لتحديد دور IB في ظهور أمراض الكلى ووصف ذلك المرض وثانيًا، تسليط الضوء على تداول ممكن لمتغيرات IB من خلال دراسة مصلية بواسطة اختبار HI والتشريح المرضي لأفات الكلى. أخيرًا ، تم إعداد دراسة البيولوجيا الجزيئية التي تهدف إلى التعرف الجزيئي لمتغيرات IB (RT-PCR والتسلسل).

تظهر نتائج الاستبيان أن أمراض الكلى في مزارع الدواجن منتشرة بشكل كبير (86٪)، وترتبط في معظم الحالات بأعراض أخرى ووفيات (معدل الوفيات بين 5-10٪ في 26٪ من الحالات). تشخيصهم السريري صعب في معظم الحالات المشتبه فيها (85٪).

أكدت دراسة التشريح المرضي وجود آفات مرضية مجهرية مميزة لالتهاب الشعب الهوائية المعدية على مستوى القصبة الهوائية والكلية. تشمل هذه الآفات ، على مستوى القصبة الهوائية ، رد فعل التهابي يتميز بانحلال (100 ٪) ، وانحطاط فجائي لبعض الخلايا الظهارية (81 ٪) ، وإزالة القشر (59 ٪) ، وانخفاض في عدد خلايا الكأس والغدد (63 ٪) مع وذمة ، احتقان وتسلل من heterophils في الصفيحة المخصصة (72 ٪) ، تضخم الظهارية المخاطية (20 ٪) ، تسلل من heterophils ، الخلايا للمفاوية وعدد قليل من الضامة في الصفيحة المخصصة ، عدم وجود خلايا الكأس والغدد المخاطية السنخية (63 ٪).

الآفات الكلوية التي لوحظت هي تنكس أنبوبي (65٪) ، احتقان وذمة (88٪) ، تسلل خلايا التهابية إلى النسيج الخلالي (التهاب الكلية الخلالي الأنبوبي) (100٪) وفي التجويف الأنبوبي (61 ٪) ، وتوسع وتضخم أنبوبي (40 ٪) وانتشار الورم الليفي (46 ٪).

أنواع الـ IBV المصلية التي تم اكتشافها بشكل متكرر في قطعان دجاج التسمم الكلوي هي (100 ٪) IB-QX () و (60 ٪) IB 4/91 () ، والتي تم اكتشافها لأول مرة في الجزائر بواسطة فريقنا .

تمكنت الدراسة الجزيئية من التعرف على سلالة جديدة هي IBDZ13a ، وهو نوع مختلف من IB 4/91 المسببة للأمراض الوبائية وهذا للمرة الأولى في مزارع تربية دجاج التسمين الجزائري. إن عزلها في المزارع المحصنة تشير إلى حماية ضعيفة للدجاج ضد المتغيرات الجديدة لالتهاب الشعب الهوائية المعدية الناتجة عن برامج التطعيم الحالية.

الكلمات المفتاحية: مرض الكلى ، التهاب الشعب الهوائية المعدية ، دجاج التسمين ، الجزائر ، اختبار HI ، RT-PCR ، التشريح المرضي ، IBDZ13a.

REMERCEMENTS

Je remercie le professeur R.KAIDI, professeur à l'université SAAD DAHLAB de Blida, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse. Remerciements respectueux.

Je remercie aussi le professeur N.SAHRAOUI, professeur à l'Université SAAD DAHLAB de Blida, qui nous a fait l'honneur de bien vouloir apporter ses compétences à notre jury.

Je remercie également le professeur D.KHELLAF, Professeur à l'ENSV d'Alger, pour avoir accepté d'examiner notre travail et de faire partie de notre jury de thèse. Remerciements respectueux.

Mes remerciements vont M. OUMOUNA, professeur à l'université de MEDEA, pour son soutien et sa confiance, qu'il trouve ici l'expression de mes sincères reconnaissances.

Mes remerciements vont également à Mme K. BENACHOUR, Professeur à l'université de MEDEA, pour son soutien tout au long de ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de mes sincères reconnaissances.

DEDICACES

**A mes parents, pour m'avoir toujours encouragé et soutenu dans mes choix,
pour m'avoir permis de faire ce beau métier. C'est grâce à vous si j'en suis là
aujourd'hui, je suis fier de vous ! Merci pour tout. Je vous aime.**

A ma très chère épouse MONA

A ma fille, Aridj, mon trésor le plus précieux,

A la mémoire de ma sœur Dalila.

A mes sœurs et mes frères pour leurs encouragements,

A toute ma famille, grande et petite pour leurs encouragements,

**A tous mes amis (es), pour leur soutien et pour les bons moments partagés
ensemble.**

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX	10
INTRODUCTION	14
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA BRONCHITE INFECTIEUSE	16
1.1 Introduction	16
1.2 Historique	16
1.3 Distribution et Incidence	17
1.4 Etiologie	17
1.4.1 Classification	17
1.4.2 Morphologie	18
1.4.3 Réplication du virus	19
1.4.4 Propriétés physiques et chimiques	19
1.4.5 Diversité antigénique	20
1.4.6 Isolement et culture	21
1.4.6.1 Culture sur des œufs embryonnés	21
1.4.6.2 Culture cellulaire	22
1.5.2 Déterminants du pouvoir pathogène	23
1.6 Epidémiologie	24
1.6.1 Sources du virus	24
1.6.2 Susceptibilité	24
1.6.3 Transmission, porteurs, et vecteurs	25
1.7 Pathogénicité	25
1.7.1 Signes cliniques	25
1.7.2 Morbidité et mortalité	27
1.7.3 Lésions	27
1.7.3.1 Lésions macroscopiques	27
1.7.3.2 Lésions microscopiques	28

1.7.4 Réponse immunitaire	28
1.7.4.1 Immunité active	28
1.7.4.2 Immunité passive	29
1.8 Diagnostic	30
1.9 Traitement	35
1.10 Prévention et contrôle	36
1.10.1 Prophylaxie sanitaire	36
1.10.2 Vaccination	36
1.10.2.1 Importance de la vaccination	36
1.10.2.2 Les différents types de vaccins	37
1.10.2.3 Méthodes d'application des vaccins	38
1.10.2.4 Limites de la vaccination	40
 2. LES AFFECTIONS RENALES CHEZ LA VOLAILLE	 42
2.1 Introduction	42
2.2 Physiologie rénale	42
2.2.1 Fonctions des reins	42
2.2.1.1 Régulation hydrique et osmotique	43
2.2.1.1.1 Filtration	43
2.2.1.1.2 Sécrétion	43
2.2.1.1.3 Réabsorption	43
2.2.1.2 Excrétion azotée	44
2.3 Différents types d'affections rénales	45
2.3.1 Définitions	45
2.3.2 Anomalies congénitales et héréditaires	46
2.3.3 Maladies infectieuses	47
2.4. Conduite à tenir lors d'une atteinte rénale	53
 3. PARTIE EXPERIMENTALE	 54
3.1 Première partie : Enquête préliminaire	54
3.1.1 Problématique	54
3.1.2 Objectifs de l'étude par questionnaire	55

3.1.3. Matériel et méthodes	55
3.1.3.1 Préparation du questionnaire	56
3.1.4 Résultats et discussion	60
3.1.4.1 Qualité de l'échantillon	60
3.1.4.2 Les biais	61
3.1.4.3 Ancienneté des vétérinaires et nombre d'élevages suivi	62
3.1.4.4 Importance des affections rénales	63
3.1.4.5 Tableau clinique associé aux affections rénales	64
3.1.4.6 Etiologies suspectées	65
3.1.4.7 Analyses de l'eau et de l'aliment	66
3.1.4.8 La part de la bronchite infectieuse dans l'apparition des affections rénales	68
3.1.4.9 Description des affections rénales	70
3.1.4.10 Diagnostic et conduite à tenir	74
3.1.5 Conclusion	77
3.2 Deuxième partie : Prévalence sérologique et génotypique des variant de la BI et une étude histopathologique des lésions trachéales et rénales.	78
3.2.1. Problématique	78
3.2.2. Objectifs tracés	79
3.2.3. Matériel et méthodes	79
3.2.3.1 Population d'étude	80
3.2.3.2 Protocole des prélèvements	81
3.2.3.3 Analyses au laboratoire	83
3.2.3.3.1 Test d'inhibition de l'hémagglutination	83
3.2.3.3.2 RT-PCR et séquençage	84
3.2.3.3.3 Histopathologie des lésions rénales et trachéales	86
3.2.3.4 Analyses statistiques	87
3.2.4 Résultats	87
3.2.4.1 Description des fiches signalétiques	87
3.2.4.2 Détermination de la circulation des souches virales de la bronchite	

Infectieuse par l'analyse sérologique I.H.A	95
3.2.4.2.1 Résultat globale	95
3.2.4.2.2 Répartition des résultats sérologiques en fonction du statut immunitaire (vacciné, non vacciné)	96
3.2.4.2.3 Répartition des résultats sérologiques de différents sérotypes	98
3.2.4.2.4 Variation des résultats sérologiques en fonction de la mortalité	99
3.2.4.2.5 Variation des résultats sérologiques en fonction de l'âge des Poulets	100
3.2.4.2.6 Variation des résultats sérologiques en fonction de la saison	101
3.2.4.2.7 Variation des résultats sérologiques en fonction de la région des Prélèvements	102
3.2.4.2.8 Variation des résultats sérologiques en fonction de l'intervalle entre la date des prélèvements et la manifestation clinique	103
3.2.4.3 Résultats de la RT-PCR	104
3.2.4.4 Résultats histopathologiques	106
3.2.5 Discussion	124
3.2.6 Conclusion	129
CONCLUSION GENERALE	130
RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES	132
APPENDICES	133
A. Liste des abréviations	133
B. Fiche du questionnaire	134
C. Fiche de prélèvement	138
D. Procédure technique du test IHA	139
E. Résultats des fiches signalétiques	145
F. Les Titres I.H.A Individuels Par Elevage	146
G. Moyenne Des Titres IHA	153
H. Article publié dans veterinary world	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	161

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 :	Exemple de protocole de vaccination BI sur des poulettes futures pondeuses	39
Tableau 1.2 :	Protections croisées observées chez des poulets Leghorn SPF vaccinés par une goutte intraoculaire à 2 et 3 semaines d'âge avec un vaccin vivant atténué d'IBV, puis infectés 4 semaines plus tard avec des souches homologues et hétérologues	40
Tableau 2.1 :	Principaux virus infectant les reins des oiseaux.	49
Tableau 3.1 :	Récapitulatif du questionnaire de l'enquête.	58
Tableau 3.2 :	Titres d'anticorps anti IBV obtenu par I.H.A dans les élevages de poulet de chair souffrant de néphrite.	96
Tableau 3.3 :	Statut immunitaire des poulets (vacciné, non vacciné) au moment des prélèvements.	97
Tableau 3.4 :	Répartition des résultats sérologiques de différents sérotypes.	98
Tableau 3.5 :	Répartition des résultats sérologiques en fonction de la mortalité.	99
Tableau 3.6 :	Répartition des résultats sérologiques en fonction de l'âge des poulets.	100
Tableau 3.7 :	Répartition des résultats sérologiques en fonction de la saison.	101
Tableau 3.8 :	Répartition des résultats sérologiques en fonction de la région des prélèvements.	102
Tableau 3.9 :	Répartition des résultats sérologiques en fonction de l'intervalle entre la date des prélèvements et la manifestation clinique.	103
Tableau 3.10 :	les changements de la sequence d'acides aminés dans IBDZ13a relatives la souche vaccinale IB 4/91.	105
Tableau 3.11 :	Les stades lésionnels des coupes rénales et trachéales.	122

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.1 :	Morphologie du virus du SARS.	19
Figure 1.2 :	Analyses phylogénétiques des souches de BI à partir d'un séquençage du gène S1.	21
Figure 1.3 :	Lésions d'IBV sur des embryons de 17 jours 7 jours post-inoculation.	22
Figure 2.1 :	Vue sagittale du cloaque.	44
Figure 3.1 :	Représentation schématique de la démarche générale de préparation d'un questionnaire.	55
Figure 3.2 :	Répartition des vétérinaires en fonction de l'ancienneté.	63
Figure 3.3 :	Répartition des vétérinaires en fonction du nombre d'élevages Suivis.	63
Figure 3.4 :	Fréquence des affections rénales rencontrées.	64
Figure 3.5 :	Le tableau clinique lié aux affections rénales.	65
Figure 3.6 :	Taux de mortalité lié aux affections rénales.	65
Figure 3.7 :	Les étiologies suspectées dans l'apparition des affections rénales.	66
Figure 3.8 :	Les maladies virales suspectées dans l'apparition des affections rénales.	66
Figure 3.9 :	Représentation graphique des analyses de l'eau et de l'aliment.	66
Figure 3.10 :	Représentation des causes d'apparition de BI.	68
Figure 3.11 :	Représentation des protocoles de vaccination.	68
Figure 3.12 :	Diagramme de la manifestation des affections rénales en fonction du type d'élevage.	71
Figure 3.13 :	Diagramme de la manifestation des affections rénales en fonction de la période d'élevage chez le poulet de chair.	71

Figure 3.14 : Apparition des affections rénales en fonction de la période d'élevage des poules.	72
Figure 3.15 : Apparition des affections rénales en fonction de la densité d'élevage de poulet de chair.	73
Figure 3.16 : Apparition des affections rénales en fonction de la densité d'élevage de reproducteurs chair.	73
Figure 3.17 : Apparition des affections rénales en fonction des saisons.	74
Figure 3.18 : Eléments de diagnostic des affections rénales.	76
Figure 3.19 : Les différents traitements lors d'affections rénales.	76
Figure 3.20 : Représentation graphique des résultats de traitements entrepris.	76
Figure 3.21 : Canevas générale de l'étude.	80
Figure 3.22 : Diagramme du protocole des prélèvements.	82
Figure 3.23 : Capacité des élevages visités.	88
Figure 3.24 : Types de bâtiment des élevages visités.	89
Figure 3.25 : Souches de poulet des élevages visités.	89
Figure 3.26 : Programmes de vaccination contre la BI des élevages visités.	90
Figure 3.27 : Age des poulets des élevages visités.	90
Figure 3.28 : Taux de mortalité dans les élevages visités.	91
Figure 3.29 : Symptômes associés aux affections rénales dans élevages visités.	92
Figure 3.30 : Lésions de surinfection (Péricardite, Périhépatite, aérosacculites).	92
Figure 3.31 : Lésions trachéale (Trachéite) et splénique (splénite).	93
Figure 3.32 : Dilatation kystique liquidien.	93
Figure 3.33 : Goutte viscérale et articulaire.	93
Figure 3.34 : Lésions rénales des élevages de l'étude.	94
Figure 3.35 : Suspensions des vétérinaires lors d'affection rénale.	94
Figure 3.36 : Traitements préconisés lors d'affections rénales.	95
Figure 3.37 : Statut immunitaire des poulets (vacciné, non vacciné) au moment des prélèvements.	97

Figure 3.38 :	Répartition des résultats sérologiques de différents sérotypes.	98
Figure 3.39 :	Répartition des résultats sérologiques en fonction de la mortalité.	99
Figure 3.40 :	Répartition des résultats sérologiques en fonction de l'âge des poulets.	100
Figure 3.41 :	Répartition des résultats sérologiques en fonction de saison.	101
Figure 3.42 :	Répartition des résultats sérologiques en fonction de la région des prélèvements.	102
Figure 3.43 :	Répartition des résultats sérologiques en fonction de l'intervalle entre la date des prélèvements et la manifestation clinique.	104
Figure 3.44 :	Alignement des épitopes prédits des sequences d'acides aminés du gène HVR S1. Nouvel isolat Algérien sauvage et souches virales vaccinales de l'IBV.	105
Figure 3.45 :	Arbre phylogénétique avec 1000 bootstrap répliques obtenu par la méthode Neighbor-joining.	106
Figure 3.46-72 :	Descriptions des lames des trachées.	107
Figure 3.73-107 :	Descriptions des lames des reins.	114

INTRODUCTION

La production avicole s'est fortement développée en Algérie ces dernières années en l'occurrence La production nationale en viande blanche qu'a connu une évolution considérable en 2017, atteignant 5,3 millions de quintaux (Mqt), contre 2,092 Mqt en 2009, soit une augmentation de 153%. Dans le cadre de cette production à large échelle, les affections rénales est une problématique émergente touchant les élevages de poulet de chair, poules pondeuses, et reproducteurs chair. Les professionnels de cette filière décrivent des épisodes d'affections rénales, associés ou non à des signes cliniques et dont les étiologies suspectées sont très variées.

Les affections du système urinaire sont souvent secondaires à une atteinte systémique. Les affections systémiques les plus fréquentes lors d'atteinte rénale sont les infections bactériennes systémiques telle que *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp* [1][2][3][4].

A côté des atteintes systémiques, le système urinaire des volailles est exposé à des infections virales d'importance capitale dont la bronchite infectieuse (BI) [5][6].

La bronchite infectieuse (BI) est une des dominantes pathologiques de l'espèce *Gallus gallus* en raison de sa grande contagiosité, de sa fréquence et de son incidence économique élevée malgré la vaccination [7][8].

Le tableau clinique de la BI est pléomorphe et non pathognomonique. Les symptômes peuvent être des troubles respiratoires de sévérité variable, des atteintes rénales souvent létales, des chutes de ponte [9]. Les lésions peuvent être aggravées par des infections bactériennes secondaires à l'origine de traitements antibiotiques coûteux Pour exemple, elle serait associée, souvent en co-infections, à environ deux tiers des infections respiratoires du poulet en Europe [10].

La prévention des infections cliniques au virus de la BI repose sur la vaccination largement pratiquée en élevage. Elle confère une protection homologue mais la protection hétérologue est très variable et souvent insuffisante [11]. Par

conséquent, dans le but d'adapter les programmes vaccinaux, il est nécessaire de connaître les sérotypes circulant dans la zone géographique des élevages en question. En Algérie, la méconnaissance des sérotypes circulant dans nos élevages compromettent l'efficacité des programmes vaccinaux.

Bien que des études récentes partout dans le monde aient montré que la BI est à l'origine des affections rénales, en Algérie, aucune étude n'a été menée pour vérifier cette relation de causalité.

Dans un premier temps, ce document va s'attacher à effectuer une synthèse bibliographique des affections rénales en élevage avicole ainsi que celle du virus de la BI en insistant sur l'existence de différents variants. La seconde partie présente une étude descriptive par questionnaire auprès de 44 vétérinaires praticiens dont l'activité est à prédominance aviaire. Elle a pour objectif de décrire le syndrome « affection rénale », déterminer la part de la BI dans l'apparition des affections rénales et d'en décrire cette maladie. Cette partie traite aussi, la mise en évidence d'une éventuelle circulation des variants de la BI à travers une étude sérologique et histopathologique des lésions rénales. Enfin, une étude de biologie moléculaire a été mise en place dont le but est l'identification moléculaire des variants de la BI (RT-PCR et séquençage).

Chapitre I

Etude bibliographique de la bronchite infectieuse

1.1 Introduction :

La bronchite infectieuse aviaire ou la BI est une maladie très contagieuse, d'évolution aiguë, maladie virale des poulets d'importante économique prépondérante causée par un coronavirus : le virus de la bronchite infectieuse (IBV). Le virus est contracté après inhalation ou par contact direct avec des oiseaux, litière, matériel contaminés ou autres. La Transmission verticale n'est jamais rapportée mais le virus peut être présent sur la surface des œufs à couver lors du passage dans l'oviducte. La maladie sévit dans tous les pays de l'industrie avicole. La nature de transmission (forte transmission) de la BI ainsi que l'occurrence et l'émergence de plusieurs sérotypes du virus ont compliqué le contrôle par la vaccination. Les volailles adultes (par exemple : les pondeuses) sont la source de nouveaux sérotypes non reconnus précédemment appelés variants. La bronchite infectieuse n'a aucun effet sur la santé humaine [12].

1.2 Historique :

La bronchite infectieuse aviaire a pour la première fois été observée dans le Nord Dakota (Etats-Unis) en 1930. Initialement, cette maladie était décrite comme une atteinte respiratoire des jeunes poulets, d'où son nom. Ce n'est que plus tard qu'elle fut décrite sur des animaux âgés, notamment des poules pondeuses [13]. D'autres étapes importantes dans la découverte de la bronchite infectieuse ont eu lieu quelques années après la description de cette maladie. Ainsi l'étiologie virale a été décrite en 1936, les premières cultures sur œufs embryonnés ont été réussies en 1937 (Beaudette et Hudson) [15]. D'autres manifestations cliniques de la bronchite infectieuse furent décrites ultérieurement, telles que les chutes de pontes (années 40) ou des lésions rénales (années 60) [14].

L'absence de protection croisée entre les souches pathogènes Massachusetts (découverte en 1941) et Connecticut (découverte en 1951) a été montrée en 1956 par Jungherr et ses collègues [16] ; c'est la découverte de l'existence de plusieurs sérotypes du virus de la bronchite infectieuse.

Récemment, les virus de type QX, aussi appelés virus « chinois » car décrits pour la première fois en Chine en 1996 [17], ont été régulièrement décrits en Asie dans les années 2000. Ils apparaissent en Europe (Italie, Pays-Bas, Allemagne, Belgique, France) après 2004. Très récemment, le virus est mis en évidence en Grande Bretagne [18][19][20][21][22][23][24].

Il semble bien que sa diffusion en Europe de l'ouest continue. Il est mis en évidence, à plusieurs reprises, dans des prélèvements réalisés en Roumanie, ce qui laisse présager sa large diffusion dans toute l'Europe [25].

1.3 Distribution et Incidence :

La bronchite infectieuse est une maladie à distribution mondiale. Aux Etats-Unis, plusieurs sérotypes, depuis l'historique Massachusetts (Mass) découvert en 1941, ont été identifiés depuis le début des années 50 [26][27]. Des souches du sérotype Mass ont été identifiées en Europe depuis les années 40. Bien d'autres sérotypes telles que les souches Connecticut (Conn), 4/91, 793/B, différents de ceux découverts en Amérique du Nord, ont été isolés depuis en Afrique, Asie (Chine, Japon, Inde et Corée), Europe et Australie [28][29][30].

Des émergences de bronchite infectieuse apparaissent régulièrement à travers le monde, même parmi des troupeaux vaccinés. Les souches virales isolées pour l'occasion sont le plus souvent, mais pas toujours, d'un sérotype distinct de celui du virus vaccinal [31].

1.4 Étiologie :

1.4.1 Classification :

Le virus de la bronchite infectieuse appartient à la famille des *Coronaviridae* avec deux genres : *Coronavirus* et *Torovirus*. Les familles *Coronaviridae*, *Ateriviridae* et

Roniviridae appartiennent à l'ordre des *Nidovirales* [32]. IBV appartient au genre : *Coronavirus*.

Ce genre est divisé en trois groupes, selon des critères historiquement antigéniques. Depuis, le séquençage du génome a confirmé cette classification. Ainsi, IBV appartient au Groupe 3, qui ne comprend que des coronavirus aviaires [29].

1.4.2 Morphologie :

L'IBV, comme tous les coronavirus, est un virus enveloppé, d'un diamètre d'environ 120 nm. Il comporte à sa surface de nombreux spicules (glycoprotéines S) de taille approchant les 20 nm. Cette structure en couronne a ainsi donné son nom au genre des coronavirus. Les particules virales (virions) se forment par bourgeonnement interne à la cellule à partir de membranes cellulaires, non pas par bourgeonnement externe.

La protéine S est un dimère (parfois trimère) dont les sous-unités S1 (partie bulbair, environ 500 acides aminés) et S2 (ancrage dans la membrane du virion, environ 600 acides aminés) ont respectivement les fonctions d'attachement à la cellule cible, et de fusion des membranes lors de l'infection par le virus. La sous-unité S1 est responsable de l'induction de la réponse immunitaire de l'hôte ; synthèse d'anticorps neutralisant le virus et inhibant l'hémagglutination [29].

Les coronavirus possèdent aussi un grand nombre de petites glycoprotéines intégrées à la membrane du virion (glycoprotéine M, environ 230 acides aminés), ainsi qu'un faible nombre de protéines non glycosylées de petites tailles et intégrées à l'enveloppe (protéine E, environ 100 acides aminés). Toutes ces protéines sont indispensables à la formation des particules virales lors d'une infection cellulaire. De plus, une protéine de nucléocapside (protéine N, environ 420 acides aminés), est étroitement liée à la molécule ARN du génome [29].

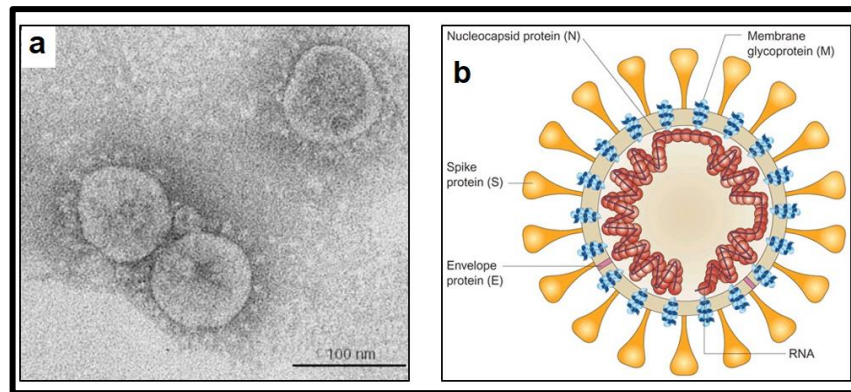


Figure 1.1 : Morphologie du virus du SARS (d'après Stadler *et al.*, 2003) [33].

Image a : image par microscopie électronique du virus cultivé sur cellules Vero (image du Dr L. Kolesnikova, institut de Virology, Marburg, Allemagne).

Image b : Représentation schématique du virus. La bicouche lipidique comprend les spicules protéiques (S). Les glycoprotéines membranaires (M) ainsi que les protéines d'enveloppe (E) protègent la nucléocapside protéique (N). Dans le cas des coronavirus, la membrane lipidique est dérivée de membranes intracellulaires.

1.4.3 Réplication du virus :

Le virus de la bronchite infectieuse se réplique dans le cytoplasme des cellules infectées. A chaque transcription du génome viral, de nouveaux ARN messagers sont produits. Les particules virales (virions) se forment par bourgeonnement de la membrane de l'endothélium réticulaire, et non à la surface cellulaire. Les virions s'accumulent dans de lisses vésicules avant d'être relargués hors de la cellule. Les nouveaux virions apparaissent environ 3 à 4 heures après le début de l'infection [13].

1.4.4 Propriétés physiques et chimiques :

La thermostabilité du virus est variable selon les sérotypes. L'IBV est en général inactivé en 15 min à 56°C, ou après 90 min à 45°C. Il est stable à 4°C après lyophilisation, ou à -30°C. Le virus n'est plus stable à des pH supérieurs à 8 ou inférieurs à 6, bien qu'une grande stabilité de certaines souches à pH 3 ait été mise en évidence. Enfin, celui-ci est sensible au traitement par l'éther, les désinfectants comme les solutions de crésyl, à 1% d'alcool à 70° et de formol à 1% pendant 3 min [34].

Il a été rapporté que le virus est résistant dans l'environnement en moyenne pendant 56 jours en hiver, et 12 jours au printemps [13]. En pratique, on peut donc estimer que le virus sera résistant environ un mois dans un environnement de poulailler, permettant ainsi une large dissémination aux individus qui l'occupent. Le virus ne sera jamais totalement éliminé lors d'un protocole de désinfection classique en élevage, mais la charge virale d'un bâtiment en sera fortement diminuée. C'est pourquoi à la prophylaxie sanitaire (nettoyage et désinfection des bâtiments d'élevage) sera toujours idéalement pratiquée une prophylaxie médicale (vaccination des poulets), afin de prévenir au mieux une infection par IBV.

1.4.5 Diversité antigénique :

La création de nouveaux sérotypes peut s'opérer par mutation (mutations ponctuelles, délétions) ou par recombinaison sur le génome viral (si une cellule est infectée par deux souches différentes d'un même virus).

Actuellement, plus d'une douzaine de sérotypes de l'IBV sont reconnus (notamment par variations antigéniques de la protéine S). Les sérotypes les plus connus sont le sérotype historique Massachusetts, ainsi que les sérotypes Connecticut ou encore Arkansas. Toutefois, au sein d'un même sérotype, on observe l'existence de différentes souches, apparues par mutations ponctuelles sur le génome de l'IBV. Ainsi, par exemple, au sein du sérotype Massachusetts, on retrouve les souches H120 et Beaudette, fréquemment utilisées lors de vaccination.

Les outils modernes d'analyses moléculaires (RT-PCR suivie d'un séquençage) ont permis de confirmer la classification sérotypique basée sur l'antigénicité due à la protéine S. En effet, le séquençage du gène de la sous-unité S1 permet de caractériser un variant, et de le rapprocher phylogénétiquement des autres variants (figure 1.2) [13].

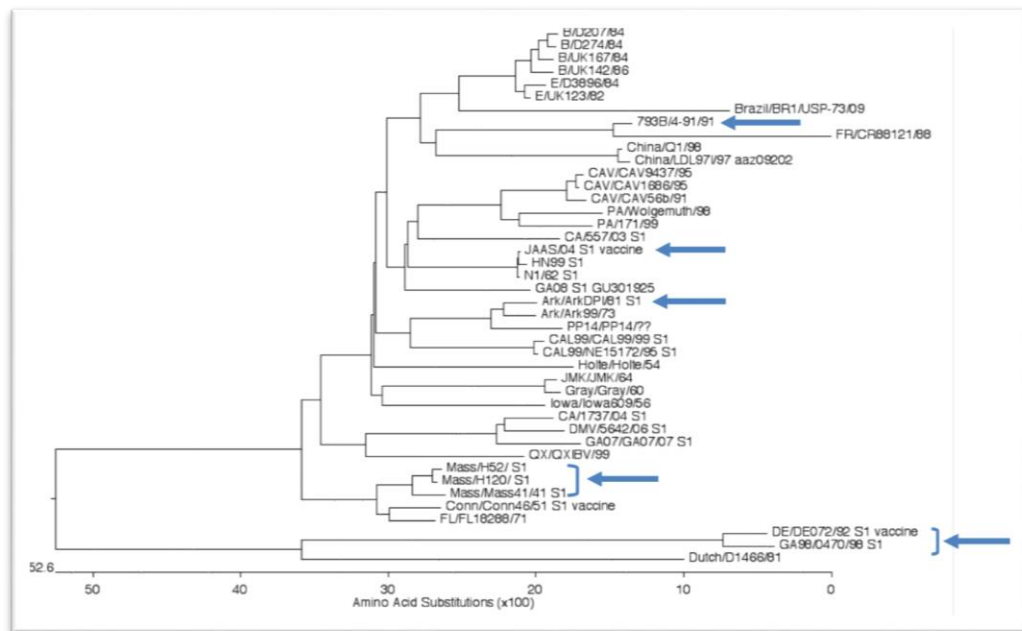


Figure 1.2 : Analyses phylogénétiques des souches de BI à partir d'un séquençage du gène S1 (d'après Smati *et al.*, 2002) [35].

1.4.6 Isolement et culture :

1.4.6.1 Culture sur des œufs embryonnés :

Le virus de la bronchite infectieuse aviaire se révèle difficile à cultiver. Il sera généralement isolé à partir d'échantillons de trachées, de poumons, de reins, ou encore de tonsilles caecales (amygdales caecales).

La culture sur œufs embryonnés SPF est le plus souvent utilisée, par inoculation d'un homogénat de tissus infectés dans le liquide allantoïdien à 10 jours d'âge. Lors des premiers passages, certains embryons infectés présentent des retards de croissance et une position recroquevillée au 19ème jour, mais peu de mortalité. On peut aussi voir une diminution du volume du sac vitellin dont la membrane est affinée. A l'autopsie des embryons, on observe très souvent des dépôts d'urates sur les reins. Plus le nombre de passages sur œufs embryonnés augmente, plus le taux d'embryons mal formés et la mortalité augmentent. On obtient généralement 80% de mortalité au 20ème jour d'incubation après 10 passages [13][36].



Figure 1.3 : Lésions d'IBV sur des embryons de 17 jours et 7 jours post-inoculation [37]. Comparaison entre un embryon normal (droite) et 2 embryons infectés (gauche). Les embryons infectés présentent un retard de croissance important.

1.4.6.2 Culture cellulaire :

L'infection de la trachée est variable selon les souches virales, et IBV peut être détecté jusqu'à 14 jours post infection [38]. L'IBV peut de plus être retrouvé dans les poumons et les sacs aériens (à de mêmes titres viraux). Ainsi l'IBV est responsable de la perte des cils des cellules de l'appareil respiratoire, voire des pneumonies peu sévères, secondairement suivies par des surinfections bactériennes, responsables directes du tableau pathologique.

L'IBV possède aussi un tropisme pour d'autres tissus non respiratoires : le rein, l'oviducte, le testicule, ainsi que certaines portions du tube digestif (œsophage, proventricule, duodénum, jéjunum, rectum, cloaque). Le virus peut être isolé dans les organes lymphoïdes : organes lymphoïdes primaires (bourse de Fabricius) et secondaires (glande de Harder, tonsilles caecales).

L'infection virale du tube digestif n'entraîne normalement pas de manifestation clinique. Les néphrites occasionnées par l'infection rénale de certains sérotypes d'IBV sont dues au tropisme pour les cellules épithéliales du bas de l'appareil

rénal (tube contourné distal, tubules collecteurs, tubes collecteurs). L'infection de l'oviducte par l'IBV est responsable d'une chute de la ponte.

Les titres en virus retrouvés dans chaque organe ne correspondent pas forcément avec la pathogénicité engendrée. Ainsi, une même souche répliquée à de mêmes titres dans la trachée et le rein peut n'entraîner qu'une trachéite sans néphrite.

L'aptitude de l'IBV à se répliquer dans des cellules épithéliales des tissus respiratoires, entériques, rénales ou ovariens pourrait, entre autres, être due au fait que l'attachement de l'IBV à la cellule hôte est dépendant de la présence d'acide N-acétylneuraminique (acide sialique) à la surface de cette dernière. De plus, si ce récepteur (ose à 10 atomes de carbone fréquemment rencontré dans les membranes cellulaires) présente une liaison $\alpha 2,3$ entre la fonction acide et le corps de l'oligo-saccharide, le tropisme de l'IBV pour la cellule est plus important [38][29][39].

1.5 Déterminants du pouvoir pathogène :

Le déterminisme du pouvoir pathogène de l'IBV n'est pas encore clairement élucidé. La protéine S semble être indispensable dans le déterminisme de celui-ci, probablement par reconnaissance spécifique des récepteurs de la cellule cible. Balesteros *et al*, (1997) [40] a montré qu'une différence d'un ou deux acides aminés dans la composition de la protéine S du coronavirus de l'entérite transmissible du porc, déterminait si celui-ci était ou non pathogène. De même Haijema *et al*, (2003) [41] a montré que l'inversion du gène de la protéine S du virus de l'hépatite de la souris (MHV) avec celui du coronavirus du chat, a permis de créer un virus capable de se répliquer dans les cellules de chats [17]. Toutefois, le rôle déterminant du pouvoir pathogène de la protéine S n'est pas encore totalement élucidé, et le fait de posséder une protéine S d'une souche pathogène ne semble pas être une condition suffisante pour exprimer un pouvoir pathogène.

Le rôle des protéines non structurales (3a, 3b, 5a, 5b) est encore non élucidé, mais il est possible que celles-ci soient, entre autre, responsables d'un contournement de l'immunité de l'hôte, et donc du pouvoir pathogène d'IBV. Cette hypothèse n'est encore qu'une pure conjecture [29].

Enfin, la présence d'acide N-acetylneuraminique sur la membrane des cellules réceptrices semble être une condition favorable au tropisme du virion.

1.6 Epidémiologie :

1.6.1 Sources du virus :

Les réservoirs du virus sont majoritairement les animaux infectés (malades ou porteurs sains), qui excrètent ce dernier par aérosols (jetage, toux) et par les fientes. L'excrétion virale par le jetage dure environ deux semaines, avec un taux maximal d'excrétion pour les oiseaux infectés à 2 semaines d'âge [42]. L'excrétion fécale peut par contre durer jusqu'à 20 semaines. Le stress peut favoriser l'excrétion.

Etant donné que plusieurs variants peuvent circuler au sein d'une population, un oiseau peut-être contaminé plusieurs fois (en cas d'absence de protection vaccinale croisée), même durant une courte période d'élevage, multipliant alors les quantités de virus excrété dans l'environnement.

De plus, le virus étant résistant environ un mois dans un environnement de poulailler, le matériel d'élevage ainsi que la litière ou l'aliment peuvent devenir à leur tour des sources potentielles de virus.

1.6.2 Susceptibilité :

Seul le genre Gallus est réceptif à l'IBV [28]. Les oiseaux de tous âges sont réceptifs, mais la sensibilité est plus grande chez les oiseaux jeunes (moins de 6 semaines), souvent en faveur d'un stress ou d'une immunodépression.

La morbidité est proche de 100%, la mortalité variable (faible pour les souches à tropisme respiratoire, plus forte pour les souches à tropisme rénal). Le stress peut favoriser la sensibilité, les oiseaux pouvant resté porteurs asymptomatiques. De nombreux autres facteurs (virulence de la souche d'IBV, statut immunitaire des oiseaux, présence d'immunité maternelle ou active, âge, surinfections bactériennes) influent sur la mortalité en élevage.

Il semble de plus que la susceptibilité à l'IBV varie selon la souche de poulets [43]. Ces différences d'expression clinique de la bronchite, et de virémie induite par l'IBV, s'expliqueraient vraisemblablement par des variations de l'expression du CMH et donc des réponses immunitaires, variables selon les souches de poulets [44][45].

1.6.3 Transmission, porteurs, et vecteurs :

L'IBV se propage rapidement au sein d'un troupeau de poulet. La maladie est fortement contagieuse et la période d'incubation est très courte. Les oiseaux sensibles placés avec les poulets infectés développent habituellement les signes cliniques dans un délai de 24-48 heures.

Le virus est toujours isolé de la trachée, des poumons, du rein, et de la Bourse de Fabricius de poulets après 24 heures et pendant sept jours après l'exposition [46]. La fréquence des isollements de virus diminuée avec le temps et elle dépend de la souche infectieuse, mais l'IBV est isolé des amygdales caecales 14 semaines et des fèces 20 semaines post infection [47].

La nature de la persistance de l'infection par IBV reste non définie, bien que le rein puisse être un des emplacements de l'infection persistante [48]. Le virus du vaccin d'IBV peut persister dans divers organes internes jusqu'à 163 jours ou plus [49]. Pendant cette période, le virus peut être périodiquement excréter dans les excréments nasales et les fèces.

La diffusion par l'air entre les bandes est inconnue, bien qu'on considère généralement que l'IBV se propage aisément. En raison de la découverte récente d'IBV chez d'autres espèces que le poulet, on doit prendre en considération ces espèces d'oiseau qui peuvent agir en tant que vecteurs d'IBV.

1.7 Pathogénicité :

1.7.1 Signes cliniques :

La période moyenne d'incubation de la bronchite infectieuse est de 18 à 36h, elle varie selon la dose infectante, la voie d'inoculation, la souche, et l'état général de l'animal.

Les signes cliniques dépendent du variant viral de IBV et de son tropisme. Souvent, il y a peu de signes cliniques et les animaux guérissent spontanément. Les signes sont les plus sévères chez les jeunes, avec une mortalité d'origine primaire. Chez les adultes, la mortalité est souvent due à des infections secondaires [50][48].

Les signes cliniques généraux sont peu spécifiques de la bronchite infectieuse ; prostration, frilosité, léthargie, retard de croissance, oiseaux ébouriffés, yeux humides (conjonctivite séreuse) [51].

Les signes respiratoires sont généralement de la toux, des râles trachéaux, des éternuements, des écoulements nasaux séro-muqueux jamais hémorragiques, parfois des sinus enflés.

Les signes d'une atteinte de l'appareil reproducteur (souvent chez les pondeuses et les reproductrices) sont une chute de ponte (10 à 50%) et une altération des œufs (déformation de la coquille, minceur de la coquille, liquéfaction de l'albumen) [52]. Chez les futures reproductrices ou futures pondeuses (de moins de 2 semaines d'âge), le passage de l'IBV bloque définitivement le développement anatomique de la grappe ovarienne, créant ainsi de « fausses pondeuses ». Le passage de BI en début de ponte provoque une légère chute de ponte qui retourne à la normale en quelques semaines. La maladie en fin de ponte entraîne un arrêt irréversible de celle-ci.

De plus, des travaux de Villarreal *et al.*, 2007 [53] ont montré la possibilité du virus de l'IBV de se répliquer aussi dans les cellules ciliées des voies séminifères des testicules de coqs. Cette atteinte serait ainsi à l'origine d'une formation de calculs dans l'épididyme, causant une réduction de fertilité chez ces coqs.

En cas d'atteinte rénale, une insuffisance rénale (avec dépression, mortalité, soif intense, fèces humides) se met en place. La mortalité est plus importante lors d'une atteinte rénale.

Enfin, l'IBV est un des virus suspectés (avec le virus de la bursite infectieuse, des *adénovirus* ou des *réovirus*) d'être responsable de proventriculite chez le poulet de chair. IBV a été détecté par PCR dans des broyats de proventricule issus d'animaux d'élevage présentant des signes cliniques, et l'inoculation

expérimentale (par gavage) de ces broyats, à des poulets SPF, a recréé une proventriculite chez les oiseaux. Dans ce cas, les oiseaux présentent un proventricule distendu, épaissi et atonique. Ce phénomène est responsable, entre autre, de ruptures accidentelles du proventricule lors de l'éviscération des oiseaux à l'abattoir, causant la condamnation de la carcasse [54].

1.7.2 Morbidité et mortalité :

La morbidité peut atteindre le 100% mais la mortalité est variable selon la virulence du sérotype infectant ; âge ; statut de l'immunité maternel ou actif ; et le stress tel que le froid et les infections bactériennes secondaires. Elle est modérée à sévère pour certaines souches respiratoires et néphropathogéniques, telles que le Delaware 072 et la souche australienne T, respectivement. Le sexe, la race, et la nutrition sont des facteurs additionnels qui contribuent à la sévérité de la maladie rénale [55][56]. La mortalité peut être aussi haute que 25% ou plus chez les poulets moins de 6 semaines d'âge et elle est habituellement négligeable chez les poulets âgés plus de 6 semaines. La mortalité dans les cas d'urolithiases est de 0.5-1.0% par semaine [57].

1.7.3 Lésions :

1.7.3.1 Lésions macroscopiques :

Les poulets infectés ont un exsudat séreux, catarrhal, ou caséux dans la trachée, les voies nasales, et les sinus. Les sacs aériens peuvent être mousseux en cas d'infection aiguë, puis elles deviennent opaques et contiennent un exsudat caséux jaune (fibrine) [58]. Des foyers de pneumonie peuvent être observés autour des grandes bronches.

Des souches néphropathogène d'IBV induisent des reins hypertrophiés et décolorés, les tubules et les uretères étant souvent distendus par des cristaux d'urate [55][59].

Des poules atteintes dans leur jeune âge par une souche à tropisme génital peuvent présenter une absence de développement de l'oviducte, invisible cliniquement en pré ponte. Elles deviendront des « fausses pondeuses ».

1.7.3.2 Lésions microscopiques :

La trachée d'un animal atteint de la bronchite infectieuse présente une muqueuse œdémateuse. On observe une perte des cils de l'épithélium de la muqueuse, parfois une desquamation de celui-ci, ainsi qu'une infiltration hétérophilique et lymphocytaire de cette dernière dès 18h post infection [13]. La régénération de l'épithélium se met en place dès 48h, et l'hyperplasie induite est suivie d'infiltrations massives de la lamina propria par des cellules lymphoïdes [60][61].

Si les sacs aériens sont touchés, on observe de l'œdème, une desquamation des cellules épithéliales, et un exsudat fibrineux dès 24h. On peut aussi observer un nombre important d'hétérophiles, ainsi qu'une prolifération de fibroblastes et une régénération de l'épithélium par des cellules cuboïdales [60].

Les lésions rénales de l'IBV sont principalement celles d'une néphrite interstitielle.

Le virus cause une dégénérescence granulaire, une vacuolisation et une desquamation de l'épithélium tubulaire. Une infiltration massive par des hétérophiles dans les espaces interstitiels est observée lors de la phase aiguë de la maladie. En cas d'urolithiase, les uretères sont distendus et contiennent le plus souvent des cristaux d'urate [30][60][62].

Une infection de l'oviducte par l'IBV engendre une décilition des cellules épithéliales et une dilatation des glandes tubulaires. On observe une infiltration de la muqueuse par des lymphocytes et des hétérophiles, ainsi qu'un œdème et une fibroplasie de celle-ci, sur toute la longueur de l'oviducte [63][59].

1.7.4 Réponse immunitaire :

1.7.4.1 Immunité active :

La réponse immunitaire active lors d'atteinte d'animaux par l'IBV est de type humoral, par synthèse d'anticorps IgM (locaux) puis IgG (systémiques) [11][48]. On observe aussi l'intervention de lymphocytes T cytotoxiques (LTC) et d'interférons [51][64][65].

Des oiseaux ayant été naturellement infectés par l'IBV et ayant guéri deviennent résistants à une infection par le même virus (protection homologue), mais la protection vis à vis d'autres variants viraux d'IBV varie et est peu prévisible (protection hétérologue) [64][65][66][67].

La réponse humorale est la plus étudiée lors d'une infection par IBV, de par son utilité lors de la mesure du taux d'anticorps pour contrôler l'efficacité d'une vaccination (cinétique sérologique) ou pour le diagnostic de la maladie. Les taux d'anticorps, le plus souvent sériques mais aussi locaux, sont évalués par ELISA, neutralisation virale (VN) ou inhibition de l'hémagglutination. Toutefois le taux d'anticorps sériques ne correspond pas à un niveau de protection (d'où l'importance d'une cinétique sérologique) [68][69][13].

Lors d'une primo-vaccination par un virus vivant atténué, un pic d'IgM est d'abord observé, suivi d'un pic d'IgG puis un déclin des deux réponses [70]. Lors d'une vaccination de rappel, ou lors d'une infection, les deux taux d'anticorps s'élèvent en même temps, mais les taux d'IgG persistent plus longtemps, apportant à l'animal une protection vaccinale durable.

La réponse à médiation cellulaire implique majoritairement l'intervention de LTC. L'apparition de cette réponse corrèle généralement avec la réduction de l'infection et des signes cliniques [71]. La lyse des cellules infectées est majoritairement induite par des LTC CD8+ et CD4-[72][73][74].

Enfin, des interférons sont aussi détectés lors d'une infection par IBV. Ces interférons sont majoritairement détectés dans la trachée et les poumons et, à de plus faibles niveaux, dans le plasma, le foie, les reins ou la rate [75]. In vitro, les interférons réduisent la réplication de l'IBV sur des cultures de cellules de reins de poulets. In vivo, l'injection intraveineuse d'interférons retarde l'apparition et la sévérité des signes cliniques de poulets infectés [29].

1.7.4.2 Immunité passive :

Les anticorps d'origine maternels (AOM) peuvent réduire à la fois la sévérité d'une réaction vaccinale et l'efficacité d'un vaccin si le vaccin est le même que celui utilisé chez les reproducteurs [76][77]. En dépit de cela, la vaccination à un jour

des poussins issus de troupeaux reproducteurs vaccinés est pratiquée, pour permettre de protéger les poussins quand ce taux d'AOM aura chuté. En effet, lors de la vaccination à un jour des poussins, le virus vaccinal atténué est généralement distribué par aérosol, stimulant ainsi l'immunité locale (bronches, narines, yeux) et la synthèse d'IgM qui n'interfèrent pas avec les anticorps d'origine maternels (IgG) systémiques [78][79].

1.8 Diagnostic :

Le diagnostic de la BI repose sur les antécédents cliniques, les lésions, la séroconversion ou la hausse des titres d'anticorps anti-IBV, la détection de l'antigène d'IBV par de nombreuses techniques de capture d'antigène à base d'anticorps, l'isolement du virus et, de plus en plus, par la détection de l'ARN virale. Le diagnostic de la BI doit inclure, si possible, une identification du sérotype ou du génotype du virus en raison de la forte variation antigénique des souches d'IBV et de la disponibilité de vaccins conçus pour différents sérotypes. De nombreuses approches de la détection de l'IBV ou des anticorps induits par celui-ci ont été décrites et comparé de manière critique par De Wit [80]. Au début, il convient de préciser qu'aucune technique, qu'elle soit basée sur la technologie des anticorps ou sur celle des acides nucléiques, n'est totalement satisfaisante pour la confirmation de l'infection par un sérotype spécifique d'IBV sur le terrain.

1.8.1 Isolement et identification de l'agent causal :

Bien qu'il s'agisse principalement d'un agent pathogène respiratoire, l'IBV peut se développer dans des tissus non respiratoires (rein, oviducte, tube digestif). La connaissance de la pathogenèse de l'IBV, revue par Dhinaker Raj et Jones [48], a été instructive pour la détection du virus. Des facteurs à prendre en compte incluent le temps écoulé entre l'infection et l'échantillonnage et le statut immunitaire de l'oiseau à l'infection. Ces facteurs et d'autres ont été discutés par De Wit [80].

1.8.1.1 Isolement virale :

La trachée est la cible primaire du virus de l'IBV et constitue par conséquent un site de prélèvement privilégié, en particulier au cours de la première semaine de

l'infection. Le prélèvement peut être constitué soit d'écouvillonnages trachéaux, soit de tissus trachéaux prélevés en post mortem. Chez les poulets individuels, les titres d'IBV sont maximum au quatrième ou au cinquième jour, après ils diminuent rapidement. Les écouvillons cloacaux ou les amygdales cæcales prélevés au cours de l'examen post mortem peuvent toutefois présenter un intérêt particulier dans les cas où plus d'une semaine s'est peut-être écoulée depuis le début de l'infection [47][81][82]. Les échantillons provenant des poumons, des reins et de l'oviducte doivent également être envisagée en fonction de l'historique clinique de la maladie [80].

Les prélèvements destinés à l'isolement viral sont généralement inoculés dans des œufs embryonnés de poulet ou dans des cultures d'organes trachéaux, de préférence provenant de poulet SPF. Les fluides doivent être récoltés après 48-72 heures de chaque système de culture pour le passage « aveugle » dans un autre ensemble de cultures. Les échantillons doivent recevoir au moins 3 à 4 passages « aveugles » avant d'être appelé négatif basé sur l'échec à causer la mort ou des lésions chez les embryons. La ciliostase peut être observée lors du passage initial dans les cultures d'organes trachéaux. Ces observations ne sont pas en elles-mêmes suffisantes pour confirmer la présence d'IBV ; la présence du virus doit être confirmée par des tests sérologiques (par exemple, VN, HI, ELISA), immunohistochimie, analyse des acides nucléiques, ou par microscopie électronique.

1.8.1.2 Confirmation du virus de la bronchite infectieuse par des méthodes basées sur les anticorps :

La détection de l'IBV directement à l'aide du matériel post mortem peut être atteinte par un certain nombre de méthodes (passées en revue dans [80]). Des sections ou des raclures de la muqueuse trachéale ou d'autres tissus prélevés sur les oiseaux en post-mortem peuvent être examinés par immunofluorescence ou immunoperoxydase utilisant des sérums polyclonaux spécifiques de l'IBV ou des anticorps monoclonaux [83][84]. Les résultats ne sont pas toujours faciles à interpréter, notamment à partir de spécimens de terrain en raison des réactions non-spécifiques. Des prélèvements de la trachée peuvent également être utilisés dans les tests de précipitation sur gel d'agar (AGPT), dont la sensibilité est

supérieure à celle qui pourrait être attendue [80]. L'IBV peut également être détecté et identifié en sérotype dans le liquide allantoïdien ou après culture d'organes trachéaux à l'aide d'anticorps monoclonaux d'ELISA (Revu dans [80][82][85]).

1.8.1.3 Confirmation de l'IBV par des méthodes basées sur l'acide nucléique :

Les RT-PCR ont été appliquées directement sur du matériel provenant de poulets ou après amplification préliminaire du virus dans des œufs embryonnés [86][87][88][89][90][91][92]. Les RT-PCR bien choisies sont suffisamment sensibles pour détecter l'ARN d'IBV extrait de la bouche, des prélèvements trachéaux ou des écouvillonnages cloacaux (c'est-à-dire qu'il n'est pas essentiel de commencer par isoler / amplifier le virus dans les embryons). Cela veut dire, en raison de l'usage omniprésent des vaccins contre la BI, obtenir simplement un résultat de PCR positif n'est pas suffisant pour le diagnostic ; la séquence du produit de PCR doit être comparée avec les séquences correspondantes des souches vaccinales.

Les méthodes de génotypage par RT-PCR ont largement remplacé le sérotypage par l'IHA et le VN pour déterminer l'identité d'une souche de terrain. La base moléculaire de la variation antigénique a été étudiée, généralement par séquençage nucléotidique du gène codant pour la protéine (S) ou, plus spécifiquement, séquençage nucléotidique du gène codant pour la sous-unité S1 de la protéine S dans laquelle on trouve la plupart des épitopes auxquels se lient des anticorps neutralisants [91][93][94][95][96][97]. Une corrélation exacte avec les résultats IHA ou VN n'a pas été observé, pour cela différents sérotypes présentent généralement de grandes différences (20 à 50%) dans les séquences d'acides aminés déduites de la sous-unité du gène S1. Alors que d'autres virus, clairement distingués par des tests de neutralisation, ne montrent que 2–3% de différences dans les séquences d'acides aminés [87]. Il est important de noter qu'il n'est pas possible à l'heure actuelle de différencier les souches vaccinales et pathogènes du terrain sur la base de séquençage du gène S.

RT-PCR par polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP) différencie les génotypes d'IBV basés sur une électrophorèse unique de motifs de bandes de fragments de la sous-unité S1 digérés par une enzyme de restriction après amplification du gène par RT-PCR [86][92].

La RT-PCR spécifique du génotype S1 peut être utilisée pour identifier les isolats de terrain en tant que génotypes d'IBV utilisant des amorces universelles et leurs génotypes spécifiques en utilisant des souches ou des amorces spécifiques à un type d'IBV [90]. Des amorces spécifiques du gène S1 des génotypes Massachusetts (Mass), Connecticut, Arkansas, JMK, DE / 072/92 et Californie ont été développées [90].

Les méthodes de génotypage spécifique au gène S1 et RT-PCR RFLP ont des limites. Cependant, des sérotypes des variants inconnus peuvent être détectés comme IBV en utilisant des amorces universelles, mais le sérotype spécifique ne peut pas être identifié jusqu'à ce que la souche soit séquencée et les amorces spécifiques soient conçues.

Le séquençage nucléotidique du gène S1 est la technique la plus utile pour la différenciation de l'IBV et la méthode de choix dans de nombreux laboratoires. Le séquençage du produit de la RT-PCR de la région hypervariable S1 peut être utilisé à des fins de diagnostic pour identifier des isolats et des variants de terrain précédemment non reconnus [93][94][95][97].

La comparaison et l'analyse des séquences d'isolats de terrain inconnus et de variants avec des souches de référence pour l'établissement d'un lien de parenté sont de significatifs avantages du séquençage.

Les principales utilisations des tests de RT-PCR relatifs au gène S sont l'identification du virus et son application à la compréhension de l'épidémiologie virale au cours des enquêtes menées lors des manifestations cliniques.

1.8.2 Sérologie :

Les multiples sérotypes d'IBV et les variations antigéniques notés dans les types décrits ajoutent de la complexité à la sélection d'une méthode sérologique appropriée et à l'analyse des résultats du test. Tous les sérotypes d'IBV

sembleraient avoir des épitopes communs (antigènes spécifiques à un groupe), ce qui n'est pas surprenant compte tenu de l'identité élevée de la séquence d'acides aminés dans les protéines N et M et la sous-unité S2. Les IBV induisent également des anticorps spécifiques de type, bien sûr, déterminés par les épitopes de la protéine S1.

Les tests ELISA, immunofluorescence et immunodiffusion lient les anticorps au groupe ainsi qu'aux antigènes spécifiques du type. Ces tests ne peuvent donc pas différencier les sérotypes. Après une première infection par l'IBV, la majeure partie de la réponse en anticorps VN et HI est spécifique au sérotype. Une deuxième infection, même avec le même sérotype, résulte en un sérum plus largement réactif. Comme les poulets sur le terrain sont presque certainement vaccinés contre la BI, et éventuellement infectés plus d'une fois par le virus de terrain, les sérums de terrain ne sont pas très utiles pour le sérotypage. Ainsi, des sérums d'infection simples, obtenus expérimentalement en utilisant des poulets SPF, sont utilisés pour le sérotypage.

La sérologie de routine est généralement effectuée à l'aide de tests VN, IHA ou ELISA, revu par De Wit [80]. L'AGPT spécifique au groupe peut être utilisé, mais les anticorps précipitant sont de courte durée et le test peut conduire à des sous-détection. Les résultats positifs de l'AGPT sont révélateurs d'une récente infection.

L'infection par un virus de même sérotype que le vaccin peut entraîner une faible production d'anticorps, tels que détectés par l'AGPT [98]. Dans l'ensemble, l'AGPT n'est pas recommandé pour la détection des anticorps anti-IBV, il est préférable de l'utiliser pour la détection de l'antigène d'IBV.

Les ELISA d'IBV sont spécifiques à un groupe [98][99][100][101][102]. Cette méthode est largement utilisée, et les kits pour mener la procédure sont commercialement disponibles. Les tests ELISA détectent d'abord les anticorps anti-IBV en l'espace d'une semaine d'infection, plus tôt que les tests IHA ou VN [98]. Deux échantillons de sérum sont requis, un au premier signe d'infection et l'autre après une semaine ou plus tard ; le retard du premier prélèvement peut empêcher la détection de la séroconversion. Les IgM sont induites très rapidement après infection par l'IBV et transitoire, et donc la détection des IgM spécifiques à l'IBV est révélatrice d'une infection récente (revue par De Wit et al [98]).

Les tests VN et IHA pour la détection des anticorps anti-IBV sont généralement considérés spécifique au type, bien qu'il y ait des réactions croisées entre sérotypes, en particulier dans le test IHA. Les sérums recueillis après des infections uniques, y compris la vaccination, peuvent être spécifiques à une souche, encore moins spécifique au sérotype [98][99]. Cela peut limiter l'utilisation du test IHA pour surveiller la réponse vaccinale. Par exemple, un test IHA avec le M41 en tant qu'antigène mal performant lorsqu'il est utilisé pour détecter des anticorps après la vaccination par H120, bien que les deux virus soient de même sérotype, tel que défini par les tests VN.

Les réactions croisées sont plus évidentes lorsque les sérums sont collectés après une infection sur le terrain ou expérimentale des poulets de chair qui ont déjà été vaccinés contre la BI- la situation habituelle sur le terrain – et dans des sérums de poules pondeuses pouvant avoir plusieurs infections de BI en plus de plusieurs vaccinations BI. Malgré les avantages du coût bas, un équipement simple et la rapidité du test IHA en font une procédure très utile pour le diagnostic de routine ; Il faut tout simplement garder à l'esprit les limites et adopter des techniques analytiques alternatives qui sont disponible en cas de doute [80].

1.8.3 Diagnostic différentiel :

Le diagnostic différentiel se fait avec la maladie de Newcastle, laryngotrachéite infectieuse, coryza infectieux, adénovirus. La BI est à considérer dans tout syndrome de chute de ponte [103].

1.9 Traitement :

Comme pour beaucoup de maladies virales, il n'existe pas de traitement spécifique à la bronchite infectieuse. Des mesures non spécifiques permettent d'améliorer le confort des oiseaux ; réchauffer les animaux, diminuer la densité d'élevage, stimuler la prise alimentaire, si nécessaire améliorer la ventilation [56].

Un traitement antibiotique permet de prévenir les surinfections bactériennes (notamment l'aérosacculites).

1.10 Prévention et contrôle :

1.10.1 Prophylaxie sanitaire :

Le virus de la bronchite infectieuse étant très contagieux, de par sa résistance dans l'environnement et la susceptibilité des oiseaux, les mesures de biosécurité dans l'élevage sont à appliquer avec rigueur. Il sera toujours utile de contrôler, lors de la visite d'un élevage, l'application de ces pratiques par l'éleveur ; protection de l'accès au site, tenues vestimentaires (incluant la gestion des bottes entre les bâtiments), désinfection des bâtiments, conduite en bandes d'âge unique...

Ces mesures de biosécurité ne sont évidemment pas spécifiques à la bronchite infectieuse, et pourront prévenir les surinfections bactériennes à craindre lors d'un tel passage viral.

1.10.2 Vaccination :

1.10.2.1 Importance de la vaccination :

La gestion sanitaire idéale d'un élevage de volailles impliquerait, pour prévenir une infection virale contagieuse, un fonctionnement en bande unique, des mesures de confinement drastiques, une même origine des animaux et des protocoles de désinfection des bâtiments rigoureux. Toutefois, ces pratiques idéales étant illusoires, seule la vaccination a permis le contrôle de la bronchite infectieuse dans les élevages intensifs de poulets de chair, de pondeuses, ou de reproducteurs.

Les intérêts de l'utilisation de vaccins sont multiples. En effet, les vaccins induisent une réaction immunitaire de l'hôte et donc, par conséquent, réduisent sa sensibilité à un agent infectieux (si la souche de celui-ci est identique ou proche du variant vaccinal). En conséquence, la vaccination diminue directement les effets pathogéniques du virus de l'IBV, et minimise la susceptibilité de l'oiseau à des surinfections secondaires possibles. De plus, les vaccins permettent de diminuer la réplication d'un virus infectieux chez un animal infecté, et de réduire significativement l'excrétion fécale et respiratoire d'un virus infectieux [67].

Toutefois, si l'utilisation de vaccins permet de réduire l'expression de la maladie, ils n'empêchent pas l'infection. Ceci signifie donc qu'une circulation d'IBV sera possible au sein d'un troupeau vacciné, sans expression de signes cliniques.

La protection de l'appareil respiratoire est usuellement étudiée après une infection par la bronchite aviaire, lors de l'évaluation de l'efficacité d'un vaccin. Les méthodes d'infection sont entre autre trachéale, intranasale, ou par une goutte dans l'œil [13]. L'impossibilité de ré-isoler l'IBV depuis la trachée 4 à 5 jours post infection a été utilisée comme un critère d'immunité [46][104]. Des évaluations plus poussées de la protection vaccinales peuvent inclure l'impossibilité de ré-isoler le virus depuis le rein [6][105] ou l'oviducte, l'absence de signes cliniques de bronchite [106], l'absence de lésions trachéales [107], la présence d'une activité ciliaire trachéale normale [37].

Une approche alternative de l'évaluation de la protection de poulets vaccinés est le challenge d'animaux avec un mélange d'IBV et d'*E.Coli*. Cette méthode a montré une plus grande protection croisée que les autres études se basant uniquement sur l'immunité trachéale [66].

1.10.2.2 Les différents types de vaccins :

Le contrôle vaccinal de la bronchite infectieuse aviaire implique à la fois l'usage de vaccins vivants atténués et de vaccins inactivés. Les vaccins vivants sont employés pour les poulets de chair et pour les primo-vaccinations des animaux à vie longue (reproducteurs, pondeuses). Les vaccins inactivés, à adjuvants huileux, sont utilisés chez les reproducteurs et les pondeuses avant l'entrée en ponte [76][108][109]. Les vaccins atténués permettent une mise en place rapide de l'immunité (d'abord locale puis systémique), mais qui décline dès 9 semaines après la vaccination [29], alors que les vaccins inactivés procurent une immunité durable (et une synthèse d'anticorps systémiques que la poule reproductrice pourra transmettre au poussin).

Les souches virales utilisées pour les vaccins vivants sont fréquemment atténuées par plusieurs passages sur œufs embryonnés [110]. Toutefois, un trop grand nombre de passage peut diminuer l'immunogénicité, voire en augmenter la

pathogénicité. On peut ainsi aisément comprendre le potentiel d'augmentation de la virulence d'une souche vaccinale atténuée circulant dans un troupeau.

Les variants employés pour une vaccination dépendent majoritairement des variants circulant dans l'environnement de l'élevage. Le sérotype Massachusetts est communément utilisé à travers le monde, au moyen de souches telles que H120 ou M41 notamment, de même que le sérotype Connecticut. Aux Etats-Unis, la souche Arkansas est largement utilisée, alors qu'en Europe, les sérotypes 4/91 ou D274 sont plus fréquemment employés.

De récentes théories [31] suggèrent que des variants du sérotype Arkansas ont pu faire apparition aux Etats-Unis dans des régions (Delaware, Maryland et Virginia) où la vaccination Arkansas ne serait pas effectuée dans tous les élevages. Cette sélection aurait fait émerger au sein d'élevages de poulets, des populations mineures de variants virulents apparues à partir de vaccins vivants atténués. Les auteurs préconisent que les vaccins Arkansas devraient être utilisés par tous les éleveurs et toute l'année, et non occasionnellement, afin d'éviter que des sous-populations de souches virulentes apparaissent.

1.10.2.3 Méthodes d'application des vaccins :

Les vaccins vivants atténués sont administrés expérimentalement par dépôt d'une goutte de solution vaccinale par voie intranasale, intraoculaire ou intratrachéale [111]. Une méthode d'injection dans des embryons a été testée expérimentalement. En pratique, les poulets sont vaccinés par nébulisation d'une solution en aérosol, ou par l'eau de boisson [112]. L'administration par aérosol est largement répandue pour les poulets de un jour au couvoir. Il est à noter que la vaccination n'est pas toujours uniforme sur l'ensemble du lot, et que les méthodes par aérosols peuvent causer quelques réactions respiratoires sévères chez les poussins quelques jours après vaccination. L'administration via l'eau de boisson est pratiquée en élevage. Les vaccins sont parfois dans ces cas susceptibles d'être détruits par les agents désinfectants chimiques utilisés dans l'eau (ions chlorures). Il est alors nécessaire à l'éleveur d'arrêter l'utilisation de ces désinfectants pendant la vaccination, voire parfois de rajouter de la poudre de lait

ou du thiosulfate de sodium à l'eau de boisson pour stabiliser la suspension vaccinale.

Les vaccins inactivés requièrent d'être injectés individuellement (par voie intramusculaire). Cette vaccination est généralement réalisée quelques semaines avant l'entrée en ponte, en rappel d'un programme vaccinal basé sur les vaccins atténués.

Usuellement, tous les animaux sont vaccinés par nébulisation (vaccin vivant) à un jour d'âge au couvoir (le plus souvent avec la souche H120). Compte tenu de l'hétérogénéité de la réponse immunitaire des animaux (hétérogénéité de taille, anticorps d'origine maternelle), une seconde vaccination avec un vaccin vivant (par nébulisation ou dans l'eau de boisson en élevage) sera nécessaire vers 2-3 semaines d'âge, avec le même vaccin, ou avec un sérotype différent si la prévalence est forte (ex : H120 et/ou 4/91).

Pour les animaux à durée de vie longue, une troisième vaccination avec un vaccin vivant est effectuée vers 7-8 semaines, suivie enfin d'une injection de vaccin inactivé au moins 8 semaines après la dernière vaccination, contenant des souches du sérotype Massachusetts (ex : M41) et d'autres sérotypes variants. Par la suite, les poules pondeuses sont vaccinées en général toutes les 8 à 10 semaines au moyen d'un vaccin atténué.

Tableau 1.1 : Exemple de protocole de vaccination BI sur des poulettes futures pondeuses [37].

Age des animaux	Vaccin	Mode d'administration
J1	Atténué H120	Nébulisation
J20	Atténué 4/91	Nébulisation
J40	Atténué H120	Nébulisation
J70	Atténué 4/91	Eau de boisson
J120	Inactivé M41	Injection IM

1.10.2.4 Limites de la vaccination :

Outre la possibilité de faire émerger des variants mutants issus de vaccins atténués au sein d'une population vaccinée, la limite principale de la vaccination est le manque de réactions croisées entre sérotypes (**Tableau 1.2**).

Tableau 1.2 : Protections croisées observées chez des poulets Leghorn SPF vaccinés par une goutte intraoculaire à 2 et 3 semaines d'âge avec un vaccin vivant atténué d'IBV, puis infectés 4 semaines plus tard avec des souches homologues et hétérologues (d'après [38]).

		Vaccins				
		Mass (Holland)	Mass (L-1) + Conn	Mass (Holland) + Ark	Mass (L-1) + Ark	Mass (Connaught) + Ark
Challenge	Mass 41	84	93	87	86	100
	Ark DPI	47	27	87	100	93
	Conn	57	100	100	87	100
	JMK	80	86	73	93	93
	Holte	70	33	79	40	93
	Florida	77	80	84	78	93

Les chiffres indiquent le pourcentage de protection, c'est-à-dire le pourcentage d'oiseaux chez lesquels on ne retrouve pas de virus à partir d'écouvillons trachéaux collectés 5 jours après infection.

Ainsi, une vaccination adaptée devra toujours tenir compte des variants circulants dans la région de l'élevage, ainsi que de leurs relations antigéniques, afin d'anticiper si une vaccination apportera une protection croisée envers plusieurs sérotypes. Sinon, il faudra toujours associer plusieurs variants pour apporter une couverture maximale des animaux.

C'est généralement lors d'apparition de cas de bronchite sur le terrain que l'on découvre l'émergence de nouveaux variants échappant à la vaccination classique.

De plus, la réponse immunitaire des oiseaux vaccinés n'est jamais uniforme au sein d'un troupeau. En situation expérimentale, il a été montré que 10% des poulets vaccinés ne présentaient pas une réponse immunitaire protectrice contre une infection par une souche virulente homologue [29]. Cette hétérogénéité de réponse des poussins vaccinés s'explique notamment par la souche des oiseaux, mais aussi par la variabilité génétique propre à chaque animal.

Chapitre 2

Les affections rénales chez la volaille

2.1 Introduction :

Le système urinaire des oiseaux présente, par rapport à celui des mammifères, des particularités anatomiques et physiologiques notables : l'absence de la vessie, la présence d'un système porte-rénal et l'excrétion des déchets azotés sous forme d'acide urique en sont les plus importantes.

Les affections rénales sont très fréquentes et elles représentent l'un des problèmes délicats pour les éleveurs et les vétérinaires praticiens.

2.2 Physiologie rénale :

La physiologie rénale des oiseaux présente des différences avec celle des mammifères. Elle permet d'expliquer la spécificité de certaines affections propres aux oiseaux.

2.2.1 Fonctions des reins :

Les reins des oiseaux ont les mêmes fonctions que ceux des mammifères : la régulation hydrique et osmotique, la régulation du pH, la production de la vitamine D sous sa forme active, l'excrétion des déchets métaboliques, la détoxification et l'excrétion des toxines endogènes et exogènes. En effet, les reins aident le foie en participant à la détoxification [113]. Ainsi, les concentrations tissulaires en antibiotiques et toxines sont souvent plus élevées et l'identification et la quantification de nombreux composés sont plus facilement réalisées dans le tissu rénal [114][115][116][117].

Bien que les fonctions soient identiques, la régulation hydrique et osmotique et l'excrétion des déchets azotés se font de manières très différentes [118] et vont donc être abordées plus en détail.

2.2.1.1 Régulation hydrique et osmotique :

Les reins jouent un rôle important dans la régulation de la composition du milieu extracellulaire, via les processus de filtration, de sécrétion et de réabsorption.

2.2.1.1.1 Filtration :

La filtration du plasma au travers des capillaires glomérulaires est analogue à celle des mammifères et constitue la première étape de la formation de l'urine.

La plupart des protéines ne traversent pas le filtre. Le glucose, les acides aminés, l'urée et de nombreux électrolytes sont présents dans le filtrat, à la même concentration que dans le plasma [119].

2.2.1.1.2 Sécrétion :

Certains composés ne sont pas filtrés, mais sécrétés au niveau des tubules. C'est le cas des phosphates (en petite quantité, sauf sous l'action de la parathormone), des protons (ce qui permet de maintenir un pH sanguin proche de 7,5 et explique le fait que l'urine soit acide), de l'ammoniaque qui représente 10% à 30% de l'excrétion azotée, mais aussi des urates qui représentent quant à eux la majorité de l'excrétion azotée et ne sont que très peu filtrés [120].

2.2.1.1.3 Réabsorption :

2.2.1.1.3.1 Réabsorption tubulaire de l'eau :

La réabsorption tubulaire permet de concentrer l'urine. Concernant l'eau, elle peut représenter jusqu'à 99% du volume filtré. L'urine finale peut donc être hyper osmotique [120] (jusqu'à 2,5 fois supérieure à l'osmolarité plasmatique, ce qui est tout de même limité par rapport aux mammifères qui sont capables de produire une urine jusqu'à 30 fois plus concentrée que le plasma [121]).

2.2.1.1.3.2 Réabsorption tubulaire d'électrolytes :

La plupart des acides aminés et des électrolytes tels que le chlorure de sodium et les bicarbonates ainsi que la totalité du glucose sont réabsorbés avec l'eau au niveau du tube contourné proximal.

Le chlorure de sodium est également réabsorbé de façon active au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé et du tube contourné distal [118].

2.2.1.1.3.3 Réabsorption intestinale d'eau et de solutés :

Une fois parvenue dans l'urodeum, l'urine est envoyée dans le coprodeum et le colon par un péristaltisme rétrograde [122] (cf. Fig. 4). La composition de l'urine est alors modifiée par réabsorption de l'eau et de solutés à travers la muqueuse intestinale [123].

Cependant, si l'urine est trop concentrée (iso- à hyper-osmotique), elle ne sera pas envoyée dans le colon, dont le gradient de pression osmotique ne permettra de toute façon aucune réabsorption [122].

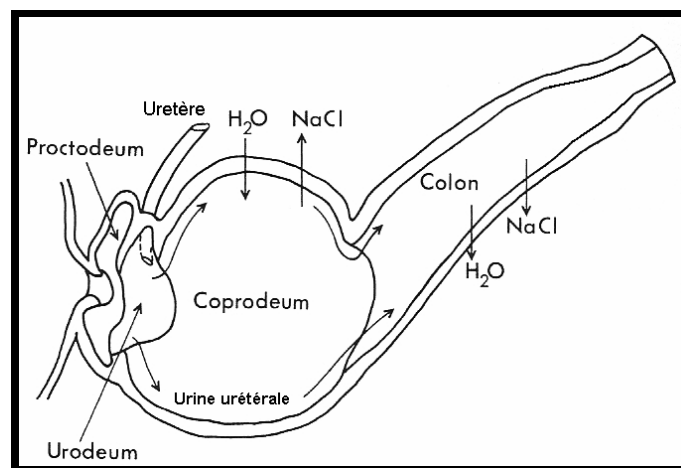


Figure 2.1 : Vue sagittale du cloaque [120].

2.2.1.2 Excrétion azotée :

Contrairement aux mammifères, les oiseaux sont uricotéliques : ils éliminent l'azote principalement sous forme d'acide urique (et de ses sels : les urates) mais produisent également de l'urée et des ions ammonium en plus petite quantité [120]. Le catabolisme de la purine et des autres acides aminés conduit à la

formation d'acide urique [124]. Il s'agit d'une adaptation qui permet aux oiseaux de limiter les déperditions d'eau dans l'urine.

L'excrétion de l'acide urique nécessite peu d'eau car ce déchet azoté est osmotiquement inactif. C'est la sécrétion de mucus dans les uretères qui facilite le passage des urates insolubles. [113]

2.2.1.3 Réponse à la déshydratation :

En réponse à la déshydratation, l'osmolarité du plasma des oiseaux augmente. Cela stimule la sécrétion d'arginine vasotocine, une hormone similaire à l'hormone antidiurétique des mammifères [125][4][126]. Elle augmente la perméabilité des tubes contournés distaux et des tubes collecteurs médullaires (qui sont en temps normal imperméables à l'eau), ce qui permet la formation d'une urine hyper osmotique [113][122].

2.3. Différents types d'affections rénales :

Chez les mammifères, beaucoup d'atteintes du système urinaire lui sont spécifiques. Au contraire, chez les oiseaux, la plupart des affections urinaires ne sont qu'une composante d'une atteinte systémique touchant de nombreux organes.

2.3.1 Définitions :

2.3.1.1 Néphrite :

C'est un terme non spécifique pour décrire une inflammation du rein. Elle peut concerner le milieu interstitiel, les tubules et/ou les glomérules [2]. Bien que certains auteurs parlent de pyélonéphrite, cette appellation est incorrecte car les reins des oiseaux sont dépourvus de bassinet [127].

2.3.1.2 Glomérulopathie :

Les glomérulopathies rassemblent toutes les atteintes rénales concernant plus particulièrement les glomérules. Le terme « glomérulonéphrite » est réservé aux atteintes glomérulaires d'origine inflammatoire. Ces dernières sont souvent dues à

un dépôt de complexes immuns ou d'anticorps dirigés contre la membrane basale du glomérule [128]. Cependant, leur étiologie reste souvent inconnue [2].

Chez les mammifères, les glomérulopathies sont les principales causes d'insuffisance rénale chronique. Elles se traduisent par une protéinurie.

Les glomérulopathies des oiseaux diffèrent en de nombreux points de celles des mammifères et n'induisent pas de protéinurie pathologique [129].

2.3.1.3 Néphrose :

La néphrose est une modification histopathologique du parenchyme rénal caractérisée par toute lésion dégénérative, non-inflammatoire du rein, quelle qu'en soit la cause. De telles lésions peuvent entraîner l'apparition de lésions inflammatoires, ce qui rend le diagnostic difficile [127].

Les causes de néphrose sont nombreuses : l'hémoglobininurie, les infections à adénovirus, les métaux lourds, les aminoglycosides, le calcium, le sodium, l'ochratoxine A et la perfusion par voie intraveineuse de solutés hypertoniques en sont quelques exemples [127][130][131][132].

2.3.2 Anomalies congénitales et héréditaires :

Bien que peu rapportées, des lésions rénales congénitales sont occasionnellement rencontrées chez les oiseaux [133].

L'aplasie ou l'hypoplasie rénale unilatérale est décrite chez la volaille [127] comme chez les oiseaux de cage [3]. Chez ces derniers, il s'agit souvent de trouvaille d'autopsie : le rein controlatéral est alors hypertrophié et la fonction rénale non altérée [1].

Les kystes rénaux, d'origine congénitale ou acquise, sont peu communs. Lorsque ces lésions sont sévères, elles peuvent conduire à une insuffisance rénale [1].

2.3.3 Maladies infectieuses :

Les néphrites infectieuses ne représentent souvent qu'une composante d'une atteinte générale touchant plusieurs organes. Toute septicémie peut potentiellement provoquer une infection et/ou inflammation rénale.

2.3.3.1 Bactériennes :

2.3.3.1.1 Type d'infection :

Les infections rénales bactériennes peuvent résulter d'une contamination ascendante (depuis le cloaque), d'une contamination par voie hématogène (lors d'affection systémique) ou encore d'une contamination de proximité par extension d'un processus infectieux localisé (cœlomite, oophorite, salpingite,...).

Les infections ascendantes par contamination cloacale sont peu fréquentes [134]. Les oiseaux atteints présentent un nombre accru de leucocytes, des cylindres et des bactéries dans le culot urinaire. La culture d'urine permet de déterminer l'agent en cause et, associée à un antibiogramme, l'antibiotique adéquat. Dans la plupart des cas, les infections sont aiguës et rapidement fatales [134].

La majorité des infections rénales d'origine bactérienne ne sont que des composantes d'une atteinte systémique [1] : la contamination a lieu par voie hématogène. Rappelons l'importance clinique d'une entérite : elle peut, du fait de l'existence du système porte-rénal, être à l'origine d'une contamination directe des reins par voie hématogène. Il est donc important de traiter correctement une entérite lors d'atteinte rénale [2].

Les infections par voie hématogène provoquent une néphrite interstitielle ou une glomérulonéphrite. Dans les deux cas, les oiseaux sont bactériémiques ou septicémiques et présentent des signes d'atteinte générale. L'hémoculture est alors plus appropriée. Lorsque l'infection est à un stade avancé, l'urine peut présenter des modifications telles que la présence de cylindres, une augmentation des protéines et des leucocytes [1].

2.3.3.1.2 Lésions :

Quel que soit le type de la contamination (ascendante ou hématogène), les reins présentent une hypertrophie ainsi que des degrés variés de nécrose. Les lésions histologiques typiques d'une néphrite bactérienne sont la dilatation tubulaire et l'infiltration par des cellules inflammatoires [127].

Les infections ascendantes aiguës sont caractérisées par la présence de nombreuses bactéries dans les tubules et parfois aussi dans le milieu interstitiel. Lorsque l'infection devient chronique, d'autres lésions apparaissent : de la nécrose tubulaire, l'apparition de kystes et de la fibrose interstitielle avec une infiltration de cellules mononuclées [127].

Lors d'infection par voie hématogène, les lésions primaires sont présentes au niveau des glomérules. Les bactéries associées à de la nécrose et à des infiltrations inflammatoires seront alors visibles.

2.2.3.1.3 Agents pathogènes :

De nombreuses bactéries Gram positives et Gram négatives sont connus par leur capacité à causer des lésions rénales, que ce soit par infection ascendante ou par voie hématogène. Les plus courantes sont *Staphylococcus* sp. Et *Streptococcus* sp. [135]. D'autres bactéries ont été décrites lors d'infections rénales : *Escherichia coli* [1][3][135], *Klebsiella* sp. [136], *Salmonella* sp., *Yersinia* sp. [135], *Proteus* sp. [1, 135], *Pseudomonas* sp. [1], *Mycobacterium* sp. [3] et *Chlamydomphila psittaci* [137].

Les infections à *Mycobacterium* sp. et *Chlamydomphila psittaci* sont généralement systémiques. Bien qu'elles puissent causer des lésions rénales, ce n'est que rarement le cas [138].

2.3.3.1.4 Démarche clinique :

D'une façon générale, le diagnostic se fait par analyse d'urine, culture bactérienne sur urine et sang et par biopsie rénale. L'interprétation des résultats d'analyse d'urine et de culture bactérienne sur urine doit tenir compte du fait qu'il est très difficile d'obtenir un échantillon d'urine pure sans contamination fécale.

Le traitement se fera en fonction de l'agent étiologique, des résultats de l'antibiogramme et de la sévérité de l'atteinte. Une antibiothérapie à base d'un antibiotique non néphrotoxique à spectre large est conseillée lors d'atteinte rénale [134].

2.3.3.2 Virale :

Le tableau suivant résume les principaux virus qui infectent ou affectent les reins des oiseaux.

Tableau 2.1 : principaux virus infectant les reins des oiseaux.

Virus	Nom commun	Lésions rénales
<i>Adenovirus</i>	-Le virus des entérites -Syndrome d'hydropéricarde chez le poulet de chair	-Hémorragie rénale -Hémorragie rénale, Néphrose tubulaire.
<i>Coronavirus</i>	-Le virus de la bronchite infectieuse.	-Néphrite interstitielle, urolithiases, goutte viscérale, hypertrophie rénale.
<i>Entérovirus</i>	-Le virus de la néphrite aviaire.	-Maladie rénale des jeunes poussins et dindons.
<i>Herpes virus</i>	-Maladie de Marek -Herpes des psittacidés -Herpes du pigeon type 1	-Lymphome rénale, rein massif. -Rénomégalie -Nécrose rénale.
<i>Orthovirus</i>	-Influenza A des ratites (autruche)	-Rénomégalie, urate verdâtre et uretères fourrés.
<i>Paramyxovirus</i>	-Paramyxovirus 1 du pigeon	-Rénomégalie, néphrite, lymphoplasmacytique.
<i>Polyomavirus</i>	-entérite néphrétique hémorragique de l'oie -Polyomavirus aviaire -Polyomavirus des psittacidés	-Néphrite -Lésions minimales. -Glomérulopathie membranaire.
<i>Reovirus</i>	-Arthrite virale et ténosynovite des poulets.	-simple inflammation.
<i>Retrovirus</i>	-Leucose aviaire /leucose lymphoïde. -Reticuloendotheliose virus	-Cancer, néphroblastome, lymphome rénal/adénome /carcinome, leucome. -Tumeur rénal
<i>Togavirus</i>	-West Nile virus -inflammation virale aviaire des séreuses. (EEE) -Alphavirus du dindon (EEE) -Alphavirus de la pintade	-Reins pâles. -Nécrose rénale. -Rénomégalie

EEE = eastern equine encephalitis

Certains virus comme l'IBV et le virus de néphrite aviaire sont parmi les causes de la goutte et des atteintes rénales.

La BI est une maladie des volailles, très contagieuse touche le tractus respiratoire mais aussi le système urinaire et génital. Certaines souches de la BI appelées : néphropathogéniques ont une prédilection pour les reins.

Le virus de la néphrite aviaire, un entérovirus affectant les reins qui a été associé aux atteintes rénales avec une véritable explosion de mortalité en Europe et en Asie.

2.3.3.3 Fongiques :

Les néphrites fongiques sont relativement rares [1]. Quelques cas d'aspergillose et de cryptosporidiose touchant les reins ont été rapportés [139][140][141]. La fonction rénale peut être altérée lors de compressions dues à la présence de granulome extensifs dans les sacs aériens adjacents, d'invasion locale ou d'un infarctus rénal dû à des thrombi artériels et veineux contenant des hyphes fongiques [134]. Cependant, les anomalies d'origine urinaire ne sont pas les principaux signes de l'atteinte systémique et ne sont cliniquement visibles que lorsque celle-ci sera sévère [1].

2.3.3.4 Parasitaires :

Surtout les coccidies rénales qui peuvent causer une morbidité et une mortalité élevée par exemple : *Eimeria truncata*, *E. somateriae*, *E. christianseni*, *E. boschadis*, *E. gaviae*, *E. fraterculae*, *E. goelandi* et *E. wobeseri*. On a aussi *Sarcocystis falcatula* chez le canard et les Cryptosporidés (*Cryptosporidia* sp.) [142][143].

2.3.3.5 Intoxications :

Les intoxications chez les oiseaux sont majoritairement chroniques et dose dépendantes. Les effets causés par un toxique sont très variables d'une espèce à l'autre. Ils apparaissent plus rapidement chez les oiseaux, du fait de la rapidité du transit et de l'absorption gastro-intestinale ainsi que du métabolisme élevé [131].

2.3.3.5.1 Etiologie :

2.3.3.5.1.1 Intoxication aux mycotoxines :

Plusieurs mycotoxines (aflatoxine, oosporéine, ochratoxine, citrinine) provoquent des troubles rénaux chez la volaille [3][144]. Elles sont présentes dans les graines et les aliments destinés aux oiseaux. Une suspicion d'intoxication aux mycotoxines est difficile à confirmer. La gravité de l'intoxication dépend souvent de la dose ingérée et les formes aiguës sont rares : la plupart des cas sont chroniques et se traduisent par des signes non-spécifiques. Les plus courants sont une immunosuppression, une hépatite chronique, une baisse des performances reproductives et une atteinte rénale [141].

2.3.3.5.1.2 Intoxication aux métaux lourds :

Comme l'intoxication au Plomb, au Zinc...etc. La présentation clinique est multi-systémique et concerne les systèmes hématopoïétique, nerveux, gastro-intestinal et rénal. Les intoxications chroniques à faible dose peuvent entraîner une immunosuppression du sujet [131].

2.3.3.5.1.3 Intoxication iatrogène :

La cause la plus connue d'atteinte rénale d'origine toxique chez les oiseaux de cage est la néphrotoxicité due aux aminoglycosides (gentamicine, amikacine,...). Elle provoque de la polyurie et une néphrose diffuse [134].

2.3.3.5.1.4 Intoxication à certaines plantes :

Ce sont les oiseaux de compagnie le plus souvent sujets à ce type d'intoxication, du fait des nombreuses plantes d'appartement présentes dans les foyers. La plupart se traduisent par des signes gastro-intestinaux, cependant l'ingestion d'avocat (le fruit) est susceptible de provoquer une néphrite [145].

2.3.3.5.1.5 Autres toxicités :

Des dommages hépatiques ou musculaires (blessure, rhabdomyolyse) importants ainsi que toute cause d'hémolyse peuvent également être à l'origine de lésions

rénales [130] [3], suite à une néphrose due aux pigments biliaires, à la myoglobinurie ou l'hémoglobinurie. Dans ces deux derniers cas, les reins sont brun foncé.

Microscopiquement, on observe dans les tubes contournés proximaux une dégénération tubulaire, une accumulation luminale d'un matériel amorphe éosinophile (les pigments) et dans les tubes collecteurs, des cylindres éosinophiles [133].

2.3.3.6 Maladies nutritionnelles :

Parmi eux l'hypervitaminose D3, l'hypovitaminose A, certains aliments présentés granulés, intoxication au sel, l'excès de cholestérol.

2.3.3.7 Néoplasies rénales :

Le carcinome est la tumeur rénale la plus courante, cependant les adénomes rénaux, néphroblastomes, cystadénomes, fibrosarcomes, lymphosarcomes, mélanome malin et autres sont également rapportés [146].

2.3.3.8 Affections métaboliques à répercussion rénale :

Comme la goutte, la déshydratation, la lipidose et l'amyloïdose.

La goutte (viscérale et/ou articulaire) est un terme désignant une condition qui accompagne différents types d'affections d'étiologies variées. Elle est fréquemment rencontrée chez les oiseaux et peut être à la fois la conséquence et la cause d'une atteinte rénale [134]. En général, elle doit être considérée comme la manifestation d'un dysfonctionnement rénal sévère et non comme une affection primaire.

Elle est causée par une réduction de l'excrétion des urates ou par une augmentation de leur production (excès de protéines dans l'alimentation [147], cachexie [148]), voire les deux [149]. Lorsque le taux d'acide urique plasmatique augmente et dépasse la solubilité de l'urate de sodium (hyperuricémie), il se forme des cristaux d'urate de monosodium [148]. La déshydratation, les obstructions urétérales, de nombreuses atteintes rénales (atteintes rénales infectieuses,

intoxications, tumeurs...) ainsi que des causes nutritionnelles (excès de calcium, déséquilibres en sodium et potassium [124], hypervitaminose [150] et hypovitaminose A [132], hypervitaminose D3 [151], B, carences en magnésium et phosphore [152]) sont les causes les plus fréquentes de goutte.

2.3.3.9 Autres affections rénales :

Urolithiases et obstruction urétérale, hémorragie rénale, ischémie et hypoxie rénales.

2.4. Conduite à tenir lors d'une atteinte rénale :

Lors d'atteinte rénale, la démarche idéale à suivre est de :

-  Découvrir l'origine de l'affection et adapter le traitement en fonction de celle-ci.
-  Suivre l'évolution de ces affections et ajuster le traitement.
-  Eviter les médicaments néphrotoxiques autant que possible. [153]

Chapitre 3

Partie expérimentale

3.1 Première partie : Enquête préliminaire

3.1.1 Problématique :

L'élevage avicole constitue une source non négligeable d'apport protéique dans les pays en voie de développement. La maîtrise des conditions d'élevage est pour la plupart des éleveurs chose facile, mais pour assurer une production économiquement bénéfique peu d'éleveurs arrivent à ce but. En effet, la production avicole est sujette à des problèmes sanitaires énormes pouvant compromettre sa rentabilité.

Parmi les préoccupations sanitaires majeurs, les atteintes rénales occupent une place prépondérante de part leur fréquence et ses effets néfastes sur la qualité de production (mortalité élevée, retard de croissance, chute de ponte...etc.).

Les affections du système urinaire chez les volailles restent plus difficiles à diagnostiquer car les signes cliniques ne sont que rarement pathognomoniques et lorsqu'ils le sont, la maladie est souvent déjà à un stade avancé.

Le système urinaire des volailles est exposé à des infections virales d'importance capitale dont la BI. Maladie dont la découverte remonte au 1930 en causant une atteinte respiratoire des jeunes poulets, ce n'est que dans les années 60 qu'elle fut décrite sur des lésions rénales. Des études actuellement disponibles décrivent l'émergence et la distribution de nouveaux variants néphropathogènes chez le poulet de chair tel que le QX [7][8].

En Algérie, certaines études ont cité les manifestations des affections rénales en poulet de chair et chez la poule pondeuse sans s'intéresser à leur

description sur le plan clinique, les étiologies probables, et le rôle de la bronchite infectieuse dans l'apparition de ces affections rénales.

A partir de là, les principales questions qui se posent sont les suivantes :

- + Quelle est la situation des affections rénales en Algérie, sur le plan clinique ?
- + Quelles sont les causes éventuelles des affections rénales ?
- + Quels sont les traitements entrepris par les vétérinaires praticiens lors d'affections rénales, ainsi que leurs résultats ?
- + Quelle est la part de la BI dans l'apparition des affections rénales ?
- + Quelle est la situation de la BI en Algérie ?

3.1.2 Objectifs de l'étude par questionnaire :

Pour réaliser ce travail nous avons tracé les objectifs suivants :

- + Décrire les affections rénales en élevages avicoles sur le plan clinique.
- + Enumérer les principales étiologies des affections rénales aviaires.
- + Avoir une idée sur les traitements entrepris sur le terrain et leurs résultats.
- + Déterminer la part de la BI dans l'apparition des affections rénales et d'en décrire cette pathologie.

3.1.3. Matériel et méthodes :

Cette étude expérimentale est représentée par une enquête de terrain effectuée à l'aide d'un questionnaire destiné aux vétérinaires praticiens.

L'élaboration de ce questionnaire se fait en plusieurs étapes :

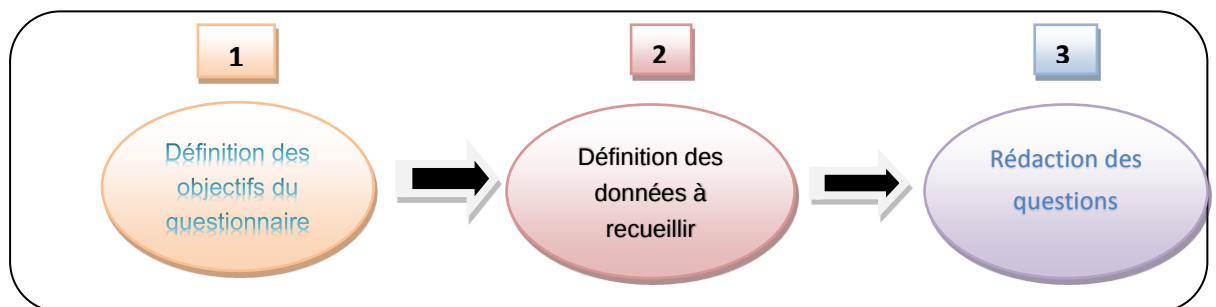


Figure 3.1 : Représentation schématique de la démarche générale de préparation d'un questionnaire [154].

3.1.3.1 Préparation du questionnaire :

3.1.3.1.1. Définition des objectifs du questionnaire :

Avant de commencer à rédiger les questions d'un questionnaire, nous avons défini précisément les objectifs, c'est-à-dire les informations que nous souhaitons obtenir.

L'objectif principal de cette étude est de décrire les affections rénales en élevages avicoles sur le plan clinique et d'énumérer les principales étiologies de ces affections (bactériennes, virales, parasitaires, fongiques, alimentaires et médicamenteuses). Par ailleurs, il nous a paru intéressant d'interroger les vétérinaires sur leurs C.A.T et les résultats obtenus sur la mortalité, les signes cliniques et les performances zootechniques.

En fin, d'autres objectifs sont, aussi, fixés à savoir d'élucider la part de la BI dans l'apparition des affections rénales et d'en décrire cette pathologie.

3.1.3.1.2 Définition des données à recueillir :

Le questionnaire ainsi finalisé, présenté en Annexe B, comporte 4 parties distinctes :

- ✚ Des données générales concernant le vétérinaire,
- ✚ Des données principales sur les affections rénales (causes, symptômes associés, mortalité).
- ✚ Des données sur la BI (causes de manifestation, type et mode d'élevage atteint, densité, âge et saison d'apparition).
- ✚ C.A.T des vétérinaires sur le terrain et les résultats obtenus.

3.1.3.1.3. Rédaction des questions :

3.1.3.1.3.1. Choix du type de questionnaire :

Différents types de questionnaire existent pour récolter les informations voulues lors d'une enquête descriptive : technique, d'opinion ou mixte. Dans notre étude,

le questionnaire est mixte car il est constitué à la fois de questions ouvertes et de questions fermées. A titre d'exemple :

9. Est-ce que ces atteintes rénales sont accompagnées de mortalité ?

Oui ☐ Non ☐ si oui, quel est le taux de mortalité ? %.

10. A quoi sont dues, d'après vous, ces atteintes rénales ?

* *Maladies virales* ☐ * *Alimentaire* ☐

* *Maladies bactériennes* ☐ * *Médicamenteuse* ☐

* *Maladies fongiques* ☐ * *Autres :*

20. En cas d'affections rénales, quelle est votre C.A.T ?

.....

3.1.3.1.3.2. Elaboration des questions :

Nous avons formulé les questions selon deux types : les questions dites «ouvertes» laissent la réponse totalement libre, et les questions «fermées» donnent le choix aux vétérinaires entre quelques réponses prédéfinies.

Pour la commodité d'exploitation des résultats et l'assurance d'obtenir un taux de réponse correct, nous avons choisi la formulation de la majorité des questions de façon fermée. Néanmoins, celles concernant les programmes vaccinaux de poulets de chair (PC), des futures pondeuses (PFP) et des futurs reproducteurs chair (FRC) ainsi que la C.A.T en cas d'affections rénales ne pouvaient être que ouvertes.

Le tableau suivant représente un résumé du questionnaire utilisé dans notre enquête.

Tableau 3.1 : Récapitulatif du questionnaire de l'enquête.

Objectifs du questionnaire	Données à recueillir	Rédaction des questions
➤ Identification des vétérinaires interrogés	➤ Statut des vétérinaires interrogés	➤ Région d'exercice ➤ Nombre d'élevages suivis ➤ Nombre d'années d'exercice
➤ Décrire les affections rénales sur le plan clinique.	➤ Données principales sur les affections rénales	➤ Symptômes associés ➤ Le taux de mortalité ➤ Les causes éventuelles de ces atteintes. ➤ Les différentes causes virales.
➤ Déterminer la part de la BI dans l'apparition des affections rénales et d'en décrire cette pathologie.	➤ La part de la BI dans ces affections.	➤ Les causes de la BI ➤ La fréquence de la maladie en fonction de l'âge, densité, saison, type et mode d'élevage.
➤ Avoir une idée sur les traitements entrepris sur le terrain et leur résultat.	➤ Diagnostic, C.A.T et les résultats obtenus	➤ Eléments de diagnostic. ➤ C.A.T ➤ Résultats des TRT sur la mortalité, signes cliniques et performances zootechniques.

3.1.3.1.3. Remplissage du questionnaire :

Quant à la récolte des informations, elle est faite par les différents enquêteurs dans le centre. Pour assurer un bon taux de réponse, nous avons décidé de faire remplir le questionnaire en face à face avec les vétérinaires mais certains vétérinaires nous ont exigés de laisser le questionnaire puis le récupérer plus tard.

3.1.3.1.4. Population d'étude :

La population d'étude ciblée regroupe tous les vétérinaires praticiens dont l'activité est à prédominance aviaire et ceci dans les quatre wilayas d'étude (MEDEA, BOUIRA, TIZI OUZOU, BOUMERDES). Malheureusement nous n'avons pas pu avoir des données sur le nombre de cette catégorie de vétérinaire ce qui rend la taille de notre population d'étude indéterminée.

3.1.3.1.5. Détermination de l'échantillon :

L'enquête n'a pas été réalisée sur l'ensemble de la population mais sur une partie de celle-ci, appelée échantillon. Ce type d'enquête, dite par sondage, a plusieurs avantages par rapport à une enquête exhaustive :

- ✚ Réduire les coûts car une enquête de ce type nécessite des moyens financiers et mobilise les enquêteurs pendant une durée déterminée.
- ✚ Assurer la faisabilité de l'enquête en réduisant le nombre de vétérinaires à interroger.

Ce protocole permet donc d'obtenir les informations voulues plus rapidement, et à un coût moindre.

L'échantillon choisi pour extrapoler les résultats obtenus à la population totale doit être représentatif d'une part, et assez élevé numériquement pour assurer des résultats précis d'autre part. Pour déterminer la taille de l'échantillon, il est nécessaire de définir deux paramètres : [154]

- ✚ La prévalence attendue (ou proportion attendue).
- ✚ La précision relative souhaitée.

Notre échantillon est choisi d'une manière aléatoire et elle n'obéi pas à ces deux paramètres du fait de l'absence des données sur la proportion des vétérinaires praticiens dont l'activité est à prédominance aviaire.

3.1.3.1.6. Analyse des données :

L'ensemble des données recueillies a été retranscrit dans un fichier Excel et codifié de façon à pouvoir les exploiter plus facilement.

3.1.4 Résultats et discussion :

Notre enquête a été réalisée auprès de 44 vétérinaires praticiens parmi les 51 contactés. Ces vétérinaires ont une activité à prédominance dans la filière aviaire (suivi d'élevage, consultation, autopsie...etc.), ils interviennent sur un nombre important d'élevages avicoles dans les wilayas de : BOUIRA, TIZI OUZOU, BOUMERDES, MEDIA.

3.1.4.1 Qualité de l'échantillon :

Notre enquête n'a pas été faite sur la totalité de la population des vétérinaires praticiens dans la région d'étude, elle est portée sur une partie de celle-ci appelée échantillon. Cet échantillon doit être adapté aux objectifs de l'enquête descriptive.

Pour pouvoir extrapoler les résultats obtenus à travers l'échantillon sur la population d'étude on doit respecter deux paramètres essentiels : exactitude et précision de l'échantillon [154].

L'exactitude dépend de la représentativité de l'échantillon, assurée par le tirage au sort. Notre échantillon serait non représentatif puisque nous n'avons pas pu prévoir de tirage au sort, par absence d'une liste exhaustive recensant les vétérinaires praticiens dont leur activité est à prédominance aviaire.

Quant à la précision, qu'est tributaire du nombre d'individus à inclure dans l'échantillon, nous n'avons pas pu estimer son degré par manque d'information sur la taille de la population d'étude (les vétérinaires praticiens dont leur activité est à prédominance aviaire). Nous avons pris 44 vétérinaires d'une manière aléatoire.

Nous n'avons pas testé le questionnaire avant de le lancer à grande envergure. En effet, le testage du questionnaire permet une éventuelle modification du fond et de forme des questions. A titre d'exemple, on aurait dû apporter les modifications suivantes :

* La reformulation de la question n° 5, qu'était un peu large englobant toute la filière avicole (RP, RC, PP, PC, Dinde), et dans l'objectif de bien définir les types d'élevages suivis on aurait dû poser la question autrement :

Vous faites des suivis d'élevages avicoles : Oui ☐ Non ☐

Si oui combien :

** Poulet de chair : Elevages.*

** Poules pondeuses : Elevages.*

** Repro-chair : Elevages.*

** Dindes : Elevages.*

* Pour la question n° :13, et pour mieux se renseigner sur les modalités d'application des vaccins, on aurait dû ajouter une colonne : Mode d'application du vaccin.

Malgré le respect des règles d'éthique pour la rédaction du questionnaire, de récolte des données, notamment, l'anonymat des vétérinaires, nous avons enregistré des cas de refus de remplissage du questionnaire (deux vétérinaires).

Enfin, il est important de signaler que nous avons rempli le questionnaire en mode face-à-face pour la majeure partie. Entre autre, nous avons reçu des questionnaires par E-mail (courrier électronique). Ce mode de remplissage du questionnaire a permis de réduire les non remplissages et les non réponses à certaines questions.

3.1.4.2 Les biais :

Les biais ont comme conséquence une image différente de la réalité. Ils entraînent une déformation de la réalité [154].

3.1.4.2.1 Biais d'échantillonnage :

Notre échantillon est non représentatif de la population d'étude (les vétérinaires praticiens dont leur activité est à prédominance aviaire) du fait de l'absence du tirage au sort et l'introduction dans l'échantillon d'une manière aléatoire de 44 vétérinaires. Cette non représentativité est un handicap majeur pour l'interprétation et l'extrapolation des résultats.

Pour pallier ce biais nous recommandons l'élaboration d'une liste exhaustive des vétérinaires praticiens dont leur activité est à prédominance aviaire, et ceci dans la région d'étude (les quatre wilayas). À partir de cette liste, tirer au sort le nombre

de vétérinaires prévu (selon la méthode de la table de nombre au hasard) et aller les visiter un par un. Au cas où ces vétérinaires désignés ne sont pas disponibles, les remplacer par une liste d'attente.

3.1.4.2.2 Biais d'observation :

Plusieurs facteurs peuvent provoquer des réponses erronées ou des non réponses de la part des vétérinaires interrogés.

* Quant au questionnaire, et bien que nous avons accordé une attention particulière à son élaboration, nous avons raté l'étape du testage avant de le lancer à grande échelle. Cela s'est traduit par des non réponses à certaines questions et l'impossibilité d'exploiter certaines autres.

* En ce qui concerne les enquêteurs (en nombre de 7), il s'agit des étudiants en fin d'étude s'occupant chacun de sa région, ils n'ont pas reçu tous une formation commune à travers des séances de travail évolutives expliquant les objectifs de chaque question. De ce fait, nous avons remarqué une variabilité inter-enquêteurs en ce qui concerne les non remplissage du questionnaire. En effet, il semblerait que les enquêteurs de BOUIRA et MEDIA ont interrogé certains vétérinaires faisant peu de suivi d'élevage aviaire (vétérinaires dont leur activité est à prédominance rurale ou autre) ce qui a conduit à l'arrêt du remplissage du questionnaire au niveau de la question n°6. Ce biais de sélection pourrait affecter la qualité des résultats en déviant de la réalité entre les régions d'étude. La solution serait de consacrer une séance pour former tous les enquêteurs en même temps.

3.1.4.3 Ancienneté des vétérinaires et nombre d'élevages suivi :

La majorité des vétérinaires visitée (58 %) exercent dans la région de BOUIRA, peu de vétérinaires exerçant dans la région de Tizi Ouzou (27 %) et très peu dans les deux autres wilayas (MEDIA, BOUMERDES).

L'analyse de l'ancienneté des vétérinaires de l'échantillon montre que près de la moitié des vétérinaires ont plus de 10 ans d'exercice et que 75 % d'entre eux ont plus de 5 ans de pratique. Donc les nouveaux vétérinaires sont minoritaires et ne représentent que 25% de l'échantillon. (Figure n°3.2).

Le même constat pour le nombre d'élevages suivi, 48 % des vétérinaires suivent plus de 10 élevages. Ces vétérinaires sont considérés comme expérimentés dans la filière avicole. Par contre, les vétérinaires suivant moins de 5 élevages, éventuellement moins expérimentés représentent une faible proportion (11%). (Figure n°3.3).

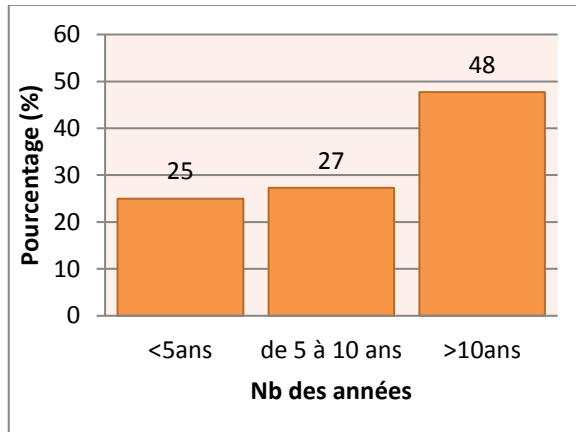


Figure n°3.2 : Répartition des vétérinaires en fonction de l'ancienneté.

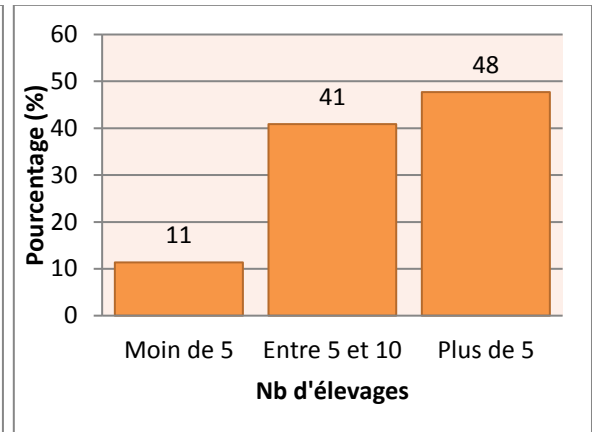


Figure n°3.3 : Répartition des vétérinaires en fonction du nombre d'élevages suivis.

3.1.4.4 Importance des affections rénales :

La majorité des vétérinaires interrogés ont rencontré des affections rénales (86%). Une minorité des vétérinaires (14%) ont répondu jamais avoir rencontré des affections rénales ce qui nous laisse poser la question : est-ce que ces vétérinaires ont vraiment une activité à prédominance aviaire ? il semblerait qu'ils n'appartiennent pas à la population d'étude (vétérinaires praticiens dont leur activité est à prédominance aviaire). Cette proportion des vétérinaires n'affecte pas l'importance des affections rénales en pathologie aviaire.

En effet, chez les volailles, Les affections rénales sont très fréquentes et elles représentent l'un des problèmes délicats pour les éleveurs et les vétérinaires praticiens. On distingue les affections rénales infectieuses et non infectieuses. La plupart des affections urinaires ne sont qu'une composante d'une atteinte systémique touchant de nombreux organes (origine infectieuse) [134].

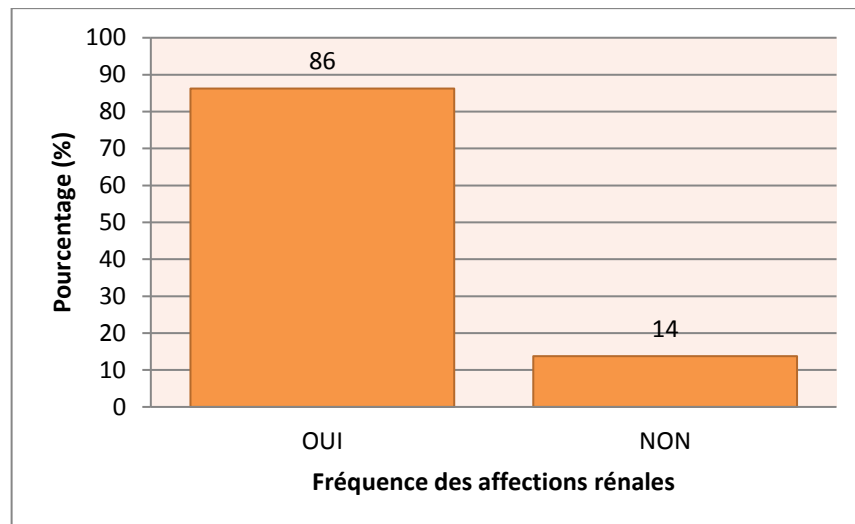


Figure n°3.4 : Fréquence des affections rénales rencontrées.

3.1.4.5 Tableau clinique associé aux affections rénales :

Les signes cliniques associés aux affections rénales sont très variés : en premier lieu, nous avons enregistré les atteintes digestives avec un pourcentage de 43%. Ensuite, nous avons constaté des symptômes respiratoires (39%). Les symptômes locomoteurs, quoique rarement signalés (4%), révèlent éventuellement une atteinte rénale grave ou chronique. (Figure n°3.5).

Chez les poules pondeuses et reproductrices chair, l'atteinte génitale est enregistrée dans 13% des cas clinique. Ce pourcentage un peu faible peut se traduire par des chutes de ponte considérable et d'étendue très importante conduisant à des pertes économiques non négligeables.

Les taux de mortalité relevés se situent entre 5 et 10% dans la moitié des cas. Dans 25 % des cas, le taux de mortalité dépasse les 10%. Ainsi, les atteintes rénales, bien qu'elles provoquent des mortalités dans la quasi-totalité des cas (97%), entraînent des taux de mortalité moyenne (entre 5 et 10%). (Figure n°3.6).

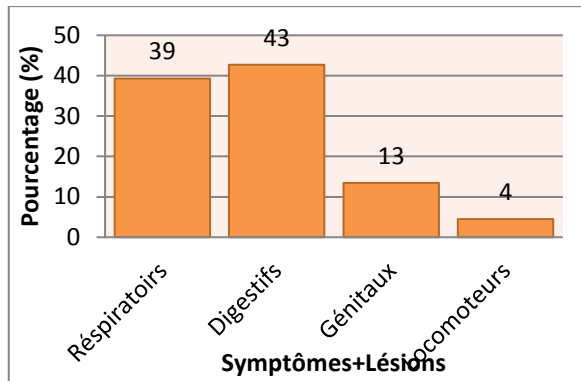


Figure n° 3.5 : Tableau clinique lié aux affections rénales.

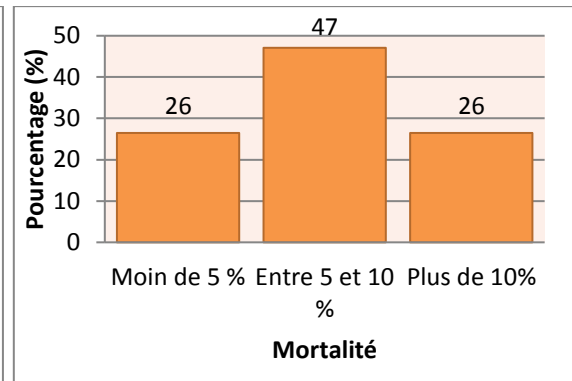


Figure n°3.6 : Taux de mortalité lié aux affections rénales.

3.1.4.6 Etiologies suspectées :

Les étiologies suspectées sont, aussi, très variées : la cause virale, fortement suspectée, représente 28%, suivi par la toxicité médicamenteuse (25%). Les agents bactériens, sont aussi, impliqués dans les affections rénales dans 21% des cas. L'alimentation et l'eau de boisson, quoique deux éléments très essentiels dans la réussite de l'élevage aviaire, sont minoritaire dans l'apparition des affections rénales (15% et 1% respectivement). (Figure n°3.7)

Parmi les étiologies virales suspectées, la bronchite infectieuse (BI) est la plus suspectée avec un pourcentage de 65%. La maladie de Gumboro (IBD), quant à elle aussi, est rencontrée dans 26% des affections rénales. La maladie de Marek est suspectée avoir une relation de causalité des affections rénales dans 10% des réponses. (Figure n°3.8)

Enfin, nous signalons qu'un seul vétérinaire a impliqué le virus de la néphrite infectieuse du poulet dans les affections rénales.

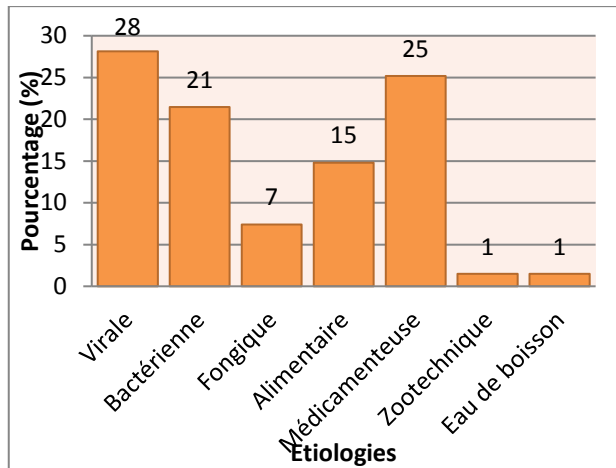


Figure n°3.7 : Les étiologies suspectées dans l'apparition des affections rénales.

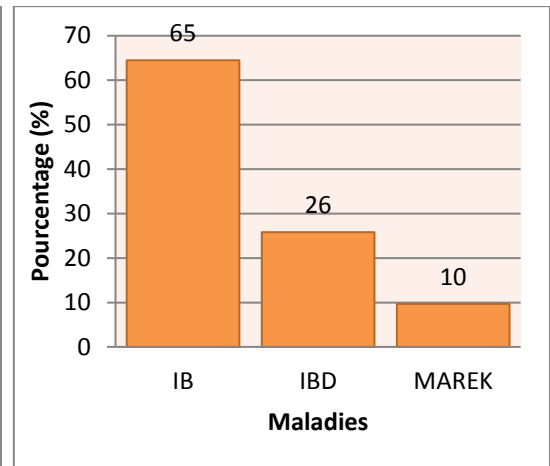


Figure n°3.8 : Les maladies virales suspectées dans l'apparition des affections rénales.

3.1.4.7 Analyses de l'eau et de l'aliment :

A travers les réponses des vétérinaires interrogés il nous a paru que les vétérinaires praticiens ne donnent pas un grand intérêt aux analyses physico-chimique et bactériologique de l'eau de boisson et de l'aliment. Seulement 18% des vétérinaires testent la qualité physico-chimique de l'eau distribuée aux oiseaux et un pourcentage faible (25%) des praticiens contrôle la qualité bactériologique. Le même constat est établi pour l'aliment (18% et 14% pour l'analyse physico-chimique et bactériologique respectivement). (Figure n°3.9).

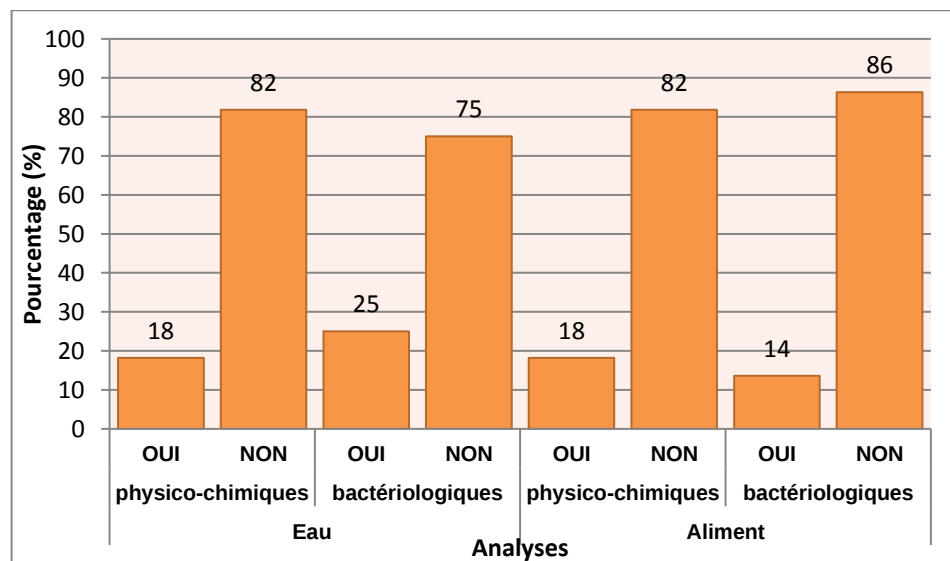


Figure n°3.9 : Représentation graphique des analyses de l'eau et de l'aliment.

Concernant l'influence de l'eau de boisson sur les pathologies digestives évoquée par Greg (2003) [155], nous constatons qu'un pH supérieur à 6,5, favorisant la prolifération des bactéries Gram-, est lié à la présence de litières humides et d'inflammations digestives. Ces désordres sont également accrus par une teneur importante en streptocoques fécaux, indicateurs de contamination fécale, ce qui confirme l'importance du paramètre qualité bactériologique de l'eau dans la lutte contre les pathologies digestives pouvant engendrer, à la longue, une atteinte rénale.

Quant à l'influence de la qualité physico-chimique de l'eau de boisson sur l'apparition des atteintes rénales on peut citer l'influence de la dureté sur la solubilité des médicaments, en effet, Une eau très dure réduit l'efficacité des antibiotiques [156], favorise les irritations intestinales. Lors d'utilisation des antibiotiques néphrotoxiques (élimination rénale), Ces eaux compromettent leur solubilisation induisant des néphrites. Ces néphrites aigue s'aggravent suite à l'administration répétée des antibiotiques (néphrite d'origine médicamenteuse). [157].

Nos résultats corroborent ceux de l'étude conduite par Douifi et al. (2011) [158], qui a permis de montrer la négligence et le faible intérêt qu'accordent les éleveurs de la commune d'El-OMARIA à la qualité de l'eau de boisson. Ainsi, les résultats bactériologiques ont montré que l'eau n'est pas potable dès l'entrée du bâtiment (réservoir) et a tendance à s'aggraver via les canalisations jusqu'aux abreuvoirs. La dureté de l'eau est supérieure aux normes dans 80% des élevages visités, alors que les valeurs du pH sont toutes acceptables.

Les résultats d'une enquête menée par l'ARVOL (Association Régionale des Volailles de Chair d'Aquitaine) en 2004 ont montré que près de 75 % des élevages de volailles disposent d'une eau dont la qualité n'est pas satisfaisante pour les animaux, bien qu'une grande majorité des producteurs disent s'en préoccuper.

Enfin, comme nous l'avons constaté au travers de ces différentes études, la majorité des élevages disposent d'une eau dont la qualité n'est pas satisfaisante pour les volailles, et il n'y a pas de recettes toutes faites pour le traitement de l'eau de boisson dans les bâtiments d'élevage. Cela montre l'importance de l'analyse périodique et systématique de l'eau dont les animaux disposent.

3.1.4.8 La part de la bronchite infectieuse dans l'apparition des affections

rénales :

La cause principale de la manifestation clinique de la BI, selon les vétérinaires interrogés, est l'échec vaccinal (34%), Suivi par le programme vaccinal qui semble être non adapté aux contextes épidémiologiques de notre pays (28%) et la souche vaccinale, aussi, non adaptée aux souches virales sauvages circulant dans nos élevages (28%). En fin, il est important de signaler l'absence de la vaccination contre la BI dans 9% des élevages suivis par les vétérinaires interrogés. (Figure n° 3.10).

L'analyse des programmes de vaccination du poulet de chair montre que les vétérinaires interrogés suivent différents programmes de vaccination : 37% d'entre eux vaccinent à j7 (primovaccination) et ils font un rappel à j21. 26% des vétérinaires interrogés vaccinent à j1 et j21. 29% vaccinent à j3 et ils réalisent un rappel après 3,4 et même 5 semaines plus tard. Enfin, il y a 9 % des vétérinaires qui vaccinent à j7 (fin de la première semaine) et font un rappel 4 semaines plus tard (à j35). (Figure n°3.11).

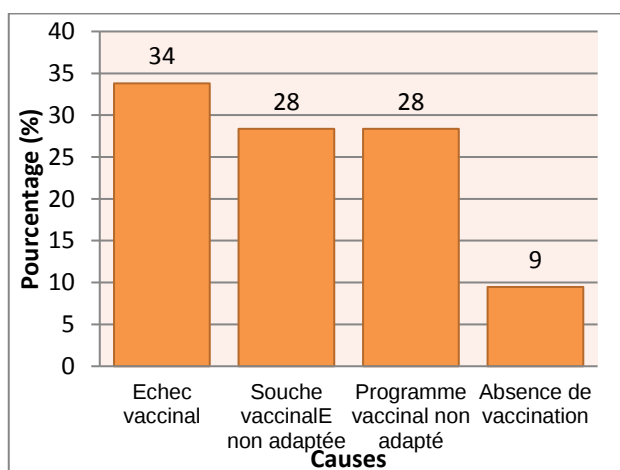


Figure n°3.10 : Représentation des causes d'apparition de BI.

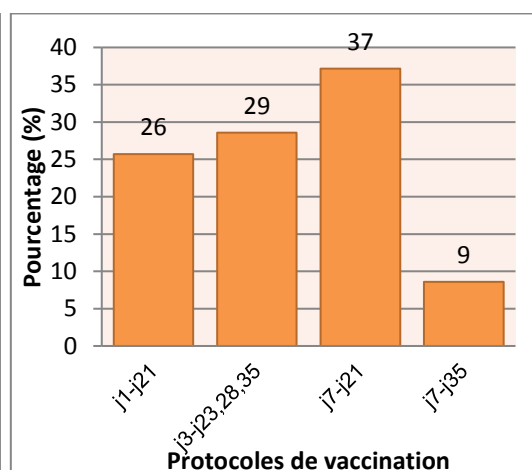


Figure n°3.11 : Représentation des protocoles de vaccination.

Les programmes de vaccination des vétérinaires interrogés ainsi que les méthodes d'application des vaccins contre la bronchite infectieuse sont non satisfaisante et ne fournissent pas une protection adéquate. En effet, seulement 25 % des vétérinaires interrogés vaccinent à J1. Suite à cette vaccination, la

protection conférée est essentiellement de type cellulaire dans un premier temps et non spécifique. Les anticorps neutralisant n'apparaissent qu'après la 3^{ème} semaine (protection de type humoral).raison pour laquelle, cette primovaccination doit être suivi d'un rappel vers 14 jours d'âge. Le programme BI à J1 suivi d'une vaccination à j14 confère la meilleure protection. Cette large protection a été démontrée dès 2001 par Jane Cook [5].

La catégorie de vétérinaires vaccinant à j1 dans l'eau de boisson font un rappel vers j21 (et non à j14) ce qui compromettre l'efficacité des protocoles vaccinales. En effet, les vaccins vivants contre les virus à tropisme respiratoire, tel que le virus de la BI, sont principalement administrés par nébulisation, permettant une stimulation à la fois de l'immunité locale et générale. Cette protection est liée principalement à l'infiltration dans les organes lymphoïdes (glande de Harder...) de lymphocytes T (T auxiliaire et T cytotoxique). Puis, cette mobilisation s'opère dans les systèmes de défense de tout l'organisme. Il y a ainsi un effet barrière sur les sites d'infection [51].

Pour les vétérinaires qui vaccinent à j7, ils n'auront pas l'effet barrière relative à la stimulation de la glande de Harder.

Les souches vaccinales utilisées par les vétérinaires praticiens (Ma5, H120, 4/91) sont jugées non adaptées à la situation épidémiologique de la maladie dans notre pays. En Algérie, aucune étude n'a été menée pour déterminer la prévalence des différents sérotypes du virus de la BI circulant dans nos élevages. De ce fait, ce jugement est établi à la base des suspicions cliniques où les vétérinaires rapportent des signes cliniques évocateurs d'une éventuelle manifestation des variants nouvellement émergés dans l'Asie et l'Europe (Variant QX ou autres).

Bien que les vaccins de sérotype Massachussetts, H120 et autres sont les plus couramment utilisés étant donné la distribution mondiale de ce sérotype [29], les souches vaccinales doivent être sélectionnées de manière à couvrir au mieux le spectre antigénique d'un pays ou d'une région. De ce fait, des sérotypes variants peuvent être inclus dans les programmes de vaccination.

Chez le poulet de chair, le protocole de vaccination proposé par Jane Cook en 1999 [159] donne les meilleurs résultats. Les poulets sont vaccinés avec un vaccin

vivant type Mass au couvoir par nébulisation, le rappel se fait avec un vaccin variant vers l'âge de 14 jours. Le rappel avec un vaccin à virus variant permet d'élargir le spectre de protection (notion de protectotype).

Les reproductrices chair et PFP reçoivent deux ou trois vaccinations à virus vivant atténué et une vaccination à virus inactivé qui s'opère par injection sous cutanée ou intra musculaire [160]. Ceci permet d'augmenter la protection des poules contre les chutes de ponte et permet de maintenir un niveau élevé d'anticorps sériques qui seront transmis à la progéniture. Dans notre étude, 60% des vétérinaires praticiens réalisent plus de 2 vaccinations à virus vivant atténué et une vaccination à virus inactivé. La réponse immunitaire obtenue dans les élevages suivis par cette catégorie des vétérinaires est jugée satisfaisante si la vaccination est conduite correctement.

Enfin, il est d'un grand intérêt de prendre en considération l'échec vaccinal signalé par les vétérinaires praticiens interrogés (36%), en effet beaucoup de facteurs peuvent avoir un impact sur les effets désirés de la vaccination. Le vétérinaire et l'éleveur doivent prendre en considération toutes les étapes nécessaires pour contrôler deux facteurs : l'opération de la vaccination et les facteurs externes [29].

Le premier groupe de facteurs est ainsi lié aux conditions de la ferme, et est basé sur le principe que seulement les animaux sains devraient être vaccinés.

Le deuxième groupe correspond à la façon dont l'opération de vaccination est effectuée et il est basé réellement sur un autre principe, à savoir ce vaccin ne confère une bonne protection seulement si elle est bien stockée et administrée correctement selon un programme approprié.

Ces divers facteurs devraient être pris en considération avec une importance égale.

3.1.4.9 Description des affections rénales :

Les résultats de la manifestation des affections rénales selon le type d'élevage montrent qu'il s'agit d'une entité pathologique très fréquente chez le poulet de chair (63%). Les reproducteurs chair et les poulettes future pondeuses ne sont affectés qu'occasionnellement (20% et 17% respectivement). (Figure n°3.12).

La question qui se pose : est-ce que les affections rénales sont vraiment propre au poulet de chair ? Il semblerait que les vétérinaires interrogés suivent beaucoup plus le poulet de chair par rapport aux autres types d'élevages (RC, PFP...). autre raison, le nombre d'élevage de poulet de chair est énormément plus élevé que les élevages de reproducteurs chair et PFP.

L'analyse des données concernant la manifestation des affections rénales chez le poulet de chair selon la période d'élevage montrent que les affections rénales sont rarement constatées dans la période de démarrage (12%). Elles s'accroissent à partir de la deuxième phase d'élevage (46%). En finition, les affections rénales sont aussi importantes (42%). (Figure n°3.13).

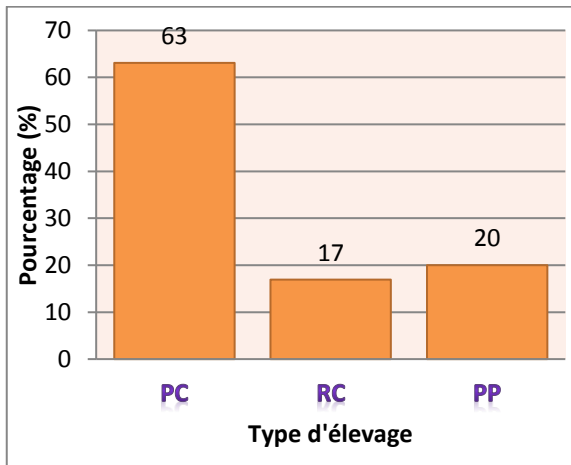


Figure n°3.12 : Représentation de la manifestation des affections rénales en fonction du type d'élevage.

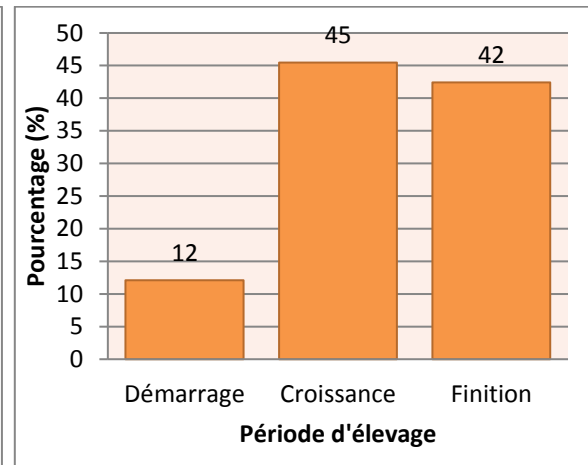


Figure n°3.13 : Représentation de la manifestation des affections rénales en fonction de la période d'élevage chez le poulet de chair.

Pour les reproducteurs chair, PFP et PP, les périodes à lesquelles se manifestent plus d'affections rénales sont la période d'élevage (39%) et la période du pic de ponte (28%). (Figure n°3.14).

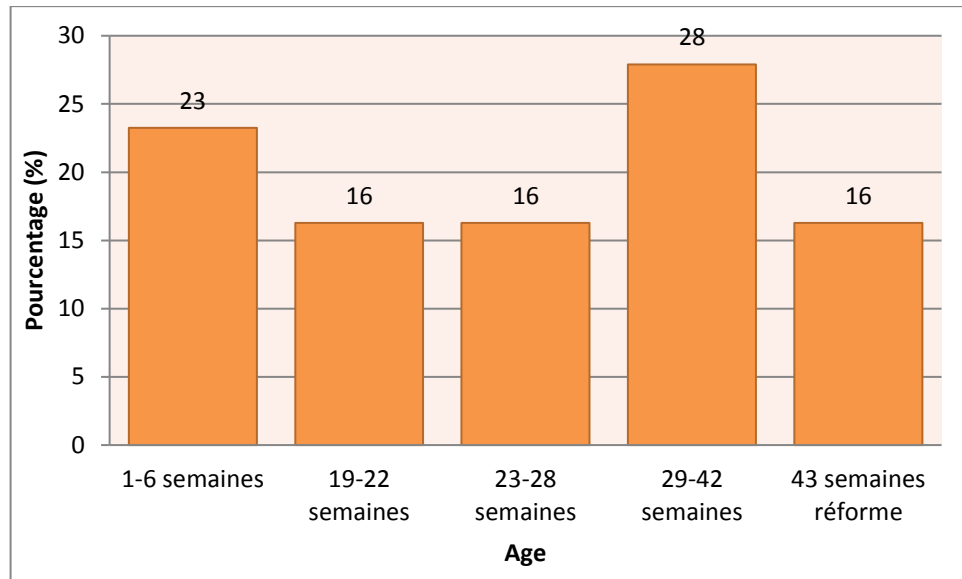


Figure n°3.14 : Apparition des affections rénales en fonction de la période d'élevage des poules.

Selon la densité d'élevage ; chez le poulet de chair, les affections rénales se rencontrent aussi bien dans les petits élevages de moins de 3000 sujets (30%) que dans les grands et moyens élevages (35%). (Figure n°3.15). Par contre, chez les reproducteurs chair les affections rénales semblent être proportionnelles à la densité d'élevage c'est-à-dire on rencontre plus d'affections rénales dans les grands élevages de plus de 5000 sujets (45%) et moins d'affections dans les petits élevages de moins de 3000 sujets (19%). (Figure 3.16).

Le même constat pour la poule pondeuse où on a enregistré plus d'affections rénales dans les batteries qui dépasse les 4800 sujets (75%).

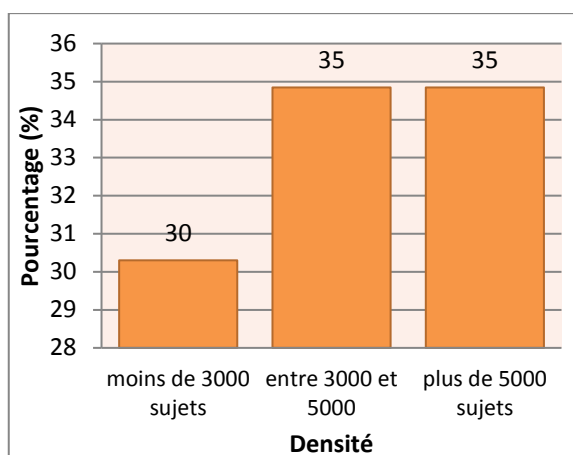


Figure n°3.15 : Apparition des affections rénales en fonction de la densité d'élevage de poulet de chair.

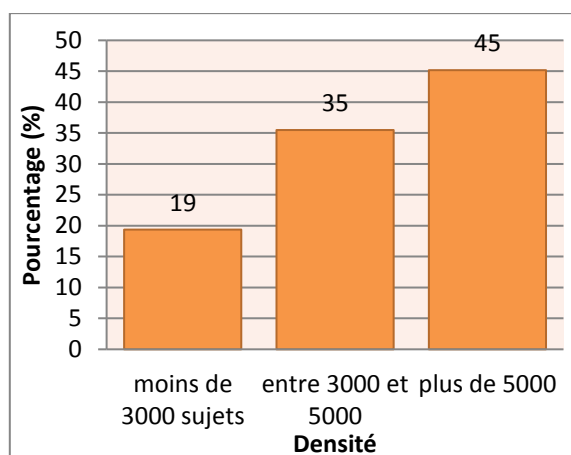


Figure n°3.16 : Apparition des affections rénales en fonction de la densité d'élevage des reproducteurs chair.

En résumé, ces données nous orientent vers des atteintes rénales multifactorielles qui rassemblent des infections virales et bactériennes, les mycotoxines, et les conditions zootechniques dans le bâtiment d'élevage, en effet, Dans tous les élevages à forte densité en raison du grand nombre de poules ou poulets, il se crée un climat infectieux léger (le microbisme). Jour après jour, tout au long de la saison d'élevage ou de production, ce microbisme sape la vitalité et la résistance des poules quelle que soit la valeur de la souche utilisée. Dans ces conditions, Il suffit que se manifeste alors un stress (agression externe) provoquant un choc physiologique pour que ce microbisme latent dégénère en une maladie infectieuse plus grave (virale, bactérienne). cette infection virale et/ou bactérienne dont l'agent étiologique est néphropathogène (comme le cas de la BI) entraîne une néphrite plus ou moins grave [6][59], diminue la ponte, engendre des retards de croissance, entraîne même, parfois, une mortalité élevée.

Quoique la maladie (BI) soit plus sévère chez les jeunes, les poulets montrent une sensibilité à tout âge. La mortalité, la néphropathogénicité, et les lésions de l'oviducte diminuent avec l'âge [161][37]. Nos résultats sont en concordance avec ces données qui montrent l'existence des atteintes rénales durant les différentes phases d'élevages.

Les vétérinaires interrogés déclarent que les affections rénales s'observent beaucoup plus en hiver (30%) et en été (33%) et de moins en moins en automne (20%) et en printemps (17%). (Figure n°3.17). On pense qu'une partie des affections rénales hivernales sont due à des infections virales néphropathogènes on l'occurrence la BI. Maladie fortement observée lors de basses températures. Ainsi, ces faibles températures augmentent la mortalité due aux souches néphropathogènes : une diminution de température de 20 à 16°C augmente la mortalité de 8 à 50% et les lésions histopathologiques rénales sont plus sévères [4].

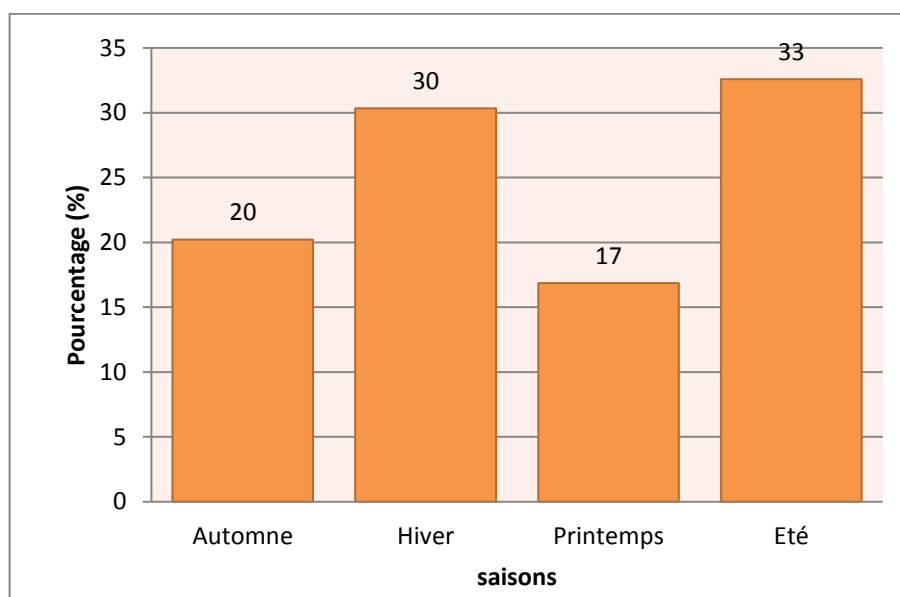


Figure n°3.17 : Apparition des affections rénales en fonction des saisons.

3.1.4.10 Diagnostic et conduite à tenir :

La majorité des vétérinaires interrogés (85%) établit le diagnostic on se basant sur le tableau clinique et des données épidémiologique. Une minorité d'entre eux sollicitent le laboratoire pour la confirmation de leur suspicion (15%). (Figure n°3.18).

Le choix et la prescription de tout traitement dépendent en premier lieu du diagnostic du cas à traiter. Si l'examen clinique des sujets n'est pas toujours évocateur, l'autopsie pratiquée sur un nombre suffisant de sujets fournit de nombreux éléments. Mais, il faudrait que cela soit complété par des analyses faites au laboratoire (bactériologie, sérologie, parasitologie, histologie) [162].

En pathologie aviaire, en raison de la diversité des étiologies incriminées (biotiques et non biotiques) [163], l'examen clinique et/ou nécropsique pratiqués indépendamment de tout examen de laboratoire (bactériologie, sérologie, parasitologie, histologie) n'est pas toujours évocateur. Une démarche diagnostic correcte et complète doit impérativement inclure tous les renseignements relatifs au troupeau à examiner : commémoratifs, données cliniques, données de l'examen nécropsique, données épidémiologiques, et enfin des données du laboratoire de diagnostic [162][164].

Face aux affections rénales, les vétérinaires suivent différentes démarches : dans près de la moitié des cas (44%), les vétérinaires administrent une tonique hépatorénale seule ou associé avec d'autres médicaments. La couverture antibiotique est assurée dans 23% des cas ainsi que le supplément vitaminique dans 5% des cas. (Figure n°3.19).

Les vétérinaires suspectant l'alimentation et l'eau de boisson comme cause des affections rénales exigent le changement de l'alimentation et la désinfection de l'eau de boisson et ceci dans 8% et 10% des cas respectivement. (Figure n°3.19).

Bien que rare (1% seulement), il y a une catégorie de vétérinaires qui revaccine contre la bronchite infectieuse aviaire dans le cas des affections rénales a suspicion virale (BI).

Enfin, il est important de signaler que 7% des vétérinaires interrogés ne font aucun traitement lors d'apparition du syndrome rénal.

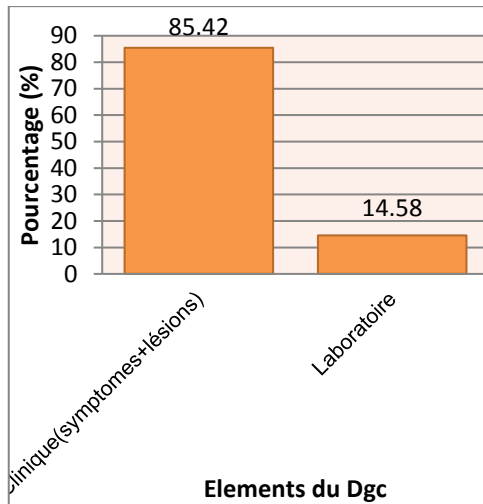


Figure n°3.18 : Eléments du diagnostic des affections rénales.

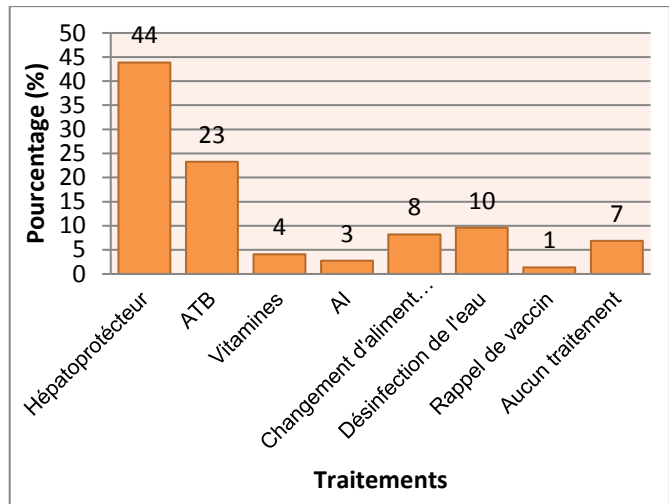


Figure n°3.19 : Les différents traitements lors d'affections rénales.

A travers les réponses des vétérinaires interrogés il est apparu que les démarches thérapeutiques sur le terrain permettent l'amélioration des signes cliniques dans la majorité des cas des affections rénales (86%). Nous avons constaté, aussi, une baisse notable de la mortalité dans la quasi-totalité des cas (95%) et ceci d'une manière progressive. 56% des répondants ont obtenu une amélioration du poids vif chez le poulet de chair. (Figure n°24).

Chez les reproducteurs chair et la poule pondeuse, l'amélioration du taux de ponte est observée dans 1/3 des cas. (Figure n°3.20).

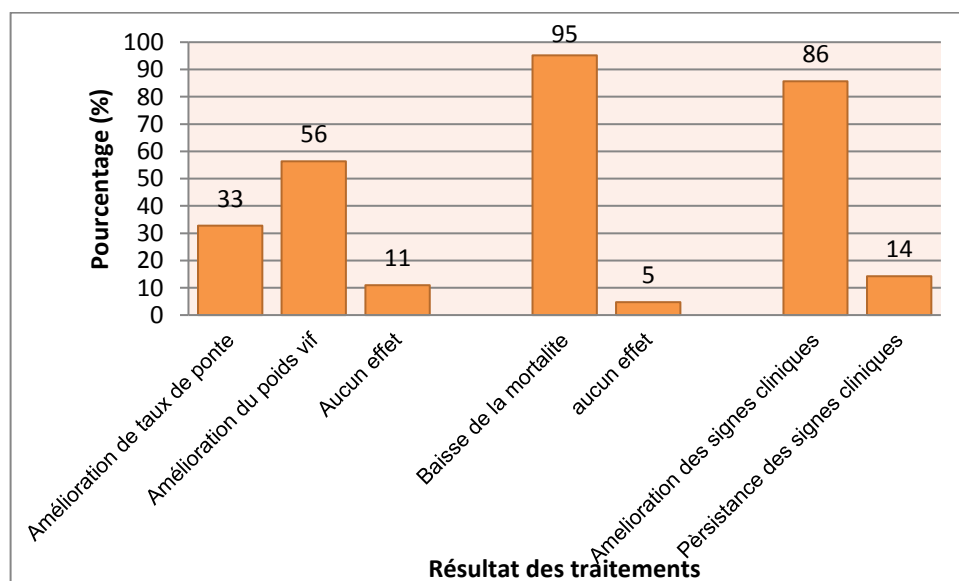


Figure n°3.20 : Représentation graphique des résultats des traitements entrepris.

3.1.5 Conclusion :

L'enquête descriptive menée par questionnaire montre que les affections rénales en élevages avicoles sont très répandues, elles sont associées dans la majorité des cas avec d'autres symptômes et de la mortalité. Leur diagnostic clinique est difficile dans la plupart des cas suspectés. En effet les symptômes observés ne sont pas pathognomoniques et les étiologies suspectées sont très variées ce qui pourrait être expliqué par l'implication des affections rénales de causes multiples.

3.2 Deuxième partie : Prévalence sérologique et génotypique des variants de la bronchite infectieuse et une étude histopathologique des lésions trachéales et rénales.

3.2.1. Problématique :

Les affections rénales du poulet de chair revêtent une importance économique considérable dans l'élevage industriel, par les retards de croissance et les mortalités qu'elles provoquent. La difficulté du diagnostic différentiel relève principalement de la variété des agents infectieux et de la fréquence des infections mixtes.

Parmi les agents infectieux incriminés dans les néphrites, les virus occupent une place prépondérante de par leur fréquence et les performances économiques médiocres qu'ils provoquent. Ces dernières années, la bronchite infectieuse néphropathogène a été rapportée dans plusieurs pays. En Algérie, quoiqu'il y ait des suspicions de la bronchite infectieuse, cette maladie n'a pas été identifiée et les néphrites continuent d'être un problème commun dans les élevages de poulet de chair.

Les signes cliniques des affections rénales ne sont pas assez spécifiques pour permettre un diagnostic différentiel. Celui-ci nécessite des méthodes de biologie moléculaire (RT-PCR, séquençage...), sérologiques (IHA, ELISA...) et d'histopathologie qui peut, par sa rapidité et sa précision relative, constituer un atout précieux pour le diagnostic précise de la bronchite infectieuse aviaire.

A partir de là, les principales questions qui se posent sont :

- ✚ Est-ce que la bronchite infectieuse existe-elle dans les élevages de poulet de chair souffrant de néphrites ?
- ✚ Quelle est la séroprévalence des différents sérotypes d'IBV dans les élevages de poulet de chair souffrant de néphrites ?
- ✚ Quels sont les génotypes d'IBV impliqués dans les élevages de poulet de chair souffrant de néphrites ?

- ✚ Quelles sont les lésions histopathologiques rénales et trachéales chez le poulet de chair atteint du virus de la bronchite infectieuse aviaire ?
- ✚ Quelle est la fréquence des différentes lésions histopathologiques au niveau rénale et trachéale ?

3.2.2. Objectifs tracés :

La présente étude consiste en l'exploitation des résultats d'analyse sérologique (IHA), de biologie moléculaire (RT-PCR et séquençage) et d'histopathologie de prélèvements de sang et d'organes provenant d'élevages de poulet de chair présentant des affections rénales.

Devant l'importance de cette affection et de son incidence sur le développement de l'aviculture en Algérie, nous nous sommes proposé d'étudier les points suivants :

- ✚ Mettre en évidence une éventuelle circulation des variants de la BI et d'en décrire la séroprévalence des différents sérotypes d'IBV dans les élevages de poulet de chair souffrant de néphrites.
- ✚ Identification moléculaire des variants de la BI (RT-PCR), puis séquençage.
- ✚ Détermination des lésions histopathologiques due au virus de la BI au niveau rénale et trachéale des poulets de chair.
- ✚ Corréler les lésions histopathologiques observées aux signes cliniques, programmes de vaccination, conditions d'élevage et aux pertes économiques engendrées en matière de mortalité.

3.2.3. Matériel et méthodes :

Notre étude expérimentale se présente en trois parties :

- ✚ Une étude sérologique par IHA des prélèvements de sang.
- ✚ Une étude de biologie moléculaire par RT-PCR puis séquençage des prélèvements d'organes (Trachées, reins).
- ✚ Une étude histopathologique des prélèvements d'organes (Trachées, reins).

Le canevas général de l'étude est le suivant :

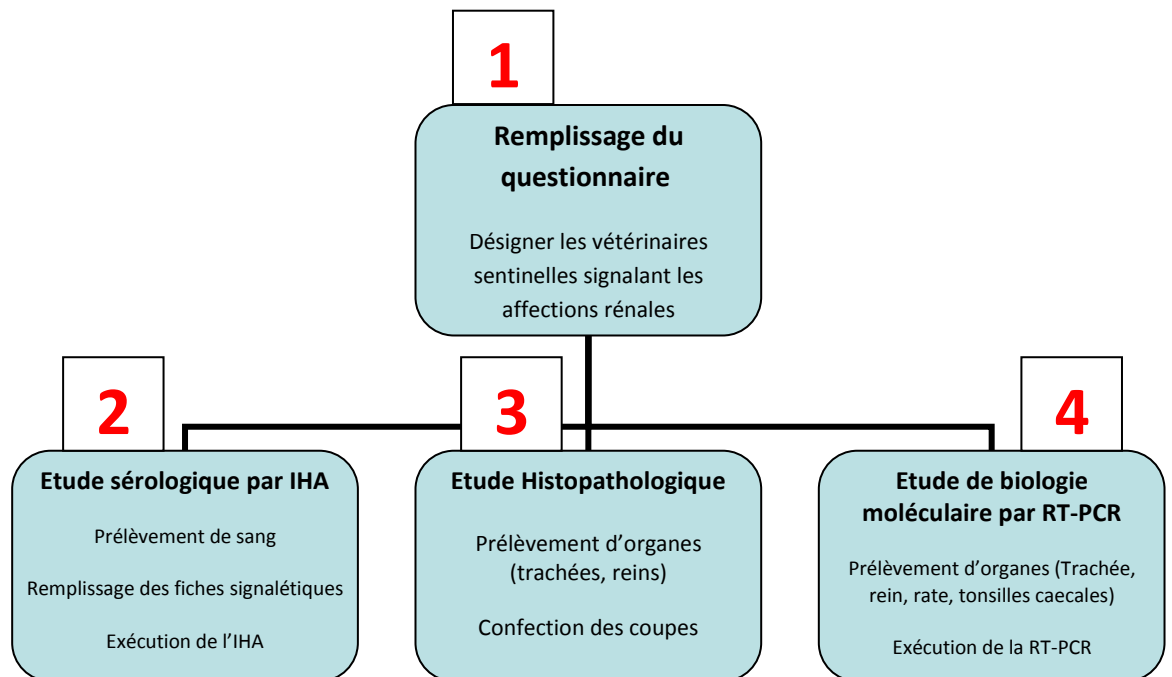


Figure n°3.21 : Canevas générale de l'étude.

3.2.3.1 Population d'étude :

Afin de détecter des infections virales aigues au virus de la bronchite infectieuse aviaire en corrélation avec les affections rénales nous avons opté, d'une part, pour la mise en évidence des anticorps spécifiques dans le sang. D'autre part, nous avons détecté l'antigène par RT-PCR.

Pour déterminer le type d'élevage à inclure dans la base de sondage nous nous sommes référés aux résultats du questionnaire. En effet, Les résultats de la manifestation des affections rénales selon le type d'élevage montrent qu'il s'agit d'une entité pathologique très fréquente chez le poulet de chair (63%). Les reproducteurs chair et les poulettes futures pondeuses ne sont affectés que occasionnellement (20% et 17% respectivement).

La base de sondage concerne tous les élevages remplissant les critères suivants :

- ✚ Elevage de poulet de chair.
- ✚ Présentant des signes cliniques et/ou lésionnels évocateur d'une infection par IBV.

Le tableau clinique comporte les symptômes suivants :

- ✚ Jeunes poussins : Atteinte rénale et/ou signes respiratoires + mortalité importante.
- ✚ Poulet adulte : Atteinte rénale et/ou signes respiratoires + mortalité due aux surinfections bactériennes.

3.2.3.2 Protocole des prélèvements :

3.2.3.2.1 Sélection des élevages :

Dans le but de sélectionner des élevages suspects nous avons contactés les vétérinaires faisant des suivis d'élevages avicoles pour leur présenter notre étude. Une feuille de protocole a été préparée expliquant le cadre de l'étude, la population d'étude et le protocole de prélèvements.

Ainsi, les vétérinaires désireux de participer à l'étude nous ont signalés les cas suspects et nous ont emmenés pour effectuer des prélèvements (sang, organes).

3.2.3.2.2 Kit de prélèvement :

Nous avons spécifié pour chaque élevage suspect un Kit contenant :

- ✚ 10 tubes de sang
- ✚ Un pot contenant du formol pour prélèvement d'organes
- ✚ Une carte FTA®
- ✚ Fiche de prélèvement à remplir
- ✚ 1 bloc refroidisseur

Chaque vétérinaire sentinelle a reçu plusieurs Kit.

3.2.3.2.3 Fiche de prélèvement :

Une fiche de prélèvement fut réalisée pour chaque élevage suspect (Annexe C). Elle contient des informations générales (date de prélèvement...), des renseignements concernant l'élevage (Type d'élevage, âge...), des renseignements sur la vaccination contre la bronchite infectieuse aviaire et des informations cliniques de l'épisode en cour (symptômes, lésions ...).

3.2.3.3.4 Exécution des prélèvements :

Après le signalement d'un cas d'affection rénale par l'un des vétérinaires sentinelles, nous nous sommes déplacés dans un délai de 1-2 jours pour effectuer la première série de prélèvement (prélèvement d'organes) et remplir la fiche de prélèvement (figure 3.22). Ainsi, le prélèvement d'organes (Trachée, rein) s'est ensuite placé sur des cartes FTA®.

Quant au protocole de prélèvement de sang, pour chaque élevage, nous avons fait une série de prélèvements « dite tardive » s'est faite 2-3 semaines après le début de l'épisode clinique.

Lors de chaque visite, afin de remplir la fiche de prélèvement, nous avons réalisé, d'une part, un interrogatoire concernant les caractéristiques de l'élevage (type d'élevage, âge...), l'historique de la vaccination contre la bronchite infectieuse et les renseignements cliniques (date de début de l'épisode clinique, taux de mortalité...). D'autre part, nous avons observé les volailles pour enregistrer d'éventuels symptômes cliniques et exécuter l'autopsie en recherchant d'éventuelles lésions.

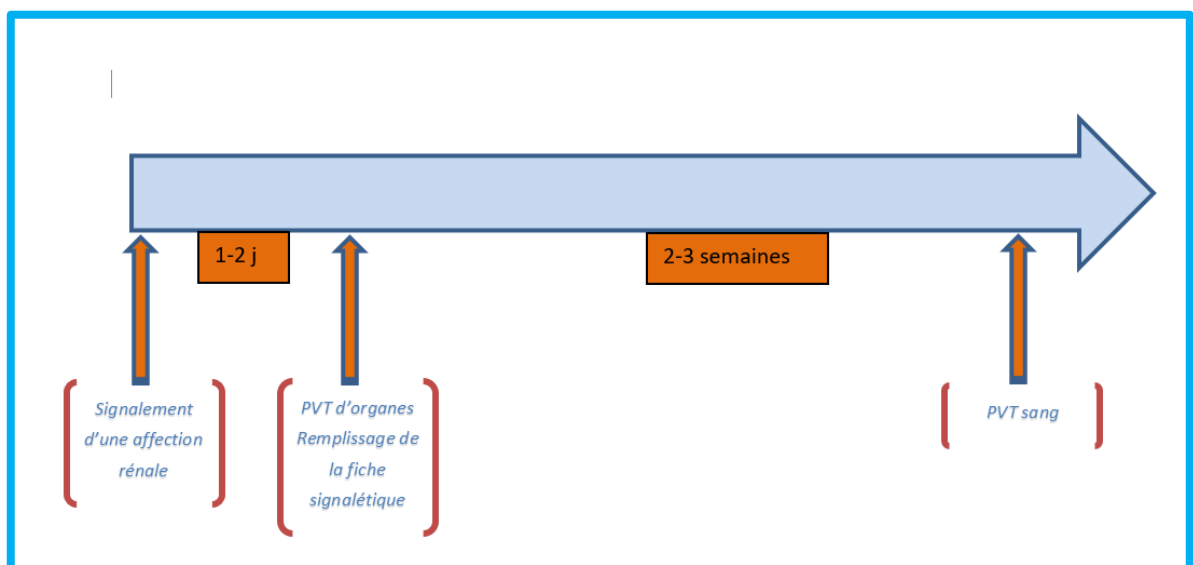


Figure 3.22 : Diagramme du protocole des prélèvements.

3.2.3.2.5 Choix des animaux :

Dès l'arrivée à l'élevage suspect, afin de réaliser des prélèvements de sang, nous avons choisi 10 poulets d'une manière aléatoire en s'efforçant de limiter les biais de recrutement. La prise du sang a été faite au niveau de la veine alaire des oiseaux à l'aide d'une seringue selon la technique de Janeen et Rini (2000) [165]. Les sérums obtenus sont aliquotés, étiquetés puis conservés à -20°C jusqu'à l'utilisation.

En ce qui concerne les prélèvements d'organes, nous les avons faits sur des animaux morts (une dizaine de cadavres).

3.2.3.3 Analyses au laboratoire :

3.2.3.3.1 Test d'inhibition de l'hémagglutination :

3.2.3.3.1.1 Principe du test et validité des résultats :

Le test I.H.A est basé sur la détermination de la présence d'anticorps inhibant l'hémagglutination dirigés contre les différents sérotypes testés (793 B, Qx, D273). Le virus de la BI utilisé a la capacité d'agglutiner les globules rouges de poulet.

Quant à la réalisation du test, nous avons suivi les instructions du fournisseur de kit FLOKSCREEN IB-HI TEST (Annexe D). Brièvement, les sérums sont dilués en série, au demi, et mélangés avec un volume équivalent d'antigène. Après incubation (30mn à 20°C), les globules rouges de poulets SPF préparés (solution d'anticoagulant) sont ajoutés. Après incubation (40mn à 20°C), la lecture s'effectue par inclinaison des plaques et observation d'une inhibition de l'hémagglutination.

L'expression du titre en anticorps du sérum testé est donné en log2 et correspond à la dilution de sérum la plus élevée ayant entraîné une inhibition complète. L'appréciation de l'agglutination s'effectue plus précisément en inclinant les plaques.

La validité des résultats doit être appréciée à l'aide d'un sérum témoin négatif qui ne devra pas présenter un titre supérieur ou égale à $2 \log_2$, et un sérum témoin positif dont le titre devra être égale au titre connu à plus ou moins une dilution après.

Pour des raisons budgétaires nous avons mis à l'épreuve chaque élevage vis-à-vis quatre sérotypes (M41, 793 B, D274, Qx).

3.2.3.3.2 RT-PCR et séquençage :

3.2.3.3.2.1 Extraction d'ARN virale à partir des cartes FTA® :

Trois morceaux de disques de 2 mM de la zone tachée des filtres ont été coupés par un ciseau stérile et placés dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. Pour chaque échantillon, nous avons utilisé un seul ciseau stérile et des pinces pour éviter la contamination croisée. Chaque disque a été placé dans 750 µl de Trifast® FL, homogénéisé et incubé 5 min à température ambiante. Le kit Trifast FL (Peq GOLD TriFast™ FL, Peqlab) a ensuite été utilisé pour extraire l'ARN du papier FTA®, en suivant les instructions du fabricant (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Allemagne). La pureté et la concentration de l'ARN ont été vérifiées avec l'utilisation de NanoDrop® ND-1000 (Peqlab).

3.2.3.3.2.2 Génération d'ADNc :

Le couple d'amorces (Oligo5 (sens): 5'-TGA AAA CTG AAC AAA AGA CA-3' et CK2 (anti-sens): 5'-CTC GAA TTC GNC TRT TRT AYT GRC A-3') ont été conçus pour l'amplification du gène S1 d' IBV qui couvre la région hypervariable 1 et la majorité de la région hypervariable 2 [104]. La transcription inverse a été réalisée en utilisant le système de transcription inverse ImProm-IITM (Promega, Madison, WI) avec des amorces aléatoires selon les instructions du fabricant. Brièvement, des oligonucléotides lyophilisés obtenus auprès du fabricant ont été dissous dans de l'eau exempte de RNase à 0,1 umol / ml pour former la solution mère. Quatre microlitres d'ARN viral ont été mélangés avec une microlitre d'amorces aléatoires dans un tube de 200 µl marqué et incubés à 70 ° C pendant 5 min suivis de 5 min dans un thermocycleur à 4 ° C. Après l'ajout d'un mélange (Master mix) constitué de 15 µl de tampon 5x (44 ul), MgCl₂ (52,8 ul), dNTP (11 ul), ARNsin (5,5 ul),

ImProm II (11 µl) et H₂O (40,7 µl), le mélange a été incubé à 25 ° C pendant 5 min suivi de 55 ° pendant 60 min. La réaction a été terminée en chauffant à 70 ° C pendant 15 minutes et en refroidissant dans de la glace.

3.2.3.3.2.3 Électrophorèse sur gel d'agarose :

L'électrophorèse sur gel a été utilisée pour détecter des produits d'ADN amplifiés. Un volume de 20 µl de produits de PCR amplifiés a été soumis à une électrophorèse à 120 V pendant 40 min dans des gels horizontaux contenant 1,5% d'agarose. Le gel a été coloré avec GelRed™ (Genaxxon Bioscience, Ulm, Allemagne, GmbH), puis exposé à la lumière u.v pour visualiser les produits amplifiés.

3.2.3.3.2.4 Séquençage nucléotidique du gène S1 de l'IBV et analyse de la séquence :

Pour le séquençage des nucléotides du gène S1 d'IBV, les produits de PCR ont été séquencés au niveau du laboratoire x-OVO Limited (x-OVO Limited Laboratories, Thomson cooper, Royaume-Uni). Les séquences nucléotidiques et d'acides aminés du gène S1 des isolats IBV ont été assemblées, alignées et comparées avec des souches IBV de référence en utilisant le programme BASIC BLAST dans DNASTar. L'analyse phylogénétique des séquences d'acides aminés S1 déduites a été réalisée avec la méthode de neighbor-joining du logiciel DNASTar [166].

3.2.3.3.2.5 Numéros d'accession GenBank :

Les séquences nucléotidiques S1 partielles des isolats IBV rapportés ici ont été soumises à la base de données GenBank et ont reçu le numéro d'accession : MG252734

Les nucléotides et acides aminés déduits du S1 des séquences de références des souches IBV incluses dans les comparaisons étaient disponibles dans GenBank sous les numéros d'accession suivants :

CR 88 (KM067900), 4/91 (JN600614), Qx (AF193423), Ma5 (AY561713), H120 (M21970), M41 (GQ219712), D274 (KR106999), Italie 02 (AJ457137), QX D388 (DQ674739).

La PCR que nous avons réalisé consiste en une PCR temps réel, avec des amorces dirigées contre le gène de la nucléocapside, très conservé chez les coronavirus. Cette première PCR dite qualitative permet de confirmer ou non la présence du coronavirus de la bronchite infectieuse aviaire et à amplifier l'ADNc.

- ✚ Si elle est négative, l'échantillon est considéré négatif vis-à-vis le virus de la bronchite infectieuse aviaire.
- ✚ Si elle est positive, nous réalisons une autre PCR dite RT-PCR nichée.

La RT-PCR nichée se réalise en deux étapes :

La première étape consiste en l'application de deux couples d'amorces différentes, le second couple se liant à l'intérieur du premier amplicon. En effet, le premier couple d'amorces est conçu pour pouvoir accrocher les parties stables du génome, la deuxième pour amplifier la séquence génétique d'intérêt pour le typage par séquençage.

Si la RT-PCR nichée est positive on procède au séquençage : une partie hypervariable du génome de la protéine S1 est séquencée puis comparer les séquences obtenus avec des séquences connues ce qui permet de décrire par la suite précisément les mutations survenues. Enfin, à l'aide de la séquence nucléotidique, la séquence en acides aminés est établie puis analysée.

3.2.3.3.3 Histopathologie des lésions rénales et trachéales :

A l'occasion des visites d'élevages suspects, les poulets morts ou euthanasiés ont été autopsiés et examinés en vue de présence d'éventuelles lésions macroscopiques au niveau trachéale et rénale. Les tissus (rein et trachée) avec lésions sont ensuite prélevés et fixés dans le formol à 10%.

Quant au laboratoire, la technique histologique que nous avons suivie conserve les tissus dans un état aussi voisin que possible de l'état vivant, tout en le rendant

imputrescible (fixation au formol). Puis on pénètre cet objet avec une substance demi dure (imprégnation à la paraffine), qui lui donne une consistance suffisante et une homogénéité relative, favorables à la confection de coupes minces (microtomie). Ensuite, on porte ces coupes en les étalant sur une lame de verre à laquelle elles adhèrent, on les colore dans des bains de teinture (coloration hematoxyline-eosine), on les recouvre d'un milieu de même réfringence que le verre et d'une mince lamelle de verre (montage des lames). On obtient ainsi des préparations persistantes, parfaitement observables au microscope à la lumière transmise.

Les lésions histologiques attendues au niveau de la trachée sont de type Décilitation, cuboïdisation des cellules épithéliales, hyperplasie épithéliale et inflammation.

Les lésions histologiques attendues au niveau du rein sont : desquamation et nécrose des tubules rénales, congestion, hémorragie et inflammation.

3.2.3.4 Analyses statistiques :

Le logiciel statistique pour les sciences sociales (SPSS) version 20 a été utilisé pour effectuer une analyse statistique. Le titre moyen géométrique (GMT) a été calculé en prenant une moyenne du nombre de puits montrant l'activité IHA de tous les échantillons de sérum dans un troupeau. Cette moyenne en nombre de puits a ensuite été vérifiée par comparaison avec les valeurs GMT indiquées dans le tableau de référence et rapportées en tant que GMT pour un troupeau donné contre un antigène IBV particulier. De plus, des statistiques descriptives comprenant des pourcentages, des moyennes et une distribution de fréquence ont été calculées pour chacune des variables.

3.2.4 Résultats :

3.2.4.1 Description des fiches signalétiques :

Le tableau présenté en «Annexe E» regroupe les caractéristiques des élevages rentrant dans le cadre des prélèvements. Il englobe des informations concernant les caractéristiques de l'élevage (type d'élevage, âge...), l'historique de la

vaccination contre la bronchite infectieuse et les renseignements cliniques (date de début de l'épisode clinique, taux de mortalité...).

3.2.4.1.1 Caractéristiques des élevages :

La capacité des élevages visités allant de 2000 poulets (petits élevages) à 6000 poulets (un élevage de taille moyenne) avec une moyenne qui avoisine les 4000 poulets/élevage. Tous ces élevages appartiennent au secteur privé (Figure n°3.23).

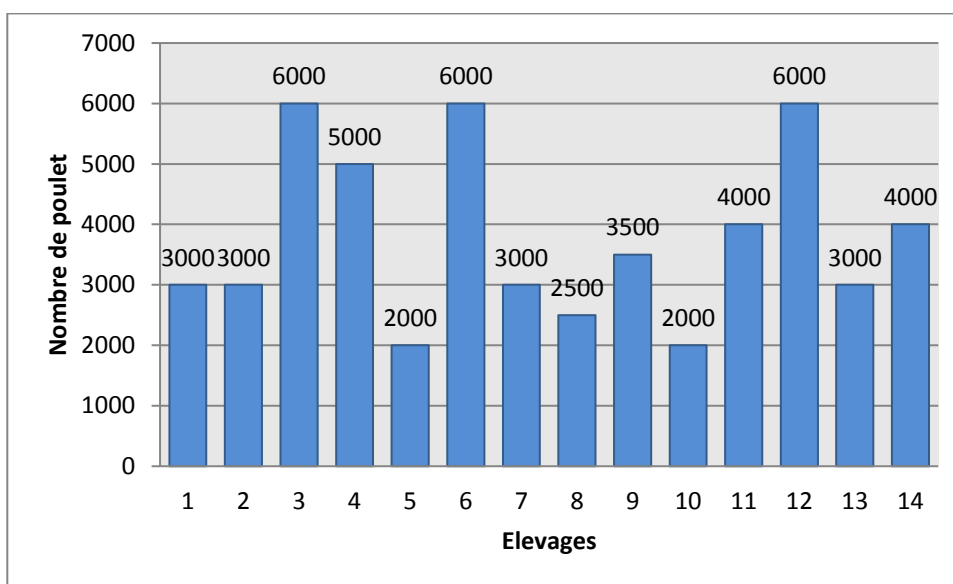


Figure n°3.23 : Capacité des élevages visités.

En ce qui concerne la conception des bâtiments, la majorité des élevages visités sont de type traditionnel (85.71%) ne respectant pas les règles de base de biosécurité (Figure n°3.24).

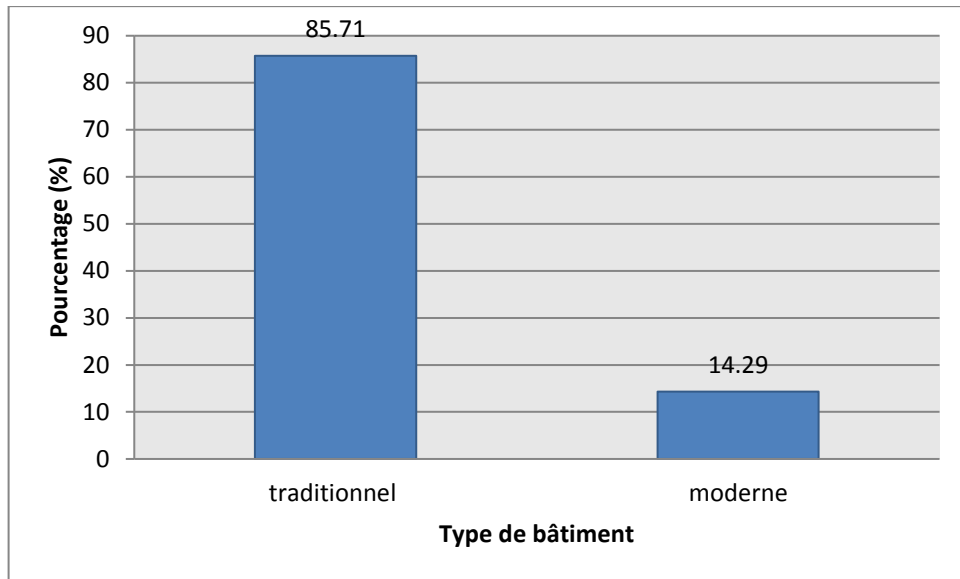


Figure n°3.24 : Types de bâtiment des élevages visités.

Les différentes souches de poulet élevées dans les élevages de l'étude sont : ISA F15, Arbor-acres et Cobb 500. Il s'avère que l'Arbor-acres est la souche la plus élevée (64.29 %) (Figure n°3.25).

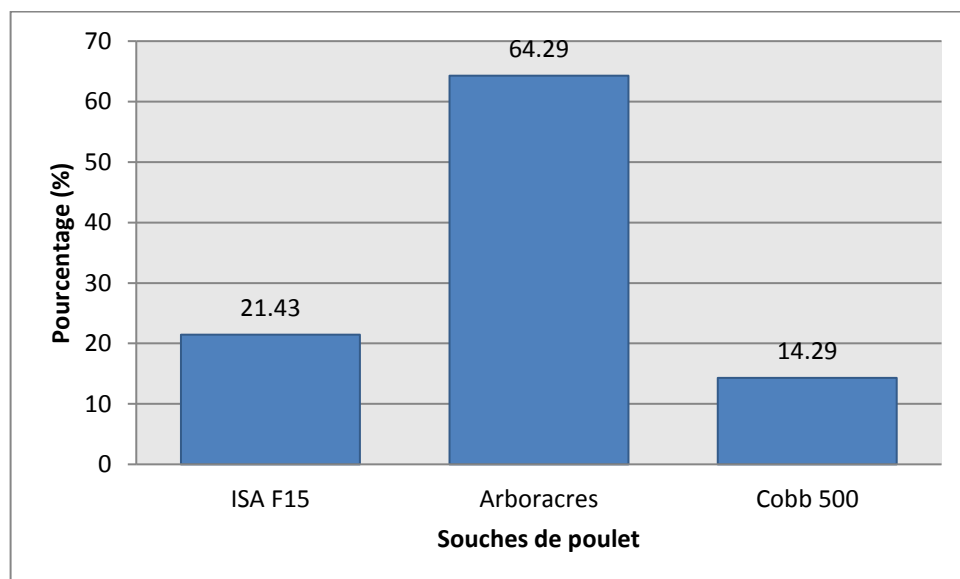


Figure n°3.25 : Souches de poulet des élevages visités.

Concernant l'historique de la vaccination des élevages de l'étude contre la bronchite infectieuse (BI), nous avons constaté que cette vaccination est faiblement pratiquée (57.14 %) malgré l'importance économique et épidémiologique que revête la bronchite infectieuse. Pour les élevages pratiquant la vaccination,

nous avons enregistré deux protocoles de vaccination ; le protectotype (35.71%) et vaccination avec Mass seule (7.14%) (Figure n°3.26).

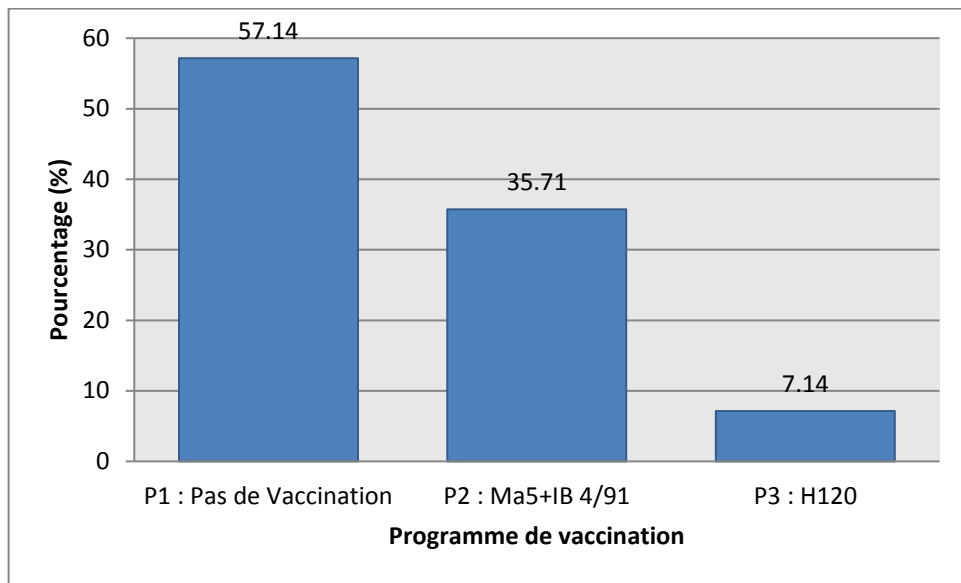


Figure n°3.26 : Programmes de vaccination contre la BI des élevages visités.

Les informations enregistrées sur le moment d'apparition des affections rénales et par conséquent sur le moment de prélèvement montrent que 85.71 % de celles-ci apparaissent en fin de production (phase de finition) (Figure n°3.27).

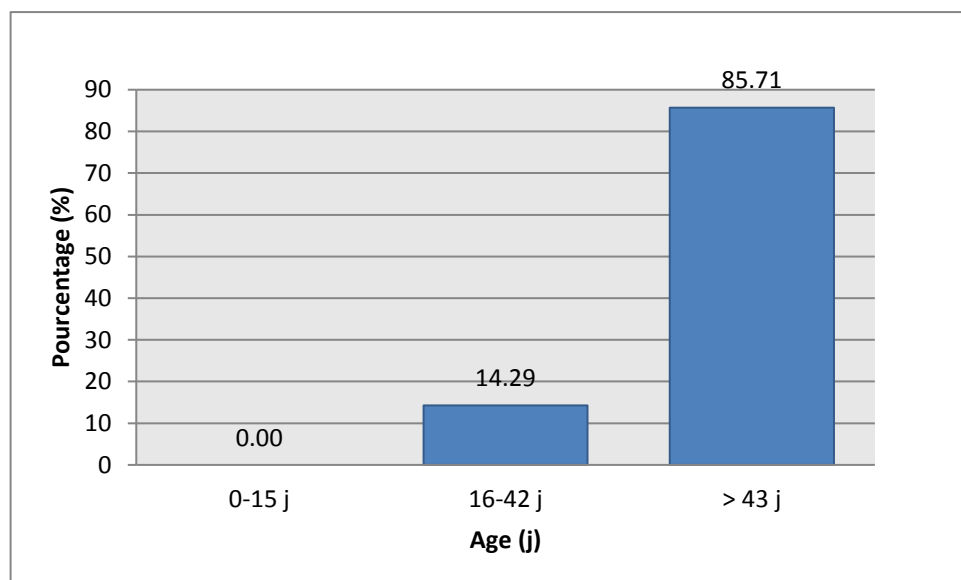


Figure n°3.27 : Age des poulets des élevages visités.

3.2.4.1.2 Aspect clinique des élevages de poulet prélevés :

Dans les élevages de l'étude nous avons constaté un taux de mortalité très élevé qui dépasse les 16% pouvant atteindre les 50% (Elevage n°11 et 13) et ceci dans la majorité des cas (71.43 %) (Figure n°3.28).

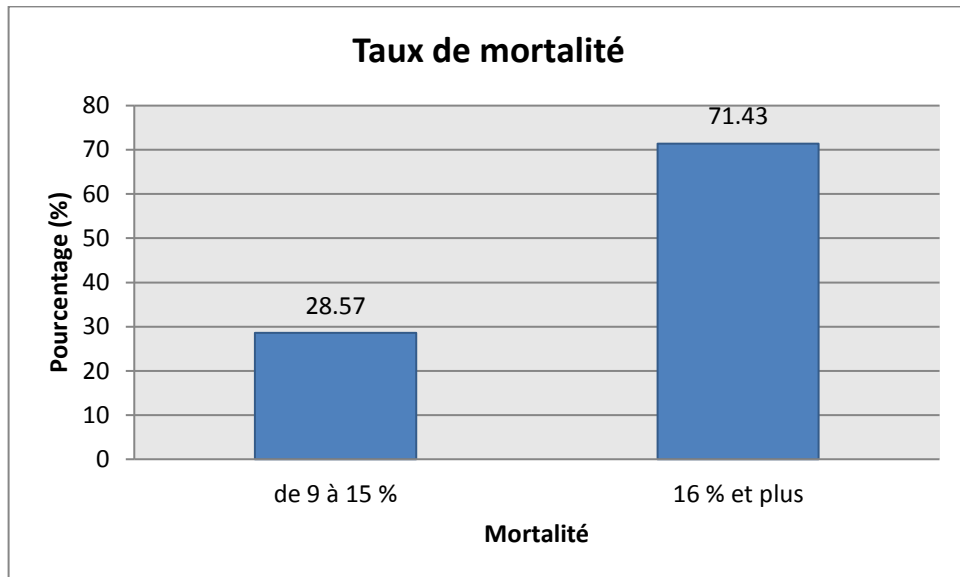


Figure n°3.28 : Taux de mortalité dans les élevages visités.

Les symptômes clinique dans les élevages présentant une affection rénale est polymorphe allant de la petite émission des fientes liquides (signe digestif) jusqu'au l'atteinte respiratoire grave (85.71%) suite à l'infection virale primaire et surtout à l'occasion des infections secondaires concomitante (Figure n°3.29).

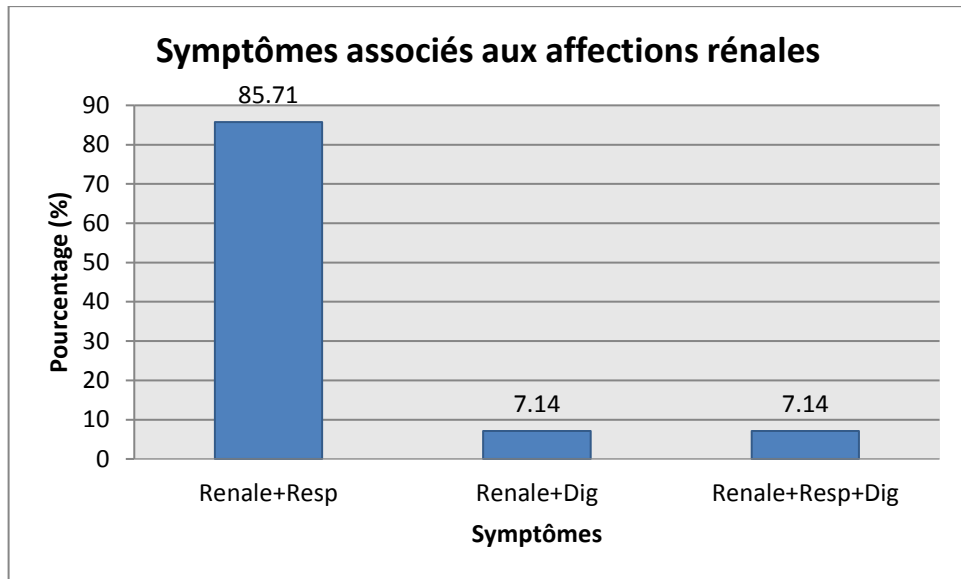


Figure n°3.29 : Symptômes associés aux affections rénales dans élevages visités.

L'autopsie réalisée sur des sujets morts ou morbides nous a permis de constater la présence des lésions variables et ceci sur plusieurs organes : des lésions rénales (néphrites), digestives (entérite), respiratoires (trachéite, pneumonie), de surinfections secondaires (péricardite, péri-hépatite, aérosacculites), splénique (splénite), de goutte viscérale et articulaire. (Figure n°3.30-34).

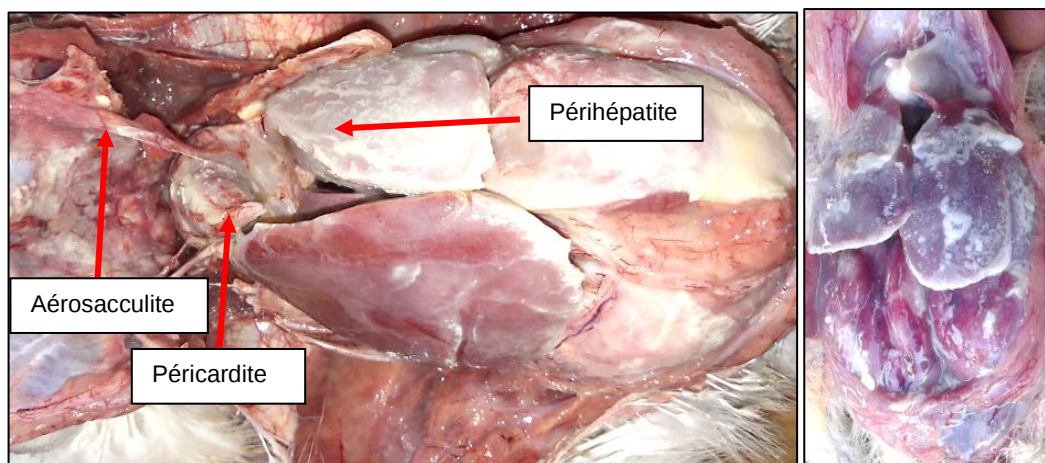


Figure n°3.30 : Lésions de surinfection (Péricardite, Périhépatite, aérosacculites)



Figure n°3.31 : Lésions trachéale (Trachéite) et splénique (splénite).

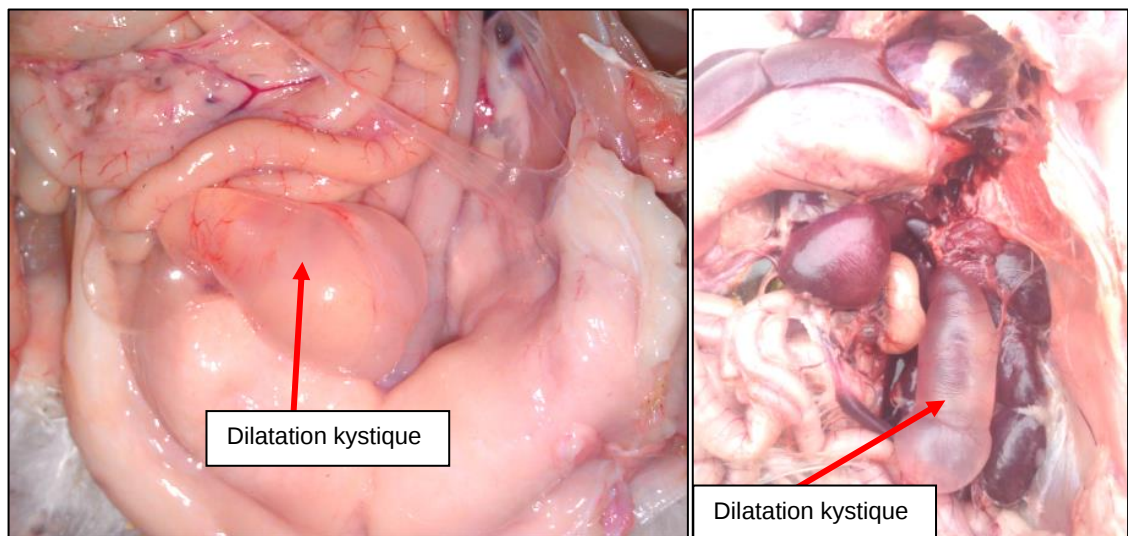


Figure n°3.32 : Dilatation kystique liquidienne.

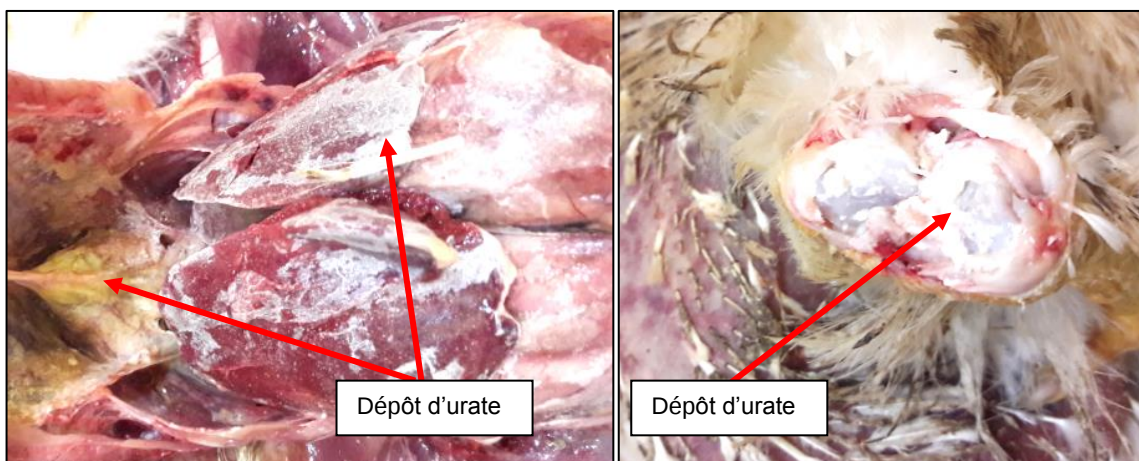


Figure n°3.33 : Goutte viscérale et articulaire.

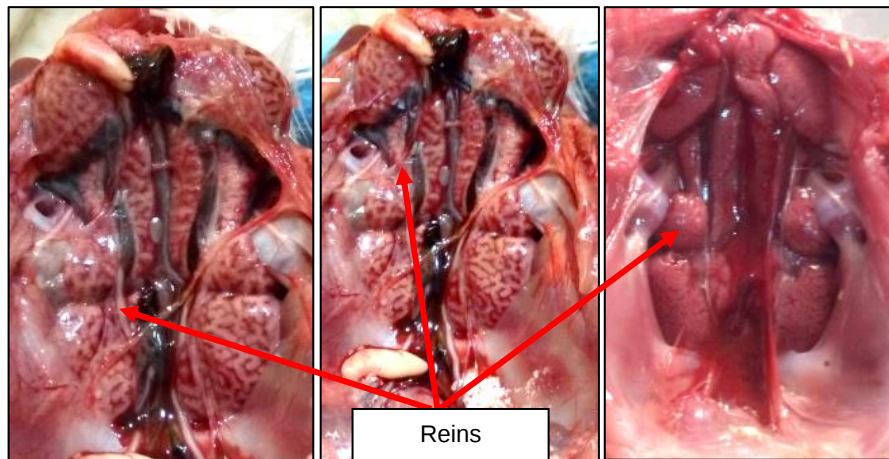


Figure n°3.34 : Lésions rénales des élevages de l'étude.

3.2.4.1.3 Suspensions des vétérinaires et traitements des affections rénales :

Les étiologies suspectées lors d'affection rénale vont principalement vers une suspicion de la bronchite infectieuse (64.28%) suivi par les MRC (21.42%). D'autres agents étiologiques bactériens tel que les salmonelles et les colibacilles sont aussi rapportés (7.14%) (Figure n°3.35).

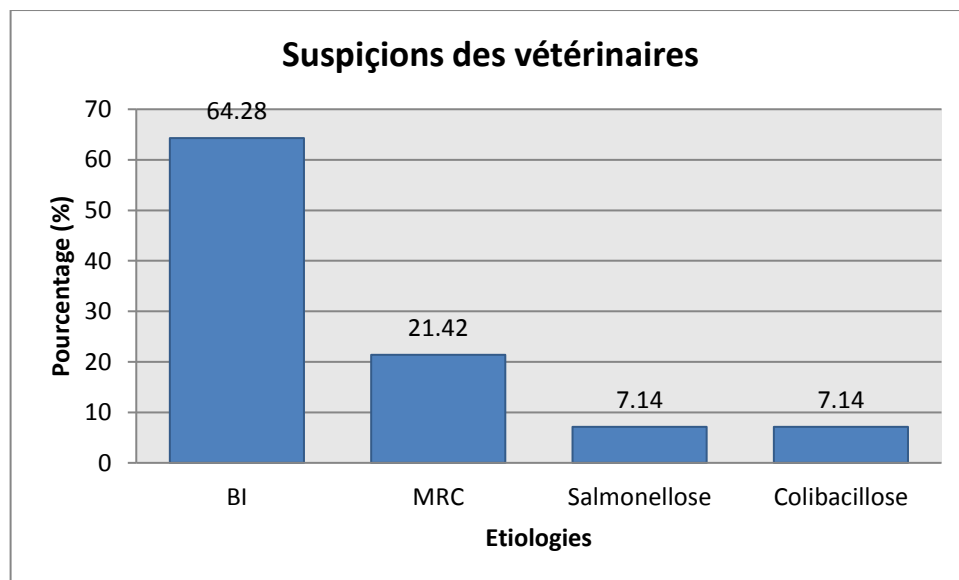


Figure n°3.35 : Suspensions des vétérinaires lors d'affection rénale.

Plusieurs traitements sont envisagés par les vétérinaires praticiens en vue de lutter contre les affections rénales. Près d'un tiers d'entre eux (35.71%) préconise l'acidification de l'eau de boisson en utilisant le vinaigre ou autre et l'administration concomitante des toniques hépatorénales. D'autres rajoutent à cela des

antibiotiques (28.57%). Quant à l'utilisation des antibiotiques seule, nous avons enregistré un pourcentage de 21.43% (Figure n°3.36).

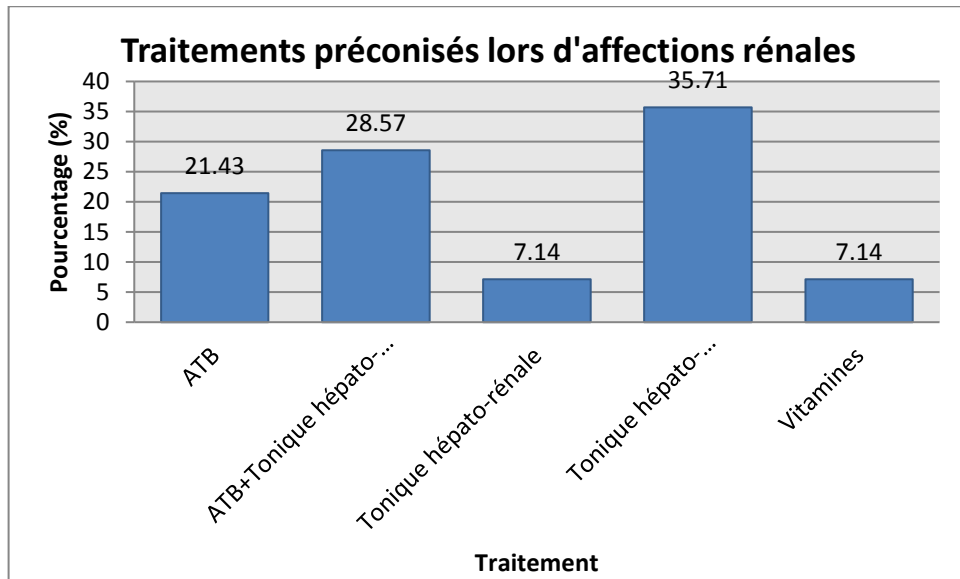


Figure n°3.36 : Traitements préconisés lors d'affections rénales.

3.2.4.2 Détermination de la circulation des souches virales de la bronchite infectieuse par l'analyse sérologique I.H.A :

3.2.4.2.1 Résultat globale :

Dans cette étude, 140 sérums de volailles de chair prélevés dans les différentes wilayets (BOUIRA, BOUMERDES, TISSEMSILT et ALGER) ont été analysé par le test I.H.A FLOKSCREEN IB-HI TEST®. Les résultats sérologiques obtenus ainsi que la moyenne géométrique des titres sont rapportées dans le tableau n°3.2.

Tableau n°3.2 : Titres d'anticorps anti IBV obtenu par I.H.A dans les élevages de poulet de chair souffrant de néphrite.

Elevages	Moyenne des titres (log2)				Mean Titers range (max-min) (log2)			
	QX	M-41	D-274	4/91	QX	M-41	D-274	4/91
1	11.00	5.80	4.70	7.00	11—11	4—9	4—9	6—11
2	11.00	7.00	4.64	7.55	11—11	5—10	4—7	7—9
3	9.70	6.50	5.20	7.20	7—11	4—11	4—8	4—11
4	10.82	6.18	5.18	7.00	9—11	5—11	4—9	4—11
5	11.00	8.09	6.91	9.00	11—11	6—10	5—10	7—11
6	11.00	6.70	5.10	6.70	11—11	5—8	4—7	5—9
7	9.78	9.78	8.78	9.89	7—11	8—11	5—11	8—11
8	11.00	7.75	5.25	7.50	11—11	7—8	5—6	7—8
9	10.50	5.33	4.50	5.17	8—11	4—9	4—6	4—9
10	10.14	4.86	4.00	5.00	5—11	4—8	4—4	4—8
11	9.50	8.33	5.83	9.67	7—11	6—10	4—8	7—11
12	8.73	7.55	5.91	8.00	4—11	5—9	4—7	5—11
13	9.80	8.70	6.70	8.80	7—11	6—11	4—11	8—11
14	10.75	9.38	6.75	9.88	10—11	8—11	5—10	8—11

3.2.4.2.2 Répartition des résultats sérologiques en fonction du statut

immunitaire des poulets (vacciné, non vacciné) :

Le statut immunitaire des poulets (vacciné, non vacciné) au moment des prélèvements est rapporté dans le tableau n°3.3 et la figure n°3.37.

Tableau n°3.3 : Statut immunitaire des poulets (vacciné, non vacciné) au moment des prélèvements.

Statut immunitaire (%)	Sérotype M-41		Sérotype 4/91		Sérotype D-274		Sérotype QX	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Non vacciné	29	29	43	14	7	50	57	0
Vacciné	21	21	36	7	0	43	43	0

En fonction du statut immunitaire des poulets (vacciné, non vacciné contre la BI), on constate une nette différence entre les séroprévalences de la BI quel que soit le sérotype recherché. Cette séroprévalence tente à être plus élevée dans les élevages non vaccinés que dans les élevages vaccinés et ceci quel que soit le protocole de vaccination utilisé. On remarque aussi, que la quasi-totalité (83,83%) des élevages de poulet de chair vaccinés pratiquant le principe de vaccination protectotype et séropositive pour la BI ne respectant pas le temps nécessaire séparant les deux vaccinations Mass et variant (80 %).

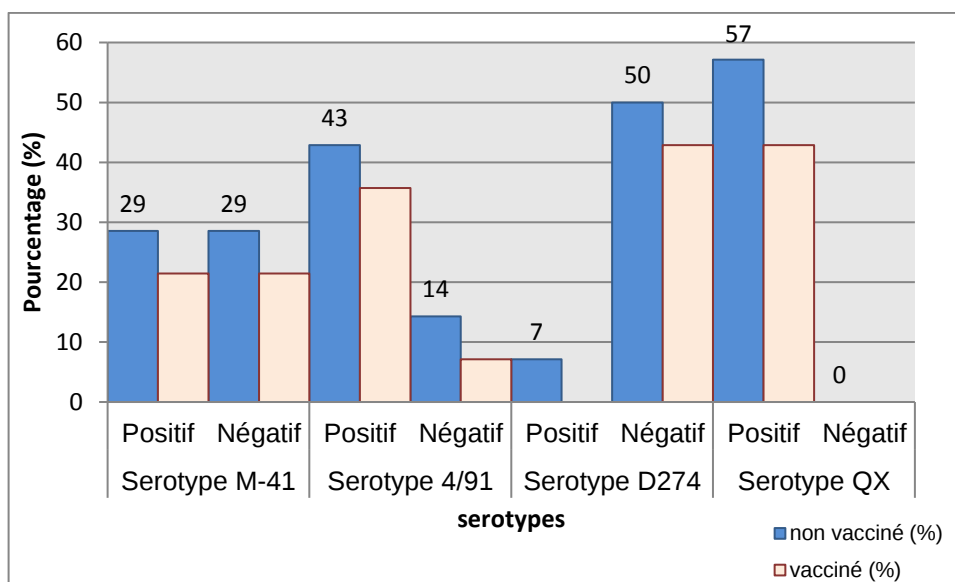


Figure n°3.37 : Statut immunitaire des poulets (vacciné, non vacciné) au moment des prélèvements.

3.2.4.2.3 Répartition des résultats sérologiques en fonction des différents

sérotypes :

Chaque lot fut testé pour quatre sérotypes : Mass (M-41), D-274, QX et 4/91. soit 540 analyses I.H.A effectuées pour les quatre sérotypes.

Le tableau n°3.4 et la figure n°3.38 représentent la répartition des résultats sérologiques en fonction des différents sérotypes.

Les résultats de la présente étude indiquent que la totalité des élevages prélevés sont positive pour la souche variante QX (100%), et que 60%, 50% des élevages de poulet de chair sont positive aux sérotypes 4/91 et M-41 respectivement. Une minorité des élevages était positive au sérotype D-274 (7%).

Tableau n°3.4 : Répartition des résultats sérologiques en fonction des différents sérotypes.

	M-41		4/91		D-274		QX	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
Positivité								
Positif	8	57.14	9	64.29	1	7.14	14	100
Négatif	4	28.57	3	21.43	11	78.57	0	0.00

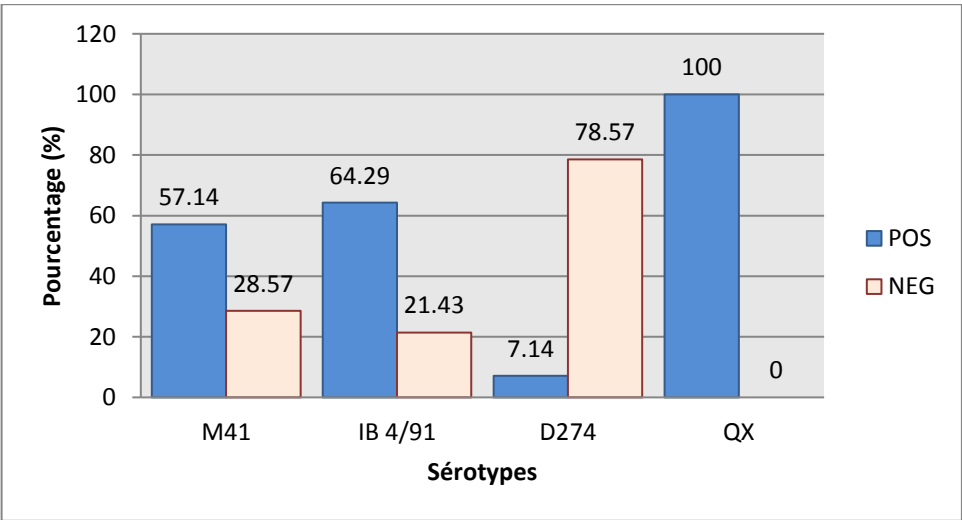


Figure n°3.38 : Répartition des résultats sérologiques en fonction des différents sérotypes.

3.2.4.2.4 Variation des résultats sérologiques en fonction de la mortalité :

Le tableau n°3.5 et la figure n°3.39 représentent la répartition des résultats sérologiques en fonction de la mortalité.

Tableau n°3.5 : Répartition des résultats sérologiques en fonction de la mortalité.

Taux de mortalité (%)	M-41		D-274		QX		4/91	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
9-15 %	7.14	21.43	0.00	28.57	28.57	0.00	21.43	7.14
16 % et plus	42.86	28.57	7.14	64.29	71.43	0.00	57.14	14.29

Les sérotypes de la bronchite infectieuse aviaire détectés dans les élevages de l'étude, qui provoquent plus de mortalité (16% et plus), sont de loin le QX et IB 4/91 avec des taux de 71,43 % et 57,14 % respectivement.

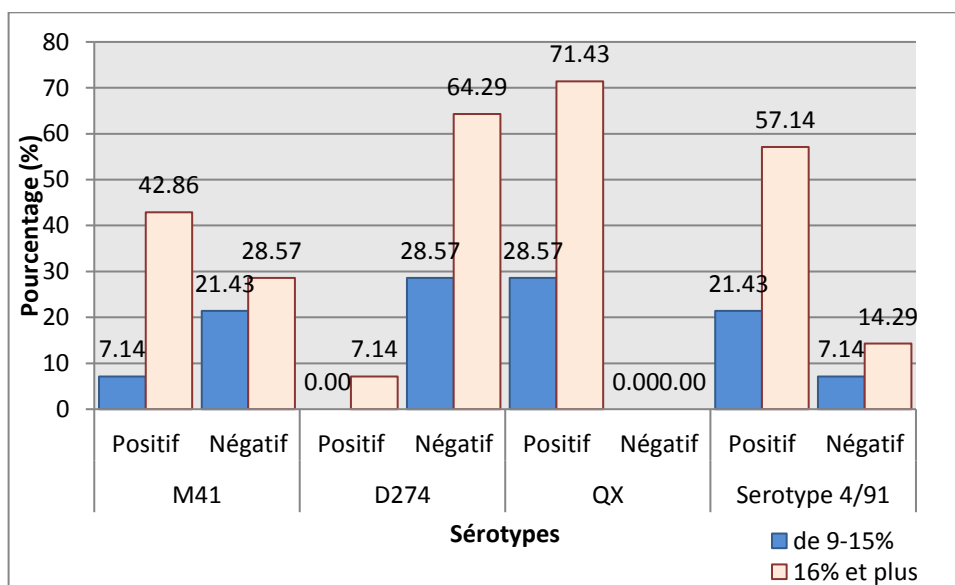


Figure n°3.39 : Répartition des résultats sérologiques en fonction de la mortalité.

3.2.4.2.5 Variation des résultats sérologiques en fonction de l'âge des poulets :

Le tableau n°3.6 et la figure n°3.40 représentent la répartition des résultats sérologiques en fonction de l'âge des poulets.

Tableau n°3.6 : Répartition des résultats sérologiques en fonction de l'âge des poulets.

Age des poulets	M-41		D-274		QX		4/91	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
de 16 à 42 jours	7.14	7.14	0.00	14.29	14.29	0.00	14.29	0.00
43 jours et plus	42.86	42.86	7.14	78.57	64.29	21.43	85.71	0.00

La période d'élevage du poulet de chair où on enregistre plus de séropositivité pour la BI est la période de finition (43 jours et plus). Dans cette période, le sérotype IB 4/91 est le plus impliqué dans les affections rénales avec un pourcentage de 85,71% suivi par le sérotype QX (64,29%) et M-41 (42,86).

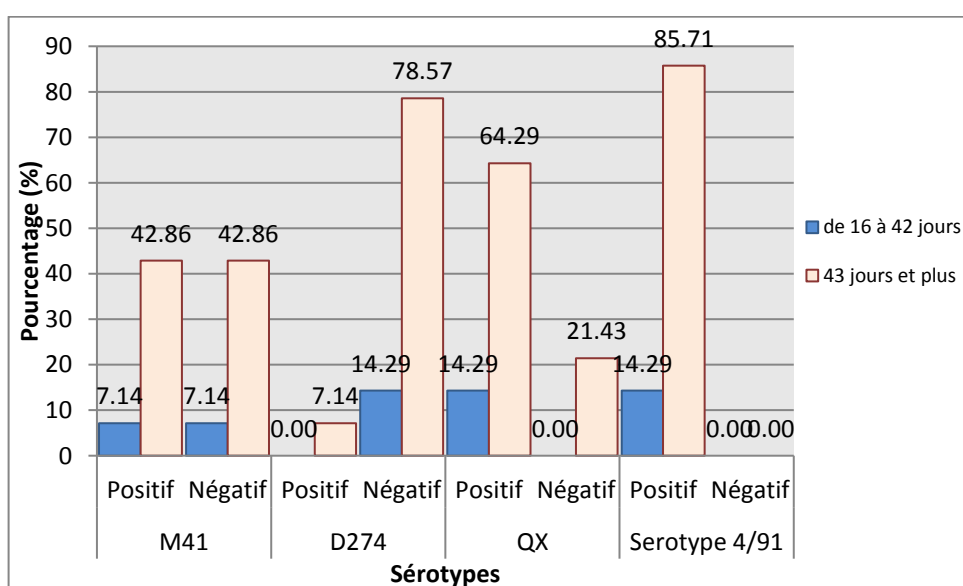


Figure n°3.40 : Répartition des résultats sérologiques en fonction de l'âge des poulets.

3.2.4.2.6 Variation des résultats sérologiques en fonction de la saison :

Le tableau n°3.7 et la figure n°3.41 représentent la répartition des résultats sérologiques en fonction de saison.

Tableau n°3.7 : Répartition des résultats sérologiques en fonction de la saison.

Saison	M-41		D-274		QX		4/91	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Hiver	14	21	7	29	36	0	29	7
Printemps	7	14	0	21	21	0	7	14
Eté	14	14	0	29	29	0	29	0
Automne	14	0	0	14	14	0	14	0

Quel que soit la saison, la séropositivité des élevages prélevés est presque la même pour les différents sérotypes.

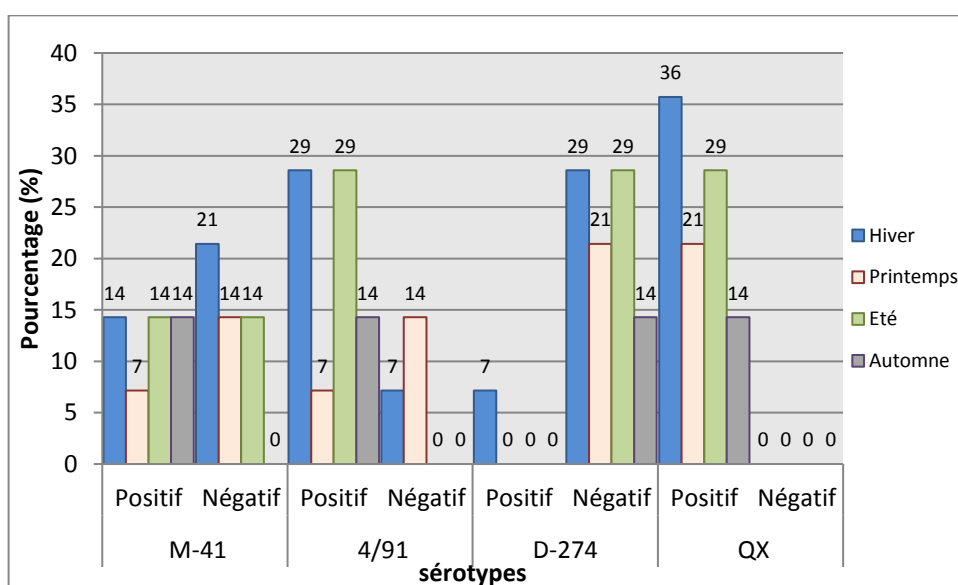


Figure n°3.41 : Répartition des résultats sérologiques en fonction de la saison.

3.2.4.2.7 Variation des résultats sérologiques en fonction de la région des prélèvements :

Le tableau n°3.8 et la figure n°3.42 représentent la répartition des résultats sérologiques en fonction de la région des prélèvements.

Tableau n°3.8 : Répartition des résultats sérologiques en fonction de la région des prélèvements.

Région	M-41		4/91		D-274		QX	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
Région centre	21	36	43	14	7	50	57	0
Région ouest	29	14	36	7	0	43	43	0

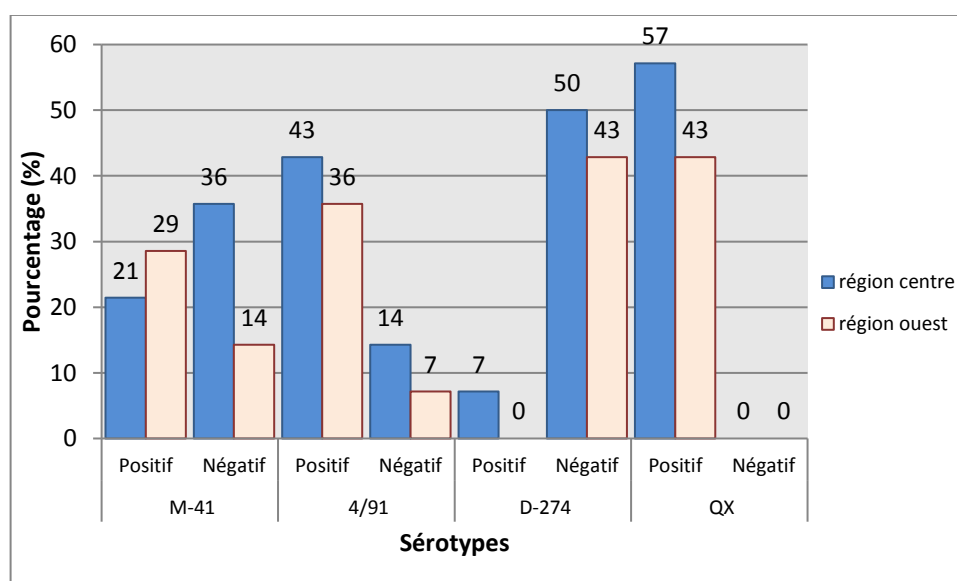


Figure n°3.42 : Répartition des résultats sérologiques en fonction de la région des prélèvements.

La séroprévalence des sérotypes QX, 4/91 de la bronchite infectieuse dans notre zone d'étude est partout très élevée. Statistiquement, il n'y a pas eu une différence significative entre les séroprévalences trouvées et les régions de notre étude (centre et ouest).

3.2.4.2.8 Variation des résultats sérologiques en fonction de l'intervalle entre la date des prélèvements et la manifestation clinique :

Le tableau n°3.9 et la figure n°3.43 représentent la répartition des résultats sérologiques en fonction de l'intervalle entre la date des prélèvements et la manifestation clinique.

La séropositivité des élevages prélevés aux sérotypes QX et 4/91 varie sensiblement en fonction de la période qui se situe entre la date des prélèvements et la manifestation clinique. Le taux de séropositivité le plus élevé est enregistré 2 à 3 semaines après le début de la maladie (57% et 43% pour le sérotype QX et 4/91 respectivement). Ce taux tend à régressé par la suite (21 jours et plus) on atteignant les 36% et 29% pour les sérotypes QX et 4/91 respectivement.

Tableau n°3.9 : Répartition des résultats sérologiques en fonction de l'intervalle entre la date des prélèvements et la manifestation clinique.

Intervalle de temps	M-41		4/91		D-274		QX	
	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif
de 1 à 10 jours	7	0	7	0	0	7	7	0
de 11 à 20 jours	21	36	43	14	0	57	57	0
21 jours et plus	21	14	29	7	7	29	36	0

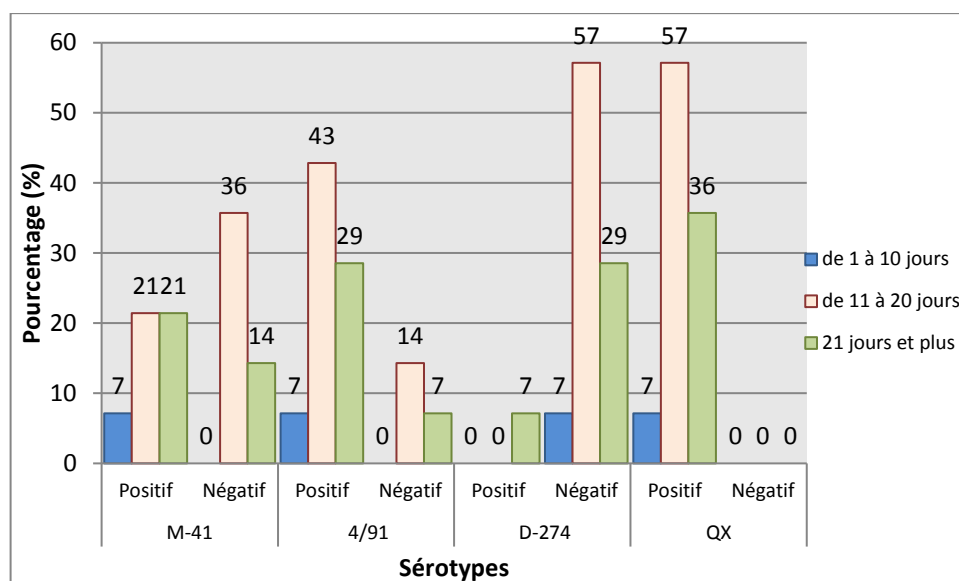


Figure n°3.43 : Répartition des résultats sérologiques en fonction de l'intervalle entre la date des prélèvements et la manifestation clinique.

3.2.4.3 Résultats de la RT-PCR :

Six parmi les 14 prélèvements des poulets de chair ont été positive pour le gène S1 d'IBV, mais seulement deux isolats ont été typable par séquençage et ont montré une grande quantité d'ARN viral d'IBV ($Ct_1 = 22.15$, $Ct_2 = 31.4$). Les deux séquences typable ont été identifiées comme un nouveau génotype IBDZ13a. Néanmoins, l'IBV a été détecté seulement dans le tissu rénal et absent dans le tissu trachéal. Toutes les séquences ont montré une homologie de 93% à la séquence partielle S1 de la souche de référence IB 4/91 (**Figure n°3.45**). La souche IBDZ13a a été caractérisé comme variant d'IB 4/91 avec substitution de 29 acides nucléiques différent de ceux de la séquence de la souche de référence IB 4/91, ce qui correspond à la substitution de huit acides aminés relative à cette souche de référence (**Table n°3.10**). Parmi les substitutions d'acides aminés, trois ont été d'acides aminés hydrophobique aux acides aminés hydrophilique. Les épitopes prédits avec les différences entre souches sauvages et les souches de référence IB 4/91 et autres a été résumé dans la **Figure n°3.44**.



Figure n°3.44 : Alignement des épitopes prédits des séquences d'acides aminés du gène HVR S1. Nouvel isolat Algérien sauvage et souches virales vaccinales de l'IBV.

Tableau n°3.10 : Les changements de la séquence d'acides aminés dans la souche IBDZ13a relatives à la souche vaccinale IB 4/91.

Position	Séquence de la souche vaccinale	Hydrophobicity Index	Sequence de l'échantillon	Index d'hydrophobicité	Hydrophobique/Hydrophilique Switch
253	Alanine	1.8	Threonine	-0.7	OUI
258	Aspartate	-3.5	Glutamate	-3.5	NON
261	Valine	4.2	Isoleucine	4.5	NON
273	Glutamate	-3.5	Threonine	-0.7	NON
286	Proline	-1.6	Serine	-0.8	NON
289	Serine	-0.8	Leucine	3.8	OUI
296	Valine	4.2	Glutamine	-3.5	OUI
305	Serine	-0.8	Aspartate	-3.5	NON

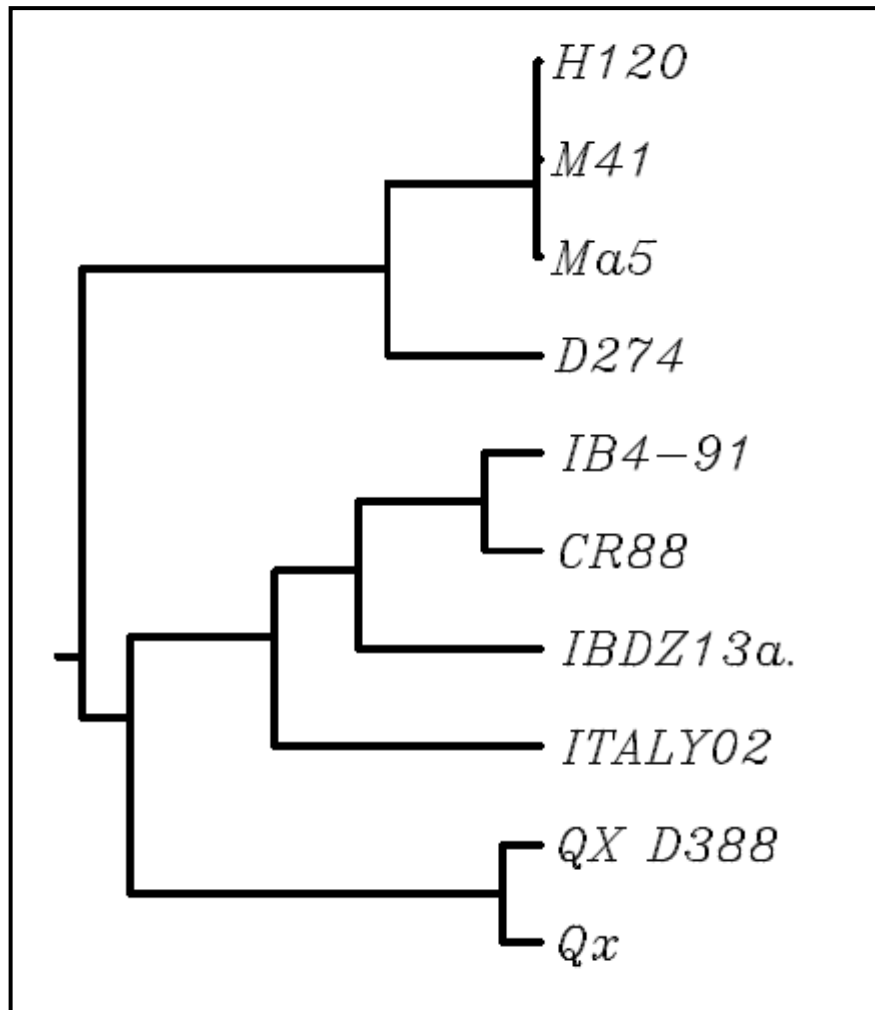


Figure n°3.45 : Arbre phylogénétique avec 1000 bootstrap répliques obtenu par la méthode Neighbor-joining.

3.2.4.4 Résultats histopathologiques

3.2.4.4.1 Trachées :

Les figures ci-dessous montrent les lésions trachéales présentes sur les coupes histopathologiques ainsi que leur description.

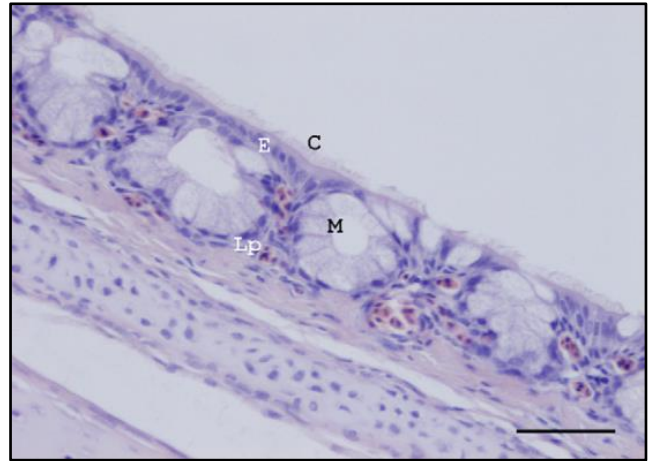
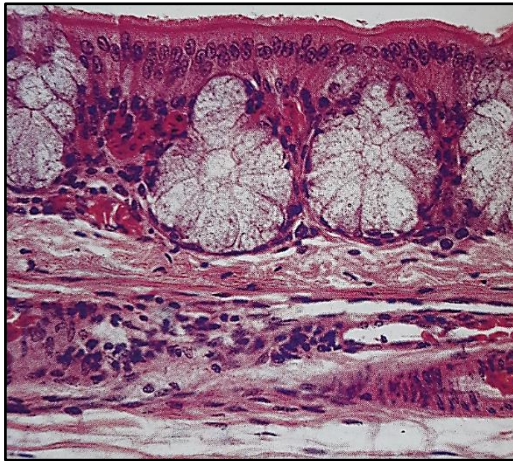


Figure n°3.46 : Trachée de la volaille saine (H & E, x 100). [60]

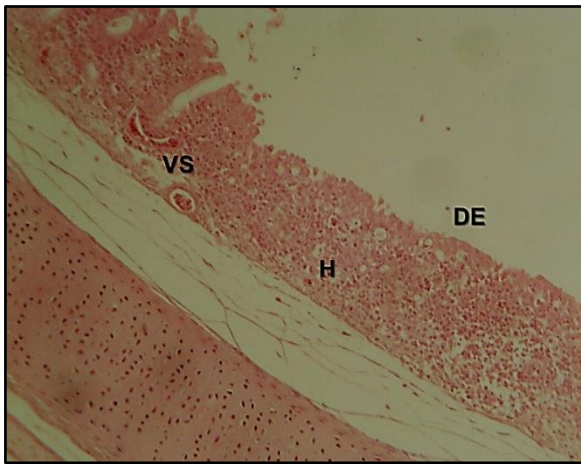


Figure n°3.47 : Stade évolutif d'une trachéite avancée (H & E, x 100). Hyperplasie et métaplasie sous-muqueuse (H) ; Desquamation épithéliale avec perte des cils (DE) ; Œdème sous épithéliale (VS).

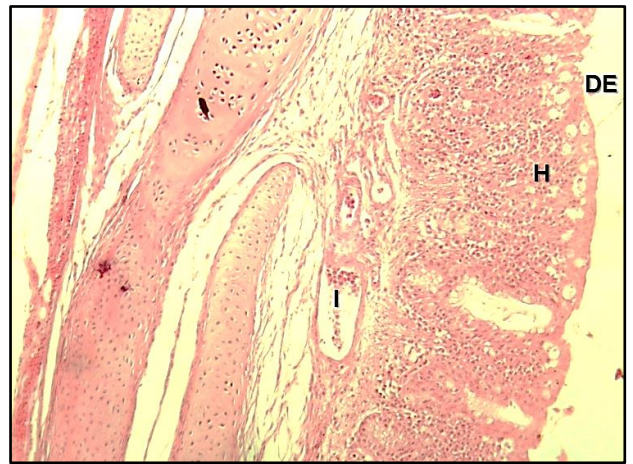


Figure n°3.48 : Hyperplasie sous muqueuse avancée (H & E, x 100). Infiltration monocytaire sous muqueuse (I) ; Hyperplasie et métaplasie de l'épithélium (H) ; abrasion épithéliale ou décapitation épithéliale modérée avec disparition partielle de la bordure en brosse (DE).

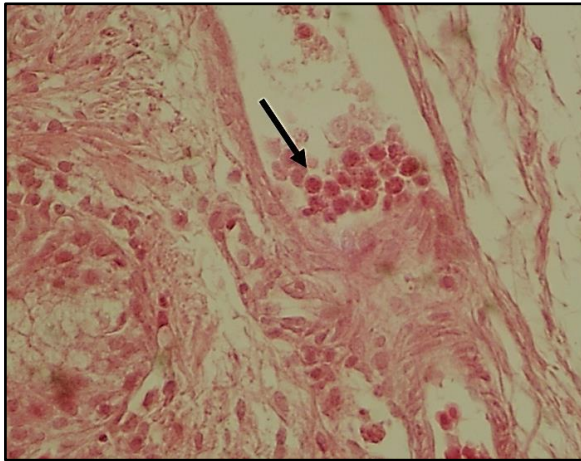


Figure n°3.49 : Recrutement leucocytaire (H & E, x 400).

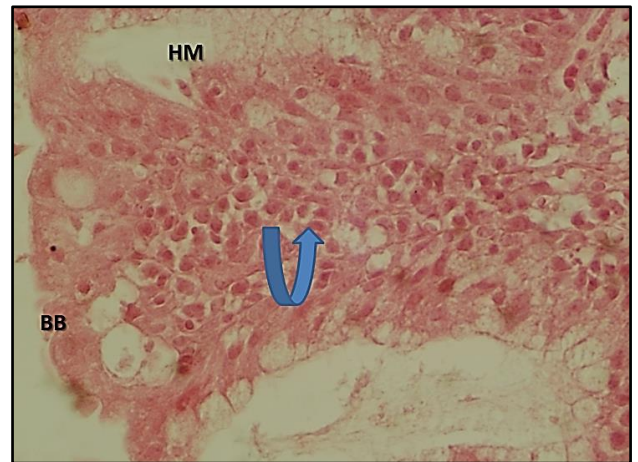


Figure n°3.50 : Hyperplasie sous muqueuse (H & E, x 400). Hyperplasie muqueuse (HM) ; Hyperplasie et métaplasie épithéliale (flèche curviligne) ; Disparition de la bordure en brosse ou Déciliation (BB).

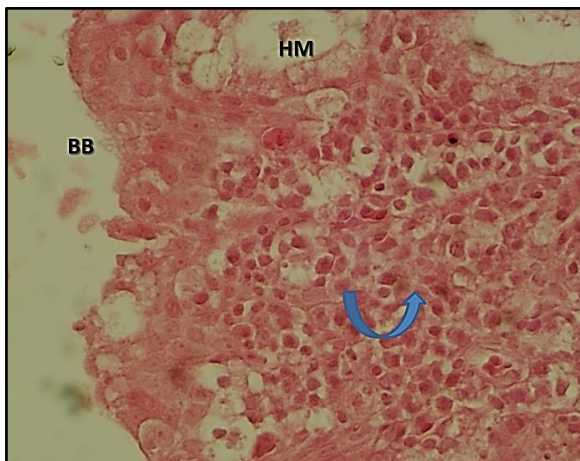


Figure n°3.51 : Hyperplasie sous muqueuse (H & E, x 400). Hyperplasie muqueuse (HM) ; Hyperplasie et métaplasie épithéliale (flèche curviligne) ; Disparition de la bordure en brosse (BB).

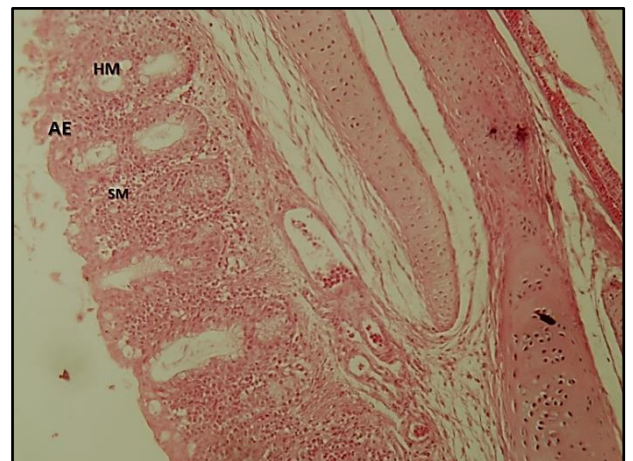


Figure n°3.52 : Abrasion épithéliale (AE), hyperplasie muqueuse (hypersécrétion de mucus) (HM) et métaplasie sous muqueuse (SM). (H & E, x 100).

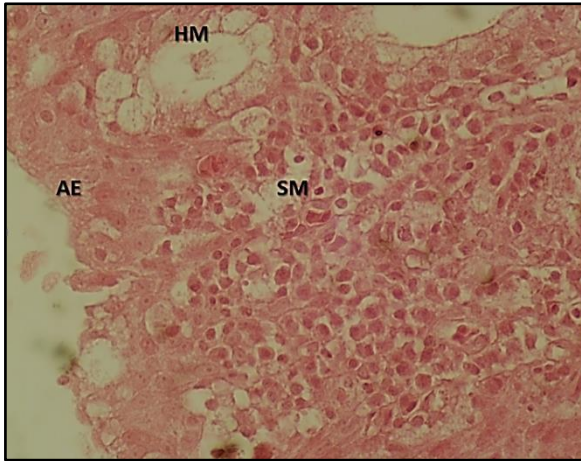


Figure n°3.53 : Abrasion épithéliale ou nécrose (**AE**), hyperplasie muqueuse (hypersécrétion de mucus) (**HM**) et métaplasie sous muqueuse (**SM**). (H & E, x 400).

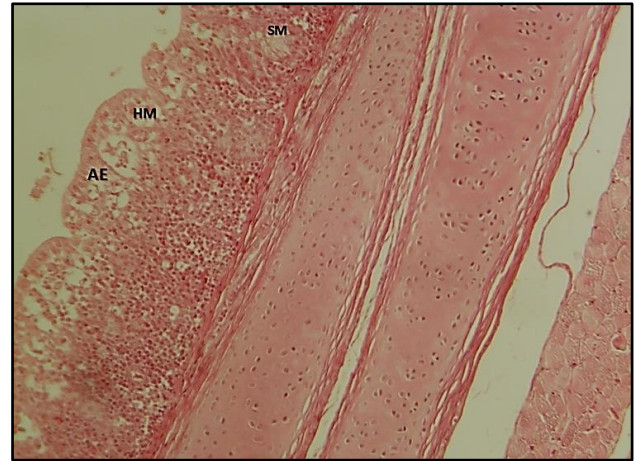


Figure n°3.54 : Abrasion épithéliale ou nécrose (**AE**), hyperplasie muqueuse (hypersécrétion de mucus) (**HM**) et métaplasie sous muqueuse (**SM**). (H & E, x 100).



Figure n°3.55 : Hyperplasie glandulaire (**HG**), Métaplasie sous muqueuse (**MS**) bordure en brosse érodée (flèche coudée). (H & E, x 100).

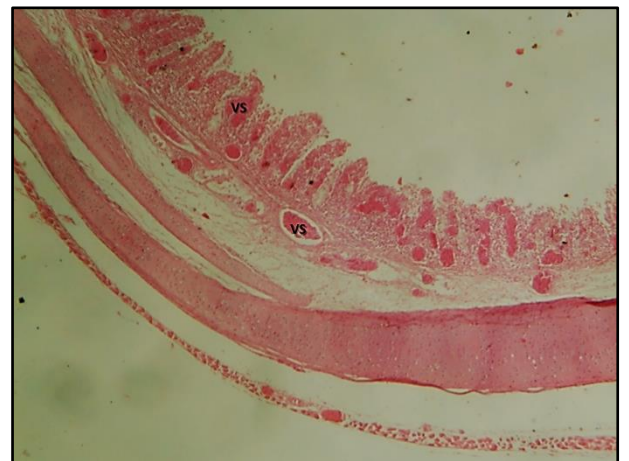


Figure n°3.56 : Stade tardif de l'infection (H & E, x 25) : Trachéite hémorragique (**VS**).



Figure n°3.57 : Stade de trachéite congestive ou hémorragique (**H & E, x 100**). Œdème hémorragique sous épithéliale sévère (**VS**) ; Hyperplasie sous muqueuse (**étoile**) ; Abrasion ou décapitation épithéliale totale (**AE**).

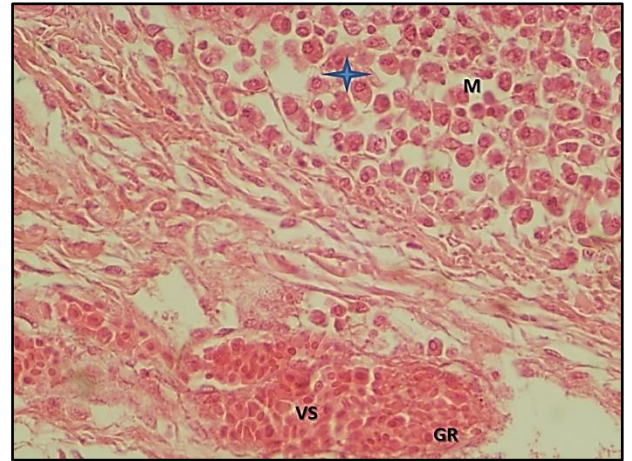


Figure n°3.58 : Stade de trachéite congestive ou hémorragique (**H & E, x 400**). Desquamation et nécrose épithéliale totale ; Hyperplasie sous-muqueuse (**étoile**) et infiltration monocytaire (**M**) ; Œdème hémorragique sévère (**VS, GR**).

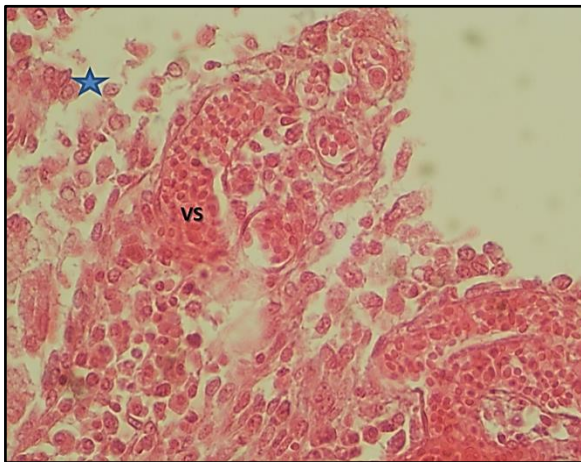


Figure n°3.59 : Stade de trachéite congestive ou hémorragique (**H & E, x 400**). Desquamation et nécrose épithéliale totale Hyperplasie sous- muqueuse (**étoile**) et infiltration

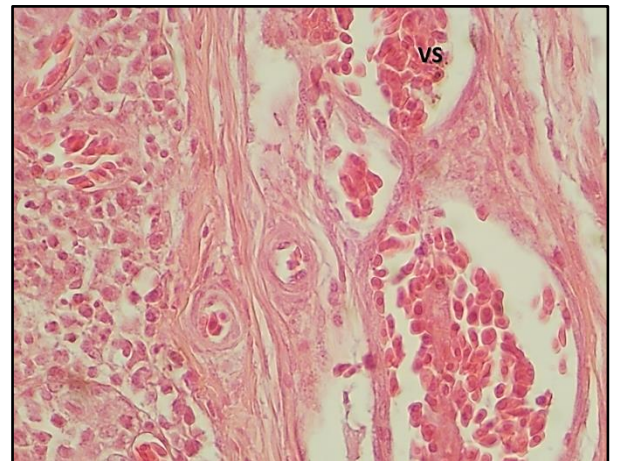


Figure n°3.60: Congestion et œdème de la sous muqueuse (**H & E, x 400**).

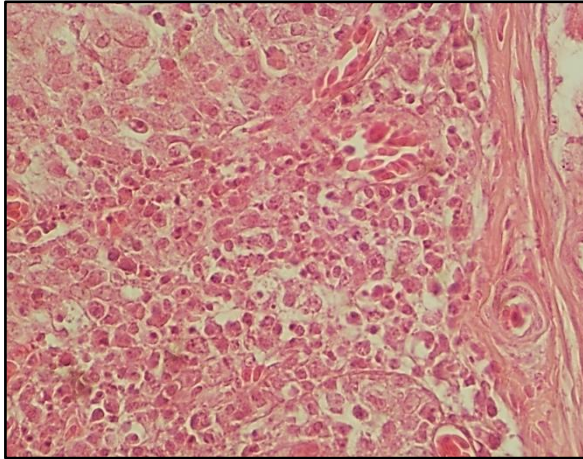


Figure n°3.61: Congestion et œdème de la sous muqueuse (**H & E, x 400**).

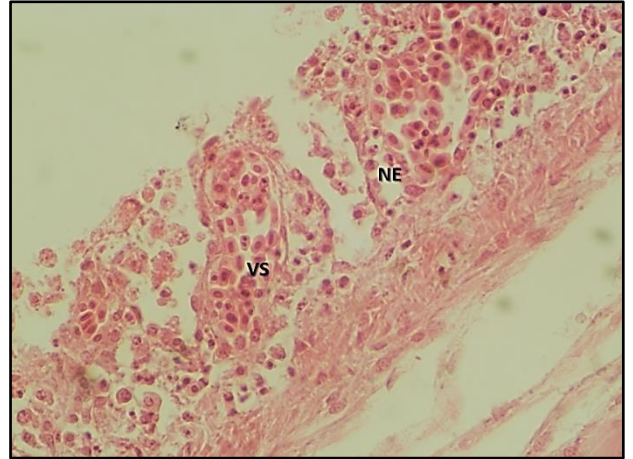


Figure n°3.62 : Nécrose épithéliale sévère (**H & E, x 400**). Vaisseaux sanguins congestionnés (**VS**) et nécrose épithéliale (**NE**).

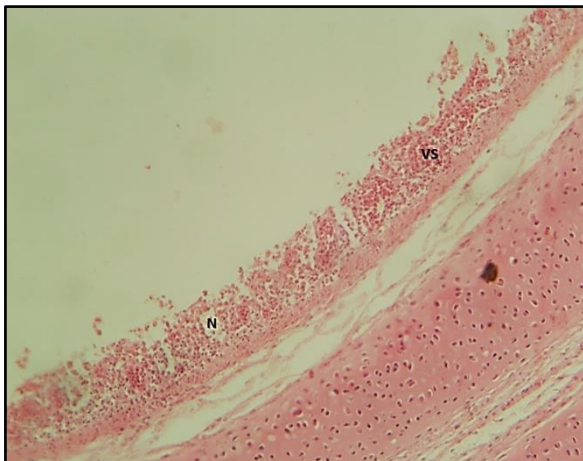


Figure n°3.63 : Abrasion trachéale généralisée (**H & E, x 100**). Nécrose de la muqueuse et de la sous muqueuse trachéale diffuse avec perte de substance (**N**) ; muqueuse et la sous muqueuse trachéale congestionnées (**VS**).

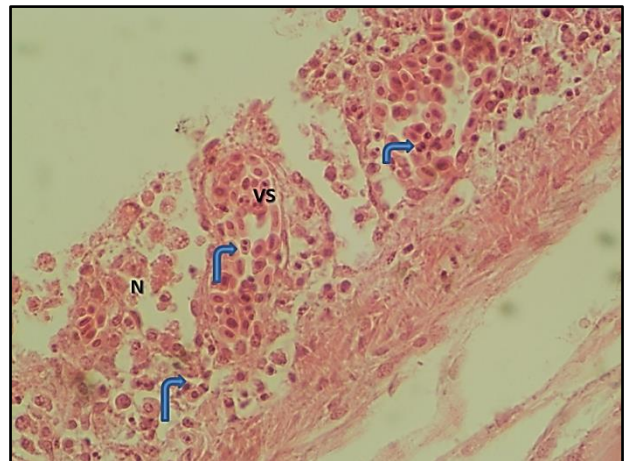


Figure n°3.64 : Détails de la nécrose trachéale (**H & E, x 400**). Nécrose de la muqueuse et de la sous muqueuse trachéale diffuse avec perte de substance (**N**) ; Présence de monocytes binucléés et mononucléés intra et perivasculaires (**flèches**) ; Vaisseaux sanguins congestionnés (**VS**).

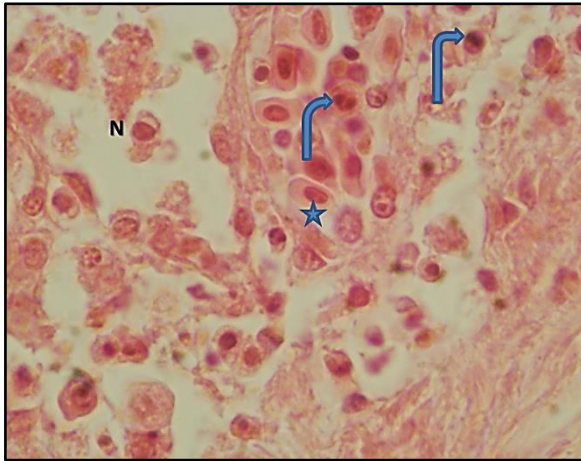


Figure n°3.65 : Détails de la nécrose trachéale (H & E, x 1000). Nécrose de la muqueuse et de la sous muqueuse trachéale diffuse avec perte de substance (**N**) ; Présence de mononucléaire binucléés et mononuclées intra et perivasculaires (**flèches**) ; étoile pour (**Hematocyte**).

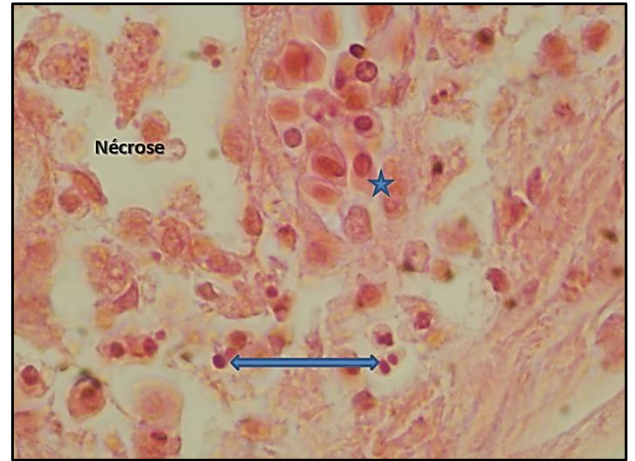


Figure n°3.66 : Détails de la nécrose trachéale (H & E, x 1000). Nécrose de la muqueuse et de la sous muqueuse trachéale diffuse avec perte de substance (**N**) ; Présence de mononucléaire binucléés et mononuclées intra et perivasculaires (**flèches**) ; étoile pour (**Hematocyte**).

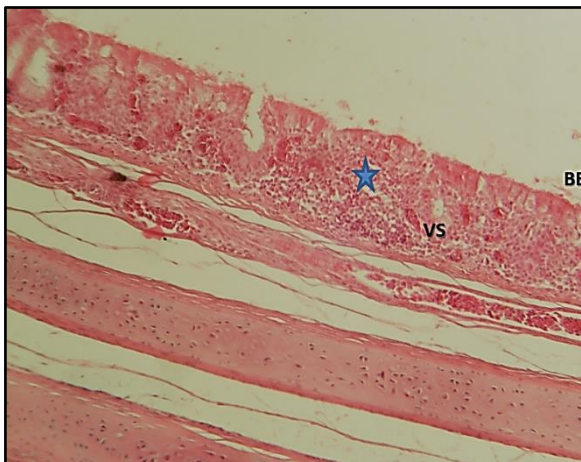


Figure n°3.67 : Epithélium trachéale au stade d'abrasion épithéliale (H & E, x 100). Abrasion partielle de La bordure en brosse (**BB**) ; Œdème sous muqueux (**VS**) et hyperplasie / métaplasie de la sous muqueuse (**étoile**).

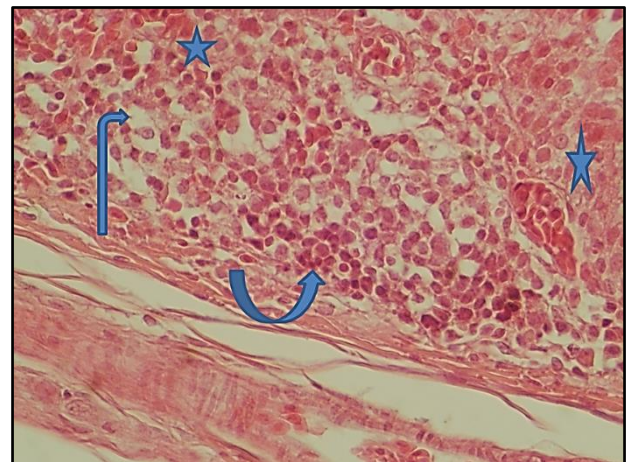


Figure n°3.68 : Epithélium trachéale au stade d'abrasion épithéliale (H & E, x 400). Hyperplasie sous muqueuse (**étoiles**) ; Infiltration monocytaire sous muqueuse (**flèches**).

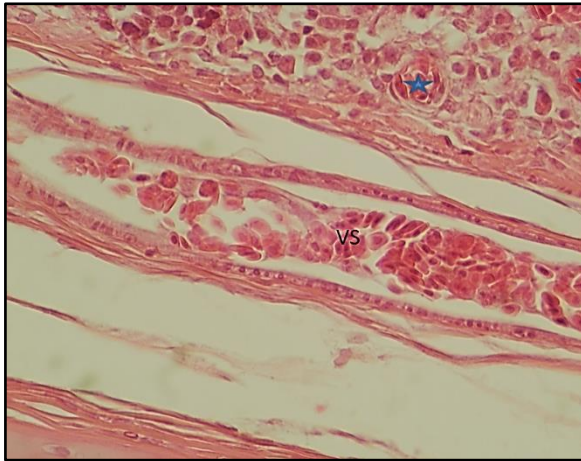


Figure n°3.69 : Œdème sous muqueux et congestion vasculaire (étoile, VS) (H & E, x 400).

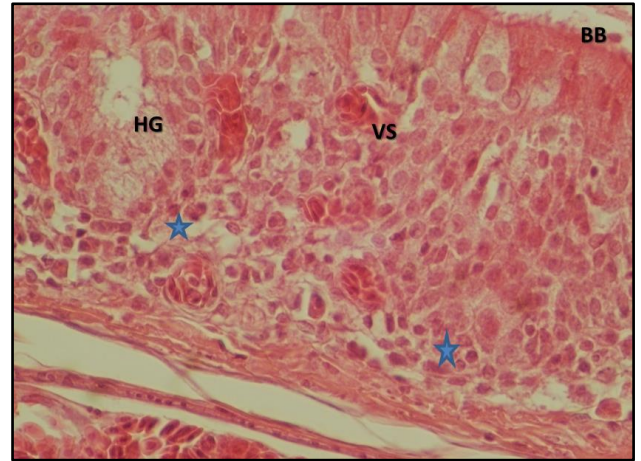


Figure n°3.70 : Hyperplasie de la muqueuse glandulaire et œdème sous muqueux (H & E, x 400). Hyperplasie glandulaire (HG) ; Infiltration monocytaire sous muqueuse (étoiles) ; Œdème sous muqueux (VS) et bordure en brosse encore présente (BB).

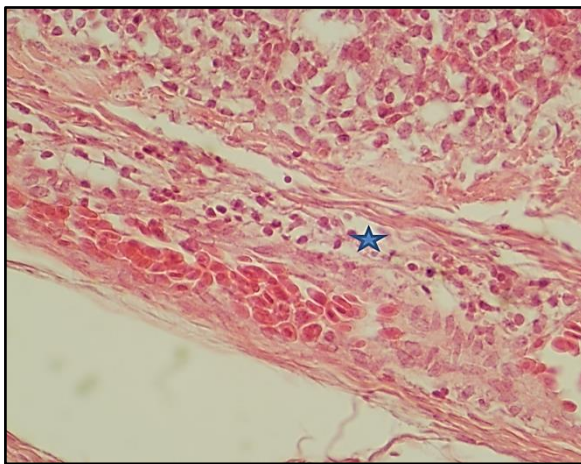


Figure n°3.71 : Infiltration perivascular monocytaire (étoile). (H & E, x 400).

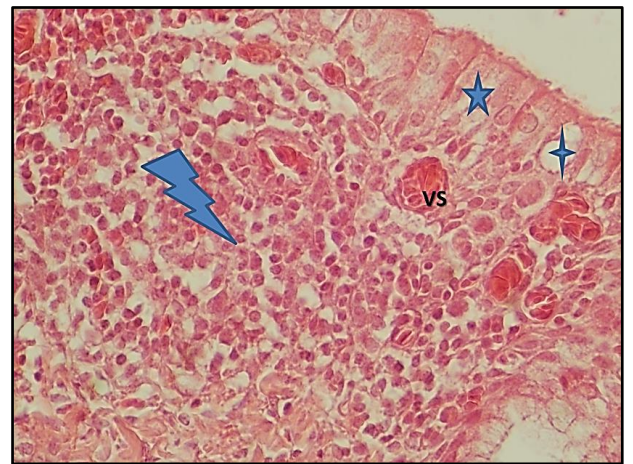


Figure n°3.72 : Hyperplasie sous muqueuse (H & E, x 400). Hyperplasie et métaplasie sous muqueuse (blitz symbole) ; congestion légère (VS) ; Bordure en brosse encore présente (étoile à 5) ; Cellule a Goblet (étoile à 4).

3.2.4.4.2 Reins :

Les figures ci-dessous montrent les lésions rénales présentes sur les coupes ainsi que leur description.

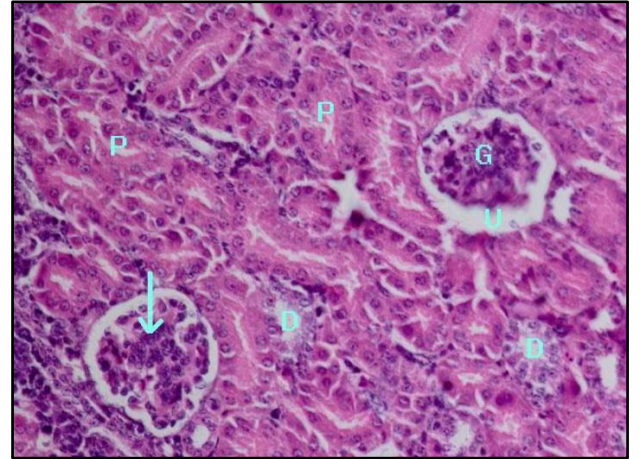
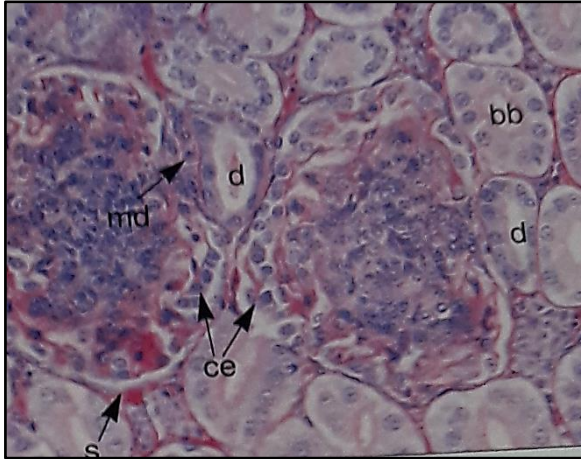


Figure n°3.73 : Rein des volailles sain (H & E, x 400). [60]

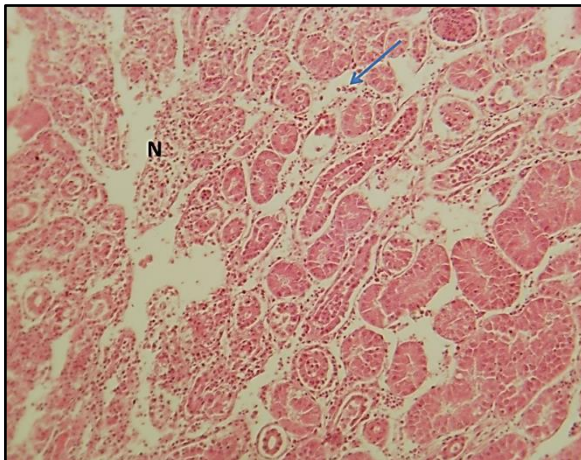


Figure n°3.74 : Nécrose tubulaire (N) et infiltration inflammatoire interstitielle (Flèche). (H & E, x 100).

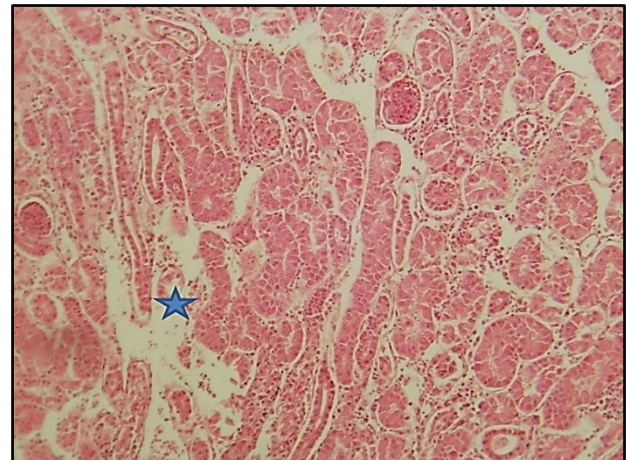


Figure n°3.75 : Nécrose tubulaire et infiltration leucocytaire (étoile). (H & E, x 100).

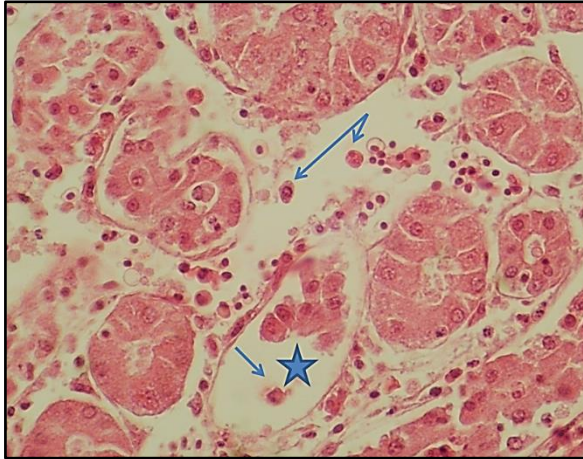


Figure n°3.76 : Nécrose tubulaire (étoile) et infiltration leucocytaire hétérophiles (flèches) (H & E, x 400).

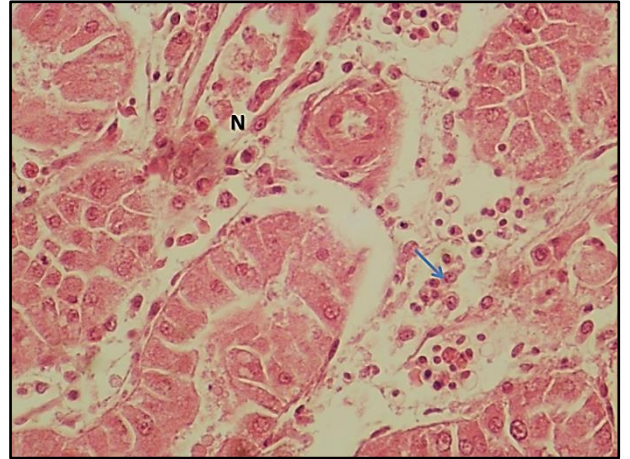


Figure n°3.77 : Nécrose tubulaire (N) et infiltration leucocytaire hétérophiles (flèches) (H & E, x 400).

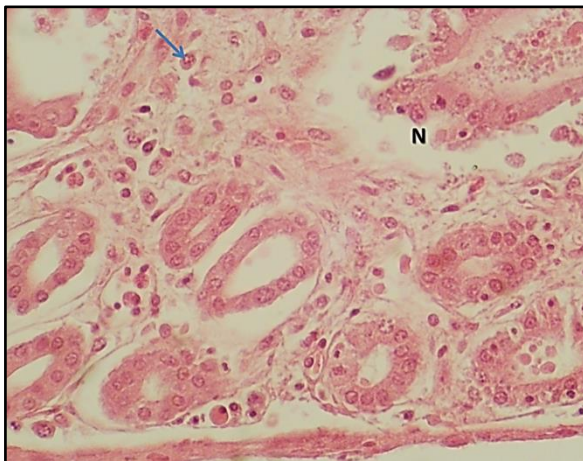


Figure n°3.78 : Nécrose tubulaire (N) et infiltration leucocytaire hétérophiles (flèches) (H & E, x 400).

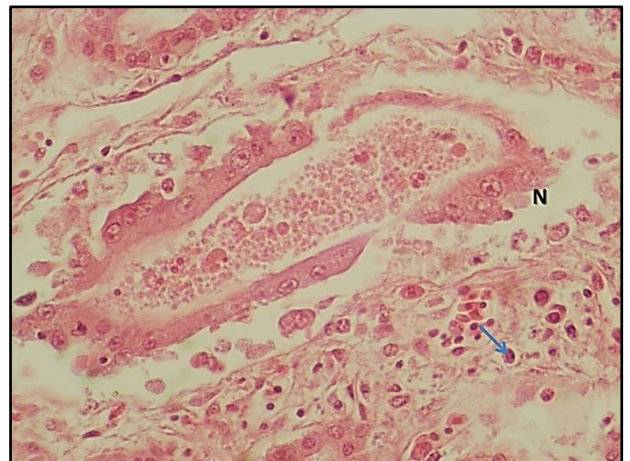


Figure n°3.79 : Nécrose tubulaire (N) et infiltration leucocytaire hétérophiles (flèches) (H & E, x 400).

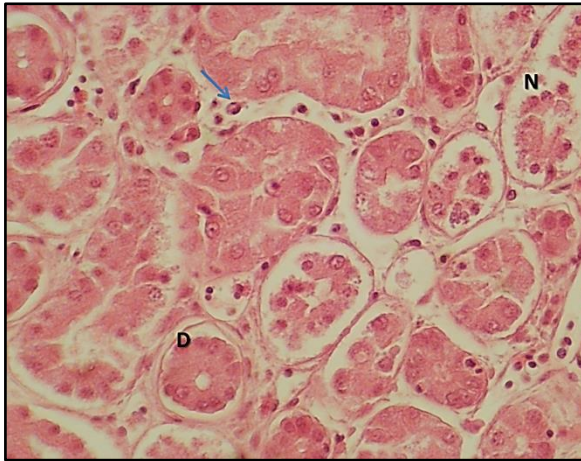


Figure n°3.80 : Nécrose tubulaire (N) ; Dégénérescence (D) et infiltration leucocytaire hétérophiles (flèches) (H & E, x 400).

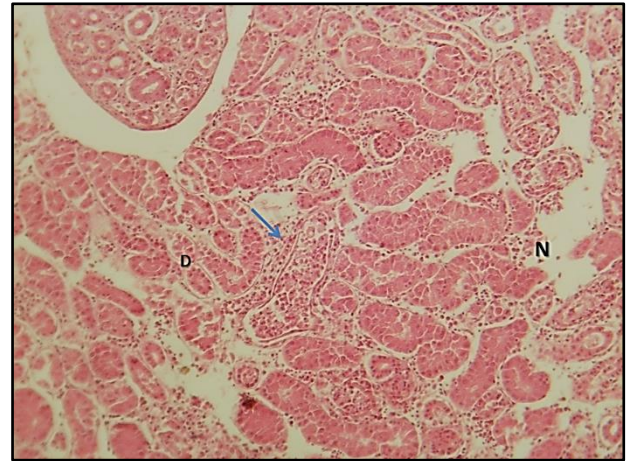


Figure n°3.81 : Nécrose tubulaire (N) ; Dégénérescence (D) et infiltration leucocytaire hétérophiles (flèches) (H & E, x 100).

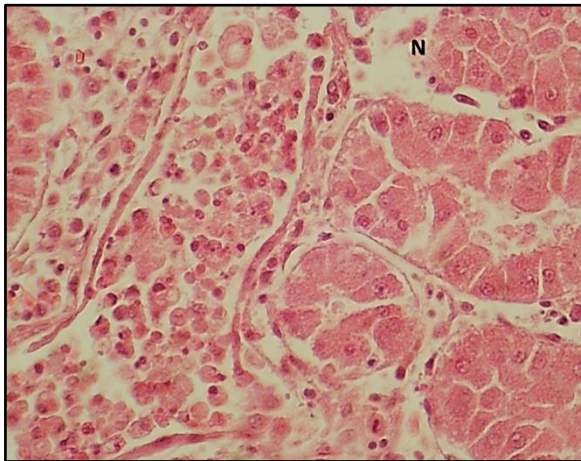


Figure n°3.82 : Nécrose tubulaire (N) (H & E, x 400).

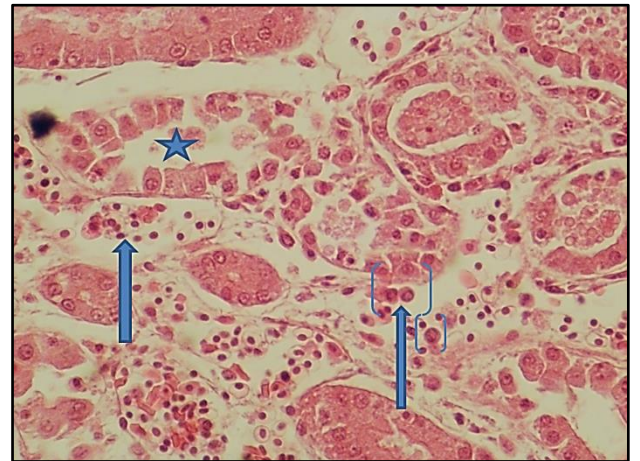


Figure n°3.83 : Nécrose tubulaire (étoile) et infiltrat inflammatoire interstitiel : Monocytes bi et mononuclées (flèches), hétérophiles (guillemets) (H & E, x 400).

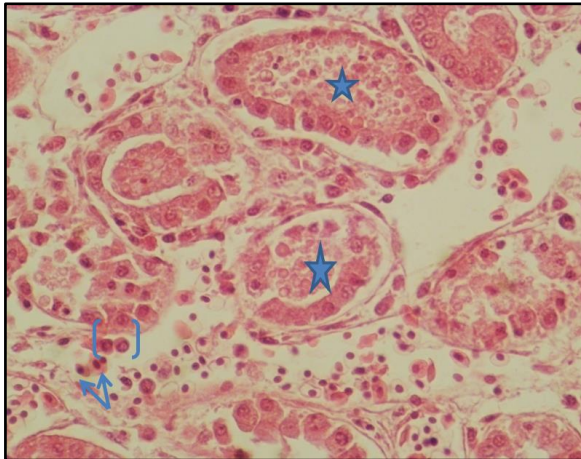


Figure n°3.84 : Nécrose tubulaire (étoile) et infiltrat inflammatoire interstitiel : Monocytes bi et mononucléés (flèches), hétérophiles (guillemets) (H & E, x 400).

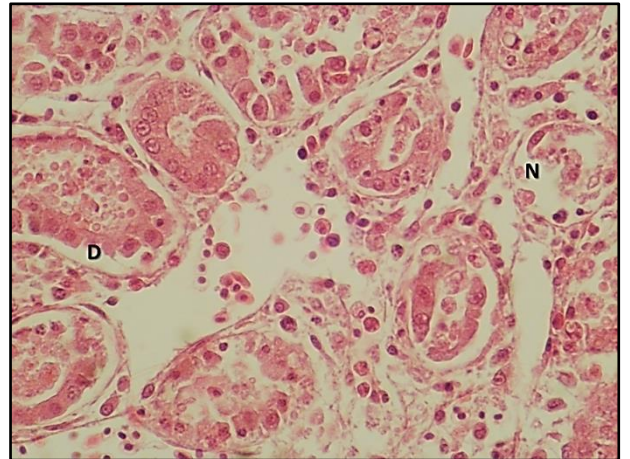


Figure n°3.85 : Dégénérescence (D) & Nécrose tubulaire (N) (H & E, x 400).

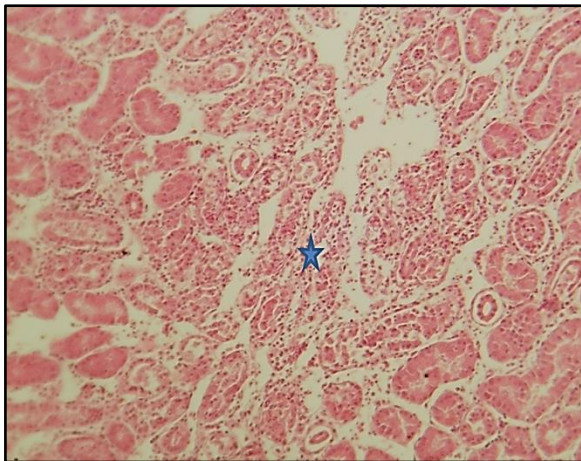


Figure n°3.86 : Plage de nécrose tubulaire (étoile) (H & E, x 100).

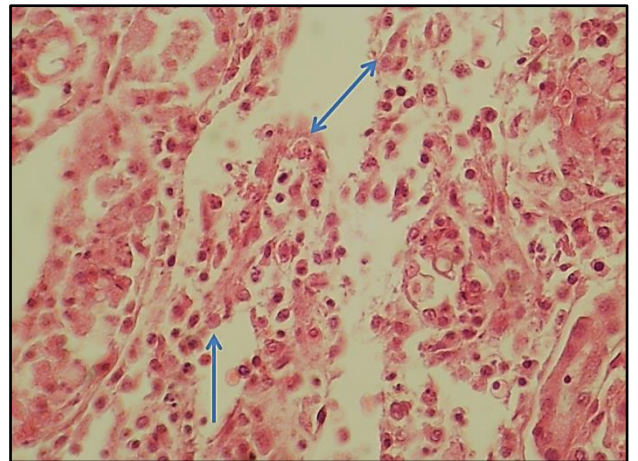


Figure n°3.87 : Nécrose tubulaire et infiltrat inflammatoire diffus (flèches) (H & E, x 400).

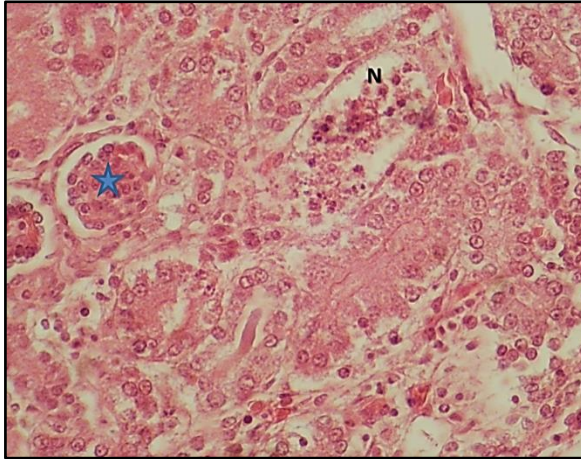


Figure n°3.88 : Nécrose tubulaire et infiltrat inflammatoire diffus (**N**) ; Glomérule (**étoile**) (H & E, x 400).

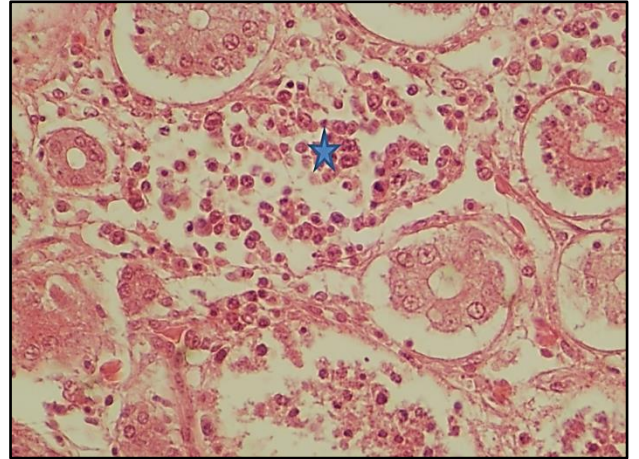


Figure n°3.89 : Nécrose tubulaire et infiltration d'hétérophiles (**étoile**) (H & E, x 400).

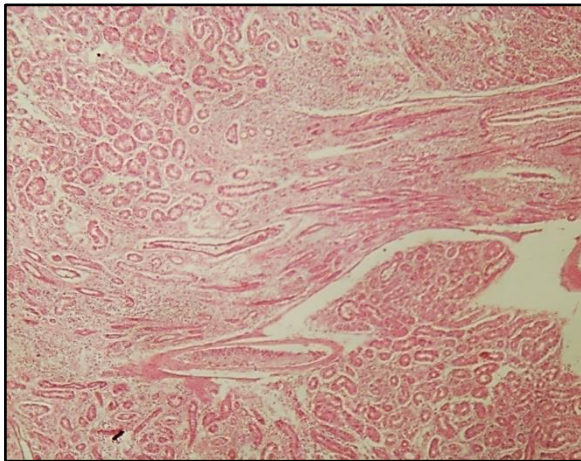


Figure n°3.90 : Plaque de nécrose diffuse (H & E, x 25).

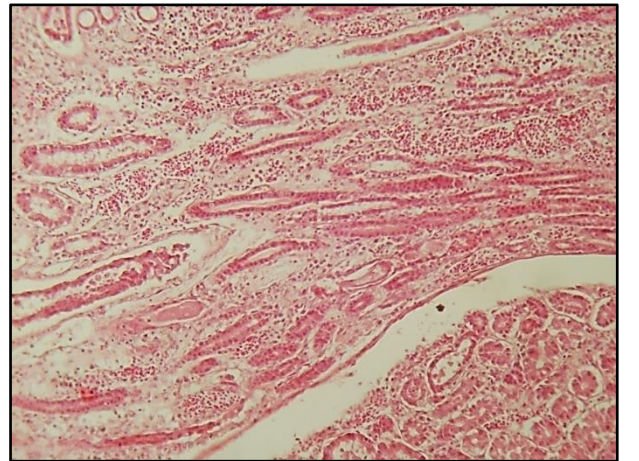


Figure n°3.91 : Plaque de nécrose diffuse (H & E, x 100).

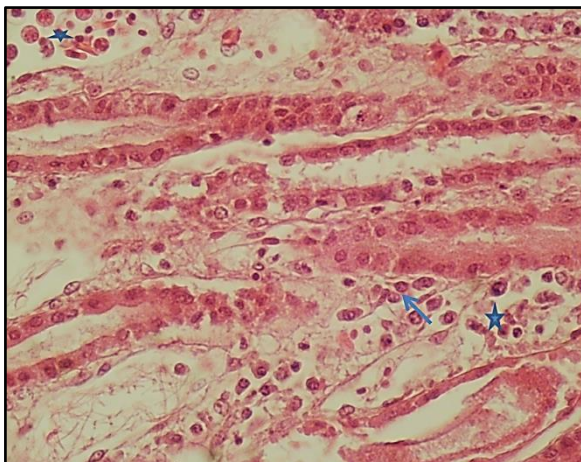


Figure n°3.92 : Nécrose tubulaire (**étoiles**) avec infiltration leucocytaire (flèche) (H & E, x 400).

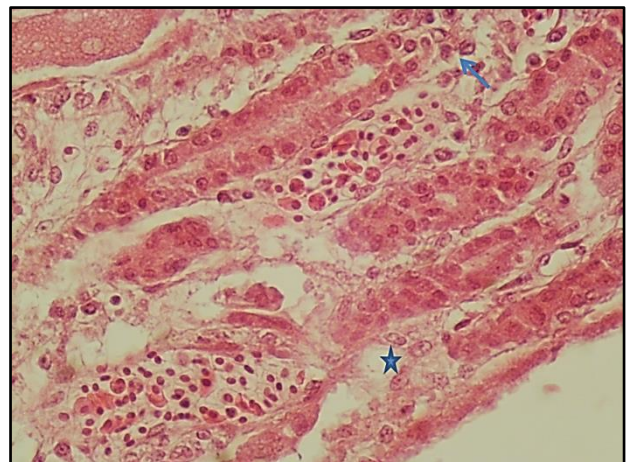


Figure n°3.93 : Nécrose tubulaire (**étoile**) avec infiltration leucocytaire (flèche) (H & E, x 400).

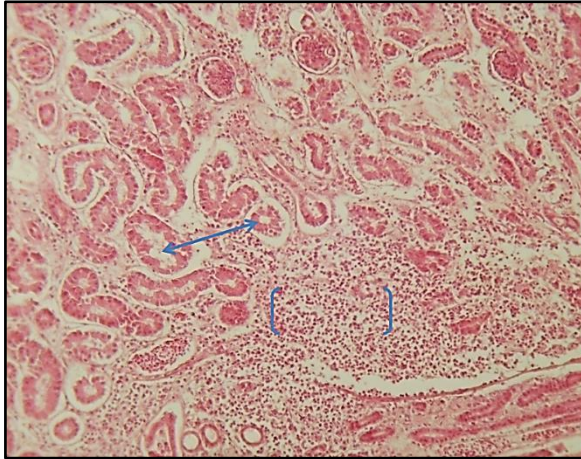


Figure n°3.94 : Nécrose tubulaire et interstitielle (**flèches**) ; infiltration leucocytaire diffuse (**guillemets**) (H & E, x 100).

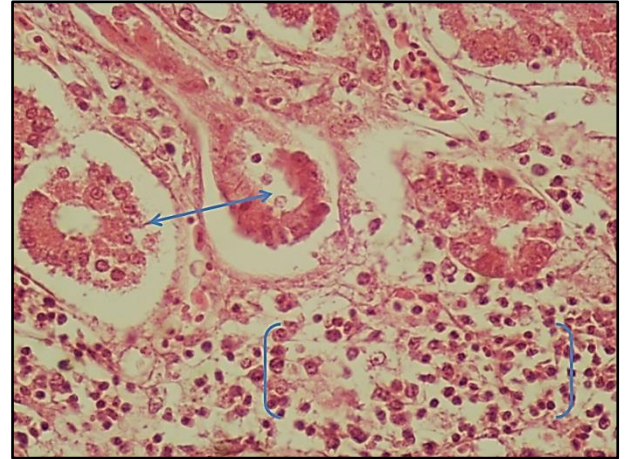


Figure n°3.95 : Nécrose tubulaire et interstitielle (**flèches**) ; infiltration leucocytaire diffuse (**guillemets**) (H & E, x 400).

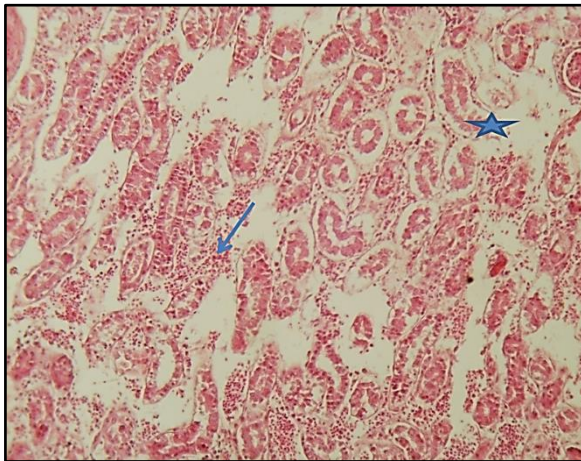


Figure n°3.96 : Nécrose tubulaire diffuse (**étoile**) et infiltrat inflammatoire interstitiel (**flèche**) (H & E, x 100).

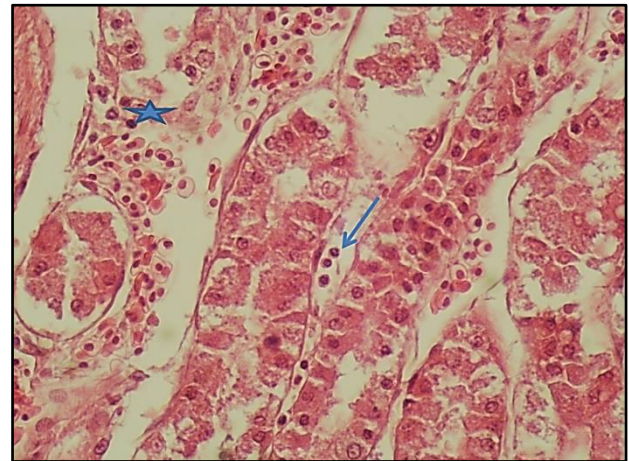


Figure n°3.97: Infiltrat inflammatoire : Monocytes (**étoile**), Hétérophiles (**flèche**) (H & E, x 400).

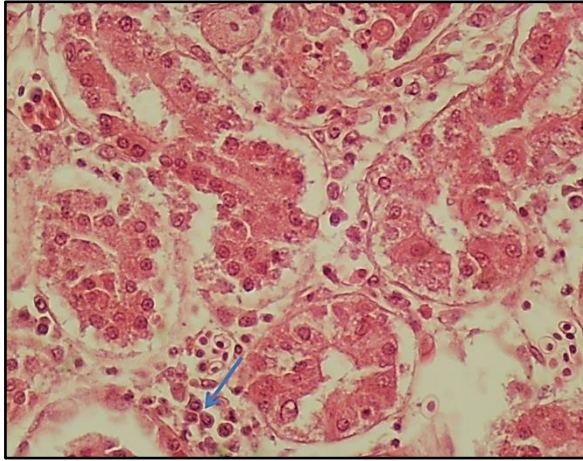


Figure n°3.98: Infiltrat inflammatoire : Hétérophiles (**flèche**) (H & E, x 400).

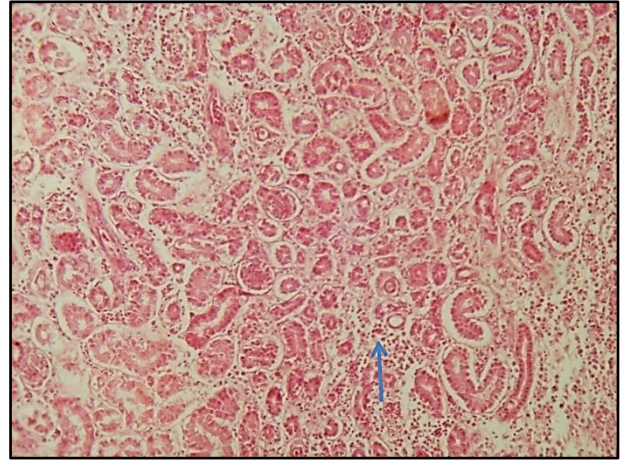


Figure n°3.99 : Infiltrat inflammatoire (**flèche**) (H & E, x 100).

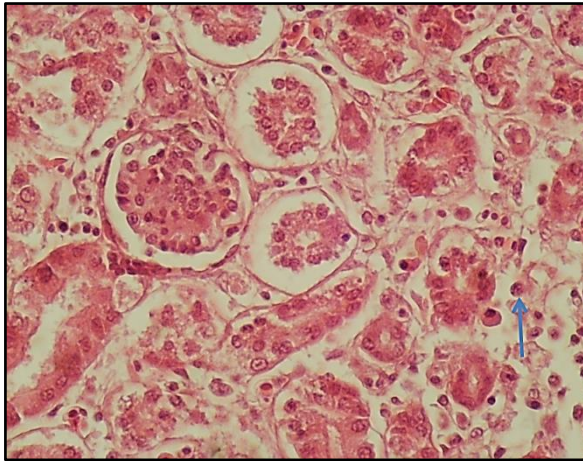


Figure n°3.100 : Infiltrat inflammatoire : Hétérophiles (**flèche**) (H & E, x 400).

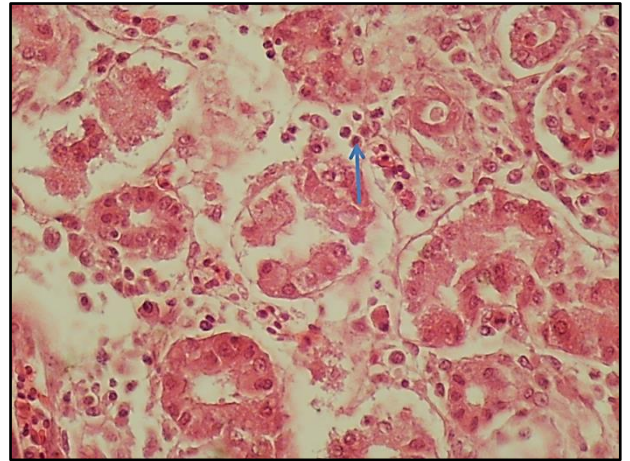


Figure n°3.101 : Infiltrat inflammatoire : Hétérophiles (**flèche**) (H & E, x 400).

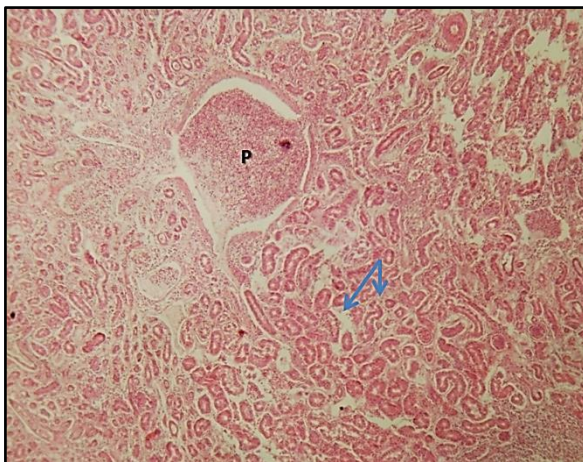


Figure n°3.102 : Néphrite purulente (P), infiltrat et nécrose tissulaire diffuse (**flèches**) (H & E, x 25).

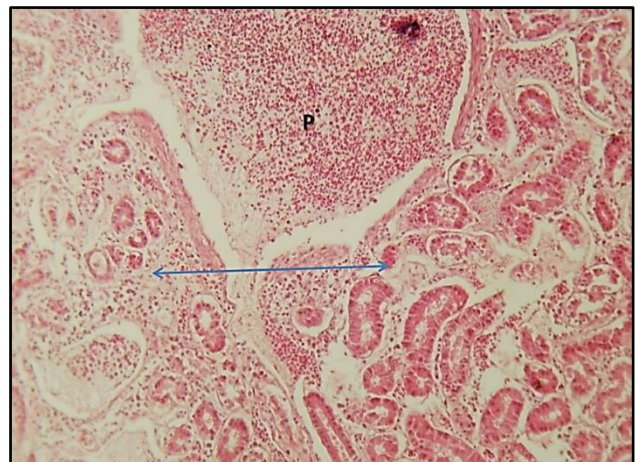


Figure n°3.103 : Néphrite purulente (P), infiltrat et nécrose tissulaire diffuse (**flèches**) (H & E, x 100).

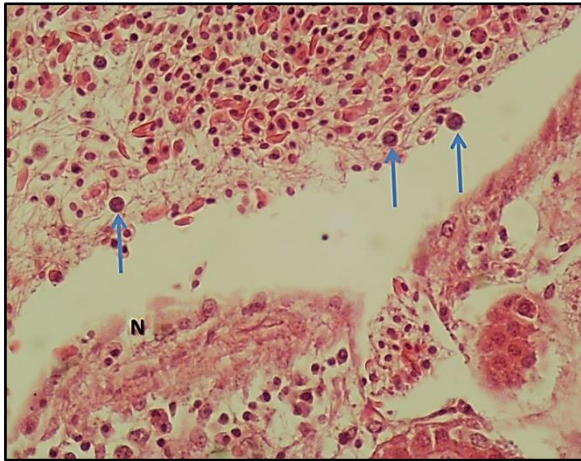


Figure n°3.104 : Nécrose tubulaire diffuse (N) et infiltration d'hétérophiles (Flèches) (H & E, x 400).

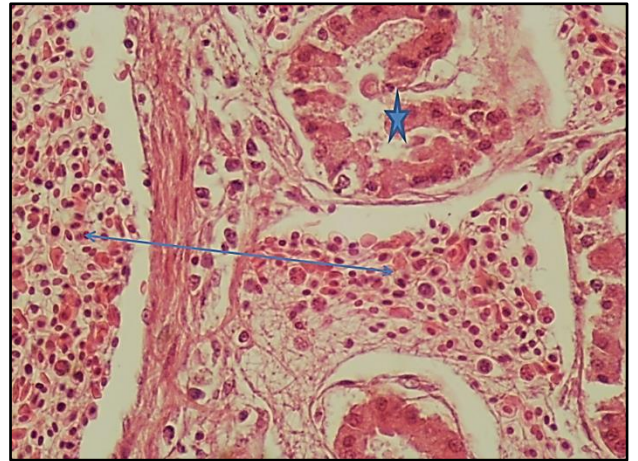


Figure n°3.105 : Néphrite tubulaire (étoile) et interstitielle (Flèches) (H & E, x 400).

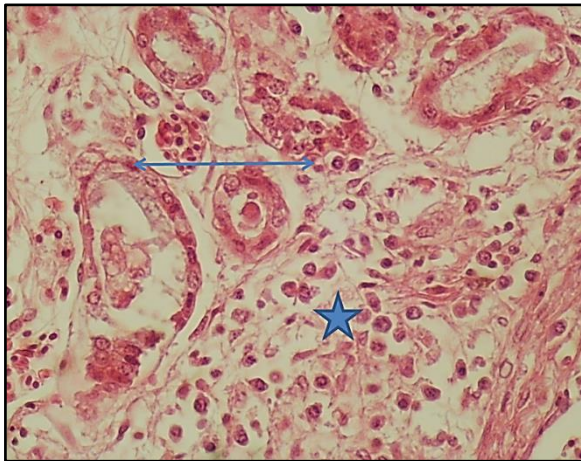


Figure n°3.106 : Infiltrat inflammatoire peritubulaire (étoile) et nécrose tubulaire (Flèches) (H & E, x 400).

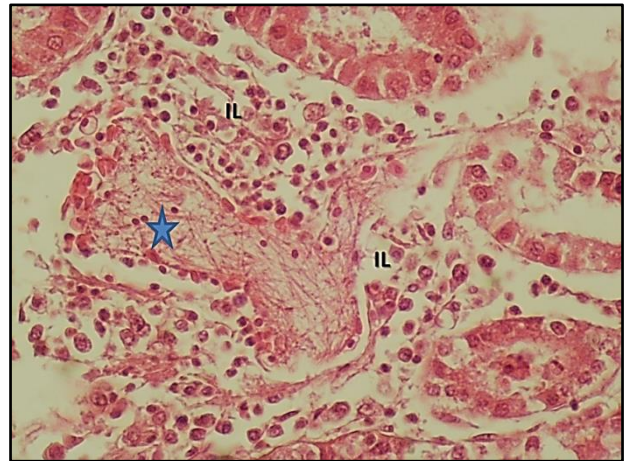


Figure n°3.107 : Nécrose tubulaire diffuse (étoile) et infiltration leucocytaire (IL) (H & E, x 400).

Le tableau ci-dessous montre les stades lésionnels des déférentes coupes

Tableau n°3.11 : Les stades lésionnels des coupes rénales et trachéales.

Elevage	Reins	stades	Trachées	Stades
E1	- Congestion et œdème -Dilatation et hypertrophie des TCP -Dégénérescence des TCP et/ou TCD -cellules inflammatoires dans les TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle	Cicatrisation	-Déciliation multifocale -Dégénérescence -Œdème -Infiltration des cellules inflammatoires -Diminution ou absence des cellules caliciformes et des cellules glandulaires	dégénératif
E2	- Congestion et œdème -Dégénérescence des TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle -Prolifération fibroblastique.	Cicatrisation	-Déciliation multifocale -Desquamation -Œdème -Infiltration des cellules inflammatoires	Inflammatoire
E3	- Congestion et œdème -Dilatation et hypertrophie des TCP et TCD -Dégénérescence des TCP et/ou TCD -cellules inflammatoires dans les TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle -Prolifération fibroblastique.	cicatrisation	-Déciliation multifocale -Desquamation -Dégénérescence -Œdème -Infiltration des cellules inflammatoires -Diminution ou absence des cellules caliciformes et des cellules glandulaires.	dégénératif
E4	- Congestion et œdème -Dégénérescence des TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle	Dégénératif	-Déciliation multifocale -Desquamation -Œdème -Infiltration des cellules inflammatoires -Diminution ou absence des cellules caliciformes et des cellules glandulaires.	Dégénératif
E5	- Congestion et œdème -Dégénérescence des TCP et/ou TCD	dégénératif	-Déciliation multifocale -Dégénérescence -Desquamation -Œdème	Dégénératif

	-cellules inflammatoires dans les TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle		-Infiltration des cellules inflammatoires -Diminution ou absence des cellules caliciformes et des cellules glandulaires.	
E6	- Congestion et œdème -Dégénérescence des TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle	Dégénératif	-Déciliation focale -Dégénérescence	Dégénératif
E7	- Congestion et œdème -Dilatation et hypertrophie des TCP et TCD -cellules inflammatoires dans les TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle	inflammatoire	-Déciliation focale -Dégénérescence -Œdème -Infiltration des cellules inflammatoires	Inflammatoire
E8	- Congestion et œdème -Dilatation et hypertrophie des TCP et TCD -cellules inflammatoires dans les TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle	inflammatoire	-Déciliation multifocale -Œdème -Infiltration des cellules inflammatoires -Diminution ou absence des cellules caliciformes et des cellules glandulaires	Dégénératif
E9	-Dégénérescence des TCP et/ou TCD -cellules inflammatoires dans les TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle	dégénératif	-Déciliation multifocale -Desquamation -Dégénérescence -Diminution ou absence des cellules caliciformes et des cellules glandulaires	Dégénératif
E10	- Congestion et œdème -Dilatation et hypertrophie des TCP et TCD -cellules inflammatoires dans les TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle	Cicatrisation	-Déciliation multifocale -Dégénérescence -Diminution ou absence des cellules caliciformes et des cellules glandulaires	Dégénératif

	-Prolifération fibroblastique.			
E11	- Congestion et œdème -Dilatation et hypertrophie des TCD -cellules inflammatoires dans les TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle	inflammatoire	-Déciliation multifocale -Hyperplasie des cellules épithéliales -Dégénérescence -Desquamation -Œdème -Infiltration des cellules inflammatoires -Diminution ou absence des cellules caliciformes et des cellules glandulaires	Dégénératif
E12	- Congestion et œdème -Dégénérescence des TCP et/ou TCD -cellules inflammatoires dans les TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle	inflammatoire	-Déciliation multifocale -Hyperplasie des cellules épithéliales -Dégénérescence -Œdème -Infiltration des cellules inflammatoires	Régénératif
E13	- Congestion et œdème -Dégénérescence des TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle	Dégénératif	-Déciliation multifocale -Dégénérescence -Desquamation -Œdème -Infiltration des cellules inflammatoires	Dégénératif
E14	-cellules inflammatoires dans les TCP et/ou TCD -Inflammation interstitielle	inflammatoire	-Déciliation multifocale -Dégénérescence -Œdème -Infiltration des cellules inflammatoires	Inflammatoire

3.2.5 Discussion :

3.2.5.1 Discussion des résultats sérologique et de la RT-PCR :

En dépit de l'émergence mondiale et l'augmentation de sa prévalence, la bronchite infectieuse avait un effet dévastateur dans les élevages de poulet de chair [167, 168]. Suite aux taux très élevés des mutations et recombinaisons dans les coronavirus, nouveaux sérotypes et génotypes d'IBV émergent fréquemment et ont été rapportés dans différentes régions dans le monde entier [167]. Très

récemment, l'IBV a été associé aux néphrites ce qui est considéré comme un problème majeur mondialement dans les élevages de poulet de chair [169, 170, 171]. La même condition a été rapportée en Algérie mais aucune étude n'a été conduite récemment dans les néphrites associées à l'IBV [172].

La présente étude a été menée pour investiguer la présence d'IBV dans les élevages de poulet de chair et son implication dans les affections rénales. Nous avons, aussi, effectué un monitoring sérologique des différents sérotypes d'IBV par le test IHA et analyser les caractéristiques phylogénétique par séquençage de la nouvelle souche d'IBV isolée en Algérie. Le test IHA et le test de neutralisation virale (VNT) sont les tests les plus fréquemment utilisés pour détecter les anticorps d'IBV [80, 173]. Des études ont montré des réactions croisées entre les sérotypes d'IBV détectés par le test IHA, et une similitude d'antigenicité détectée par le VNT et le test IHA [174, 175, 176]. Néanmoins, du moment où le VNT est coûteux pour l'examen de routine, le test IHA est communément utilisé dans la sérologie de routine [177].

Les sérotypes d'IBV les plus fréquemment détectés dans les élevages de poulet de chair souffrant de néphrites sont IB-QX (100%) et IB 4/91 (60%), qui ont été détectés pour la première fois en Algérie par notre équipe. Après la découverte de la forme néphropathogène d'IBV [178], les sérotypes sus-cités ont été rapportés en Chine, Europe et Afrique et ont été associés avec des affections rénales sévères, des morbidités élevées et de mortalité dans des élevages vaccinés. A présent, ces sérotypes sont les souches sauvages les plus prédominantes dans la plupart des fermes de poulets à travers le monde [7, 168]. L'analyse sérologique a montré significativement des titres d'IB4/91 très faibles par rapport à ceux d'IB-QX, ce qui pourrait être due à la vaccination de certains élevages par la souche IB 4/91. De Wit (2000) [80], a rapporté que plusieurs facteurs influencent le taux d'anticorps d'IBV, parmi eux le plus critique est la présence de l'immunité au moment de l'infection. Ceci est consistant avec les titres d'anticorps anti-IB 4/91 les plus bas observés dans les élevages vaccinés comparés de ceux non vaccinés. Un autre facteur pourrait diminuer la sensibilité de l'HI test et pourrait affecter l'interprétation des résultats est la réaction croisée entre les différents sérotypes, spécialement quand plusieurs sérotypes d'IBV sont impliqués. Nous avons détecté des réactions croisées entre les sérotypes QX et 4/91 dans plusieurs élevages, de même des

infections mixtes de trois sérotypes (QX, 4/91 and M41) ont été, aussi, observées dans 4 élevages. Nous signalons aussi, que la spécificité du test IHA aux sérotypes d'IBV est réduite après réinfection ou vaccination, spécialement quand le sérotype utilisé est hétérologue [80].

La protéine S1 d'IBV détermine le génotype, sérotype et phénotype des virus de la bronchite infectieuse aviaire [179]. Le gène S1 de la souche sauvage IBDZ13a a été plus proche de celui de la souche IB 4/91 (**Figure n°3.45**) selon les critères déterminés par Worthington et al. [168] et Ganapathy *et al.* [180], qui ont classifié les séquences d'IBV de moins de 99% d'homologie avec les souches vaccinales comme variants. Notre découverte indique la circulation des souches virulentes d'IB 4/91, qui a été devenu le génotype prédominant en Afrique, Asie et Europe [7]. D'autre part, nous n'avons pas constaté une forte corrélation entre les résultats de HI test montrant la circulation des sérotypes IB-QX et IB 4/91, et ceux de la RT-PCR montrant l'émergence d'un nouvel génotype de la souche IB 4/91. Ces résultats sont cohérents avec les découvertes de Kusters et al. [181] qui a rapporté que les résultats du HI Test et RT-PCR n'étaient pas exactement corrélés, où différents sérotypes ont montrés des différences considérables (20-50%) dans les séquences d'acides aminés de la sous-unité S1. HI Test est utilisé en routine pour tester les sérums des jeunes poulets afin de déterminer le statut d'anticorps spécifique au sérotype d'un élevage [182]. Cependant, la présence de plusieurs anticorps à réaction croisée dirigés contre des souches antigéniquement non apparentées, comme a été souvent observé lors des manifestations clinique de BI, diminue la valeur sérodiagnostic du HI test. Pour cette raison, la combinaison entre sérotypage et génotypage est fortement recommandée afin d'identifier les souches sauvages. Fondé sur les résultats du HI Test et RT-PCR, nous concluons que le IBDZ13a variant d'IB 4/91 est impliqué dans les affections rénales des élevages de poulet de chair de l'étude.

Quand les vaccins d'IBV vivant atténué et inactivé ont été introduits pour la première fois ils ont été efficaces dans le contrôle de la maladie dans les élevages aviaires [5]. Cependant, ces dernières années, des élevages de poulet vaccinés dans plusieurs régions Algériennes ont montré des mortalités et des pertes économiques considérables. L'isolement de la nouvelle souche d'IBV (IBDZ13a) à partir des élevages de poulet vaccinés et non vaccinés pourrait être expliqué par

deux hypothèses. La première hypothèse, basée sur les mutations et les recombinaisons d'acides aminés dans l'épitope S1, c'est que la souche d'IBV progresse pour échapper à la réponse immunitaire de l'hôte générée par les vaccins actuels [14]. Cependant, cette hypothèse est faible puisque les changements d'acides aminés ne se traduisent pas toujours en différences dans l'antigenicité ou dans la fonction biologique. De plus, les données de la séquence fournissent seulement des informations sur la structure primaire de la protéine et non pas celles de la structure secondaire et tertiaire qui sont vitales pour sa fonction biologique et son antigenicité [80]. La seconde hypothèse est l'échec d'adaptation des programmes de vaccinations aux souches sauvages d'IBV circulantes dans les élevages des poulets. Dans notre étude, seulement deux élevages ont reçu le vaccin IB Ma5 (à J7) combiné au vaccin IB 4/91 (à J14). L'échec de protection des poulets contre les affections rénales pourrait être aussi dû au court intervalle de 7 jours entre les deux vaccinations. Terregino et al. [183] ont démontré une protection prouvée contre plusieurs sérotypes d'IBV en vaccinant par deux vaccins antigéniquement différents donnés avec un intervalle de 14 jours. Cette approche obvie au besoin de développer de nouveaux vaccins d'IBV pour chaque nouveau sérotype qui émerge. En fin, un seul élevage a été vacciné avec la souche H120 ce qui, toutefois, est insuffisant pour produire une protection contre l'infection à l'IBV [5, 184].

3.2.5.2 Discussion des résultats histopathologiques :

3.2.5.2.1 Au niveau trachéal :

Les souches de l'IBV ont une affinité pour les voies respiratoires des poussins. Les caractéristiques et le développement chronologique des lésions observées étaient d'accord avec les résultats des expériences précédentes (Purcell et McFerran, 1972; Nakamura et al, 1991.; Owen et al, 1991.; Chen et al, 1996.; Kotani et al, 2000.; Chousalkar et al., 2007). En dépit de la gravité des lésions dans la muqueuse de la trachée.

Dans l'histopathologie trachéale ; Les lésions débutent dans tous les cas par une phase des réactions inflammatoires aiguës qui peut varier en fonction de l'agent pathogène. Dans les maladies virales, des lésions épithéliales caractéristiques

permettent d'identifier l'agent causal et d'exclure les mycoplasmes qui n'induisent aucune lésion épithéliale spécifique.

Nous avons constaté une réaction inflammatoire caractérisée par une Déciliation (100%), des dégénérescences vacuolaires de quelque cellules épithéliales (81%), une desquamation (59%), diminution du nombre des cellules caliciformes et des glandes (63%) avec un œdème, une congestion et une infiltration des hétérophiles dans la lamina propria (72%).

Après la réaction inflammatoire, nous avons observé une hyperplasie de l'épithélium mucosale (20%), une infiltration des hétérophiles, des lymphocytes et un faible nombre de macrophages dans la lamina propria, absence des cellules caliciformes et les glandes alvéolaires à mucus (63%). Ce qui est d'accord avec les résultats de Hofstadt (1945), Jungherret al (1956), Köhler (1960), Garside (1965) et Mayor (1968) qui considèrent que la lésion caractéristique de la bronchite infectieuse consiste en une infiltration lymphohistiocytaire diffuse et massive des lamina propria et des sous-muqueuses. Mais Macdonald et Mac Martin (1970), van der Heide (1971), Timms (1972) et Springer *et al.*, (1974) considèrent que l'hyperplasie épithéliale, observée dans la maladie expérimentale durant la semaine qui suit l'inoculation, est la lésion caractéristique. Elle constitue le critère essentiel du diagnostic histologique de la bronchite infectieuse.

3.2.5.2.2 Au niveau rénal :

Les changements histopathologiques présentés dans notre étude indiquent que l'IBV pourrait être un virus néphropathogénique (NIBV). Les lésions rénales observées sont la dégénérescence tubulaire (65%), la congestion et l'œdème (88%), l'infiltration des cellulaires inflammatoires dans le tissu interstitiel (de néphrite interstitielle ducto-tubulaire) (100%) et dans la lumière tubulaire (61%), la dilatation et l'hypertrophie tubulaire (40%) et la prolifération fibroblastique (46%). Ces résultats corroborent avec les travaux précédents ou les lésions observées sont similaires (Albassam et al 1985, Capoue et al 1999, Chen et al 1996, Chong et al 1982, Dhinakar et al 1996, Julian et al 1996, Purcell et al 1976, 1981 Siller, Winterfield et al 1984).

Nos résultats suggèrent que, en plus d'être néphropathogène, l'IBV a une capacité à produire une pathologie sévère dans la trachée ce qui a été démontré dans l'étude de (Cumming, 1962; 1988) et (Ignjatovic et al. 2002) sur certaines souches d'IBV.

3.2.6 Conclusion :

Nous avons pu identifier une nouvelle souche IBDZ13a, un variant d'IB 4/91 néphropathogène et ceci pour la première fois dans les élevages Algériens de poulet de chair. Son isolement à partir des élevages vaccinés indique une faible protection des poulets contre les nouveaux variants de la bronchite infectieuse générée par les programmes de vaccinations actuels. D'autres études sont nécessaires pour expliquer l'échec des vaccins actuels contre la nouvelle souche IB 4/91 et d'investiguer la protection croisée et la pathogénicité du nouveau génotype IBDZ13a.

Le diagnostic histopathologique des affections respiratoires particulièrement la bronchite infectieuse repose sur la coexistence dans la trachée, durant les dix premiers jours de l'infection, de réactions inflammatoires aiguës, d'une forte hyperplasie épithéliale et d'une infiltration lymphohistiocytaire relativement discrète.

Le diagnostic histopathologique montre l'importance de la BI dans l'apparition des affections respiratoire et rénales et sont gravité sur la trachée et les reins ; ceci malgré la vaccination largement pratiquée en élevages. Les programmes de vaccination pratiqués semblent fournir une protection homologue et sont loin de fournir une protection hétérologue.

CONCLUSION GENERALE

La présente étude pratique qui fait l'objet de cette thèse a été réalisée en réponse à une problématique émergente d'affections rénales en élevage de poulet de chair où les variants du virus de la bronchite infectieuse demeure la cause la plus probable. Ces variants viraux constituent une problématique d'actualité pour les vétérinaires avicoles Algériens, et leur gestion implique appui médical et rigueur sanitaire.

L'enquête descriptive menée par questionnaire montre l'importance des affections rénales en élevages avicoles, qui sont très répandues. Il s'agit d'une entité pathologique très fréquente en élevage de poulet de chair. Elle est associée dans la majorité des cas avec d'autres symptômes (Digestives, respiratoires, locomoteurs) et de la mortalité. son diagnostic clinique est difficile dans la plupart des cas suspectés. En effet les symptômes observés ne sont pas pathognomoniques et les étiologies suspectées sont très variées (virale, toxicité médicamenteuse, bactérienne, l'alimentation) ce qui pourrait être expliqué par l'implication des affections rénales de causes multiples.

L'étude sérologique conduite par IHA présente des preuves que les variants d'IBV sont répondus dans les élevages de poulet de chair souffrant d'affections rénales. Cette étude sérologique met en évidence la prédominance des sérotypes QX et IB 4/91 .

Nos résultats de la RT-PCR et séquençage fournissent la preuve d'un nouveau génotype émergent en Algérie et ceci pour la première fois dans les élevages algériens de poulet de chair. Nous l'avons appelé IBDZ13a en fonction du lieu où il a été trouvé. Il a, aussi, été démontré que le variant algérien d'IBV (génotype IBDZ13a) a présenté un changement dans les séquences d'acides aminées du gène S1 par rapport à la souche vaccinale IB 4/91 ce qui pourrait être associé à la survenue de la maladie clinique dans les élevages vaccinés.

L'étude histopathologique montre l'importance de la BI dans l'apparition des affections rénales, sa gravité sur la trachée et les reins et a confirmé la présence des lésions microscopiques pathognomoniques de la bronchite infectieuse au niveau trachéale et rénale. Ces lésions comprennent, au niveau trachéale une réaction inflammatoire caractérisée par une déciliation, des dégénérescences vacuolaires de quelques cellules épithéliales, une congestion et une infiltration des hétérophiles dans la lamina propria. Les lésions rénales observées sont essentiellement l'infiltration des cellules inflammatoires dans le tissu interstitiel (néphrite interstitielle ducto-tubulaire) et dans la lumière tubulaire, la dégénérescence tubulaire, la congestion et l'œdème.

L'étude réalisée ici a permis non seulement de clarifier les affections rénales et l'implication des variants viraux de la bronchite infectieuse mais aussi d'en proposer des solutions de prévention, *via* la modulation de la vaccination. Les résultats obtenus permettent d'affirmer que les protocoles de vaccination utilisés dans les élevages de l'étude sont classiques (Mass) génèrent une faible protection contre le nouveau variant de la bronchite infectieuse (IBDZ13a), et qu'un protocole impliquant le variant vaccinal IB 4/91 dans le bon moment pourrait améliorer encore cette protection.

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

Au terme de ce travail nous avons tiré certaines recommandations que nous avons partagées en plusieurs volets :

- ✚ Sur le plan épidémiologique, se focaliser sur la détermination de la prévalence réelle de la BI dans les élevages avicoles paraît nécessaire.
- ✚ Continuer l'investigation virologique et sérologique de la nouvelle souche virale IBDZ13a par isolement et identification sur culture cellulaire ou œufs embryonnés.
- ✚ Mettre en évidence le pouvoir pathogène de la nouvelle souche virale IBDZ13a au laboratoire par des essais cliniques.
- ✚ Evaluer la réponse immunitaire générée contre la nouvelle souche IBDZ13a par des essais de vaccination.

APPENDICE A

LISTE DES ABREVIATIONS

- + IBV : Le virus de la Bronchite infectieuse
- + BI : Bronchite infectieuse
- + ARN : Acide ribonucléique
- + PCR : Polymerase Chain Reaction
- + RT-PCR : Revers Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
- + Mass : Massachusetts
- + MHV : Virus de l'hépatite de souris
- + LTC : Lymphocyte T Cytotoxique
- + VN : Virus neutralisation
- + IgG : Immunoglobuline G
- + IgM : Immunoglobuline M
- + ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay
- + AOM : Anticorps d'origine maternels
- + E.coli : Escherichia coli
- + IM : Intramusculaire
- + ARK : Arkansas
- + Conn : Connecticut
- + C.A.T : Conduit à tenir
- + Ca/P : Calcium/Phosphore
- + PC : Poulets de chair
- + PFP : Poulettes future pondeuses
- + FRC : Future reproducteurs chair
- + TRT : Traitement
- + IBD : Maladie de Gumboro
- + ATB : Antibiotique
- + AI : Anti-inflammatoire

APPENDICE B

QUESTIONNAIRE

Dans le cadre d'une thèse de doctorat, nous souhaitons effectuer une enquête de terrain sur les affections rénales en élevage aviaire.

1. Nom du vétérinaire :

2. Région d'activité :

3. Vous exercez depuis quand :

4. Vous faites des suivis d'élevages avicoles : Oui ☐ Non ☐

5. Si oui combien :

* Moins de 5 élevages ☐

* Entre 5 et 10 élevages ☐

* Plus de 10 élevages ☐

6. Est-ce que vous avez observé des signes d'une atteinte rénale au niveau des élevages suivis?

Oui ☐ Non ☐

7. Est-ce que l'atteinte rénale est associée avec d'autres symptômes ?

Oui ☐ Non ☐

8. Si oui, lesquels ?

* Respiratoires ☐

* Nerveux ☐

* Digestifs ☐

* Autres :

* Génitaux ☐

9. Est-ce que ces atteintes rénales sont accompagnées de mortalité ?

Oui ☐ Non ☐ si oui, quel est le taux de mortalité ? %.

10. A quoi sont dues, d'après vous, ces atteintes rénales ?

* Maladies virales ☐

* Alimentaire (Ca/P) ☐

* Maladies bactériennes ☐

* Médicamenteuse ☐

* Maladies fongiques ☐

* Autres :
.....

11. Si la cause est virale quelles sont, d'après vous, les pathologies suspectées ?

- * *Bronchite infectieuse (IB)* ☐ * *Maladie de MAREK* ☐
 * *Maladie de Gumboro (IBD)* ☐ * *Autres :*

12. Si la cause est la BI, quelles sont les raisons de cette manifestation ?

- * *Echec vaccinal* ☐
 * *Souche vaccinale non adaptée* ☐
 * *Programme vaccinal non adapté* ☐
 * *Autres :*

13. Pouvez-vous nous donner le programme vaccinal de PC, PP, RC :

	Date de vaccination	Nom du vaccin
Poulet de chair	- Primo-vaccination :..... - Rappels :.....	
Repro-chair, poule pondeuse	- Primo-vaccination :..... - Rappels :.....	

14. Dans les élevages présentant des affections rénales, est-ce que vous avez réalisé des analyses de :

Eau :

Aliment :

- | | | |
|---|---|---|
| * <i>Physico-chimiques</i> ☐ | | * <i>Physico-chimiques</i> ☐ |
| * <i>Bactériologiques</i> ☐ | ↓ | * <i>Bactériologiques</i> ☐ |

15. Dans quel type d'élevage cette maladie est-elle plus fréquente ?

- * *Poulet de chair* ☐
 * *Repro-chair* ☐
 * *Poule pondeuse* ☐

16. Dans quelle période d'élevage cette maladie est-elle plus fréquente ?

Poulet de chair :		Repro-chair, poule pondeuse :	
* Démarrage (1-15 jours)	☐	* Période d'élevage (1-18 semaines)	☐
* Croissance (16-42 jours)	☐	* Période pré-ponte (19-22 semaines)	☐
* Finition (43 à l'abattage)	☐	* Début de ponte (23-28 semaines)	☐
		* Pic de ponte (29-42 semaines)	☐
		* Phase descendante et fin de production (43 semaines à la réforme)	☐

17. Dans quelle taille d'élevage cette maladie est-elle plus fréquente ?

Poulet de chair :		Repro-chair		Poule pondeuse	
*Moins de 3000 sujets	☐	*Moins de 3000 sujets	☐	*Moins de 4800 sujets	☐
*Entre 3000 et 5000 sujets	☐	*Entre 3000 et 5000 sujets	☐	*Entre 4800 et 10000 sujets	☐
*Plus de 5000 sujets	☐	*Plus de 5000 sujets	☐	*Plus de 10000 sujets	☐

18. Dans quelle saison et mode d'élevage cette maladie est-elle plus fréquente ?

Saison :		Mode d'élevage :	
* Automne	☐	* Traditionnel	☐
* Hiver	☐	* Moderne	☐
* Printemps	☐		
* Eté	☐		

19. Lors d'atteinte rénale, le diagnostic est basé sur :

* Clinique (symptômes + lésions)	☐
* Diagnostic du laboratoire	☐

20. En cas d'affections rénales, quelle est votre C.A.T ?

.....

.....

.....

21. Quel était le résultat de votre traitement sur :

<i>Mortalité :</i>		<i>Signes cliniques :</i>		<i>Performances zootechniques :</i>	
*Baisse notable de la mortalité	☐	*Amélioration des signes cliniques	☐	*Amélioration du taux de ponte	☐
*Aucun effet	☐	*Persistance des signes cliniques	☐	*Amélioration du poids vif	☐
				*Aucun effet	☐

APPENDICE C

Fiche de prélèvement**I. Informations générales :**

1. Nom du vétérinaire :
2. Date de prélèvement :/...../2013.
2. Lieu de prélèvement :

II. Renseignements concernant l'élevage :

1. Type d'élevage :

* *reproducteur chair* ☐* *poule pondeuse* ☐* *poulet de chair* ☐

2. Age de la bande :

3. Effectif dans le Bâtiment :

4. Souche de poule ou poulet :

5. Historique de la vaccination contre la BI :

* *Primo-vaccination* : Oui ☐ Non ☐* *Rappels* : Oui ☐ Non ☐ si oui, Nombre de rappels :* *Types de vaccins utilisés* : *Mass ☐ *Variants ☐* *si le vaccin utilisé est de type variant, précisez le nom du vaccin* :
.....**III. Renseignements cliniques :**

1. Date d'apparition de l'épisode clinique :/...../2013.

2. Signes cliniques (symptômes + lésions) :

* *Respiratoires* ☐* *Digestifs* ☐* *Rénaux* ☐* *Génitaux* ☐

3. Mortalité :

4. Suspicion du vétérinaire :

5. Traitement préconisé :

APPENDICE D

PROCEDURE TECHNIQUE DU TEST IHA

The FLOCKSCREEN IB-HI Kit

The Disease Syndrome

Infectious bronchitis infections occur globally in commercial poultry production systems. The causative agent is a RNA virus belonging to the family *Coronaviridae*. Infection compromises the health and welfare of affected stock and often leads to severe economic losses through poor egg production, increased mortality, and elevated condemnations at slaughter.

Infectious bronchitis viruses have been classified into a series of serotypes or genotypes determined by the characteristics of the viral S protein. This classification covers a very large number of viruses on a global scale with novel viruses emerging constantly. Some of the most economically significant serotypes described in Europe are: M41, D1466, D274, 4/91, Italian 02 and Chinese QX. These isolates are capable of causing an array of pathologies in susceptible birds ranging from mild to severe respiratory signs, digestive disturbances, depression and egg related pathologies (ranging from shell and embryo mortality to production drops to classical blind layers unable to produce eggs due to the absence of a functional oviduct following infection of the immunologically naive animal in early life). Appropriate diagnosis and the optimisation of vaccination programmes are therefore essential if optimal flock health, welfare and economic production are to be maintained.

The Diagnosis

The diagnosis of infectious bronchitis may be facilitated using HI (haemagglutination inhibition), VN (virus neutralisation) and ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) testing on serum samples, with PCR and sequencing of tracheal swab samples adding a further level of confirmation.

The antibody response elicited by coronaviruses, assessed by HI and VN testing may be used as an aid to the diagnosis of the predominant serotype present. Suspicious flocks requiring further investigation may be sampled using tracheal swabbing and subjected to PCR and sequencing analyses to characterise the predominant viral genotype present in the flock. As ELISA testing



x-OvO Limited, Thomson Cooper, 3 Castle Court, Carnegie Campus, Dunfermline, KY11 8PB
United Kingdom

Tel: +44 (0) 131 208 3454 Email: sales@x-ovo.com

Vat No: GB 902 7320 57

involves antibody binding to group specific as well as type specific antigens, this method is unable to differentiate the different infectious bronchitis serotypes.

The **FLOCKSCREEN IB-HI** kit provides M41, D1466, D274, 4/91, Italian 02 and Chinese QX high titre antigens, positive sera and negative control SPF sera. The kit allows the clinician to assess both the level of overall challenge and gain an indication of the predominant viral subtype present.

Product Storage Conditions

For optimal shelf life, the lyophilised product should be stored at +4°C. Following reconstitution under hygienic laboratory conditions, the product may be stored at 4°C and used over a period of 14 days. Should the expected period of use exceed 14 days, it is recommended that aliquots of the reconstituted product be made and stored separately at +4°C to avoid bacterial contamination.

Test Protocol

The **FLOCKSCREEN IB-HI** kit includes approved HI protocols and batch release documentation detailing the titre and quality control testing results of all respective components. Users should refer to this documentation during the process of determining the haemagglutinating activity of antigens and sera as variations in titre between batches can occur.

General recommendations

The red blood cell (RBC) solution should be prepared 24 hours in advance. During performance of the test, the antigen should be kept at all times in an ice-bath or at +4°C. It is not recommended to freeze the antigen at any time.



x-Ovo Limited, Thomson Cooper, 3 Castle Court, Carnegie Campus, Dunfermline, KY11 8PB
United Kingdom
Tel: +44 (0) 131 208 3454 Email: sales@x-ovo.com
Vat No: GB 902 7320 57

Titration of Reference Antigens to Calculate 4 Haemagglutinating Units

Introduction

Before performing an HI test, titration of the reference antigen is necessary in order to prepare a 4 haemagglutinating unit (HAU) antigen solution.

Reagents

- Isotonic saline buffered with phosphate (0.05M) to pH 7.0-7.4.
- Red blood cells (RBCs) taken and pooled from a minimum of three specific pathogen free chickens into an equal volume of Alsever solution (anti-coagulant solution).
- RBCs should be washed three times in PBS before use, by centrifuging them at 1100g for 5 minutes. An aliquot of packed cells (v/v) in PBS should be used to prepare the 0.5% suspension (e.g. 0.5 ml of packed cells in 99.5 ml of PBS).

Procedure

- Dispense 0.025 ml PBS in the first two rows of a plastic microtitre plate (V-bottomed wells) (Figure 1).
- Place 0.025 ml of reference antigen suspension in the first two wells of rows A and B.
- Make two-fold dilutions (from 1:2 to 1:4096) of antigen across the plate.
- Dispense a further 0.025 ml of PBS to each well.
- Add 0.025 ml of 0.5 % RBCs to each well.
- Mix by tapping gently and place at 4 °C.
- Plates are read 30-40 minutes later when the RBC control has settled. Reading is done by tilting the plate and observing the presence (no haemagglutination) or absence (haemagglutination) of tear-shaped streaming of the RBCs. Wells with no haemagglutination should flow at the same rate as the control cells with no antigen.



x-OvO Limited, Thomson Cooper, 3 Castle Court, Carnegie Campus, Dunfermline, KY11 8PB
United Kingdom

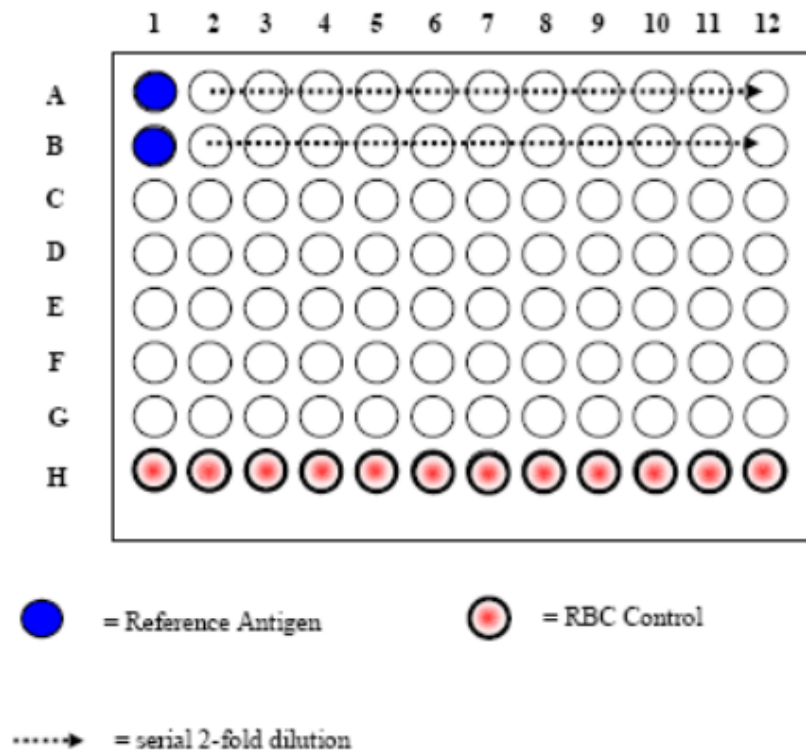
Tel: +44 (0) 131 208 3454 Email: sales@x-ovo.com

Vat No: GB 902 7320 57

- The HA titre is the highest dilution that causes agglutination of the RBCs. That dilution may be regarded as containing one HA unit (HAU).

For example: if the HA titre obtained is 1:512 (i.e. 1 HAU), the value for 4 HAU can be obtained by dividing that titre four times i.e. $512/4=128$. A dilution of 1:128 of the reference antigen should then be utilised for the HI test.

Figure 1. Schematic representation of the HA test



x-OvO Limited, Thomson Cooper, 3 Castle Court, Carnegie Campus, Dunfermline, KY11 8PB
United Kingdom

Tel: +44 (0) 131 208 3454 Email: sales@x-ovo.com

Vat No: GB 902 7320 57

Haemagglutination Inhibition Test for Infectious Bronchitis Virus Antibodies

Reagents

1. Isotonic saline buffered with phosphate (0.05M) to pH 7.0-7.4.
2. Red blood cells (RBCs) taken and pooled from a minimum of three specific pathogen free chickens into an equal volume of Alsever solution (anti-coagulant solution).
3. RBCs should be washed three times in PBS before use, by centrifuging them at 1100g for 5 minutes. An aliquot of packed cells (v/v) in PBS should be used to prepare the 0.5% suspension (e.g. 0.5 ml of packed cells in 99.5 ml of PBS).

Procedure

1. Dispense 0.025 ml PBS into each well of a plastic microtitre plate (V-bottomed wells).
2. Place 0.025 ml of serum in the first well.
3. Make two-fold dilutions of serum across the plate.
4. Add 0.025 ml of antigen containing 4 HAU to each well.
5. Mix by tapping and incubate at 20°C for 30 mins.
6. Add 0.025 ml of 0.5 % RBCs, prepared as above, to each well.
7. Mix by tapping gently and incubate at 20°C.
8. Read the plates after 40 minutes when the RBC control has settled. Reading is done by tilting the plate and observing the presence or absence of tear-shaped streaming of the RBCs. Wells with haemagglutination inhibition (HI) - positive result - should flow at the same rate as the control cells containing RBCs and PBS only.
9. The HI titre is the highest dilution of antiserum causing complete inhibition of 4 units of viral antigen.



x-OvO Limited, Thomson Cooper, 3 Castle Court, Carnegie Campus, Dunfermline, KY11 8PB
United Kingdom

Tel: +44 (0) 131 208 3454 Email: sales@x-ovo.com

Vat No: GB 902 7320 57

Frequently Asked Questions

Antigen	
How many tests can I carry out from my vial of antigen?	This depends on the titre of the antigen. If the antigen has a titre of 1:1024 it means that one HA unit is contained in the antigen diluted 1:1024. To obtain 4 HA units the antigen must be four times more concentrated, and therefore must be diluted 1:256.
Do I have to titrate the antigen before testing samples?	Yes. Antigen should be titrated prior to every working session.
What titre should be considered positive?	A significant antibody level is expressed at an HI titre of 5 or above.
The antigen titration shows a button of RBC sediment in columns 1, 2 or 3.	Antigen is over diluted (weak). You are using less than 4 HA units.
The antigen titration shows a button of RBC sediment in column 5 or above.	Antigen is too concentrated (strong). You are using more than 4 HA units.
Up to what well should you have haemagglutination inhibition in the positive serum control?	The result depends on the titre of the positive control serum but is generally from wells 7 to 9.
No RBC sedimentation present.	RBC solution too weak or the blood quality is poor. RBC solution should be re-made.
Total RBC sedimentation.	Major protocol error – check all steps.
What should I dilute the antigen in?	The lyophilised antigen should be reconstituted in sterile distilled water. Subsequent dilution to working strength should be in PBS.
How do I read the test?	The last well that shows a button of RBC sedimentation is the titre e.g. well 7 = a titre of $\log_2 = 7$.

When contacting your supplier to discuss any technical questions, please ensure that you have the following information available:

Kit code
 Kit antigen
 Batch number
 Expiry date
 In use dilution
 Diluent



x-OvO Limited, Thomson Cooper, 3 Castle Court, Carnegie Campus, Dunfermline, KY11 8PB
 United Kingdom

Tel: +44 (0) 131 208 3454 Email: sales@x-ovo.com

Vat No: GB 902 7320 57

APPENDICE E

Résultats des fiches signalétiques

Flock number	Age of sampling (d)	Season of Sampling	Time between outbreak-sampling	Region	Biosecurity status	Mortality rate (%)	Clinical signs	Vaccination program
1	51	Spring	20	West	Average	48	Renal, Respiratory	no vaccination
2	71	Summer	23	West	Average	13	Renal, Respiratory	d7 : Ma 5
3	60	Summer	27	Central	Average	26.5	Renal, Respiratory	d7 : Ma5 d14 : IB 4/91
4	56	Spring	16	Central	Average	15	Renal, Respiratory	d5 : Ma 5
5	52	Summer	14	West	Poor	30.5	Renal, Respiratory	No vaccination
6	58	Winter	18	Central	Poor	22	Renal, Respiratory	No vaccination
7	65	Winter	25	Central	Average	25	Renal, Respiratory, Digestive	d5 : Ma 5
8	52	Winter	15	West	Poor	24	Renal, Respiratory	No vaccination
9	42	Winter	11	Central	Average	25	Renal, Respiratory	No vaccination
10	49	Winter	11	Central	Average	14	Renal, Respiratory	No vaccination
11	65	Summer	25	Central	Poor	50	Renal, Respiratory, Digestive	d7 : Ma5 d14 : IB 4/91
12	38	Spring	7	Central	Poor	26.5	Renal, Respiratory, digestive	No vaccination
13	52	Autumn	30	West	Poor	50	Renal, Respiratory, Digestive	d7 : H120
14	55	Autumn	15	West	Average	14.5	Renal, Respiratory	No vaccination

APPENDICE F

LES TITRES IHA INDIVIDUELS PAR ELEVAGE

ELEVAGE N°1

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	5	6	4	11	12	1
2	4	6	4	11	12	1
3	6	6	4	11	12	1
4	5	6	4	11	12	1
5	6	8	5	11	12	1
6	6	7	4	11	12	1
7	9	11	9	11	12	1
8	6	6	5	11	12	1
9	5	8	4	11	12	1
10	6	6	4	11	12	1
Moyenne	5.8	7	4.7	11	12	1
Ecart-type	1.32	1.63	1.57	0.00	0.00	0.00

ELEVAGE N°2

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	7	8	5	11	12	1
2	5	8	4	11	12	1
3	6	6	4	11	12	1
4	8	8	5	11	12	1
5	7	7	4	11	12	1
6	6	7	4	11	12	1
7	6	7	4	11	12	1
8	9	8	6	11	12	1
9	10	9	7	11	12	1
10	7	7	4	11	12	1
11	6	8	4	11	12	1
Moyenne	7.00	7.55	4.64	11.00	12.00	1.00
Ecart-type	1.48	0.82	1.03	0.00	0.00	0.00

ELEVAGE N°3

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	7	7	4	10	12	1
2	6	7	5	11	12	1
3	11	10	8	11	12	1
4	5	6	4	7	12	1
5	6	6	4	8	12	1
6	4	7	4	8	12	1
7	11	11	8	11	12	1
8	5	6	7	11	12	1
9	4	4	4	10	12	1
10	6	8	4	10	12	1
Moyenne	6.50	7.20	5.20	9.70	12.00	1.00
Ecart-type	2.55	2.04	1.75	1.49	0.00	0.00

ELEVAGE N°4

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	10	11	8	9	12	1
2	5	6	5	11	12	1
3	6	6	4	11	12	1
4	5	6	4	11	12	1
5	5	4	4	11	8	1
6	5	7	4	11	10	1
7	11	11	9	11	12	1
8	5	5	4	11	9	1
9	5	5	4	11	6	1
10	5	7	4	11	9	1
11	6	9	7	11	8	1
Moyenne	6.18	7.00	5.18	10.82	10.00	1.00
Ecart-type	2.18	2.37	1.89	0.60	2.14	0.00

ELEVAGE N°5

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	10	11	7	11	3	1
2	10	11	10	11	12	1
3	6	7	5	11	5	1
4	7	8	6	11	7	1
5	8	11	7	11	12	1
6	8	8	7	11	7	1
7	7	8	7	11	6	1
8	8	8	6	11	5	1
9	7	11	7	11	7	1
10	8	8	6	11	7	1
11	10	8	8	11	5	1
Moyenne	8.09	9.00	6.91	11.00	6.91	1.00
Ecart-type	1.38	1.61	1.30	0.00	2.81	0.00

ELEVAGE N°6

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	8	8	6	11	7	1
2	5	8	5	11	2	1
3	9	6	4	11	1	1
4	8	6	5	11	10	1
5	7	6	4	11	1	1
6	5	5	4	11	7	1
7	6	7	7	11	6	1
8	6	5	5	11	8	1
9	7	9	5	11	2	1
10	6	7	6	11	1	1
Moyenne	6.7	6.7	5.1	11	4.5	1
Ecart-type	1.34	1.34	0.99	0.00	3.44	0.00

ELEVAGE N°7

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	10	11	11	11	12	4
2	9	11	11	11	12	2
3	8	9	7	11	6	1
4	11	9	10	9	8	1
5	11	11	9	9	8	1
6	9	8	7	8	6	1
7	8	8	5	7	4	1
8	11	11	11	11	9	3
9	11	11	8	11	7	1
Moyenne	9.78	9.89	8.78	9.78	8.00	1.67
Ecart-type	1.30	1.36	2.17	1.56	2.69	1.12

ELEVAGE N°8

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	7	8	5	11	1	1
2	8	7	5	11	4	1
3	8	7	5	11	5	1
4	8	8	6	11	3	1
Moyenne	7.75	7.50	5.25	11.00	3.25	1.00
Ecart-type	0.50	0.58	0.50	0.00	1.71	0.00

ELEVAGE N°9

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	9	9	6	11	1	1
2	6	6	5	8	2	1
3	4	4	4	11	1	1
4	4	4	4	11	1	1
5	4	4	4	11	1	1
6	5	4	4	11	1	1
Moyenne	5.33	5.17	4.50	10.50	1.17	1.00
Ecart-type	1.97	2.04	0.84	1.22	0.41	0.00

ELEVAGE N°10

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	5	4	4	11	1	1
2	4	4	4	11	1	1
3	4	4	4	11	3	1
4	4	4	4	11	3	1
5	4	6	4	11	3	1
6	8	8	4	11	2	1
7	5	5	4	5	1	1
Moyenne	4.86	5.00	4.00	10.14	2.00	1.00
Ecart-type	1.46	1.53	0.00	2.27	1.00	0.00

ELEVAGE N°11

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	8	11	7	9	8	1
2	6	7	4	11	7	1
3	9	11	7	11	7	1
4	10	11	8	7	8	1
5	9	8	4	8	6	1
6	8	10	5	11	8	1
Moyenne	8.33	9.67	5.83	9.50	7.33	1.00
Ecart-type	1.37	1.75	1.72	1.76	0.82	0.00

ELEVAGE N°12

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	8	11	7	11	9	1
2	9	11	7	11	8	1
3	9	10	7	11	8	1
4	9	10	7	11	7	1
5	8	7	5	7	4	1
6	7	5	5	7	4	1
7	5	5	4	4	3	1
8	6	7	5	7	4	1
9	8	7	6	9	4	1
10	8	8	7	9	7	1
11	6	7	5	9	4	3
Moyenne	7.55	8.00	5.91	8.73	5.64	1.18
Ecart-type	1.37	2.19	1.14	2.28	2.16	0.60

ELEVAGE N°13

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	11	11	9	7	3	1
2	9	8	11	11	2	1
3	11	10	7	11	7	1
4	11	9	7	11	7	2
5	6	8	4	7	6	1
6	6	6	4	8	6	1
7	9	11	9	11	2	1
8	9	8	6	10	7	1
9	9	9	6	11	7	3
10	6	8	4	11	6	1
Moyenne	8.7	8.8	6.7	9.8	5.30	1.3
Ecart-type	2.06	1.55	2.41	1.75	2.11	0.67

ELEVAGE N°14

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
1	11	11	10	11	6	2
2	11	11	7	11	9	1
3	10	11	7	11	4	1
4	9	11	6	11	8	3
5	7	8	5	11	3	1
6	8	8	5	10	3	1
7	8	8	6	10	9	1
8	11	11	8	11	7	1
Moyenne	9.375	9.875	6.75	10.75	6.13	1.375
Ecart-type	1.60	1.55	1.67	0.46	2.53	0.74

APPENDICE G
MOYENNE DES TITRES IHA

	M41	4/91	D274	Qx	NDV	HI-H9
E1	5.80	7.00	4.70	11.00	12.00	1.00
E2	7.00	7.55	4.64	11.00	12.00	1.00
E3	6.50	7.20	5.20	9.70	12.00	1.00
E4	6.18	7.00	5.18	10.82	10.00	1.00
E5	8.09	9.00	6.91	11.00	6.91	1.00
E6	6.70	6.70	5.10	11.00	4.50	1.00
E7	9.78	9.89	8.78	9.78	8.00	1.67
E8	7.75	7.50	5.25	11.00	3.25	1.00
E9	5.33	5.17	4.50	10.50	1.17	1.00
E10	4.86	5.00	4.00	10.14	2.00	1.00
E11	8.33	9.67	5.83	9.50	7.33	1.00
E12	7.55	8.00	5.91	8.73	5.64	1.18
E13	8.70	8.80	6.70	9.80	5.30	1.30
E14	9.38	9.88	6.75	10.75	6.13	1.38

APPENDICE H

Article publié dans veterinary world

Veterinary World, EISSN: 2231-0916
Available at www.veterinaryworld.org/Vol.11/November-2018/17.pdf

RESEARCH ARTICLE
Open Access

The first evidence of a new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and unvaccinated broiler flocks in Algeria

A. Lounas¹, K. Oumouna-Benachour², H. Medkour³ and M. Oumouna²

1. Department of Medicine and Animal Surgery, Veterinary Sciences Institute, University of Blida, Algeria; 2. Department of natural sciences and life, Faculty of Sciences and Technology, University Yahia Fares of Medea, Algeria; 3. Microbes, Evolution, Phylogeny and Infection, UMR Aix-Marseille University, IRD, APHM, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France.

Corresponding author: A. Lounas, e-mail: azizovet@yahoo.fr

Co-authors: KO: Benachourkarine1@gmail.com, HM: hacenevet1990@yahoo.fr, MO: oumouna@gmail.com

Received: 16-07-2018, Accepted: 12-10-2018, Published online: 29-11-2018

doi: 10.14202/vetworld.2018.1630-1636 How to cite this article: Lounas A, Oumouna-Benachour K, Medkour H, Oumouna M (2018) The first evidence of a new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and unvaccinated broiler flocks in Algeria, *Veterinary World*, 11(11): 1630-1636.

Abstract

Background and Aim: Avian infectious bronchitis virus (IBV) frequently infects broilers and is responsible for severe economic losses to the poultry industry worldwide. It has also been associated with kidney damage in the broiler flocks. The aim of the present study is to determine the presence of IBV and its possible involvement in kidney damage of broiler chicks.

Materials and Methods: 14 clinically diseased broiler flocks from Western and Central Algeria were sampled and analyzed by hemagglutination inhibition (HI) test and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by phylogenetic analysis.

Results: The QX (100%) and 4/91 (60%) IBV serotypes were the most prevalent in the kidney damaged broilers regardless of vaccination status. The molecular detection of avian IBV by RT-PCR identified six samples as positive, of which only two isolates were typable by sequencing. We identified a novel IBDZ13a genotype which showed 93% sequence homology to the partial-S1 gene sequence of the IB 4/91 commercial vaccine strain. Sequencing analysis characterized this virus as a novel and divergent IB 4/91 field virus with eight amino acid substitutions that might have resulted in altered immunogenicity.

Conclusion: The isolation of a new IBV strain (IBDZ13a) from vaccinated broiler flocks may explain the failure of the vaccination programs against IBV field strains. Combination of the HI test and RT-PCR indicated that the nephropathogenic IB outbreaks in broilers are related to this novel strain.

Keywords: avian infectious bronchitis virus, broilers, kidney damages, Algeria, hemagglutination inhibition test, reverse transcriptase-polymerase chain reaction, IBDZ13a.

Introduction

Poultry production in Algeria faces many zootechnical and health constraints, such as viral infections like avian infectious bronchitis (IB). The avian IB virus (IBV), a member of the Coronaviridae family (order *Nidovirales* and genus *Coronavirus*), frequently infects broilers and egg-laying hens and leads to severe economic losses to the poultry industry [1]. Since its discovery in the 1930s [2], the IBV has been identified as the major cause of respiratory infections and poor zootechnical performances. Interestingly, it can also multiply in the renal tissue and cause nephritis [3], a phenomenon first described in the United States [4]. More recently, IBV-associated nephritis has been accepted as the most pressing problem in broiler flocks in many countries [5-9].

The most effective method of protecting poultry from IBV infections is through live or killed vaccines [1]. However, nephritis associated with infectious bronchitis has been observed in several vaccinated flocks, suggesting that the current vaccination strategies against IBV may not provide adequate protection [3,10]. In fact, outbreaks of IB are frequently caused due to the strains serologically different from those used for vaccination [11,12]. Since its discovery in 1931, a large number of serotypes or variants of IBV have emerged [5,13,14], and little or no cross-protection occurs between these serotypes [15]. Therefore, it is crucial to track epidemic-causing serotypes in each geographic region or country and produce new vaccines to control IB.

In Algeria, poultry flocks have been vaccinated against IB with the Massachusetts (Mass) strain combined with the IB 4/91 United Kingdom variant strain or 793/B since the past few years. However, kidney damage with suspicion of IB has also been reported in recent years in spite of vaccination but has not been confirmed so far. This has led to the speculation of the possible emergence of variant strains against

Copyright: Lounas, *et al.* Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

which conventional vaccines are not completely effective [16].

The aim of this study was to investigate the presence of IBV among Algerian broiler flocks and its possible involvement in broiler kidney damage. Clinically diseased broiler flocks were sampled and analyzed by the hemagglutination inhibition (HI) test and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by phylogenetic analysis.

Materials and Methods

Ethical approval

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care Committee of the National Administration of the Algerian Higher Education and Scientific Research (Ethical approval number: 98–11, Law of August 22, 1998) and were conducted according to the recommendations of the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals."

Sample collection

Fourteen commercial broiler flocks from Western and Central Algeria in which the chickens were suffering from kidney damage and respiratory disease were sampled between January and December 2012. Trachea and kidney specimens were taken from 10 diseased chickens from each flock and were directly applied to the FTA® cards (GE Healthcare, UK) during the acute phase of the clinical outbreak. The samples were transported and analyzed at the Laboratory of Virology, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie, Italy. In addition, blood samples were also collected from each bird to determine the prevalence of different IBV serotypes. The serum was collected from the samples by centrifugation (2000 rpm/min 5 min) and stored at –20°C for further analysis. HI test was performed at MSD International laboratory, Amman, Jordan.

RNA extraction from FTA® cards and reverse transcription

Three pieces of 2 mm discs from the spotted area of the filters were cut by a sterile scissor and placed in 1.5 mL Eppendorf tubes. Separate sterile scissors and pincers were used for each sample to prevent cross-contamination. Each disc was placed in 750 µL Trifast® FL (PEQLAB, Germany), homogenized, and incubated for 5 min at RT. The Trifast FL kit (Peq GOLD TriFast™ FL, Peqlab) was used to extract the RNA from the FTA® paper according to the manufacturer's instructions (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). RNA purity and concentration were determined by NanoDrop® ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). Reverse transcription was performed using the ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) with random primers according to the manufacturer's instructions. Briefly, 0.1 µM lyophilized oligonucleotides provided with the kit were dissolved in 1 mL RNase-free water, and 1 µL of the random primer solution was mixed with 4 µL viral RNA and incubated

at 70°C for 5 min. After adding Buffer 5× (56 µL), MgCl₂ (67.2 µL), dNTP (14 µL), RNAsin (7 µL), ImProm II (14 µL), and H₂O (51.8 µL), the mixture was incubated at 25°C for 5 min followed by 55°C for 60 min. The reaction was terminated by heating at 70°C for 15 min and cooling on ice.

PCR amplification of the S1 gene

The primer sets (Oligo5 [forward]: 5'-TGAAAA CTG AAC AAA AGA CA-3' and CK2 [reverse]: 5'-CTC GAA TTC CNG TRT TRT AYT GRC A-3') were designed for the IBV S1 gene, which contains the hypervariable region 1 and most of the hypervariable region 2 [17]. The S1 gene was amplified with the Superscript® III One-Step RT-PCR Platinum® Taq HiFi (Invitrogen™ Life Technologies™, Carlsbad, CA), which generated a PCR product of 344 bp. For the PCR reaction, the following reaction mix was made: 35 µL Buffer 10×, 14 µL dNTP, 14 µL CK2, 14 µL Oligo5, 243.25 µL H₂O, 1.75 µL Taq polymerase (Taq HiFi, Invitrogen™ Life Technologies™, Carlsbad, CA), and 2 µL cDNA to a final volume of 25 µL. The PCR parameters were as follows: 45 cycles of denaturation (94°C, 20 s), annealing (51°C, 1 min), and polymerization (72°C, 1 min). The pre-denaturation step was done at 94°C for 5 min and post-polymerization step at 70°C for 10 min. A 20 µL aliquot of each PCR product was electrophoresed at 120 V for 40 min in 1.5% agarose gel, which was then stained with GelRed™ (Genaxxon Bioscience, Ulm, Germany, GmbH).

S1 gene sequencing

The amplified cDNA was purified using the NucleoSpin® (MACHEREY-NAGEL GmbH, Germany) Gel and PCR Clean-up kit according to the manufacturer's instructions and sent for sequencing to x-OVO Limited (x-OVO Limited Laboratories, Thomson Cooper, United Kingdom). The nucleotide and amino acid sequences of the S1 gene of the IBV isolates were assembled, aligned, and compared with reference IBV strains using BASIC BLAST program in DNASTar. Phylogenetic analysis of the S1 amino acid sequences was performed with the neighbor-joining method using the DNASTar software [18]. The partial S1 nucleotide sequences from the IBV isolates have been submitted to the GenBank database and assigned the accession number MG252734. The nucleotide and amino acid sequences of the S1 gene of IBV strains used for the comparison are available in GenBank under the following accession numbers: CR 88 (KM067900), 4/91 (JN600614), Qx (AF193423), Ma5 (AY561713), H120 (M21970), M41 (GQ219712), D274 (KR106999), Italy 02 (AJ457137), and QX D388 (DQ674739).

HI test

The specific IBV strains that were used in this study were M-41 (a US strain), 4/91 (European vaccine strain), D274 (a Dutch field isolate), and QX (Chinese strain). HI test was performed using the

FLOKSCREEN IB-HI TEST kit according to the manufacturer's instructions. Briefly, the sera were serially diluted and mixed with an equivalent volume of the antigen. After 30 min of incubation at 20°C, the red blood cells of SPF chickens (anticoagulant solution) were added and incubated further for 40 min at 20°C. The plates were then tilted to observe inhibition of hemagglutination.

Statistical analysis

Statistical Package for the Social Sciences version 20 (IBM, USA) was used for statistical analysis. The geometric mean titer (GMT) was calculated by counting the number of wells from all serum samples within one flock showing HI activity, and the average number was then cross-checked against GMT values given in Brug's table. The results were reported as the GMT for a given flock against a particular IBV antigen. Descriptive statistics including percentages, means, and frequency distribution were calculated for each of the variables.

Results

Information regarding the sampling date, biosecurity status, region of sampling, vaccination programs, necropsic and clinical signs, the age of the broilers, and mortality rates are summarized in Table-1. We collected 14 samples from broiler farms located in Western and Central Algeria from the flocks showing kidney damage and high mortality rates. Eight of these farms had not vaccinated their flocks against IBV, 2 farms conducted the prototype vaccination program but with a short interval between the first and second vaccinations, and 4 farms vaccinated their broilers only against the Mass serotype. All vaccinations were performed through the drinking water route, and all the sampled broiler farms showed poor zootechnical performance with rare period elongation (until 71 days in farm 2) and high mortality rates (up to 50% in farms 11 and 13).

The seroprevalence of various IBV strains in broiler flocks suffering from kidney damage in Algeria is summarized in Table-2. All the broiler flocks (100%) tested in this study were seropositive for the QX variant strain, with high mean titer levels ($MT=11 \log_2$) regardless of the vaccination status. Furthermore, 60% and 50% of the broiler flocks were seropositive for antibodies against the 4/91 and M-41 strains, respectively, although with low mean titer levels. The seroprevalence of IBV D-274 was the lowest with only 7% of the broiler flocks testing positive.

Six of the 14 broiler samples were positive for the IBV S1 gene, but only two isolates were typable by sequencing and showed a high load of IB viral RNA ($Ct_1=22.15$ and $Ct_2=31.4$). One of the two sequences was identified as the IBDZ13a genotype. Furthermore, IBV was only detected in the kidney tissues and not in the trachea. All samples showed 93% homology to the partial-S1 sequence acquired from

Table-1: Farm characteristics and the history of IBV outbreaks in Algeria.

Flock number	Age of sampling (d)	Season of sampling	Time between outbreak-sampling	Region	Biosecurity status	Mortality rate (%)	Clinical signs	Vaccination program
1	51	Spring	20	West	Average	48	Renal, respiratory	No vaccination
2	71	Summer	23	West	Average	13	Renal, respiratory	d7: Ma 5
3	60	Summer	27	Central	Average	26.5	Renal, respiratory	d7: Ma5 d14: IB 4/91
4	56	Spring	16	Central	Average	15	Renal, respiratory	d5: Ma 5
5	52	Summer	14	West	Poor	30.5	Renal, respiratory	No vaccination
6	58	Winter	18	Central	Poor	22	Renal, respiratory	No vaccination
7	65	Winter	25	Central	Average	25	Renal, respiratory, digestive	d5: Ma 5
8	52	Winter	15	West	Poor	24	Renal, respiratory	No vaccination
9	42	Winter	11	Central	Average	25	Renal, respiratory	No vaccination
10	49	Winter	11	Central	Average	14	Renal, respiratory	No vaccination
11	65	Summer	25	Central	Poor	50	Renal, respiratory, digestive	d7: Ma5 d14: IB 4/91
12	38	Spring	7	Central	Poor	26.5	Renal, respiratory, digestive	No vaccination
13	52	Autumn	30	West	Poor	50	Renal, respiratory, digestive	d7: H120
14	55	Autumn	15	West	Average	14.5	Renal, respiratory	No vaccination

IBV= Infectious bronchitis virus

the IB 4/91 reference strain (Figure-1). The IBDZ13a strain was characterized as an IB 4/91 variant IBV with 29 nucleic acid substitutions differing from the known IB 4/91 vaccine reference strain sequence, which corresponded to eight amino acid substitutions relative to this reference strain (Table-3). Three of these amino acid substitutions were from a hydrophobic to a hydrophilic amino acid. A change in hydrophilicity altered the epitopes on the S1 protein of the IB DZ13a virus. The predicted epitopes with differences between the field virus and IB 4/91 vaccine strain are shown in Figure-1.

Discussion

Infectious bronchitis has had a devastating effect on broiler farms since the worldwide emergence and increased prevalence of IBV [11,13]. Due to the high rate of mutation and recombination in coronaviruses, new serotypes and genotypes of IBV frequently emerge and have been reported in different regions around the world [11]. More recently, IBV has been associated with nephritis which is now a major problem in broiler flocks worldwide [19-21]. Similar concerns have been reported in Algeria, but no study has been performed so far on IB-associated nephritis [22].

Table-2: IBV-HI antibody titers in broiler flocks suffering from kidney damages.

Flocks	Mean titers (log ₂)				Mean titers range (maximum-minimum) (log ₂)			
	Qx	M-41	D-274	4/91	Qx	M-41	D-274	4/91
1	11.00	5.80	4.70	7.00	11-11	4-9	4-9	6-11
2	11.00	7.00	4.64	7.55	11-11	5-10	4-7	7-9
3	9.70	6.50	5.20	7.20	7-11	4-11	4-8	4-11
4	10.82	6.18	5.18	7.00	9-11	5-11	4-9	4-11
5	11.00	8.09	6.91	9.00	11-11	6-10	5-10	7-11
6	11.00	6.70	5.10	6.70	11-11	5-8	4-7	5-9
7	9.78	9.78	8.78	9.89	7-11	8-11	5-11	8-11
8	11.00	7.75	5.25	7.50	11-11	7-8	5-6	7-8
9	10.50	5.33	4.50	5.17	8-11	4-9	4-6	4-9
10	10.14	4.86	4.00	5.00	5-11	4-8	4-4	4-8
11	9.50	8.33	5.83	9.67	7-11	6-10	4-8	7-11
12	8.73	7.55	5.91	8.00	4-11	5-9	4-7	5-11
13	9.80	8.70	6.70	8.80	7-11	6-11	4-11	8-11
14	10.75	9.38	6.75	9.88	10-11	8-11	5-10	8-11

IBV-HI=Infectious bronchitis virus-hemagglutination inhibition

Table-3: Changes in IBDZ13a amino acid sequence relative to the known IB 4/91 vaccine strain sequence.

Position	Vaccine strain sequence	Hydrophobicity index	Sample sequence	Hydrophobicity index	hydrophobic/hydrophilic switch
253	Alanine	1.8	Threonine	-0.7	Yes
258	Aspartate	-3.5	Glutamate	-3.5	No
261	Valine	4.2	Isoleucine	4.5	No
273	Glutamate	-3.5	Threonine	-0.7	No
286	Proline	-1.6	Serine	-0.8	No
289	Serine	-0.8	Leucine	3.8	Yes
296	Valine	4.2	Glutamine	-3.5	Yes
305	Serine	-0.8	Aspartate	-3.5	No

IB=Infectious bronchitis



Figure-1: Predicted epitope alignment of deduced amino sequences of HVR S1 gene. New field Algerian isolate and selected infectious bronchitis virus vaccine vial reference strains.

The present study was carried out to investigate the presence of IBV in broiler flocks and its possible involvement in kidney damage. We also monitored the seroprevalence of different IBV serotypes by the HI test and analyzed the phylogenetic characteristics of the new IBV strains isolated in Algeria in 2013 by sequencing. The HI test and virus neutralization test (VNT) are the most commonly used tests for detecting IBV antibodies [9,23]. Studies show extensive cross-reactions between the IBV serotypes detected by the HI test and similar antigenicity detected by the VNT and HI test [24-26]. However, since VNTs are not cost-effective for routine examination, HI tests are commonly used for routine serology [27].

The most frequently detected IBV serotypes in the broiler flocks with nephritis were IB-QX (100%) and IB 4/91 (60%), which have been detected for the 1st time in Algeria by our group. After reporting the nephropathogenic form of IB [3], the above serotypes have been reported in China, Europe, and Africa and have been seen to be associated with severe kidney damage, high morbidity, and mortality in the vaccinated flocks. At present, these serotypes are the predominant field strains in most poultry farms worldwide [13,28]. The serological analysis showed significantly lower titers of IB 4/91 compared to IB-QX, which could be related to the vaccination of some flocks with the IB 4/91 strain. De Wit [23] reported that many factors influence the level of IBV antibodies, of which the most critical is the presence of immunity at the time of infection. This is consistent with the lower anti-IB 4/91 antibody titers seen in the vaccinated flocks compared to the unvaccinated ones. Another factor that can reduce the sensitivity of HI and thus affect the interpretation of the results is the cross-reaction between the different serotypes, especially when multiple serotypes of IBV are involved. We detected cross-reaction between the QX and 4/91 serotypes in many flocks, and 4 flocks showed mixed infection of three serotypes (QX, 4/91, and M41). Therefore, the serotype specificity of HI is reduced after reinfection or vaccination, especially when the subsequent serotype is heterologous [23].

The S1 protein of IBV determines the genotype, serotype, and phenotype of IBVs [29]. The S1 gene of the IBDZ13a field strain was most closely related to that of the IB 4/91-type strain (Figure-2) as determined by the criterion of Worthington *et al.* [13] and Kannan *et al.* [30], who classified IBV sequences with <99% homology to vaccine strains as variants. Our findings indicate the circulation of virulent strains of IB 4/91, which have become the predominant genotype in Africa, Asia, and Europe [28]. However, we did not see a strong correlation between the HI results which showed the circulation of the QX and 4/91 serotypes and RT-PCR which showed the emergence of a new genotype of the 4/91 strain. This is consistent with the findings of Kusters *et al.* [31] who also reported that RT-PCR and HI results were not exactly correlated,



Figure-2: Neighbor-joining phylogenetic tree with 1000 bootstrap replicates expressing the relations among deduced S1 amino acid sequences of IBDZ13a with selected infectious bronchitis virus reference strains.

wherein different serotypes showed considerable differences (20-50%) in the amino acid sequences of the S1 subunit. HI is used for routine testing of sera from young growing chickens to determine the serotype-specific antibody status of a flock [32]. However, the presence of multiple cross-reactive antibodies against antigenically unrelated strains, as is often seen during IB outbreaks, reduces the serodiagnostic value of HI. Therefore, a combination of serotyping and genotyping is recommended to identify field strains. Based on the results of HI and RT-PCR, we conclude that the IBDZ13a variant of IB4/91 is involved in kidney damage of broiler flocks.

When live-attenuated and inactivated vaccines of IBV were first introduced, they were effective in controlling IB among poultry flocks [33]. However, vaccinated flocks in many regions of Algeria have shown considerable mortality and production losses in recent years. The isolation of a new IBV strain from the vaccinated and unvaccinated flocks can be explained by two hypotheses. The first hypothesis, based on the mutations and amino acid alterations in the S1 epitope, is that the IBV strain evolved to escape the host immune response elicited by the current vaccines [34]. However, this hypothesis is weak since amino acid alterations do not always translate into differences in antigenicity or biological function. Furthermore, the sequence data only provide information regarding the primary structure of the protein and not the secondary

and tertiary structures which are vital for its biological function and antigenicity [23]. The second hypothesis is the failure to adopt the vaccination programs to the IBV field strains circulating in the farms. In our study, only two flocks received the combined vaccine of IB Ma5 (at day 7) and IB 4/91 (at day 14). The failure to protect broilers against nephritis could also be related to the shorter inter-vaccination interval of 7 days. Terregino *et al.* [35] demonstrated improved protection against several IB serotypes by vaccinating with two antigenically different IB vaccines given at the interval of 14 days. This approach obviates the need to develop a new IB vaccine for each new emerging serotype. One flock was vaccinated with the Mass vaccine type H120 strain, which, however, did not provide sufficient protection against IBV infection [33,36].

Conclusion

We identified IBDZ13a, a new nephropathogenic variant of IB 4/91, for the 1st time in Algerian broiler flocks. Its isolation from the vaccinated flocks indicates poor protection afforded by the vaccination programs to the broilers against infection with new IB variants. Further studies are needed to explain the failure of the current vaccines against the new IB4/91 strain and to investigate the cross-protection and pathogenicity of the new genotype.

Authors' Contributions

AL and MO planned and designed the whole study. AL and HM collected samples, performed technique, and analyzed the data. KO and MO supervised the project and helped during manuscript writing, crosschecking, and revision. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the MSD International Laboratory, AMMAN, Jordan, and MSD, Algeria, for providing the facilitation and equipment throughout the study. The authors are also thankful to Entisar and Husam Bakri for technical assistance and help with the HI test analysis.

Competing Interests

The authors had used the facility of MSD International Laboratory, Jordan but no person from MSD was involved at any stage of the experiment or publication. Also, authors have not received any fund from MSD Algeria.

References

- Cavanagh, D. and Gelb, J.J. (2008) Infectious bronchitis. In: Diseases of Poultry, 12th ed. Blackwell Publishing, Iowa, USA. p117-135.
- Schalk, A.F. and Hawn, M.C. (1931) An apparently new respiratory disease of baby chicks. *J. Am. Vet. Med. As.*, 78: 413-416.
- Shengwang, L. and Kong, X. (2004) A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathol.*, 33(3): 321-327.
- Winterfield, R.W. and Hitchner, S.B. (1962) Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *Am. J. Vet. Res.*, 23(11): 1273-1279.
- Zanella, A., Lavazza, A., Marchi, R., Martin, A.M. and Paganelli, F. (2003) Avian infectious bronchitis: Characterization of new isolates from Italy. *Avian Dis.*, 47(1): 180-185.
- Cuiping, X., Jixun, Z. and Xudong, Z. (2007) Isolation and identification of four isolates of infectious bronchitis strains in China and analysis of their SI protein gene. *Vet. Microbiol.*, 122(1-2): 61-71.
- Shimazaki, Y., Horiuchi, T., Harada, M., Tanimura, C., Seki, Y., Kuroda, Y., Yagyu, K., Nakamura, S. and Suzuki, S. (2008) Isolation of 4/91 type of infectious bronchitis virus as a new variant in Japan and efficacy of vaccination against 4/91 type field isolate. *Avian Dis.*, 52(4): 618-622.
- Awad, F., Chhabra, R., Baylis, M. and Ganapathy, K. (2014) An overview of infectious bronchitis virus in chickens. *Worlds Poult. Sci. J.*, 70(2): 375-384.
- Fellahi, S., Harrak, M.E.L., Ducatez, M., Saad Ibn Souda Koraichi, L., Kuhn, J.H., Khayi, S., Houadfi, M.L., Ennaji, M.M. (2015) Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus S1 glycoprotein regions reveals emergence of a new genotype in Moroccan broiler chicken flocks. *Virology*, 12(1): 116.
- Abdel-Moneim, A.S., El-Kady, M.F., Ladman, B.S. and Gelb, J. (2006) S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Virology*, 3: 78.
- Cavanagh, D., Picault, J.P., Gough, R.E., Hess, M., Mawditt, K. and Britton, P. (2005) Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. *Avian Pathol.*, 34(1): 20-25.
- Li, L., Xue, C., Chen, F., Qin, J., Xie, Q. and Bi, Y. (2010) Isolation and genetic analysis revealed no predominant new strains of avian infectious bronchitis virus circulating in South China during 2004-2008. *Vet. Microbiol.*, 143(2-4): 145-154.
- Worthington, K.J., Currie, R.J.W. and Jones, R.C. (2008) A reverse transcriptase polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol.*, 37(2): 247-257.
- Bochkov, Y.A., Batchenko, G.V., Shcherbakova, L.O., Borisov, A.V. and Drygin, V.V. (2006) Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis virus in Russia. *Avian Pathol.*, 35(5): 379-393.
- Cavanagh, D. (2007) Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res.*, 38(2): 281-297.
- Wang, L., Junker, D. and Collisson, E.W. (1993) Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virology*, 192(2): 710-716.
- Gelb, J., Weisman, Y., Ladman, B.S. and Meir, R. (2005) Gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathol.*, 34(3): 194-203.
- Xu, G., Liu, X., Zhao, Y., Chen, Y., Zhao, J. and Zhang, G. (2016) Characterization and analysis of an infectious bronchitis virus strain isolated from southern China in 2013. *Virology*, 13: 40.
- El Bouqdaoui, M., Mhand, R.A., Bouayoune, H. and Ennaji, M.M. (2005) Genetic grouping of nephropathogenic avian infectious bronchitis virus isolated in Morocco. *Int. J. Poult. Sci.*, 4(9): 721-727.
- Feng, J., Hu, Y., Ma, Z., Yu, Q., Zhao, J., Liu, X. and Zhang, G. (2012) Virulent avian infectious bronchitis virus, people's republic of China. *Emerg. Infect. Dis.*, 18(12): 1994-2001.
- Amit, G., Hanish, D., Pal, J.K. and Prajapati, K.S. (2010) Isolation, identification and molecular characterization of IBV variant from outbreak of visceral gout in commercial

- broilers. *Vet. World*, 3(8): 375.
22. Sid, H., Fettah, A. and Lounas, A. (2011) Descriptive study of an outbreak of avian urolithiasis in a large commercial egg complex in Algeria. *Not. Sci. Biol.*, 3(1): 22-25.
 23. De Wit, J.J. (2000) Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, 29(2): 71-93.
 24. Lashgari, M.S. and Newman, J.A. (1984) Serological comparison and antigenic relationships of seven serotypes of infectious bronchitis virus using the haemagglutination-inhibition test. *Avian Dis.*, 28(2): 435-443.
 25. Brown, A.J. and Bracewell, C.D. (1985) Application of the haemagglutination inhibition test to typing of infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.*, 116(2): 47-48.
 26. Cook, J.K.A., Brown, A.J. and Bracewell, C.D. (1987) Comparison of the haemagglutination inhibition test and the serum neutralization test in tracheal organ cultures for typing infectious bronchitis virus strains. *Avian Pathol.*, 16(3): 505-511.
 27. Etteradossi N, Britton P: Avian infectious bronchitis, in: Biological Standards Commission (Ed.), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. World Organisation for Animal Health, Paris, France. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf. Last accessed on 15-11-2018.
 28. De Wit, S., Cook, J.K.A. and Van Der Heijden, H.M.J. (2011) Infectious bronchitis virus variants history, current situation and control measures. *Avian Pathol.*, 40(3): 223-235.
 29. Liu, S.W., Zhang, Q.X., Chen, J.D., Han, Z.X., Liu, X., Feng, L., Shao, Y.H., Rong, J.G., Kong, X.G. and Tong, G.Z. (2006) Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Arch. Virol.*, 151(6): 1133-1148.
 30. Kannan, G., Ball, C. and Forrester, E. (2015) Genotypes of infectious bronchitis viruses circulating in the Middle East between 2009 and 2014. *Virus Res.*, 210: 198-204.
 31. Kusters, J.G., Niesters, H.G.M., Lenstra, J.A., Horzinek, M.C. and Van Der Zeijst, B.A.M. (1989) Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virol. J.*, 169(1): 217-221.
 32. Alexander, D.J., Allan, W.H., Biggs, P.M., Bracewell, C.D., Darbyshire, J.H., Dawson, P.S., Harris, A.H., Jordan, F.T., Macpherson, I., McFerran, J.B., Randall, C.J., Stuart, J.C., Swarbrick, O. and Wilding, P. (1983) A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.*, 113(3): 64.
 33. Cook, J.K., Chesher, J., Baxendale, W., Greenwood, N., Huggins, M.B. and Orbell, S.J. (2001) Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, 30(4): 423-426.
 34. Jackwood, M.W. (2012) Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.*, 56(4): 634-641.
 35. Terregino, C., Toffan, A., Beato, M.S., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., Ortali, G., Mancin, M. and Capua, I. (2008) Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen-free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol.*, 37(5): 487-493.
 36. Sasipreeyajan, J., Pohuang, T. and Sirikobkul, N. (2012) Efficacy of different vaccination programs against Thai QX-like infectious bronchitis virus. *Thai. J. Vet. Med.*, 42(1): 73-79.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Phalen, D.N., Avian Renal Disorders, in Laboratory medicine: avian and exotic pets, A.M. Fudge, Editor. 2000, Saunders: Philadelphia. p. 61-68.
2. Echols, M.S., Evaluating and treating the kidneys, in Clinical Avian Medicine, G.J. Harrison and T. Lightfoot, Editors. 2006, Spix Publishing: Palm Beach, FL. p. 451-491.
3. Lumeij, J.T., Nephrology, in Avian Medicine: Principles and Application, B.W. Ritchie, G.J. Harrison, and L.R. Harrison, Editors. 1994, Wingers: Lake Worth. p. 538-555.
4. Giladi, I., D. L. Goldstein, B. Pinshow, and R. Gerstberger, Renal function and plasma levels of arginine vasotocin during free flight in pigeons. *J Exp Biol*, 1997. 200 (Pt 24): p. 3203-11.
5. J. K. A. Cook, J. Chesher, W. Baxendale, N. Greenwood, M. B. Huggins & S. J. Orbell (2001): Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus, *Avian Pathology*, 30:4, 423-426
6. Liu, S.W. and Kong, X.G. 2004. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathol.* 33: 321-327.
7. J. J. (Sjaak) de Wit, Jane K. A. Cook & Harold M. J. F. van der Heijden (2011): Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures, *Avian Pathology*, 40:3, 223-235
8. Jane K. A. Cook , M. Jackwood & R. C. Jones (2012) The long view: 40 years of infectious bronchitis research, *Avian Pathology*, 41:3, 239-250, DOI: 10.1080/03079457.2012.680432
9. Meulemans G et al. Epidemiology of infectious bronchitis virus in broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. *Avian Pathol*, 2001, 30: 411-421.
10. Smith, H. W, J. K. A. Cook, and Z. E. Parsell. 1985. The experimental infection of chickens with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *J Gen Viral.* 66:777-786.
11. Cavanagh D., Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus, *Avian Pathol.* (2003) 32:567–582.
12. Brice ROBINEAU et Pierre-Yves MOALIC, une manifestation clinique de la bronchite infectieuse : les poules fausses pondeuses ; évolution en France des coronavirus responsables. *Bull. Acad. Vét. France* — 2009 - Tome 162 - N°2 <http://www.academie-veterinaire defrance.org>, 155-160.
13. Cavanagh D., NAQI S.A., Infectious bronchitis In : CALNEK B.W., BARNES H. J., BEARD C. W., et al., *Diseases of poultry*, Tenth edition, 1997, 511-526.
14. Mark W. Jackwood (2012) Review of Infectious Bronchitis Virus around the World. *Avian Diseases: December 2012, Vol. 56, No. 4*, pp. 634-641.
15. Beaudette F and Hudson C, "Cultivation of the virus of infectious bronchitis," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 90, pp. 51–60, 1937.
16. Jungherr, E.L., Chomiak, T.W. & Luginbuhl, R.E. (1956). Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. In *Proceedings of 60th Annual Meeting of the United States Livestock Sanitary Association* (pp. 203209). Chicago, IL, USA.

17. Yudong, W.; YongLin, W.; Zichun, Z.; GenChe, F.; Yihai, J.; Xiang, L.; Jiang, D.; Shushuang, W. Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chin. J. Anim. Quarantine* **1998**, *15*, 1–3.
18. Ganapathy, K.; Wilkins, M.; Forrester, A.; Lemiere, S.; Cserep, T.; McMullin, P.; Jones, R.C. QX-like infectious bronchitis virus isolated from cases of proventriculitis in commercial broilers in England. *Vet. Rec.* 2012, *171*, 597.
19. Moreno, A.; Franzo, G.; Massi, P.; Tosi, G.; Blanco, A.; Antilles, N.; Biarnes, M.; Majo, N.; Nofrarias, M.; Dolz, R.; et al. A novel variant of the infectious bronchitis virus resulting from recombination events in Italy and Spain. *Avian Pathol.* 2017, *46*, 28–35.
20. Ovchinnikova, E.V.; Bochkov, Y.A.; Shcherbakova, L.O.; Nikonova, Z.B.; Zinyakov, N.G.; Elatkin, N.P.; Mudrak, N.S.; Borisov, A.V.; Drygin, V.V. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates from Russia and neighbouring countries: Identification of intertypic recombination in the S1 gene. *Avian Pathol.* 2011, *40*, 507–514.
21. Krapez, U.; Slavec, B.; Barlic-Maganja, D.; Rojs, O.Z. Molecular analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Slovenia between 1990 and 2005: A retrospective study. *Virus Genes* 2010, *41*, 414–416.
22. Pohjola, L.K.; Ek-Kommonen, S.C.; Tammiranta, N.E.; Kaukonen, E.S.; Rossow, L.M.; Huovilainen, T.A. Emergence of avian infectious bronchitis in a non-vaccinating country. *Avian Pathol.* 2014, *43*, 244–248.
23. Abro, S.H.; Renstrom, L.H.; Ullman, K.; Belak, S.; Baule, C. Characterization and analysis of the full-length genome of a strain of the European QX-like genotype of infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.* 2012, *157*, 1211–1215.
24. Irvine, R.M.; Cox, W.J.; Ceeraz, V.; Reid, S.M.; Ellis, R.J.; Jones, R.M.; Errington, J.; Wood, A.M.; McVicar, C.; Clark, M.I. Detection of IBV QX in commercial broiler flocks in the UK. *Vet. Rec.* 2010, *167*, 877–879.
25. Valentin TUDOR, Gheorghe Florinel BRUDAȘCĂ, Mihaela NICULAE, Eموke PALL, Carmen Dana ȘANDRU, Vlad NEGRUȚIU, Silvana POPESCU, Marina SPÎNU, 2018. REGIONAL DISTRIBUTION OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS STRAINS IN ROMANIA. *AgroLife Scientific Journal - Volume 7, Number 1*, 2018, 143-147.
26. Fabricant, J., 1998. The early history of infectious bronchitis. *Avian Dis.* 42 (4): 648-650.
27. Johnson, R. B., & Marquardt, W. W. (1976). Strains of Infectious Bronchitis Virus on the Delmarva Peninsula and in Arkansas. *Avian Diseases*, 20(2), 382. doi:10.2307/1589277.
28. Cavanagh, D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* 34, 439-448.
29. Cavanagh, D., Coronavirus avian infectious bronchitis virus, *Vet. Res.*, 2007, 38:281-297.
30. Chen, C. H., C. L. Shao, and D. X. Pengo 1997. Isolation and identification of a kidney type strain of infectious bronchitis virus. *Chinese J Vet Sci Technol.* 27:22-23.
31. Nix, W. A., D. S. Troeber, B. F. Kingham, C. L. Keeler, Jr., and J. Gelb, Jr. 2000. Emergence of subtype strains of the Arkansas serotype of infectious bronchitis virus in Delmarva broiler chickens. *Avian Diseases.* 44:568-581.

32. Enjuanes, L., D. Brian, D. Cavanagh, K. Holmes, M. M. C. Lai, H. Laude, P. Masten, P. Rottier, S. Siddell, W. 1. M. Spaan, F. Taguchi, P. Talbot, P. 2000. Coronaviridae. In *Virus Taxonomy*. Academic Press: New York, 835-849.
33. Stadler K, Masignani V, Eickmann M, Becker S, Abrignani S, Klenk HD, Rappuoli R: SARS--beginning to understand a new virus. *Nat Rev Microbiol* 2003, 1:209-218.
34. BRUDER, M. 1991. Le diagnostic sérologique de la bronchite infectieuse aviaire par la méthode d'inhibition de l'hémagglutination. Quelques exemples dans six élevages de poules pondeuses. Th. : Med. vet. : Lyon, 1991. 74.
35. SMATI R., SILIM A., GUERTIN C., HENRICHON M., MARANDI M., ARELLA M., MERZOUKI A. Molecular characterization of three new avian infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated in Quebec. *Virus Genes*, 2002, 25:1, 85-93.
36. Kusters JG, Jager EJ, Niesters HG, van der Zeijst BA. Sequence evidence for RNA recombination in field isolates of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Vaccine* 1990; 8:605-8.
37. CORRAND., Evaluation de l'efficacité de souches vaccinales contre un variant de la bronchite infectieuse aviaire isolé au Québec., Université Paul-Sabatier de Toulouse., 2008.
38. Ambali A.G., Jones R.C., Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus, *Avian Dis.* (1990) 34:809–817.
39. WINTER C., SCHEGMANN-WESSELS C., CAVANAGH D., NEUMAN U., HERRLER G., Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian infectious bronchitis virus, *J. Gen. Virol.*, 2006, 87:1209-1216.
40. BALESTEROS M.L., SANCHEZ C.M., ENJUANES L. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism, *Virology*, 1997, 227:378-388.
41. HAIJEMA B.J., VOLDERS H., ROTTIER P.J.M., Switching species tropism: an effective way to manipulate the feline coronavirus genome, *J. Virol.*, 2003, 77:4528-4538.
42. ANIMAS S.B., OTSUKI K., HANAYAMA M., SANEKATA T., TSUBOKURA M. Experimental infection with avian infectious bronchitis virus (Kagoshima-34 strain) in chicks at different ages. *J. Vet. Med. Sci.*, 1994, 56(3):443-7.
43. COOK J., OTSUKI K., HUGGINS M., BUMSTEAD N., Investigations into resistance of chicken lines to infection with infectious bronchitis virus, *Adv Exp Med Biol.*, 1990, 276:491-6.
44. L. D. Bacon , D. B. Hunter , H. M. Zhang , K. Brand & R. Etches (2004), Retrospective evidence that the MHC (B haplotype) of chickens influences genetic resistance to attenuated infectious bronchitis vaccine strains in chickens, *Avian Pathology*, 33:6, 605-609, DOI: 10.1080/03079450400013147.
45. Joiner, K. S., Hoerr, F. J., Ewald, S. J., van Santen, V. L., Wright, J. C., van Ginkel, F. W., & Toro, H. (2007). Pathogenesis of Infectious Bronchitis Virus in Vaccinated Chickens of Two Different Major Histocompatibility B Complex Genotypes. *Avian Diseases*, 51(3), 758–763.
46. Hofstad, M.S., Cross-immunity in chickens using seven isolates of avian infectious bronchitis virus, *Avian Diseases*, 1981, 25:650-654.
47. ALEXANDER, D.J. and GOUGH, R.E. (1977) Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. *Research in Veterinary Science* 23: 344-347.

48. Alexker Raj G., Jones R.C., Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken, *Avian Pathol.* (1997) 26:677–706.
49. Gay, K. 2000. Infectious bronchitis virus detection and persistence in experimentally infected chickens. M.S. thesis, Cornell University: Ithaca, New York.
50. Cavanagh D., Naqi S., Infectious bronchitis, in: Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R., Swayne D.E. (Eds.), *Diseases of poultry*, Iowa, 11th edition, Ames, Iowa State University Press, 2003, pp. 101–119.
51. Chubb, R. C., V. Huynh, and R. Law. 1987. The detection of cytotoxic lymphocyte activity in chickens infected with infectious bronchitis virus or fowl pox virus. *Avian Pathol.* 16:395-405.
52. Parsons, D., Ellis, M.M., Cavanagh, D. & Cook, J.K.A. (1992). Characterisation of an infectious bronchitis virus from vaccinated broiler breeders. *Veterinary Record*, 131, 408-411.
53. Villarreal, L. Y., P. E. Brandão, J. L. Chacón, A. B. Saidenberg, M. S. Assayag Jr., R. C. Jones, and A. J. P. Ferreira. 2007. Molecular characterization of infectious bronchitis virus strains isolated from the enteric contents of Brazilian laying hens and broilers. *Avian Dis.* 51:974–978.
54. PANTIN-JACKWOOD M. J., BROWN T. P., HUFF G. R., Reproduction of proventriculitis in commercial and specific-pathogen-free broiler chickens., *Avian Diseases*, 2005, 49:352-360.
55. Cumming, R. B. 1963. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Aust Vet J.* 39:145–147.
56. Cumming, R. B. 1969. The control of avian infectious bronchitis/nephrosis in Australia. *Aust Vet J.* 45:200–203.
57. Lister, S. A., J. V. Beer, R. E. Gough, R. G. Holmes, J. M. W. Jones, and R. G. Orton. 1985. Outbreaks of nephritis in pheasants (*Phasianus colchicus*) with a possible coronavirus etiology. *Vet Rec.* 117:612–613.
58. Benyeda, Z., Szeredi, L., Mató, T., Süveges, T., Balka, G., Abonyi-Tóth, Z., Palya, V. (2010). Comparative Histopathology and Immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B Serotypes of Infectious Bronchitis Virus Infection in Chickens. *Journal of Comparative Pathology*, 143(4), 276–283. doi:10.1016/j.jcpa.2010.04.007.
59. Ziegler AF, B.S. Ladman, P.A. Dunn, A. Schneider, S. Davison, P.G. Miller, H. Lu, D. Weinstock, M. Salem, R.J. Eckroade, and J.Jr. Gelb. 2002. Nephropathogenic infectious bronchitis in Pennsylvania chickens 1997–2000. *Avian Dis.* 46:847–58.
60. RIDDELL C., Infectious Bronchitis., In: *Avian histopathology*, Second Edition (2001)., American Association of Avian Pathology.
61. Riddell, C. 1987. *Avian Histopathology*. American Association of Avian Pathology: Kennett Square, PA.
62. Chen, B. Y., S. Hosi, T. Nunoya, and C. Itakura. 1996. Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. *Avian Pathol.* 25:269–283.
63. Sevoian, M. and P.P. Levine. Effects of infectious bronchitis on the reproductive tracts, egg production, and egg quality of laying chickens. 1957. *Avian Dis.* 1:136–164.
64. Seo, H. S. and E. W. Collisson. 1997a. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. *J Virol.* 71:5173–5177.

65. Seo, H. S. and E. W. Collisson. 1997b. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. *J Virol.* 71:7889–7894.
66. Cook, J. K. A., H. W. Smith, and M. B. Huggins. 1986. Infectious bronchitis immunity: Its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *J Gen Virol.* 67:1427–1434.
67. De Wit, J. J., M. C. M. de Jong, A. Pijpers, and J. H. M. Verheijden. 1998. Transmission of infectious bronchitis virus within vaccinated and unvaccinated groups of chickens. *Avian Pathol.* 27:464–471.
68. Davelaar, F. G. and B. Kouwenhoven. 1976. Changes in the Harderian gland of the chicken following conjunctival and intranasal infection with infectious bronchitis virus in one- and 20-day old chickens. *Avian Pathol.* 5:39–50.
69. Gelb, J., Jr., W. A. Nix, and S. D. Gellman. 1998. Infectious bronchitis virus antibodies in tears and their relationship to immunity. *Avian Dis.* 42:364–374.
70. MARTINS N.R., MOCKETT A.P., BARRETT A.D., COOK J.K. IgM responses in chicken serum to live and inactivated infectious bronchitis virus vaccines. *Avian Diseases*, 1991, 35:470-475.
71. COLLISSON E. W., PEI J., DZIELAWA J., SEO S.H., Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry, *Dev. Comp. Immunol.*, 2000, 24:187-200.
72. Janse, M. E., D. van Rooselaar, and G. Koch. 1994. Leukocyte subpopulations in kidney and trachea of chickens infected with infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 23:513–523.
73. Timms, L. M. and C. D. Bracewell. 1981. Cell mediated and humoral immune response of chickens to live infectious bronchitis vaccines. *Res Vet Sci.* 31:182–189.
74. Timms, L. M. and C. D. Bracewell. 1983. Cell mediated and humoral immune response of chickens to inactivated oil-emulsion infectious bronchitis vaccine. *Res Vet Sci.* 34:224–230.
75. OTSUKI K., NAKAMURA T., KUBOTA N., KAWAOKA Y., TSUBOKURA M., 1987. Comparison of two strains of avian infectious bronchitis virus for their interferon induction.
76. Klieve, A. V. and R. B. Cumming. 1988. Immunity and cross-protection to nephritis produced by Australian infectious bronchitis viruses used as vaccines. *Avian Pathol.* 17:829–839.
77. Klieve, A. V. and R. B. Cumming. 1988. Infectious bronchitis: Safety and protection in chickens with maternal antibody. *Aust Vet J.* 65:396–397.
78. Mockett, A. P. A., J. K. A. Cook, and M. B. Huggins. 1987. Maternally-derived antibody to infectious bronchitis virus: Its detection in chick trachea and serum and its role in protection. *Avian Pathol.* 16:407–416.
79. Mondal, S. P. and S. A. Naqi. 2001. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: Its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. *Vet Immunol and Immunopath.* 79:31–40.
80. De Wit, J. J. 2000. Detection of infectious bronchitis. *Avian Pathol.* 29:71–93.
81. R. C. and A. G. Ambali. 1987. Re-excretion of an enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. *Vet Rec.* 120:617–620.

82. B. and J. Fabricant. 1990. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 34:865–870.
83. Bhattecharjee, P. S., C. J. Naylor, and R. C. Jones. 1994. A simple method for fluorescence staining of tracheal organ cultures for the rapid identification of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 23:471–480.
84. Handberg, K. J., O. L. Nielsen, M. W. Pedersen, and P. H. Jorgensen. 1999. Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. *Avian Pathol.* 28:327–335.
85. Johnson, R. B. and W. W. Marquardt. 1975. The neutralizing characteristics of strains of infectious bronchitis virus as measured by the constant virus variable serum method in chicken tracheal cultures. *Avian Dis.* 19:82–90.
86. Alvarado I.R., P.Villegas, J. El-Attrache, and M.W. Jackwood. 2006. Detection of Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus in broilers. *Avian Dis.* 50:292–7.
87. Cavanagh, D., P. J. Davis, J. K. A. Cook, D. Li, A. Kant, and G. Koch. 1992. Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 21:33–43.
88. Jonassen, C.M., Kofstad, T., Larsen, I.L., Lovland, A., Handeland, K., Follestad, A., and Lillehaug, A. 2005. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *J Gen Virol.* 86: 1597–1607.
89. Kant, A., G. Koch, D. J. van Roozelaar, J. G. Kusters, J. G. Poelwijk, and B. A. M. van der Zeijst. 1992. Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *J Gen Virol.* 73:591–596.
90. Keeler, C. L., Jr., K. L. Reed, W. A. Nix, and J. Gelb, Jr. 1998. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RTPCR of the peplomer (S1) gene. *Avian Dis.* 42:275–284.
91. Koch, G., L. Hartog, A. Kant, and D. J. van Roozelaar. 1990. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: Correlation with biological functions. *J Gen Virol.* 71:1929–1935.
92. Mardani K, A.H. Noormohammadi, J. Ignatovic, G.F. Browning. 2006. Typing infectious bronchitis virus strains using reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis to compare the 3' 7.5 kb of their genomes. *Avian Pathol.* 35:63–9.
93. Fulton, R. M., W. M. Reed, and H. L. Thacker. 1993. Cellular responses of the respiratory tract of chickens to infection with Massachusetts 41 and Australian T infectious bronchitis viruses. *Avian Dis.* 37:951–960.
94. Kingham, B. F., C. L. Keeler, Jr., W. A. Nix, B. S. Ladman, and J. Gelb, Jr. 2000. Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S1 gene. *Avian Dis.* 44:325–335.
95. Lee CW, D.A. Hilt and M.W. Jackwood MW. 2003. Typing of field isolates of infectious bronchitis virus based on the sequence of the hypervariable region in the S1 gene. *J Vet Diagn Invest.* 15:344–8.
96. Mondal S.P. and C.J. Cardona. 2003. Characterization of infectious bronchitis virus isolates by slot blot hybridization. *Avian Dis.* 47:725–30.

97. Ramneek, Mitchell NL, and R.G. McFarlane RG. 2005. Rapid detection and characterisation of infectious bronchitis virus (IBV) from New Zealand using RT-PCR and sequence analysis. *N Z Vet J* 53:457–61.
98. De Wit, J. J., D. R. Mekkes, B. Kouwenhoven, and J. H. M. Verheijden. 1997. Sensitivity and specificity of serological tests for detection of infectious bronchitis virus induced antibodies in broilers. *Avian Pathol.* 26:105–118.
99. Karaca, K. and S. Naqi. 1993. A monoclonal antibody-based ELISA to detect serotype-specific infectious bronchitis virus antibodies. *Vet Microbiol.* 34:249–257.
100. Chubb, R. C., V. Huynh, and R. Bradley. 1988. The induction and control of delayed type hypersensitivity reactions induced in chickens by infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 17:371–383.
101. Ignjatovic, J. and L. Galli. 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Arch Virol.* 138:117–134.
102. Ignjatovic, J., S. I. Sapats, and F. A. Ashton. 1997. Long term study of Australian infectious bronchitis viruses indicates a major antigenic change in recently isolated strains. *Avian Pathol.* 26:535–552.
103. Eck, J. H. H. van. 1983. Effects of experimental infection of fowl with EDS'76 virus, infectious bronchitis virus, and/or fowl adenovirus on laying performance. *Vet Q.* 5:11–25.
104. GELB Jr J., WEISMANN Y., LADMAN B.S., MEIR R., S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000), *Avian Pathology*, 2005, 34(3), 194-203.
105. KHUAN-YU L., HUI-CHUNG W., CHING-HO W., Protective effect of vaccination in chicks with local infectious bronchitis viruses against field virus challenge, *J Microbiol Immunol Infect*, 2005, 38:25-30.
106. Jackwood, M.W., Hilt, D.A., Williams, S.M., Woolcock, P., Cardona, C. & O'Connor, R. (2007). Molecular and serologic characterization, pathogenicity, and protection studies with infectious bronchitis virus field isolates from California. *Avian Diseases*, 51, 527-533.
107. Martin, M. P., Wakenell, P. S., Woolcock, P., & O'Connor, B. (2007). Evaluation of the Effectiveness of Two Infectious Bronchitis Virus Vaccine Programs for Preventing Disease Caused by a California IBV Field Isolate. *Avian Diseases*, 51(2), 584–589.
108. Huang Y. P. and C. H. Wang CH. 2006. Development of attenuated vaccines from Taiwanese infectious bronchitis virus strains. *Vaccine.* 24:785–91.
109. Macdonald, J. W. and D. A. McMartin. 1976. Observations on the effects of the H52 and H120 vaccine strains of the infectious bronchitis virus in the domestic fowl. *Avian Pathol.* 5:157–173.
110. Bijlenga, G., Cook, J.K.A, Gelb, J., and de Wit, J.J. (2004). Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from The Netherlands as a vaccine: a review. *Avian Pathol.* 33:550-557.
111. Andrade, L. F., P. Villegas, and O. J. Fletcher. 1983. Vaccination of day-old broilers against infectious bronchitis: Effect of vaccine strain and route of administration. *Avian Dis.* 27:178–187.

112. Ratanasethakul, C. and R. B. Cumming. 1983. The effect of route of infection and strain of virus on the pathology of Australian infectious bronchitis. *Aust Vet J.* 60:209–213.
113. GLAHN, R. P., WIDEMAN, R. F., & COWEN, B. S. (1988). Effect of Dietary Acidification and Alkalinization on Urolith Formation and Renal Function in Single Comb White Leghorn Laying Hens. *Poultry Science*, 67(12), 1694–1701. doi:10.3382/ps.0671694.
114. Afifi, N.A. and A. Ramadan, Kinetic disposition, systemic bioavailability and tissue distribution of apramycin in broilers chickens. *Res Vet Sci*, 1997. 62: p.249-252.
115. Anadon, A., M. R. Martinez-Larranaga, J. Iturbe, M. A. Martinez, M. J. Diaz, M. T. Frejo, and M. Martinez, Pharmacokinetics and residues of ciprofloxacin and its metabolites in broiler chickens. *Res Vet Sci*, 2001. 71(2): p. 101-9.
116. Bailey, T.A., J. H. Samour, J. Naldo, and J.C. Howlett, Lead toxicosis in captive houbara bustards (*Chlamydotis undulata maqueenii*). *Vet Rec*, 1995. 137: p. 193-194.
117. Om, A.S., K.W. Chung, and H.-S. Chung, Effect of cadmium accumulation on renal tissue of broilers. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2002. 68: p. 297-301.
118. Phalen, D.N., S. Ambrus, and D.L. Graham. The avian urinary system: Form, function, and diseases. in *Proc Assoc Avian Vet.* 1990. Phoenix, AZ.
119. Yokota, S.D., S. Benyajati, and W.H. Dantzler, Comparative aspects of glomerular filtration in vertebrates. *Ren Physiol*, 1985. 8(4-5): p. 193-221.
120. Goldstein, D.L. and E. Skadhauge, Renal and estrarenal regulation of body fluid composition, in *Sturkie's Avian Physiology*, G.C. Whittow, Editor. 2000, Academic Press: San Diego, Calif. p. 265-291.
121. Braun, E.J., Comparative Renal Function in Reptiles, Birds and Mammals. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 1998. 7(2): p. 62-71.
122. Brummermann, M. and E.J. Braun, Effect of salt and water balance on colonic motility of white leghorn roosters. *Am J Physiol*, 1995. 268(3 Pt 2): p. R690-8.
123. Braun, E.J., Integration of renal and gastrointestinal function. *J Exp Zool*, 1999. 283(4-5): p. 495-9.
124. Siller, W.G., Kidney diseases in the fowl, in *Poult Dis*, R.F. Gordon and T.T.W. Jordan, Editors. 1982, Balliere Tindall: London. p. 247-259.
125. Goecke, C.S. and D.L. Goldstein, Renal glomerular and tubular effects of antidiuretic hormone and two antidiuretic hormone analogues in house sparrows (*Passer domesticus*). *Physiol Zool*, 1997. 70(3): p. 283-91.
126. Roberts, J.R. and W.H. Dantzler, Glomerular filtration rate in conscious unrestrained starlings under dehydration. *Am J Physiol*, 1989. 256(4 Pt 2): p. R836-9.
127. Siller, W.G., Renal pathology of the fowl. *Avian Pathol*, 1981. 10: p. 187-262.
128. Grauer, G.F., Glomerulonephritis. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, 1992. 7(3): p. 187-97.
129. Bolton, W.K., F.L. Tucker, and B.C. Sturgill, New avian model of experimental glomerulonephritis consistent with mediation by cellular immunity. Non humorally mediated glomerulonephritis in chickens. *J Clin Invest*, 1984. 73(5): p. 1263-76.

130. Bermudez, A.J. and B.A. Hopkins, Hemoglobinuric nephrosis in a rhea (*Rhea americana*). *Avian Dis*, 1995. 39(3): p. 661-5.
131. La Bonde, J., Toxicity in pet avian patients. *Semin Avian Exotic Pet Med*, 1995. 4(1): p. 23-31.
132. Degernes, L.A., Toxicities in waterfowl. *Semin Avian Exotic Pet Med*, 1995. 4(1): p. 15-22.
133. Schmidt, R.E., Types of Renal Diseases in Avian Species. *Vet Clin Exot Anim*, 2006. 9: p. 97-106.
134. Orosz, S.E., G.M. Dorrestein, and B.L. Speer, Urogenital disorders, in *Avian Medicine and Surgery*, R.B. Altman, et al., Editors. 1997, WB Saunders: Philadelphia. p. 614-644.
135. Gerlach, H., Bacterial diseases, in *Clinical Avian Medicine and Surgery*, G.J. Harrison and L.R. Harrison, Editors. 1986, WB Saunders: Philadelphia. p. 434-453.
136. Olsen, G.H., S.H. Shane, and K.S. Harrington. Investigation of the pathology of *Klebsiella pneumonia* in psittacine birds. in *Proc Assoc Avian Vet*. 1986. Miami.
137. Gerlach, H., Chlamydia, in *Clinical Avian Medicine and Surgery*, G.J. Harrison and L.R. Harrison, Editors. 1986, WB Saunders: Philadelphia. p. 457-463.
138. Sato, Y., T. Aoyagi, S. Matsuura, S. Fukui, I. Kitazawa, K. Nishimori, and Y. Yokomizo, An occurrence of avian tuberculosis in hooded merganser (*Lophodytes cucullatus*). *Avian Dis*, 1996. 40(4): p. 941-4.
139. Tham, V.L., D.A. Purcell, and D.J. Schultz, Fungal nephritis in a grey-headed albatross. *J Wild Dis*, 1974. 10: p. 306-309.
140. Nakamura, K. and F. Abe, Respiratory (especially pulmonary) and urinary infections of *Cryptosporidium* in layer chickens. *Avian Pathol*, 1988. 17: p. 73-71.
141. Abbassi, H., F. Coudert, Y. Cherel, G. Dambrine, J. Brugere-Picoux, and M. Naciri, Renal *Cryptosporidiosis* (*Cryptosporidium baileyi*) in specific-pathogenfree chickens.
142. Tully TN, et al: Liposarcomas in a monk parakeet (*Myiopsitta monachus*). *J Assoc Avian Vet* 8(3):120-124, 1994.
143. Turk JR, Kim J, Gallina AM: Seminoma in a pigeon. *Avian Dis* 25:752-755, 1981.
144. Dumonceaux, G. and G.J. Harrison, Toxins, in *Avian Medicine: Principles and Application*, G.J. Harrison, L.R. Harrison, and B.W. Ritchie, Editors. 1994, Wingers: Lake Worth. p. 1030-1053.
145. Hargis, A.M., Avacado (*Persa Americana*) intoxication in caged birds. *J Am Vet Med Assoc*, 1989. 194: p. 64-66.
146. Schmidt, R.E., D.R. Reavill, and D. Phalen, Pathology of pet and aviary birds. 2003, Ames: Iowa State Press : Blackwell Publishing. 234p.
147. Lowenstine, L.J., Diseases of excess in nutritional disorders of birds, in *Zoo and Wild Animal Medicine*, M.E. Fowler, Editor. 1986, WB Saunders: Philadelphia. p. 203.
148. Trampel, D.W., T.M. Pepper, and B.L. Blagburn, Urinary tract cryptosporidiosis in commercial laying hens. *Avian Dis*, 2000. 44(2): p. 479-84.
149. Austic, R.E. and R.K. Cole, Impaired renal clearance of uric acid in chickens having hyperuricemia and articular gout. *Am J Physiol*, 1972. 223(3): p. 525-30.

150. Humphreys, P.N., Noninfectious diseases. Ducks, geese, swans and screamers (Anseriformes), in Zoo and Wild Animal Medicine, M.E. Fowler, Editor. 1986, WB Saunders: Philadelphia. p. 355.
151. Takeshita, K. Hypervitaminosis D in baby macaws. in Proc Assoc Avian Vet. 1986. Miami.
152. Ekstrom, D.D. and L.A. Degernes. Avian gout. in Proc Assoc Avian Vet. 1989. Seattle.
153. Pollock, C. (2006). Diagnosis and Treatment of Avian Renal Disease. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice, 9(1), 107–128. doi:10.1016/j.cvex.2005.10.007.
154. Toma B., Dufour B., Sanaa M., Bénet J.J., Shaw A., Moutou F., Louza A., «Epidémiologie appliquée à la lutte collective contre les maladies animales transmissibles majeures », (2001).
155. Greg. C., “Water for livestock: interpreting water quality tests”, (2007), 13p.
156. Brian, D.F. and Casey, W.R., “Poultry Drinking Water Primer”, Bulletin 1301, (April 2009), 1-3p.
157. Villate, D., “maladies des volailles”, manuel pratique, édition France agricole, deuxième édition, (2001), 86- 96.
158. Douifi M. et Rahal K. « Etude de la qualité de l’eau de boisson en élevage de poulet de chair (Daira d’EL-OMARIA, wilaya de MEDEA).mémoire de magistère, USD Blida, 2011.
159. Cook, J. K., Orbell, S. J., Woods, M. A., & Huggins, M. B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. Avian Pathology, 28(5), 477-485.
160. Gibaud S., 2011. « incidence du coronavirus de la bronchite infectieuse et de ses trois variants en France », thèse pour le diplôme d’état de docteur vétérinaire, Nantes, France.
161. Braun, E.J., Comparative Renal Function in Reptiles, Birds and Mammals. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, 1998. 7(2): p. 62-71.
162. Brudere C. 1992. « La thérapeutique aviaire, Manuel de pathologie aviaire », édition : Jeanne Brugere-Picoux et Amer Silim, 365-367.
163. Drouin P. 2000. « Les principes de l’hygiène en productions avicoles », Page : 10-14. Edition : Sciences et technologies avicoles. Hors série – Septembre 2000.
164. Duval J., Soussy C.J. 1990. « Antibiothérapie ». Masson, 4ème édition.
165. Alders R. & Spradbrow P. (2001). – Appendix 2: Collection of blood from the wing vein of chickens. In Controlling Newcastle disease in village chickens: a field manual. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) Monograph no. 82. ACIAR, Canberra, 78-80.
166. Xu G, Liu X, Zhao Y, Chen Y, Zhao J, Zhang G. (2016) Characterization and analysis of an infectious bronchitis virus strain isolated from southern China in 2013. Virol J. 13:40.
167. Cavanagh, D., Picault, J.P., Gough, R.E., Hess, M., Mawditt, K. and Britton, P. (2005) Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. Avian Pathol., 34(1): 20-25.

168. Worthington, K.J., Currie, R.J.W. and Jones, R.C. (2008) A reverse transcriptase polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol.*, 37(2): 247-257.
169. El Bouqdaoui, M., Mhand, R.A., Bouayoune, H. and Ennaji, M.M. (2005) Genetic grouping of nephropathogenic avian infectious bronchitis virus isolated in Morocco. *Int. J. Poult. Sci.*, 4(9): 721-727.
170. Feng, J., Hu, Y., Ma, Z., Yu, Q., Zhao, J., Liu, X. and Zhang, G. (2012) Virulent avian infectious bronchitis virus, people's republic of China. *Emerg. Infect. Dis.*, 18(12): 1994-2001.
171. Amit, G., Hanish, D., Pal, J.K. and Prajapati, K.S. (2010) Isolation, identification and molecular characterization of IBV variant from outbreak of visceral gout in commercial broilers. *Vet. World*, 3(8): 375.
172. Sid, H., Fettah, A. and Lounas, A. (2011) Descriptive study of an outbreak of avian urolithiasis in a large commercial egg complex in Algeria. *Not. Sci. Biol.*, 3(1): 22-25.
173. Fellahi, S., Harrak, M.E.L., Ducatez, M., Saad Ibn Souda Koraichi, L., Kuhn, J.H., Khayi, S., Houadfi, M.L., Ennaji, M.M. (2015) Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus S1 glycoprotein regions reveals emergence of a new genotype in Moroccan broiler chicken flocks. *Virology*, 12(1): 116.
174. Lashgari, M.S. and Newman, J.A. (1984) Serological comparison and antigenic relationships of seven serotypes of infectious bronchitis virus using the haemagglutination-inhibition test. *Avian Dis.*, 28(2): 435-443.
175. Brown, A.J. and Bracewell, C.D. (1985) Application of the haemagglutination inhibition test to typing of infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.*, 116(2): 47-48.
176. Cook, J.K.A., Brown, A.J. and Bracewell, C.D. (1987) Comparison of the haemagglutination inhibition test and the serum neutralization test in tracheal organ cultures for typing infectious bronchitis virus strains. *Avian Pathol.*, 16(3): 505-511.
177. Eterradossi N, Britton P: Avian infectious bronchitis, in: Biological Standards Commission (Ed.), *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health, Paris, France. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf. Last accessed on 15-11-2018.
178. Shengwang, L. and Kong, X. (2004) A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. *Avian Pathol.*, 33(3): 321-327.
179. Liu, S.W., Zhang, Q.X., Chen, J.D., Han, Z.X., Liu, X., Feng, L., Shao, Y.H., Rong, J.G., Kong, X.G. and Tong, G.Z. (2006) Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Arch. Virol.*, 151(6): 1133-1148.
180. Kannan, G., Ball, C. and Forrester, E. (2015) Genotypes of infectious bronchitis viruses circulating in the Middle East between 2009 and 2014. *Virus Res.*, 210 : 198-204.
181. Kusters, J.G., Niesters, H.G.M., Lenstra, J.A., Horzinek, M.C. and Van Der Zeijst, B.A.M. (1989) Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology*, 169(1): 217-221.
182. Alexander, D.J., Allan, W.H., Biggs, P.M., Bracewell, C.D., Darbyshire, J.H., Dawson, P.S., Harris, A.H., Jordan, F.T., Macpherson, I., McFerran, J.B., Randall,

- C.J., Stuart, J.C., Swarbrick, O. and Wilding, P. (1983) A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.*, 113(3): 64.
183. Terregino, C., Toffan, A., Beato, M.S., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., Ortali, G., Mancin, M. and Capua, I. (2008) Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen-free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol.*, 37(5): 487-493.
184. Sasipreeyajan, J., Pohuang, T. and Sirikobkul, N. (2012) Efficacy of different vaccination programs against Thai QX-like infectious bronchitis virus. *Thai. J. Vet. Med.*, 42(1): 73-79.