



Institut des Sciences
Vétérinaires-Blida

Université Saad
Dahlab-Blida1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du
Diplôme de Master complémentaire Vétérinaire

**Diagnostic histopathologique des cas sauvages de Maladie de
Marek chez des poules reproductrices chair dans la région centre
d'Algérie**

Présenté par:

LADDI MOHAMEDLAMINE

MANSOURI MALEK

Devant le jury:

Président(e):	HADDOUM M.	MCA	ISV-BLIDA
Examineur:	SAIDI A.	MAA	ISV-BLIDA
Promoteur:	LOUNAS A.	MCB	ISV-BLIDA

Année:2020/2021

REMERCIEMENT

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

J'exprime toute ma gratitude, mes profonds respects à mon promoteur

Dr .LOUNAS ABDELAZIZ

Qui malgré ses lourdes tâches n'a cessé de nous m'encourager et de nous guider par ses conseils, son aide, et surtout pour sa gentillesse.

Madame Haddoum M

Professeur à l'institut des sciences vétérinaire de Blida (Université Blida 1)

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

Hommages respectueux

Madame Dr SAIDI A

Professeur à l'institut des sciences vétérinaire de Blida (Université Blida 1)

Qui apporté un œil critique sur ce travail

Sincères remerciements

Ainsi, à tous nos enseignants qui ont fait tout leur possible pour nous donner les connaissances nécessaires.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail

A mon guide, qui n'a jamais cessé de me conseiller quand j'en avais le plus besoin, à toi mon éternel guide ,mon PERE.

A celle qui m'a donné magnifique modèle de la beur et de persévérance, à ma précieuse mère qui a veillé sur moi et continue de le faire ,elle qui a toujours surmonter le moral chaque fois que j'en avais besoin ,merci

MAMAN.

*A mes très chers frères et chère sœur A
toute ma famille paternelle Mansouri
et maternelle Adjout.*

A tous mes chers amis.

Mansouri Malek

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail

A mon guide, qui n'a jamais cessé de me conseiller quand j'en avais le plus besoin, à toi mon éternel guide, mon PERE.

A celle qui m'a donné magnifique modèle de la beur et de persévérance ,à ma précieuse mère qui a veillé sur moi et continue de le faire ,elle qui a toujours su remonter le moral chaque fois que j'en avais besoin ,merci MAMAN.

*A mes très chers frères et chère
sœur A toute ma famille paternelle
Laddi et Maternelle.*

A tous mes chers amis.

Laddi Mohamed Lamine

Résumé

Cette thèse est un travail dont l'objet est de l'exploitation des résultats d'analyse d'histopathologie des prélèvements d'organes provenant des élevages de reproducteurs chair présentant des lésions tumorales due au virus de MM (maladie de Marek) .

L'autopsie des oiseaux morts ou euthanasiés a révélé une lymphomatose viscérale dans un grand nombre d'organes (Cœur, foie, rate, proventricule, rein, intestin, bourse de Fabricius, gonades) sous forme de lymphomes diffus ou focaux. Les nerfs périphériques tels que le nerf sciatique ont montré des changements macroscopiques comprenant une perte de striation longitudinale, un changement de couleur (grisâtre) et une augmentation de volume (hypertrophie)

L'examen histopathologique a montré une infiltration lymphomateuse polymorphe multicentrique marquée (foie, poumon, cœur, rate, intestins, proventricule, cerveau, nerfs sciatiques).

Les résultats histopathologiques de l'infiltration et de la prolifération des lymphocytes et des cellules blastiques (lymphoblastes) dans divers organes tels que la rate, le foie, le cœur, les reins sont une preuve de cas sauvage de MM dans les élevages de l'étude.

Les mots clés : Maladie de Marek, tumeurs, histopathologie, lymphomes, nerfs sciatiques, infiltration lymphomateuse.

الملخص:

هذه الرسالة عبارة عن عمل يهدف إلى استغلال نتائج تحليل التشريح المرضي لعينات الأعضاء من مزارع تربية دجاج التسمين المصابة بأفات أورام بسبب فيروس (مرض ماريك).

كشفت تشريح جنث الطيور الميتة أو التي تم قتلها الرحيم عن وجود ورم لمفاوي حشوي في عدد كبير من الأعضاء (القلب ، الكبد ، الطحال ، البروفنتريكولوس ، الكلى ، الأمعاء ، جراب فابريسيوس ، الغدد التناسلية) في شكل أورام ليمفاوية منتشرة أو بؤرية. أظهرت الأعصاب المحيطية مثل العصب الوركي تغيرات عيانية بما في ذلك فقدان التخطيط الطولي وتغير اللون (الرمادي) وزيادة الحجم (تضخم).

أظهر الفحص التشريحي المرضي ارتشاحا لمفاويا متعدد المراكز ملحوظا (الكبد ، الرئة ، القلب ، الطحال ، الأمعاء ، البطيني ، المخ ، الأعصاب الوركية).

تعتبر النتائج النسيجية المرضية للتسلل وانتشار الخلايا الليمفاوية والخلايا المتفجرة (الأورام اللمفاوية) في أعضاء مختلفة مثل الطحال والكبد والقلب والكلى دليلاً على حالات برية من مرض ماريك في قطعان الدراسة.

الكلمات المفتاحية: مرض ماريك، الأورام، التشريح المرضي، الأورام اللمفاوية، العصب الوركي، الارتشاح الليمفاوي .

Summary

This thesis is a work whose purpose is to exploit the results of histopathology analysis of organ samples from broiler breeding farms with tumor lesions due to the MM virus (Marek's disease).

Autopsy of dead or euthanized birds revealed visceral lymphomatosis in a large number of organs (heart, liver, spleen, proventriculus, kidney, intestine, bursa of Fabricius, gonads) in the form of diffuse or focal lymphomas. Peripheral nerves such as the sciatic nerve have shown macroscopic changes including loss of longitudinal striation, change in color (grayish) and increase in volume (hypertrophy).

Histopathological examination showed marked multicentric polymorphic lymphomatous infiltration (liver, lung, heart, spleen, intestines, proventriculus, brain, sciatic nerves).

Histopathological findings of infiltration and proliferation of lymphocytes and blast cells (lymphoblasts) in various organs such as spleen, liver, heart, kidneys are evidence of wild cases of MM in herds of study.

Keywords : Marek's disease, tumors, histopathology, lymphomas, sciatic nerves, lymphomatous infiltration.

Table des matières

REMERCIEMENT

DEDICACE

Résumé

الملخص

Summary

Introduction	1
I. Partie bibliographique	2
I.1 Historique de la maladie	2
I.2 Importance économique	2
I.3 Etiologie :	2
I.4 Symptômes	3
I.5 Lésions microscopiques	3
I.6 Diagnostic	3
I.7 Diagnostic différentiel	4
I.8 Pronostic	4
I.9 Traitement	4
I.10 Prophylaxie	5
• Prophylaxie sanitaire	5
• Prophylaxie médicale	6
- La vaccination	6
II. Partie expérimentale	7
II.1 Objectifs de l'étude	7
II.2 Matériel et méthodes	7
II.2.1 Matériel	7
II.2.2 Matériel de laboratoire	7
II.3 Collecte des données épidémiologiques	8
II.4 Collection d'échantillons de tissus	8
II.5 Etude macroscopique et histopathologique	8
II.5.1 Fixation	9
II.5.2 Inclusion	9
II.5.3 La microtomie	9
II.5.4 Etalement et collage des coupes sur des lames de verre	9
II.5.5 Coloration des lames	10

II.5.6	Montage des lames	10
II.6	Résultats	11
II.6.1	Informations générales	11
II.6.2	Lésions macroscopiques.....	12
II.6.3	Histopathologie	16
II.7	Discussion	20
Conclusion	22
Références bibliographiques	23

Liste des tableaux

page

Tableau 1 : Caracteristiques des exploitation et historique des foyer de la MD dans la région central d'Algérie.7

Liste des figures

page

Figure 1 : Nodules tumorales diffuses au niveau cardiaque.	8
Figure 2 : Nodules tumorales diffuses au niveau hépatique.....	9
Figure 3 : Nodules tumorales diffuses au niveau du proventricule et dilatation (aspect externe).	10
Figure 4 : Nodules tumorales diffuses au niveau du proventricule et dilatation (aspect interne).....	10
Figure 5 :Infiltration lymphoïde de la rate	11
Figure 6 :Infiltration lymphoïde des reins.	11
Figure 7 :Hypertrophie du nerf sciatique.	12
Figure 8 : Lymphocytes pléomorphe (PL) dans le pro ventricule . H&E, X400.	13
Figure 9 :Lymphocytes pléomorphe (PL) dans le foie. H&E, X100.....	13
Figure 10 :Lymphocytes pléomorphe (PL) dans le foie. H&E, X400.....	14
Figure 11: Infiltration diffuse des lymphocytes pléomorphe (PL) dans le nerf sciatique. H&E, X400. ...	15
Figure 12 :Infiltration des lymphocytes pléomorphe (PL) dans le coeur. H&E, X400.	15
Figure 13 :Infiltration des lymphocytes pleomorphe (PL) dans le rein. H&E, X640.....	16

LISTE DES ABREVIATIONS :

MM : Maladie de marek

MMV : Virus de la maladie de marek

HVT : Herpes virus du dindon

MDV : Virus de la maladie de marek

ENSV : Ecole national des sciences vétérinaire

MD : Maladie de marek

PL : Lymphocytes pléomorphe

MM : Maladie de marek

Introduction

Les volailles sont couramment exposées à des maladies néoplasiques, le plus important d'entre eux est la maladie de Marek [MM] causée par le virus de la maladie de Marek [MMV], membre de la famille *Herpesviridea*, *Gallidherpesvirus II*. Des trois sérotypes de MMV [sérototype 1, 2 et 3], seul le sérototype 1 est capable d'induire des tumeurs (**Bertzbach et al, 2020**) et (**Davison, A. J. 2010**). La maladie a un impact économique important, d'une part en raison du coût de la procédure de vaccination et d'autre part par les pertes dues aux épidémies cliniques (**Payne, L. N. et al 2000**).

MM est reconnu pour la première fois il y a plus d'un siècle par un vétérinaire hongrois Josef Marek comme une polynévrite affectant principalement les poules âgées avec une faible morbidité et une mortalité négligeable (**Marek, J. 1907**). La maladie est devenue un problème sérieux à la fin des années 1950 lorsque la nature de la maladie est devenue principalement néoplasique, caractérisée par une mortalité élevée de 30 % ou plus et la forte incidence de tumeurs lymphoïdes viscérales en plus des lésions nerveuses (**Zhuang, X. et al . 2015**).

Un succès spectaculaire dans la prévention et le contrôle de la MM est obtenu par la vaccination (**Boodhoo, N et al. 2016**). Elle consiste en l'application de vaccins de différentes générations [HVT, Respens, SB-1...]. Bien que, le rôle vital joué par la vaccination, des MDV de virulence accrue aient été récemment isolés dans de nombreux pays (**Zhuang, X. et al .2015**) et (**Morrow, C. et al. 2004**), soulevant la question du dépassement du programme de vaccination actuel contre les virus de la MM.

I. Partie bibliographique

I.1 Historique de la maladie

La maladie a été décrite pour la première fois par Josef Marek en 1907, comme une polynévrite des poulets âgés principalement avec une faible morbidité ou bien mortalité négligeables. Dans les années 60 le chemin de la maladie aiguë a commencé à prédominer dans la plupart des pays qui avaient une industrie avicole bien développée avec des pertes économiques **(Calnek et Witter, 1997; Trapp et Osterreider, 2010)**. Le contrôle de la maladie a été effectué avec l'introduction et large utilisation du vaccin contre l'herpès virus de la dinde (HVT), mais Dans les années 1970, l'efficacité du vaccin a diminué en raison d'interférences avec les anticorps maternels et émergence d'une souche dans le terrain du virus de la maladie de Marek (VEM) de plus grande virulence.

L'introduction d'un vaccin bivalent, avec HVT et la souche SB-1 de sérotype 2, au milieu des années 80, excellente protection que lorsque ses composants étaient utilisés séparément

Actuellement, la maladie continue d'être une grave menace pour l'industrie avicole **(Tian et al., 2011)**.

I.2 Importance économique

La maladie de Marek est l'un des plus grands dangers économiques pour les élevages de volailles du fait des saisies et baisses de performances en production de chair, la mortalité pour les volailles à vie longue et de la baisse de la production globale d'œufs.

(<https://www2.zoetis.fr/pathologies/volailles/maladie-de-marek>)

I.3 Etiologie :

La maladie de Marek est causée par un Herpes virus Gallid oncogène 2. Le virus est strictement associé aux cellules dans tous les organes sauf le follicule de la plume, où les virions infectieux se répandent dans le milieu et environnement en tant qu'élément des pellicules et de la poussière. Les poulets sont sensibles à l'infection par MMV, mais certaines études génétiques suggèrent que des haplotypes spécifiques complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) peut conférer une résistance à la progression de la maladie prévention de la neuropathie et de la formation de lymphomes.

I.4 Symptômes

Les volailles atteintes de tumeurs viscérales peuvent développer une dépression et la cachexie survient généralement avant la mort. L'infiltration cellulaire des nerfs périphériques, entraînant une hypertrophie étendue, la disparition des stries et la paralysie sont des caractéristiques du MM classique . Les nerfs périphériques chez les oiseaux peuvent présenter une infiltration lymphatique, entraînant une paralysie partielle et/ou une expansion du nerf vague affecté. Le GaHV-2 peut également infecter le cerveau, provoquant une paralysie temporaire ou une maladie neurologique persistante. La cécité est liée à une infiltration lymphatique de l'iris

I.5 Lésions microscopiques

Le développement de la maladie de Marek (paralysie aviaire ; neurolymphomatose) a été étudié par examen des nerfs périphériques et d'autres tissus à différents moments après l'infection de jeunes poussins par la souche HPRS-814 de la maladie de Marek.

Trois types de lésions nerveuses ont été retrouvés :

- Type A : caractérisé par une prolifération de cellules lymphoïdes, la présence de cellules de la maladie de Marek, et parfois une démyélinisation et une prolifération de cellules de Schwann.
- Type B : caractérisé par une infiltration diffuse de plasmocytes et principalement de petits lymphocytes, généralement un œdème inter neuronale, parfois une démyélinisation et une prolifération des cellules de Schwann.
- Type C : caractérisé par une légère infiltration de plasmocytes et de petits lymphocytes. Une lésion mixte de type A et B a également été trouvée.

I.6 Diagnostic

La maladie de Marek représente une pathologie très complexe. Des progrès sont réalisés par Biggs (1961) et Campbell (1961), qui ont proposé de différencier la MM étiologiquement des autres maladies lymphoprolifératives.

Les indications typiques d'une infection par le MMV dans un troupeau comprennent la paralysie à la suite d'une infiltration lymphoïde dans les nerfs périphériques, immunosuppression, dépression sévère, cécité et lésions cutanées, qui peuvent tous

s'accompagner de signes non spécifiques tels qu'une perte de poids, anorexie et pâleur. Actuellement, les symptômes de la MM sont classés en deux formes : « classiques » forme neurale de paralysie aviaire et « leucose aiguë » avec tumeurs lymphomateuse au niveau des organes viscéraux.

I.7 Diagnostic différentiel

Plusieurs nouveaux critères ont été testés pour aider à réaliser le diagnostic différentiel des tumeurs induites par le virus de la maladie de Marek (MMV) de celles induites par le virus de la leucose aviaire (ALV) et celui de la réticulo-endothéliose (REV). A partir de tumeurs induites par inoculation de souches spécifiques de MMV, ALV et REV, seules ou associées, il a été testé la quantité d'ADN de MMV par PCR en temps réel, l'expression de l'oncogène Meq de MMV, l'expression de différents marqueurs associés à la transformation (le CD30, l'antigène de surface associé à la maladie de Marek ou MATSA, et le p53), et le niveau de méthylation de l'ADN dans les cellules des tumeurs. De plus, les tissus infectés latents par le MMV et les tissus non infectés ont été testés comme témoins. Les tumeurs induites par le MMV avaient environ 102 fois plus de copies d'ADN de MMV que les autres tissus infectés latents par le MMV.

I.8 Pronostic

Le pronostic est défavorable dans tous les cas, avec des rapports de guérison spontanée mais incomplète. Mais nous ne sommes pas intéressés à élever des bondes qui seront comme source du virus. **(Saidi, 1982).**

I.9 Traitement

La lutte contre la maladie de Marek doit reposer sur une bonne prévention. Toute la pharmacopée anti-tumorale a connu un succès à court terme, mais en fait tout traitement est illusoire. Dans les cas bénins, nous pouvons essayer de traiter avec de la vitamine B1, mais nous produirons alors des porteurs et des propagateurs du virus, ce qui constituera une menace pour l'élevage, mais aussi pour ceux qui sont à proximité. C'est pour cette raison le meilleur traitement sera la réforme **(Didier, 2001; Saidi, 1982).**

Il n'existe aucun traitement efficace de la MM, mais l'administration correcte d'un vaccin approprié et une bonne biosécurité de l'élevage peuvent prévenir la maladie clinique. Les troupeaux de volailles sont habituellement vaccinés, soit in ovo au 18e jour d'âge de

l'embryon ou à l'éclosion. Parmi les vaccins disponibles, le vaccin CVI988/Rispens assure la meilleure protection contre les souches hautement virulentes éprouvées. Aucun des vaccins actuels n'offre une immunité stérilisante et les troupeaux vaccinés peuvent être encore infectés par des virus GaHV-2 virulents qui se répliquent, se propagent par les squames de l'ÉFP, infectant ainsi d'autres poulets, ce qui a certainement contribué à augmenter la virulence des souches du terrain. Dans les zones à forte densité d'élevages de poulets, confrontées aux souches les plus virulentes, des niveaux élevés de biosécurité doivent être maintenus pour éviter l'exposition précoce des poussins au virus GaHV-2 et l'emploi des vaccins polyvalents (MeHV-1 + CVI988/Rispens ou MeHV-1 + RB1B + CVI988/Rispens) doit être envisagé. Il a aussi été préconisé récemment d'utiliser le MeHV-1 (HVT) en tant que vecteur pour un vaccin recombinant contre le virus influenza aviaire hautement pathogène H7N1 et la MM (Li et al. 2011). De même, un vaccin vecteur vivant MeHV-1 (HVT) codant la protéine VP2 de la maladie de Gumboro (MG) s'est révélé efficace pour lutter à la fois contre cette maladie et la MM. Il s'est révélé compatible avec la souche CVI988/Rispens (administration à l'âge d'un jour), leur association permettant ainsi de lutter plus efficacement contre les souches très virulentes vvGaHV-2 (**Lemière et al. 2011**).

I.10 Prophylaxie

• Prophylaxie sanitaire

Cette précaution ne peut être utilisée que pour les troupeaux expérimentaux ou les troupeaux de sélection de base. Dans un environnement contaminé, les œufs doivent être désinfectés dans les deux heures suivant la ponte afin de détruire toutes les particules toxiques qui adhèrent à la coquille humide pendant la ponte. Les poussins doivent être protégés du virus pendant la première semaine après la naissance afin d'établir une protection vaccinale.

(<https://www.memoireonline.com/12/08/1665/Maladie-de-Marek-importance-Diagnostic-et-prophylaxie.html>)

D'autres mesures sanitaires sont à pratiquer :

- Mesures de biosécurité afin de prévenir la propagation entre les troupeaux et entre les lots
- Séparer les oiseaux par groupes d'âge
- Éviter les élevages multi-âges

- Lavage, désinfection et vide sanitaire des bâtiments
- Ne pas utiliser la litière de lots précédents
- Assurer une bonne ventilation et établir une pression positive à l'intérieur des bâtiments

L'étude de Boulianne et al en 2011, a démontré que les risques de maladie de Marek diminuent de 90% et la mortalité de 30% dans les troupeaux d'oiseaux du même âge comparativement aux fermes multi-âges. Les chances de maladie de Marek augmentent de 4,3 lorsque les oiseaux sont élevés sur le sol comparativement aux oiseaux élevés en cage. Les chances de maladie de Marek augmentent de 3,7 lorsque l'on compte plus de 3 oiseaux par cage, comparativement à 1,2 ou 3 oiseaux.

- **Prophylaxie médicale**

- **La vaccination**

Les vaccins vétérinaires représentent actuellement 26 % du marché des médicaments vétérinaires au niveau mondial (source IFAH). Ce pourcentage montre l'importance des vaccins en santé animale.

II. Partie expérimentale

II.1 Objectifs de l'étude

La présente étude consiste en l'exploitation des résultats d'analyse d'histopathologie de prélèvements d'organes provenant d'élevages de reproducteurs chair présentant des lésions tumorales.

Devant l'importance de la maladie de Marek et de son incidence sur le développement de l'aviculture en Algérie, nous nous sommes fixé comme objectif :

- D'étudier les lésions histopathologiques due au virus de la MM au niveau des organes viscéraux,
- Mettre des hypothèses des causes éventuelles de la manifestation clinique de la MM
- Adresser des recommandations pratique au producteurs Algériens du poussin reproductrice chair.

II.2 Matériel et méthodes

II.2.1 Matériel

En vue de réaliser une étude histopathologique nous avons besoin de :

- **Organes de 03 poules par élevage** présentant des lésions macroscopiques :(foie, rein, rate... etc)

II.2.2 Matériel de laboratoire

- **Scalpel** : instrument bien tranchant utilisé pour obtenir un prélèvement sain et non écrasé.
- **Formole** : pour la fixation des tissus,
- **Alcool** : utilisé pour la déshydratation dans l'étape d'inclusion et la réhydratation dans l'étape de coloration.
- **Paraffine** : c'est une substance utilisée pour donner une consistance solide aux prélèvements.
- **Xylène** : c'est un solvant miscible à la paraffine, utilisé pour éliminer l'éthanol des tissus et le déparaffinage.
- **Microtome** : c'est un appareil très précis permet de donner un ruban de coupes des tissus prélevés.
- **Lames** : pour l'étalement des coupes.
- **Eau albumineuse et platine chauffante et étuve** : c'est un matériel utilisé dans l'étalement et le collage des coupes sur les lames de verre.

- **Batterie de colorants** : « hémateine, éosine ».
- **Lamelles et résine synthétique** : utilisées dans le montage des lames pour préserver les colorations et conserver les lames pendant plusieurs années.
- **Microscope optique** : c'est un appareil permettant la lecture des lames.

II.3 Collecte des données épidémiologiques

Lors de la collecte des échantillons, toutes les informations nécessaires ont été collectées et représentées ici dans le tableau-1. Il contient la date d'échantillonnage, le type d'oiseaux, l'effectif total, la région d'échantillonnage, le statut vaccinal, l'âge de la vaccination, l'âge du début de la maladie, les signes cliniques, les lésions post mortem et les taux de mortalité.

II.4 Collection d'échantillons de tissus

La présente étude a été menée dans 10 élevages de reproducteurs de poulets de chair situés dans le centre de l'Algérie. Au cours de la période de juin à septembre 2020, des échantillons ont été collectés dans des élevages de reproducteurs de poulets à chair vaccinés avec le vaccin HVT ou Rispens à l'âge d'un jour au couvoir, souffrant de tumeurs évolutives dans différents organes viscéraux.

Les échantillons de tissus tumoraux tels que le cœur, le foie, la rate, l'intestin, le proventricule et les nerfs sciatiques ont été prélevés au hasard sur trois poulets malades de chaque élevage, et fixés immédiatement dans du formol tamponné à 10 %. Les échantillons ont été transportés et analysés au laboratoire d'anatomie pathologique, ENSV, Alger, Algérie.

II.5 Etude macroscopique et histopathologique

Le diagnostic de MM a été fait sur la base des signes cliniques, des lésions post-mortem, macroscopiques et histopathologiques.

Grossièrement, les volailles ont été examinées pour des tumeurs dans divers organes viscéraux et une hypertrophie des nerfs.

Du point de vue histopathologique, des tissus fixés dans du formol tamponné à 10 % ont été traités en routine comme décrit précédemment (Zhang, 2015). Ils ont été déshydratés dans de l'alcool, noyés dans de la cire de paraffine et coupés en sections de 4 µm d'épaisseur. Les coupes ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) pour un examen en microscopie optique.

Les étapes de la technique histopathologique en détaille sont les suivantes :

II.5.1 Fixation

Immédiatement après l'étape de prélèvement, chaque échantillon est mis dans une boites identifie, contenant du formol à 10% avec un volume dix fois plus grande par rapport à celui de l'échantillon. Tous cela pour immobiliser les constituants tissulaires et éviter l'autolyse cellulaire ainsi que la putréfaction bactérienne.

II.5.2 Inclusion

L'inclusion en paraffine consiste à infiltrer et à enrober les tissus à examiner avec de la paraffine, pour luis donne une consistance solide, facilite la microtomie.

Cette étape se déroule en trois phases :

- La déshydratation
Les tissus ont été passé dans des bains d'alcool de degré croissant (70° ,80°,90° ,95°,99°,100°) pour déshydrater les tissus et d'éliminer le fixateur.
- L'élimination de l'alcool (d'éclaircissement)
L'alcool (éthanol) est remplacé par un solvant miscible à la paraffine(le xylène). Cette substance élimine l'éthanol Par l'infiltration dans les tissus, et donne une couleur plus claire à ces derniers.
- Le paraffinage
Les tissus ont été placé dans la paraffine fondue avec une température de 56/58°C pour provoquer l'évaporation du solvant et sa dissolution dans la paraffine. Ensuite, la paraffine a été placé dans de petits moules, à température ambiante, pour provoquer son durcissement et formation de blocs contenant des fragments tissulaires prélevés.

II.5.3 La microtomie

Elle consiste en la réalisation des coupes dans le bloc de paraffine. Nous avons utilisé, pour cela, un microtome qui fait avancer le bloc sur un rasoir : le bloc avance d'environ 5um à chaque fois. L'ensemble des tranches vont former un ruban dans lequel des coupes de prélèvement tissulaire sont inclus.

II.5.4 Etalement et collage des coupes sur des lames de verre

Les sections de la microtomie sont placées dans un bain d'eau chaude (43-45°C), étalé sur lame puis laisser sécher pendant une heure à l'étuve (45°C).

II.5.5 Coloration des lames

Les détails des tissus (noyau et cytoplasme) ne sont pas spontanément colorés, donc pour les observer il faut les colorer.

La technique de coloration utilisée dans notre travail est la technique H&E. L'hématéine est une substance plutôt basique, qui colore les noyaux en violet donc colore les acides nucléiques. L'éosine est une substance plutôt acide, qui colore les cytoplasmes (en rose).

Cette étape se déroule en trois phases :

- Déparaffinage

Nous avons déparaffiné les lames par l'utilisation de deux bains de toluène (95%-100%) pendant 3 minutes afin de dissoudre la paraffine.

- Réhydratation

Nous avons passé ces lames dans trois bains d'alcool degré décroissant (de 100° à 70°) pendant 3 minutes pour les réhydratées .puis on a rincé les lame a l'eau courante.

- Coloration proprement dite

Nous avons mis les lames dans :

- Des bains d'hématoxyline (5 minute).
- Ensuite différencier avec le bicarbonate de Na (5 à 10 secondes).
- Puis rincer à l'eau courante.
- Ensuite mis dans des bains d'éosine (1 minute).
- Puis rincer à l'eau courante.
- A la fin, mis dans trois bains d'alcool à 100% (40 secondes) chacun.

II.5.6 Montage des lames

Nous avons plongé les lames dans trois bains de toluènes à 100% dans le but de les déshydratées, puis nous avons collé des lamelles de verre par-dessus grâce à des résines synthétiques.

Le but de montage est de préserver les préparations et leur couleur, Les lames ainsi montées peuvent être conservées pendant plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'années.

II.6 Résultats

II.6.1 Informations générales

Au cours de la période de juin à septembre 2020, dix élevages de reproducteurs de poulet à chair ARBOR-ACRES du centre de l'Algérie avec une population totale de 90000 ont été examinés pour la MM (Tableau-1). L'âge des oiseaux atteints variait de 13 à 22 semaines. Comme le montre le tableau 1, tous les troupeaux étaient de la souche ARBOR-ACRES et vaccinés au couvoir (Jour 1) en utilisant deux types de vaccins en même temps (HVT et Rispens). Les taux de mortalité variaient sensiblement de 4% à 10%. Les signes cliniques signalés dans les troupeaux atteints comprennent des symptômes locomoteurs, nerveux, digestifs et respiratoires.

Tableau 1 : Caractéristiques des exploitation et historique des foyer de la MD dans la région central d'Algérie.

Numero de troupeau	Age a l'échantillonnage (semaine)	Age au debut de maladie (s)	force	Region "centre d'algerie"	Statut de vaccination	Age a la vaccination	Tot de mortalité (%)	Signes clinique et necroptique
1	16	14	Arbor-acres	Rouiba	CEVAC® MD HVT + CEVAC® MD RISPENS	A l'ecloserie (j 1)	4	✓ Tumeurs dans divers organes ✓ Elargissement des nerfs
2	17	15	Arbor-acres	Rouiba	CEVAC® MD HVT + CEVAC® MD RISPENS	A l'ecloserie (j 1)	6	✓ Tumeurs dans divers organes ✓ Elargissement des nerfs
3	17	15	Arbor-acres	Lakhdaria	CEVAC® MD HVT + RISPENS	A l'ecloserie (j 1)	8	✓ Elargissement des nerfs
4	19	17	Arbor-acres	Lakhdaria	CEVAC® MD HVT + RISPENS	A l'ecloserie (j 1)	6	✓ Elargissement des nerfs
5	15	13	Arbor-acres	Boumerdes	CEVAC® MD HVT + CEVAC® MD RISPENS	A l'ecloserie (j 1)	10	✓ Tumeurs dans divers organes ✓ Elargissement des nerfs
6	15	13	Arbor-acres	Lakhdaria	CEVAC® MD HVT + RISPENS	A l'ecloserie (j 1)	8	✓ Tumors in various visceral organs ✓ Enlargement of nerves

7	15	13	Arbor-acres	Tiziouzou	CEVAC® MD HVT + CEVAC® MD RISPENS	A l'ecloserie (j 1)	5	✓ Tumeurs dans divers organes ✓ Elargissement des nerfs
8	17	15	Arbor-acres	Hammedi	CEVAC® MD HVT + RISPENS	A l'ecloserie (j 1)	4	✓ Elargissement des nerfs
9	16	14	Arbor-acres	Rouiba	CEVAC® MD HVT + RISPENS	A l'ecloserie (j 1)	10	✓ Tumeurs dans divers organes ✓ Elargissement des nerfs
10	15	13	Arbor-acres	Ain taya	CEVAC® MD HVT + RISPENS	A l'ecloserie (j 1)	8	✓ Tumeurs dans divers organes ✓ Elargissement des nerfs

II.6.2 Lésions macroscopiques

L'autopsie des oiseaux morts ou euthanasiés a révélé une lymphomatose viscérale dans un grand nombre d'organes (Cœur, foie, rate, proventricule, rein, intestin, bourse de Fabricius, gonades) sous forme de lymphomes diffus ou focaux. La taille des nodules tumoraux variait de 0.5 à 2 mm de diamètre, elles étaient de couleur blanchâtre, de consistance ferme et lisse lors de coupe. Elles étaient observées le plus souvent dans la rate et le foie.

Les nerfs périphériques tels que le nerf sciatique ont montré des changements macroscopiques comprenant une perte de striation longitudinale, un changement de couleur (grisâtre) et une augmentation de volume (hypertrophie).

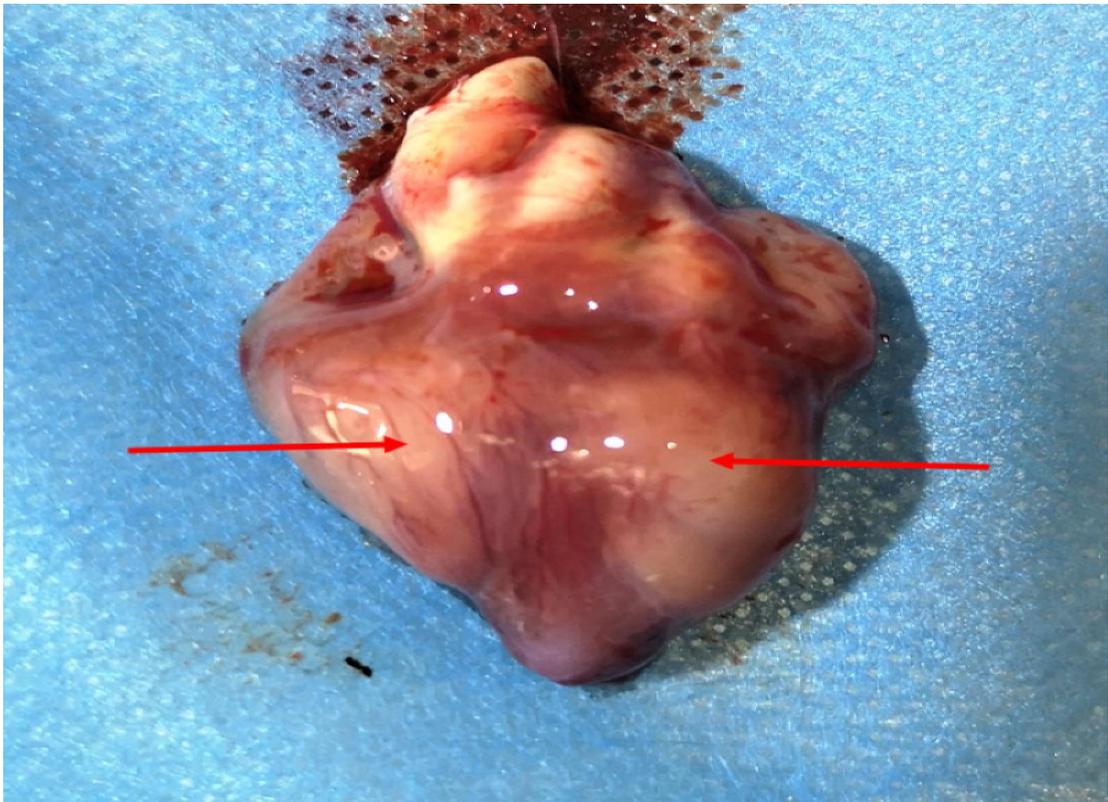


Figure 1 : Nodules tumorales diffuses au niveau cardiaque.photo personnel (2021)

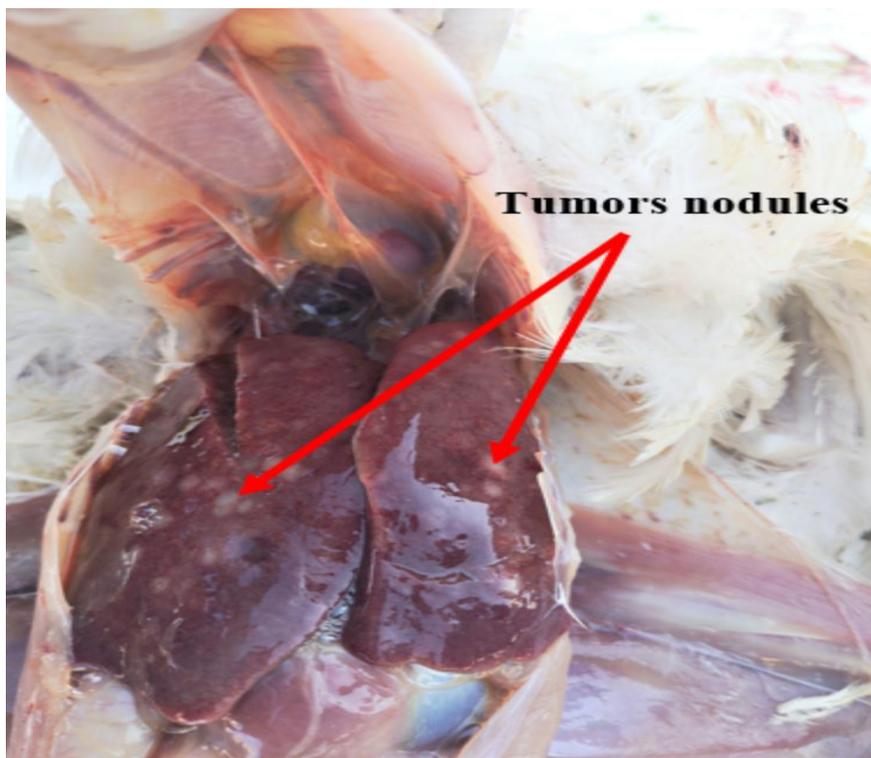


Figure 2 : Nodules tumorales diffuses au niveau hépatique.photo personnel (2021)

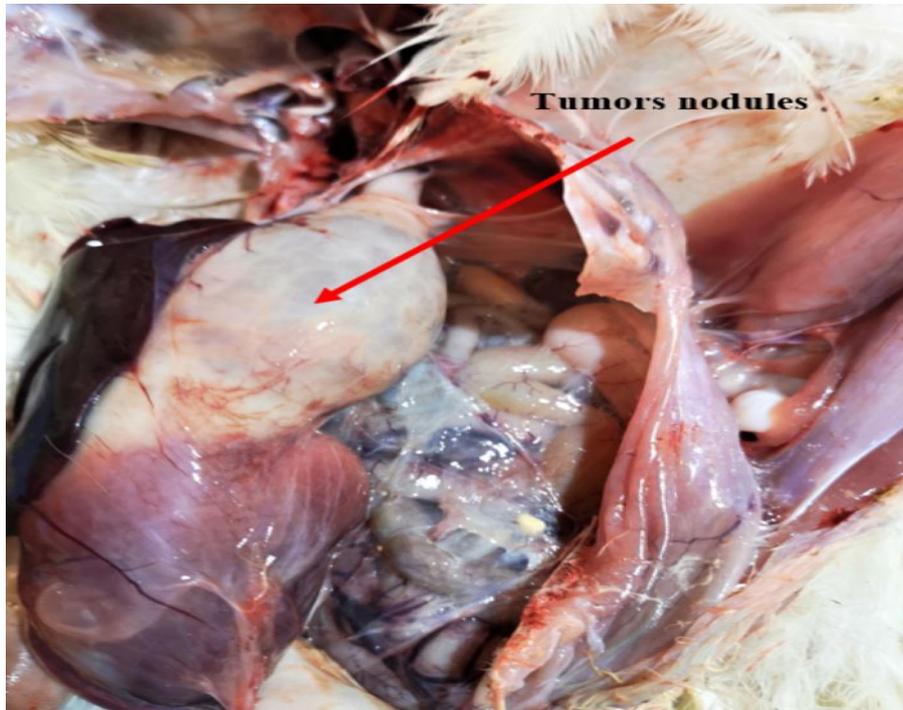


Figure 3 : Nodules tumorales diffuses au niveau du proventricule et dilatation (aspect externe).photo personnel (2021)

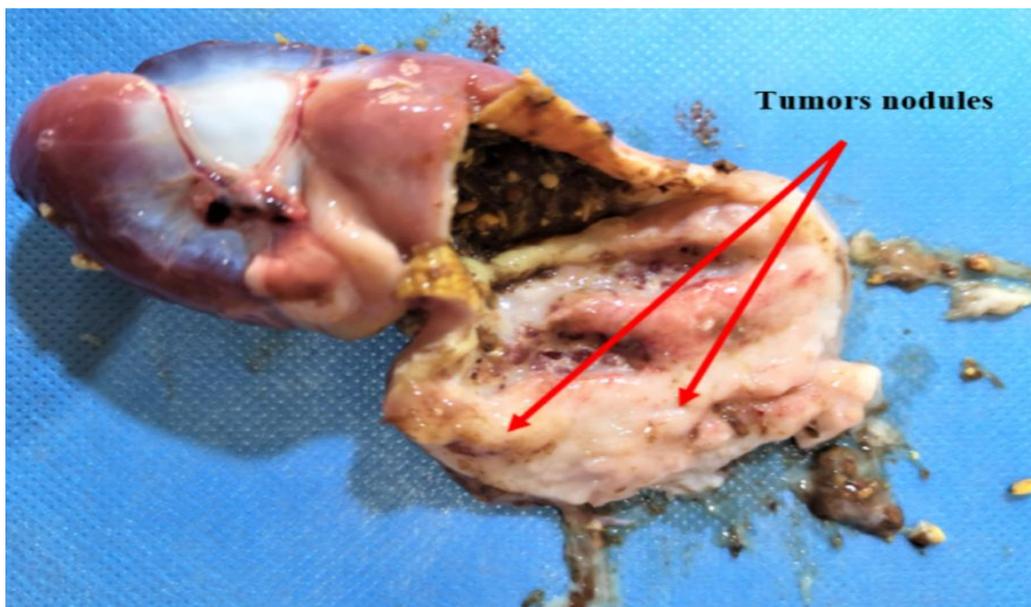


Figure 4 : Nodules tumorales diffuses au niveau du proventricule et dilatation (aspect interne).photo personnel (2021)

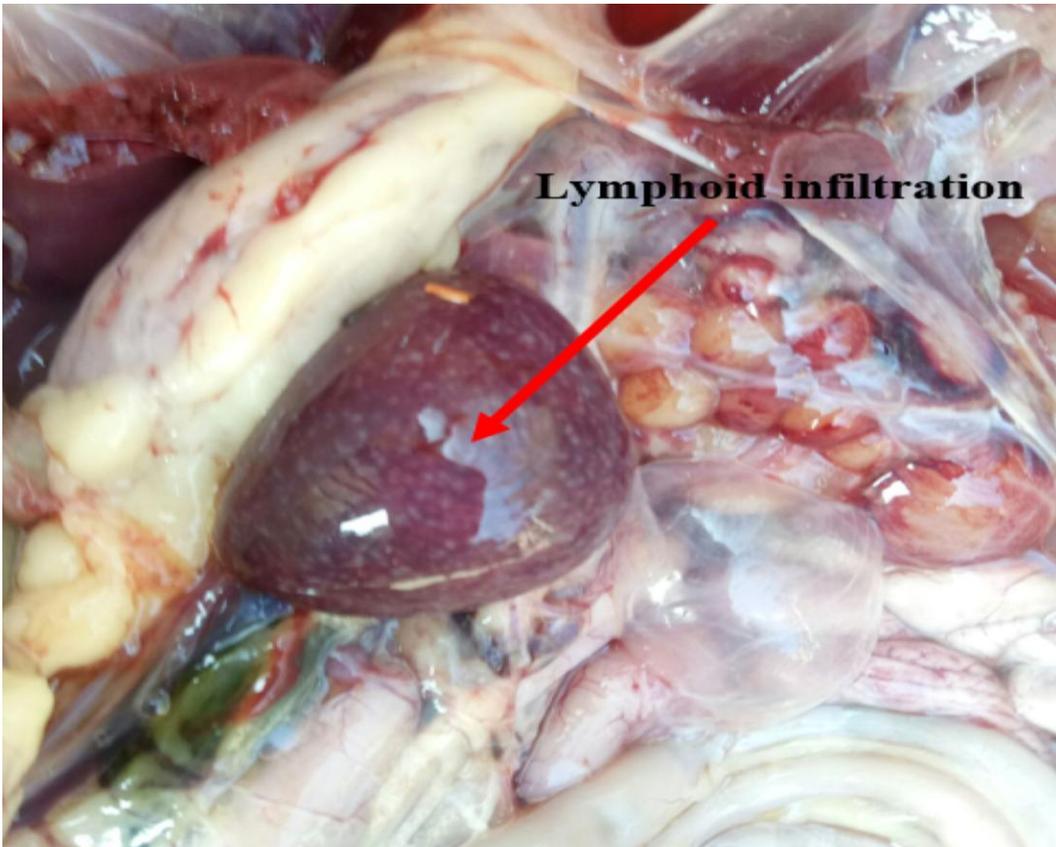


Figure 5 : Infiltration lymphoïde de la rate .photo personnel (2021)

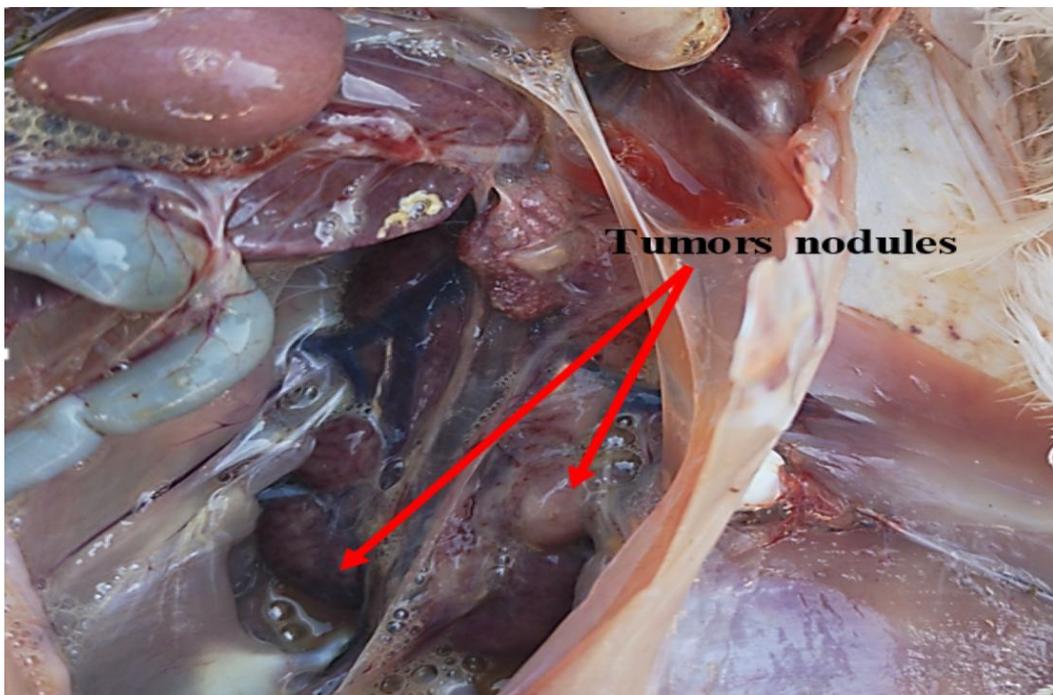


Figure 6 : Infiltration lymphoïde des reins .photo personnel (2021)

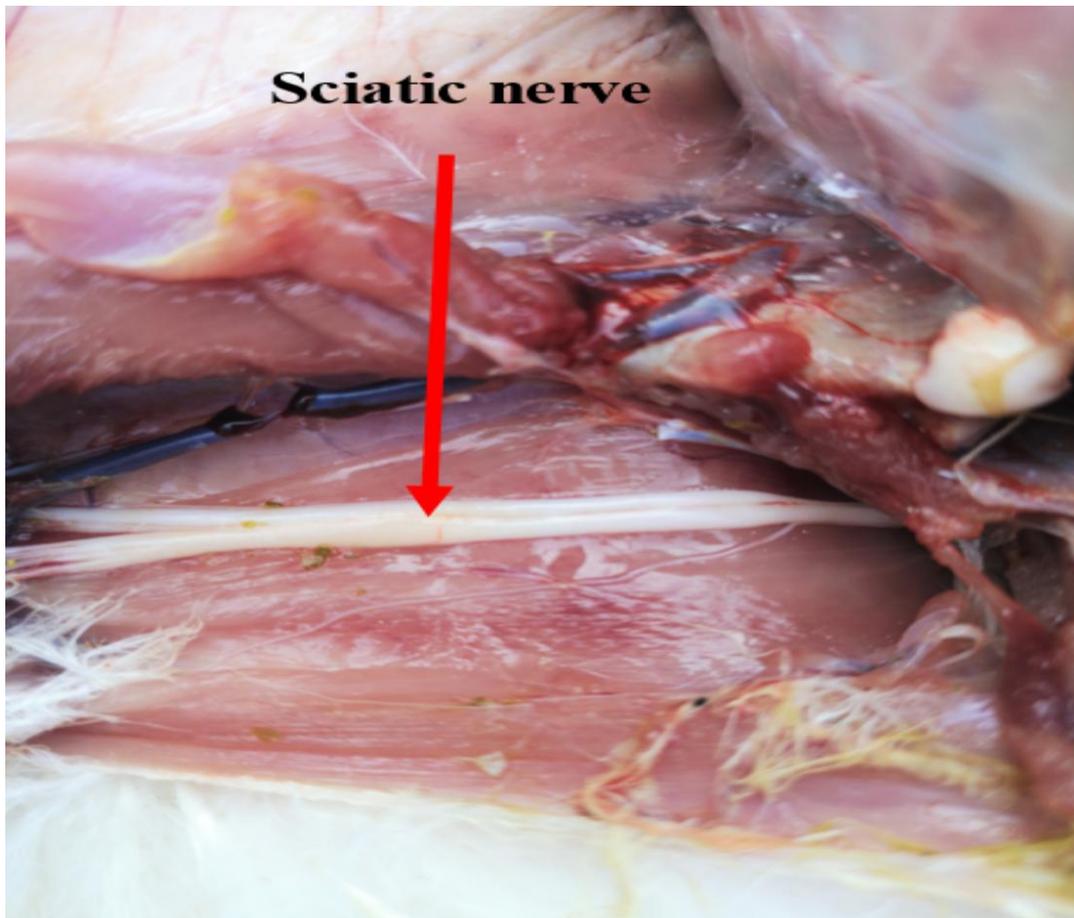


Figure 7 : Hypertrophie du nerf sciatique .photo personnel (2021)

II.6.3 Histopathologie

L'examen histopathologique a montré une infiltration lymphomateuse polymorphe multicentrique marquée (foie, poumon, cœur, rate, intestins, proventricule, cerveau, nerfs sciatiques) formée par des zones multifocales à diffuses de cellules rondes non cohésives de taille variable (petits, moyens et gros lymphocytes comme ainsi que de nombreuses cellules blastiques (lymphoblastes). Le noyau est ovoïde, excentré avec une encoche centrale et présente un petit nucléole para central basophile, la chromatine est dense pour les petits et moyens lymphocytes, ainsi qu'un noyau vésiculaire pour les grands lymphocytes et les lymphoblastes.

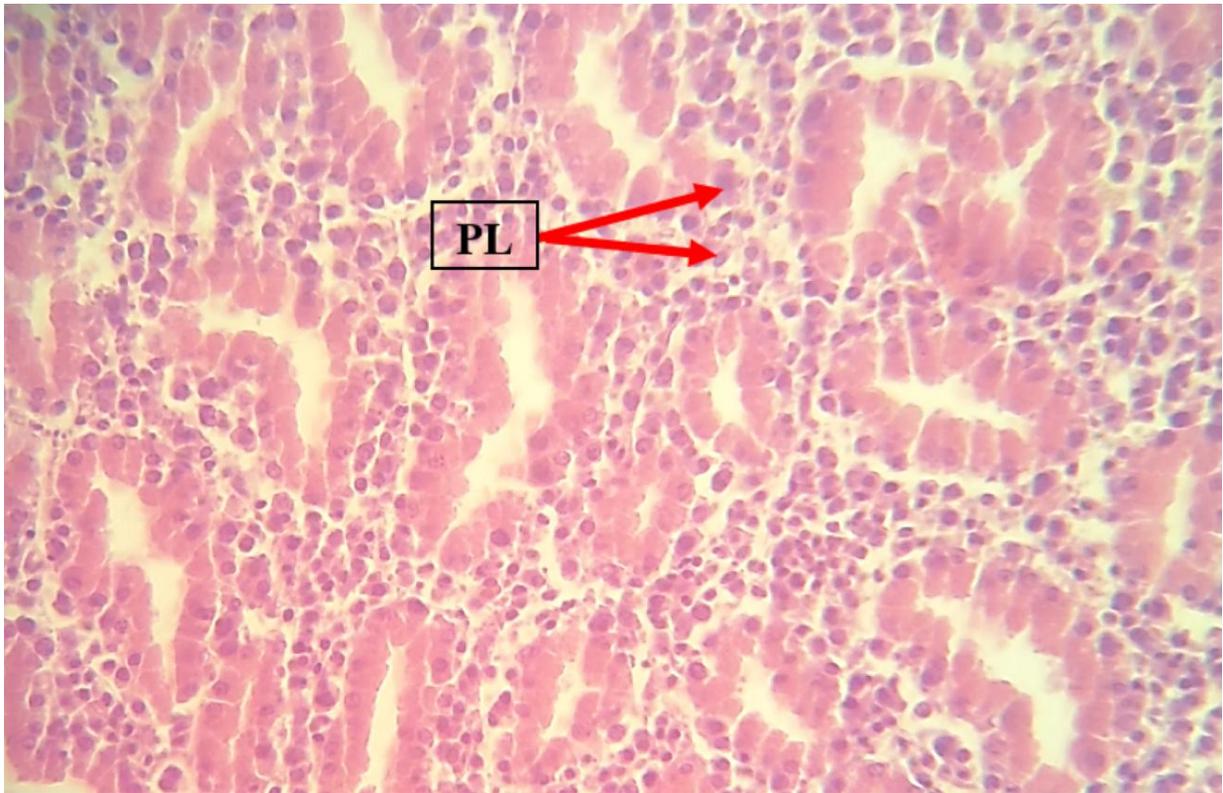


Figure 8 : Lymphocytes pléomorphe (PL) dans le pro ventricule . H&E, X400.photo personnel (2021)

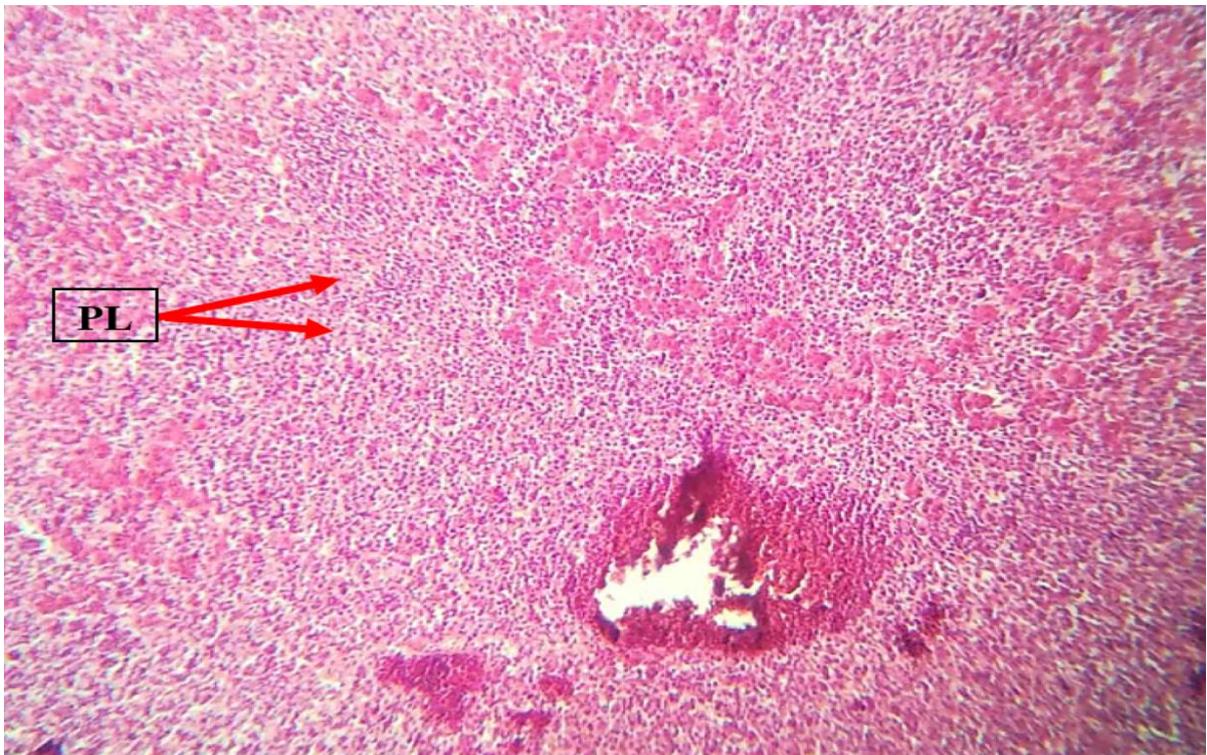


Figure 9 : Lymphocytes pléomorphe (PL) dans le foie. H&E, X100.photo personnel (2021)



Figure 10 : Lymphocytes pléomorphe (PL) dans le foie. H&E, X400.photo personnel (2021)

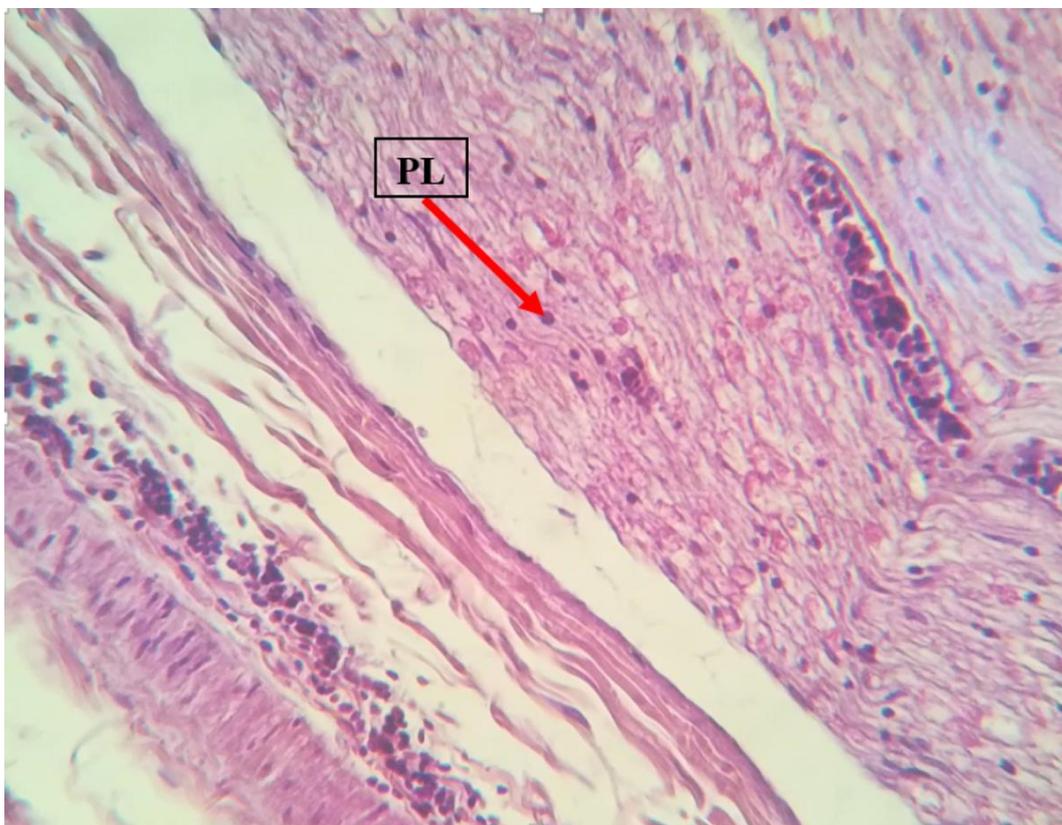


Figure 11: Infiltration diffuse des lymphocytes pléomorphe (PL) dans le nerf sciatique. H&E, X400.photo personnel (2021)

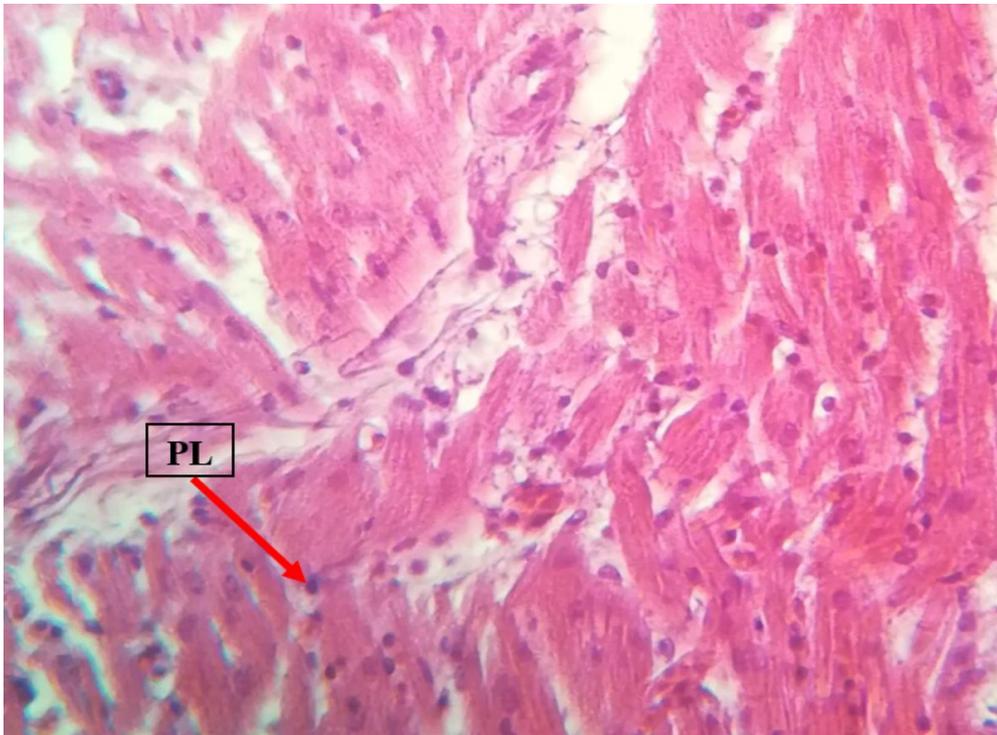


Figure 12 : Infiltration des lymphocytes pléomorphe (PL) dans le coeur. H&E, X400. photo personnel (2021)

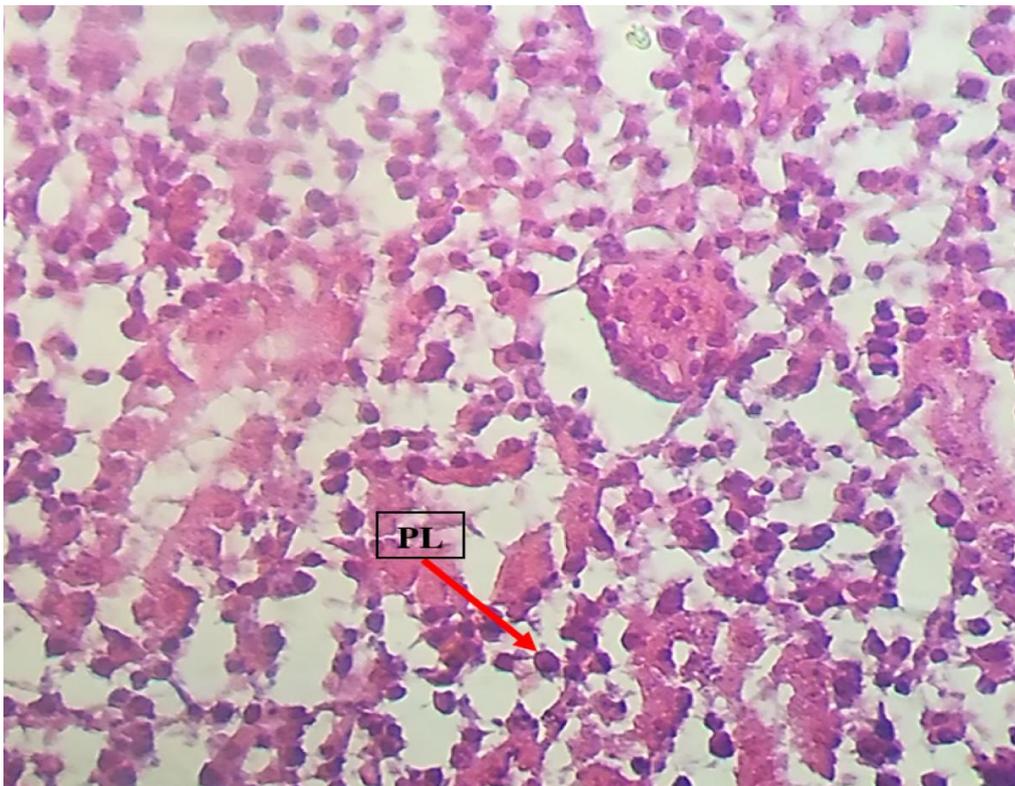


Figure 13 : Infiltration des lymphocytes pléomorphe (PL) dans le rein. H&E, X640. photo personnel (2021)

II.7 Discussion

La présente étude a été menée en réponse à la survenue de la maladie de Marek dans les troupeaux de reproducteurs chair sélectionnés dans la région centre d'Algérie. Ces troupeaux de volailles ont été vaccinés avec un vaccin bivalent contenant HVT (MDV sérotype 3) plus Rispens (MDV sérotype 1).

Les cas positifs pour le VMM dans ces troupeaux ont été diagnostiqués par des méthodes conventionnelles (étude macroscopique et histopathologie) qui, jusqu'à récemment, étaient considérées comme la première étape de la confirmation en laboratoire des observations sur le terrain **(Chris morrow, et al 2004) et(Wen,et al 2018)**. généralement, des tumeurs ont été observées sur un grand nombre d'organes viscéraux (foie, cœur, rate, rein, gonades...) avec atteinte des nerfs périphériques, ce qui est en accord avec des rapports antérieurs **(KAAMLDEEP, et al 2007)(Gimeno, 2008)**.

Les infections tumorales au VMM sont généralement trouvées chez les poulets âgés de plus de 20 semaines, la mortalité due au lymphome de la MM commence généralement dès 7 à 12 semaines. Dans cette étude, tous les cas de MM chez les reproducteurs chair ont été observés à plus de 13 semaines. Le retard d'apparition des signes cliniques dans les foyers de MM pourrait être lié à la vaccination des troupeaux de reproducteurs chair enquêtés **(Calnek,B 2001)**.

Les résultats histopathologiques de l'infiltration et de la prolifération des lymphocytes et des cellules blastiques (lymphoblastes) dans divers organes tels que la rate, le foie, le cœur, les reins... sont en accord avec d'autres études et suggèrent une infection sauvage de MM **(Lobago,et al 2004),(Nabinejad, 2013),(Namratha,et al 2019),(Ikezawa,et al 2010)**.

En Algérie, ces dernières années, Les cas d'infection au VMM ont soudainement augmenté dans les élevages de reproducteurs chair. Qu'est-ce qui a fait augmenter soudainement la maladie? Nous avons posé deux hypothèses. Le premier est la possibilité d'échec de la vaccination contre la MM au couvoir. Les fermes de l'étude ont été vaccinées avec un vaccin bivalent HVT et Rispens, qui est plus protecteur que le HVT seule .De nombreux chercheurs **(chanson,c et al 2020), (Reddy,s et al 2017), (Chang,c et al 2011)** ont

rapporté l'efficacité de l'utilisation du vaccin Rispens pour protéger contre les tumeurs. Dans notre étude, des tumeurs sévères ont été observées dans des troupeaux vaccinés avec une valence Rispens. Les données du couvoir peuvent expliquer en partie l'utilisation inappropriée possible du vaccin qui conduit à l'échec de la vaccination.

En fait, la reconstitution et l'administration des vaccins sont les plus importantes ; les poussins reproducteurs chair algériens sont vaccinés traditionnellement au pistolet de vaccination, ce qui augmente les erreurs humaines. De plus, l'enquête nous a permis de savoir qu'il n'y avait aucune procédure appliquée pour contrôler la qualité de stockage et de reconstitution des vaccins ; Le flacon de vaccin Rispens utilisé est souvent confondu avec un autre contenant le vaccin HVT+ Rispens.

Un autre point très important est de vérifier la compatibilité des additifs au vaccin MM. De ce côté, nous avons remarqué l'utilisation d'antibiotiques dilués avec le vaccin MM. Nous avons également remarqué l'utilisation dans le couvoir de différents vaccins commerciaux contre la MM. Cette hétérogénéité des vaccins utilisés et d'autres informations n'a pas été mentionnée dans une fiche. En effet, pour un meilleur contrôle de la qualité de vaccination, de nombreux auteurs ont recommandé la délivrance des oiseaux du couvoir avec un certificat comprenant des détails tels que la souche vaccinale, le nom du fabricant et le numéro du lot. CHRIS MORROW, (2004) a remarqué que la meilleure approche pour prévenir les problèmes de MM est l'introduction de la stratégie des meilleures pratiques (BPS) à toutes les étapes du processus de production, ce qui a été manquant dans les couvoirs algériens de reproducteurs chair.

La deuxième hypothèse est l'augmentation de la virulence des isolats du VMM puisque les cas de MM ont été observés dans des fermes vaccinées dans lesquelles des pertes sévères avaient été enregistrés.

En effet, les oiseaux sont plus sensibles aux mutants du VMM qui ont émergé dans des régions avec des souches plus virulentes qu'aux précédents isolats de VMM (**Zhuang et al, 2015**), (**Bertzbach, et al 2020**), (**Woźniakowski, et al 2014**). Pour croire davantage à cette hypothèse, une étude plus approfondie devrait isoler le VMM ; tester sa pathogénicité et l'efficacité des vaccins actuels.

Conclusion

La présente étude fournit des preuves que la MM est très répandu dans les troupeaux de reproducteurs de poulet de chair vaccinés au couvoir avec un vaccin bivalent (HVT + Rispens). Ces résultats peuvent conduire à un niveau élevé d'échec de la vaccination. Les producteurs algériens de poussins reproducteurs chair devraient améliorer leur procédure de vaccination avec l'application de BPS au couvoir.

Références bibliographiques

1. **Bertzbach, L. D., Conradie, A. M., You, Y., &Kaufer, B. B. (2020).** Latest insights into Marek's disease virus pathogenesis and tumorigenesis. *Cancers*, 12(3), 647.
2. **Bertzbach, L. D., Conradie, A. M., You, Y., &Kaufer, B. B. (2020).** Latest insights into Marek's disease virus pathogenesis and tumorigenesis. *Cancers*, 12(3), 647.
3. **Boodhoo, N., Gurung, A., Sharif, S., &Behboudi, S. (2016).** Marek's disease in chickens: a review with focus on immunology. *Veterinaryresearch*, 47(1), 1-19.
4. **Calnek, B. W. (2001).** Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Marek'sdisease*, 25-55.
5. **Chang, S., Ding, Z., Dunn, J. R., Lee, L. F., Heidari, M., Song, J., ...& Zhang, H. (2011).** A comparative evaluation of the protective efficacy of rMd5ΔMeq and CVI988/Rispens against a vv+ strain of Marek's disease virus infection in a series of recombinant congenic strains of White Leghorn chickens. *Aviandiseases*, 55(3), 384-390.
6. **Davison, A. J. (2010).** Herpesvirus systematics. *Veterinarymicrobiology*, 143(1), 52-69.
7. **Gimeno, I. M. (2008).** Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow?. *Vaccine*, 26, C31-C41.
8. **Ikezawa, M., Goryo, M., Sasaki, J., Haridy, M., & Okada, K. (2010).** Late Marek's disease in adult chickens inoculated with virulent Marek's disease virus. *Journal of VeterinaryMedical Science*, 1007120283-1007120283.
9. **Kamaldeep, P., Sharma, C., &Narang, G. (2007).** Occurrence of Marek's disease in vaccinated poultry flocks of Haryana (India). *International Journal of Poultry Science*, 6(5), 372-377.
10. **Lemiere, S., Wong, S. Y., Saint-Gerand, A. L., Goutebroze, S., & Le Gros, F. X. (2011).** Compatibility of turkey herpesvirus–infectious bursal disease vector vaccine with Marek's disease rispens vaccine injected into day-old pullets. *Avian diseases*, 55(1), 113-118.
11. **Lobago, F., &Woldemeskel, M. (2004).** An outbreak of Marek's disease in chickens in central Ethiopia. *Tropical animal health and production*, 36(4), 397-406.
12. **Marek, J. (1907).** Multiple Nervenzuendung (Polyneuritis) beiHuehnern. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 15, 417-521.
13. **Morrow, C., &Fehler, F. (2004).** Marek's disease: a worldwide problem. In *Marek'sdisease* (pp. 49-61). AcademicPress.

14. **Nabinejad, A. (2013).** Study on subclinical and clinical Marek's disease (MD) in the broiler chickens using histopathology. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1(8), 795-801.
15. **Namratha, M. L., Reddy, K. A. K., Kumar, Y. R., & Lakshman, M. (2019).** Marek's disease outbreak in adult Rajasri layer chicken.
16. **Payne, L. N., & Venugopal, K. (2000).** Neoplastic diseases: Marek's disease, avian leukosis and reticuloendotheliosis. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 19(2), 544-564.
17. **Reddy, S. M., Izumiya, Y., & Lupiani, B. (2017).** Marek's disease vaccines: Current status, and strategies for improvement and development of vector vaccines. *Veterinary microbiology*, 206, 113-120.
18. **Song, C., Yang, Y., Hu, J., Yu, S., Sun, Y., Qiu, X., ... & Ding, C. (2020).** Safety and Efficacy Evaluation of Recombinant Marek's Disease Virus with REV-LTR. *Vaccines*, 8(3), 399.
19. **Tian, M., Zhao, Y., Lin, Y. et al (2011).** Comparative analysis of oncogenic genes revealed unique evolutionary features of field Marek's disease virus prevalent in recent years in China. *Virology* 8, 121
20. **Wen, Y., Huang, Q., Yang, C., Pan, L., Wang, G., Qi, K., & Liu, H. (2018).** Characterizing the histopathology of natural co-infection with Marek's disease virus and subgroup J avian leucosis virus in egg-laying hens. *Avian Pathology*, 47(1), 83-89.
21. **Witter R.L., Nazerian K., Purchase H.G. et al. (1970).** Isolation from turkeys of a cell associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *Am J. vet. Res.*, 31a, p 525-538.
22. **Woźniakowski, G., & Samorek-Salamonowicz, E. (2014).** Molecular evolution of Marek's disease virus (MDV) field strains in a 40-year time period. *Avian diseases*, 58(4), 550-557.
23. **Zeghdoudi, M., Bouzidi, N., & Aoun, L. (2013).** Etude lésionnelle de la maladie de Marek chez le poulet de chair et chez les reproducteurs dans l'Est algérien. *Revue Méd. Vét.*, 164(3), 106-111.
24. **Zhuang, X., Zou, H., Shi, H., Shao, H., Ye, J., Miao, J., ... & Qin, A. (2015).** Outbreak of Marek's disease in a vaccinated broiler breeding flock during its peak egg-laying period in China. *BMC veterinary research*, 11(1), 1-6.
25. **Zhuang, X.Y., Zou, H.T., Shi, H.Y., Shao, H.X., Ye, J.Q., Miao, J., Wu, G. & Qin, A.J. (2015).** Outbreak of Marek's disease in a vaccinated broiler breeding flock during its peak egg-laying period in China. *BMC Veterinary Research*, 11, 353.