



Institut des  
Sciences  
Vétérinaires- Blida



Université Saad  
Dahlab-Blida 1-

Projet de fin d'études en vue de l'obtention du

## **Diplôme de Docteur Vétérinaire**

**Approche bibliographique sur les principales techniques de  
sérologie utilisées dans le diagnostic en pathologies aviaires**

Présenté par

**YOUSFI Amine**

**Devant le jury :**

**Présidente :** Boumahdi-Merad Z. Pr ISV-Blida

**Examineur :** Merdja S.E. MCB ISV-Blida

**Promoteur :** Khaled H. MCA ISV-Blida

**Année : 2020/2021**





Institut des  
Sciences  
Vétérinaires- Blida



Université Saad  
Dahlab-Blida 1-

Projet de fin d'études en vue de l'obtention du

## **Diplôme de Docteur Vétérinaire**

**Approche bibliographique sur les principales techniques de  
sérologie utilisées dans le diagnostic en pathologies aviaires**

Présenté par

**YOUSFI Amine**

**Devant le jury :**

**Présidente :** Boumahdi-Merad Z. Pr ISV-Blida

**Examineur :** Merdja S.E. MCB ISV-Blida

**Promoteur :** Khaled H. MCA ISV-Blida

**Année : 2020/2021**

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à mon promoteur **Mr KHALED H.** et mes chaleureux remerciements au président de jury du PFE **Mme BOUMAHDI-Merad Z.** Professeur à l'Institut des sciences vétérinaires Blida 1 et l'examineur **Mr MERDJA S.E.** Maître de conférence B, d'avoir accepté de diriger ce travail, pour leurs disponibilités, pour leurs conseils précieux, pour leurs suivis et leurs orientations.

Ma gratitude s'adresse à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail, en l'occurrence **Mme BOUKENAOUI-FERROUK N.** qui nous a donnée des conseils précieux pour la bonne réalisation de ce manuscrit de projet de fin d'études.

# Dédicace

Je dédie ce travail à mes **deux parents**.

## **A ma famille**

Pour leur soutien, leur aide.

**A tous les enseignants** de l'Institut des Sciences Vétérinaires Blida-1 spécialement **Mr KALEM A.** qui avec ses paroles m'a aider à dépasser certains moments difficiles.

## **A tous mes amis**

Pour leur bonne humeur, leur gentillesse et pour m'avoir soutenue moralement.

# Résumé

La sérologie est un outil de diagnostic très pertinent en aviculture surtout avec le développement des élevages qu'a connu notre pays. Cette synthèse bibliographique est subdivisée en deux parties, la première partie rapporte des notions de bases sur différentes espèces des oiseaux (taxonomie, biologie, rappels anatomiques concernant le système immunitaire) et un passage de différentes lésions touchant les organes hématopoïétiques. La deuxième partie décèle en premier lieu, les critères de validation d'une méthode sérologique, par la suite, les principales techniques utilisées en sérologie seront détaillées.

En conclusion de notre travail, on mettra un point très important sur une évidence, que le diagnostic sérologique ne doit jamais être interpréter à lui seul.

**Mots clés :** sérologie, pathologies aviaire, oiseaux, volaille, antigène, anticorps.

# Abstract

Serology is a very relevant tool in avicultur, this bibliographic synthesis is divided on two parts, the first part rapport some basics of different species of birds (birds taxonomy and some anatomies reminders of immune system) and a passage of lesions affecting hematopoietic organ. The seconde part show us in first place the criteria of validation of a serologic method, we found useful to speak about some of those notions then to go further the serologic methods.

To conclude, we will speak about a very important point, the fact that we can never interpret a serologic test just buy it self.

**Key words:** serology, avian pathology, birds, fowl, antigen, antibody.

# الملخص

علم الامصال في تربية الدواجن يعتبر اداة فعالة، عملنا البيبليوغرافي يحتوي على فصلان، الفصل الاول يعرفنا ببعض اساسيات علم الاحياء و تصنيف بعض انواع الطيور الى جانب التذكير بعلم التشريح للجهاز المناعي و الآفات التي تصيب الاعضاء المكونة للدم.

اما الفصل الثاني فهو يعرض لنا معايير صحة الاختبارات المصلية، راينا انه من الافضل التكلم اولاً عن بعض المفاهيم و بعد ذلك الذهاب مباشرة نحو مختلف الاختبارات المصلية. اخيراً سوف نتكلم عن نقطة مهمة، وهي اننا لا يمكننا ابدا ترجمة نتائج اختبار مصلي لوحده.

**الكلمات الدالة:** علم المصل، امراض الدواجن، الطيور، الدواجن، مولد الضد، الجسم المضاد.



## Table des matières

Introduction .....	1
1 Taxonomie des oiseaux .....	2
2 Particularités anatomiques du système immunitaire.....	2
2.1 Organe lymphoïde.....	2
2.1.1 Organe lymphoïde primaire.....	2
2.1.1.1 Thymus .....	2
2.1.1.2 Bourse de Fabricius .....	3
2.1.2 Organe lymphoïde secondaire.....	4
2.1.2.1. Rate.....	5
3 Aperçu générale sur les différentes lésions des organes hématopoïétiques et diagnostique différentiel .....	6
3.1 Thymus et bourse de Fabricius .....	6
3.1.1 Hémorragies et granulomes de la bourse .....	6
3.1.2 Atrophie .....	7
3.1.3 Hypertrophie de la bourse de Fabricius .....	9
3.2 Rate .....	10
4 Méthodes sérologiques.....	12
4.1 Facteurs de variations .....	12
4.2 Critères de validation .....	13
4.2.1 Spécificité analytique .....	13
4.2.2 Sensibilité analytique .....	13
4.2.3 Linéarité .....	13
4.2.4 Exactitude (Justesse) .....	13
4.2.5 Fidélité .....	14
4.2.5.1 Répétabilité.....	14
4.2.5.2 Fidélité intermédiaire .....	14
4.2.5.3 Reproductibilité.....	14
4.2.5.4 Précision .....	14
4.2.6 Intervalle de validité.....	14
4.2.7 Limite de détection : .....	14
4.2.8 Limite de quantification.....	14
4.2.9 Robustesse.....	15

4.2.10	Stabilité des solutions.....	15
5	Méthodes sérologiques.....	16
5.1	Réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) .....	16
5.1.1	Principe de la réaction .....	16
5.1.2	Réalisation pratique : .....	17
5.2	Réaction d'Immunofluorescence indirecte .....	18
5.2.1	Principe de la méthode .....	18
5.2.2	Réalisation pratique .....	18
5.3	Réaction de séroneutralisation.....	19
5.3.1	Principe de la réaction.....	19
5.3.2	Réalisation pratique .....	19
5.3.3	Séroneutralisation par réduction de plage de lyse .....	20
5.4	Test de précipitation de double diffusion en gel (réaction d'Ouchterlony) .....	21
5.4.1	Principe de la réaction.....	21
5.4.2	Réalisation pratique .....	21
5.5	Fixation du complément :.....	22
5.5.1	Principe de la réaction :.....	22
5.5.2	Réalisation pratique .....	23
5.6	Western blot .....	24
5.7	Test ELISA.....	25
5.7.1	Principe du test .....	25
5.7.2	ELISA indirect : .....	25
5.7.3	Réalisation pratique d'un test ELISA indirect au laboratoire .....	27
5.7.4	ELISA compétitif .....	27
5.7.5	ELISA capture IgM (ou MAC-ELISA : IgM Antibody-Capture ELISA) .....	28
5.7.6	ELISA capture IgG : .....	28
5.8	Réaction d'agglutination : .....	29
5.9	Tests sérologiques de référence de certaines maladies bactériennes aviaires .....	30
5.10	Tests sérologiques de référence de certaines maladies virales aviaires .....	31
5.11	Epreuve d'immunoperoxydase indirecte : .....	32
5.12	Epreuve d'inhibition de la croissance .....	32
	Conclusion.....	33
	Références bibliographiques .....	34

## Listes des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Principales maladies accompagnées par une hémorragie et des granulomes de la bourse de Fabricius et du thymus .....	6
<b>Tableau 2 :</b> Principales maladies accompagnées par une atrophie de la bourse de Fabricius et du thymus. ....	7
<b>Tableau 3 :</b> Principales maladies accompagnées par une hypertrophie de la bourse de Fabricius et du thymus .....	9
<b>Tableau 4 :</b> Principales maladies causant des lésions de la rate .....	10
<b>Tableau 5 :</b> Tests sérologiques de références de certaines maladies bactériennes selon l'OIE ....	30
<b>Tableau 6 :</b> Tests sérologiques de références de certaines maladies virales selon l'OIE .....	31

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Schémas histologique du Thymus .....	3
<b>Figure 2</b> : Schémas de la bourse de Fabricius .....	4
<b>Figure 3</b> : Dessin de la rate.....	5
<b>Figure 4</b> : Principe de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination.....	17
<b>Figure 5</b> : Schéma comparatif entre l'IFI et IFD .....	19
<b>Figure 6</b> : Principe de la réaction de séroneutralisation .....	20
<b>Figure 7</b> : Principe de la méthode de fixation du complément .....	22
<b>Figure 8</b> : Principe de la réaction Wastern blot. ....	24
<b>Figure 9</b> : Schémas de l'ELISA indirect.....	25
<b>Figure 10</b> : Schémas d'un test ELISA compétitif .....	28

## Liste des abréviations

LB : Lymphocyte B

LT : Lymphocyte T

CPA : Cellules présentatrices d'antigène

HALT: Head-associated lymphoid tissues

BALT: Bronchus-associated lymphoid tissues

Retrovirus VLA-J: Retrovirus Avian leukosis virus subgroup J

IHA : Réaction d'inhibition de l'hémagglutination

EDS'76 : Eag Drop Syndrome '76

pH : potentiel d'Hydrogène

IFI : Immunofluorescence indirecte

IFD : Immunofluorescence directe

SN : Séroneutralisation

AGID: Agar Gel Immunodiffusion assay

CFT: Complement fixation test

Ag-Ab: Antigen-Antibody

C1 : Complement component 1

C3-C9 : Complement component 3- Complement component 9

MAC : Membrane attack complex/Complexe d'attaque membranaire

C5b-C6-C7-C8-C9 : Complement component for « C »

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

LA : Latex agglutination

IgM : Immunoglobuline M

IgG : Immunoglobuline G

MAC ELISA : IgM Antibody-Capture Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

OIE : Office International des Epizooties/ Organisation mondiale de la santé animale

RWBA : Rapide Wall Blood Agglutination

RSA : Rapide Séroagglutination

MAT : Microagglutiantion test

IPI : Immunoperoxydase indirecte

IC : Inhibition de la croissance

## Introduction

Le diagnostique en pathologie aviaire se repose sur une triade, en premier lieu, le vétérinaire récolte des données zootechniques en relation avec la gestion d'élevage (Alimentation, hygiène et conditions d'ambiances) c'est ce qu'on appelle l'audit d'élevage, et des données en relation avec la clinique et l'analyse des concepts épidémiologiques c'est le diagnostique épidémio-clinique, cela permettra au Vétérinaire de suspecter un tel trouble, après, l'autopsie prendra le relais, différentes lésions seront décelés, et un rapport final ou le bilan lésionnel sera rédigé, cela permettra de renforcer notre suspicion et d'éliminer en parallèle avec les premières données une gamme de maladies venant fausser notre diagnostique, sauf que les lésions sont multiples et communes entre un grand nombre de pathologies, dans cette étape, la mise en évidence directe ou indirecte du micro-organisme est indispensable c'est le diagnostique complémentaire qui vient confirmé notre hypothèse. Des laboratoires et différents examens complémentaire seront mis en jeu, cette triade forme le diagnostique pathologique aviaire de certitude.

Dans ce travail bibliographique, on en parlera sur une des étapes de ce diagnostique, la où on suit les empreintes de la présence d'un micro-organisme ou on révèle la présence du micro-organisme mais toujours par la sérologie.

## 1 Taxonomie des oiseaux

Règne:	Animalia
Embranchement :	Chordata
Classe:	Aves

Plusieurs Ordres et familles ont été classés, on va citer que les classifications zoologiques des espèces à utilisation dans les élevages et certains oiseaux de cage.

Ordre :

- Anseriformes : contient 2 familles à savoir la famille des Anatidae formant les canards.
- Galliformes : Contient 6 familles à savoir la famille des Odontophoridae formant les coqs, la famille des Phasianidae formant les faisans et la dinde et la famille des Numididae formant la pintade.
- Psittaciformes : Contient 3 familles à savoir la famille des Psittacidae formant les perroquets (**Linné, 1758**).

## 2 Particularités anatomiques du système immunitaire

L'organisation générale et les mécanismes de l'immunité chez les oiseaux sont assez semblables à ceux des mammifères, bien qu'il existe certaines différences dans les caractéristiques anatomiques, cellulaires, génétiques et moléculaires.

### 2.1 Organe lymphoïde

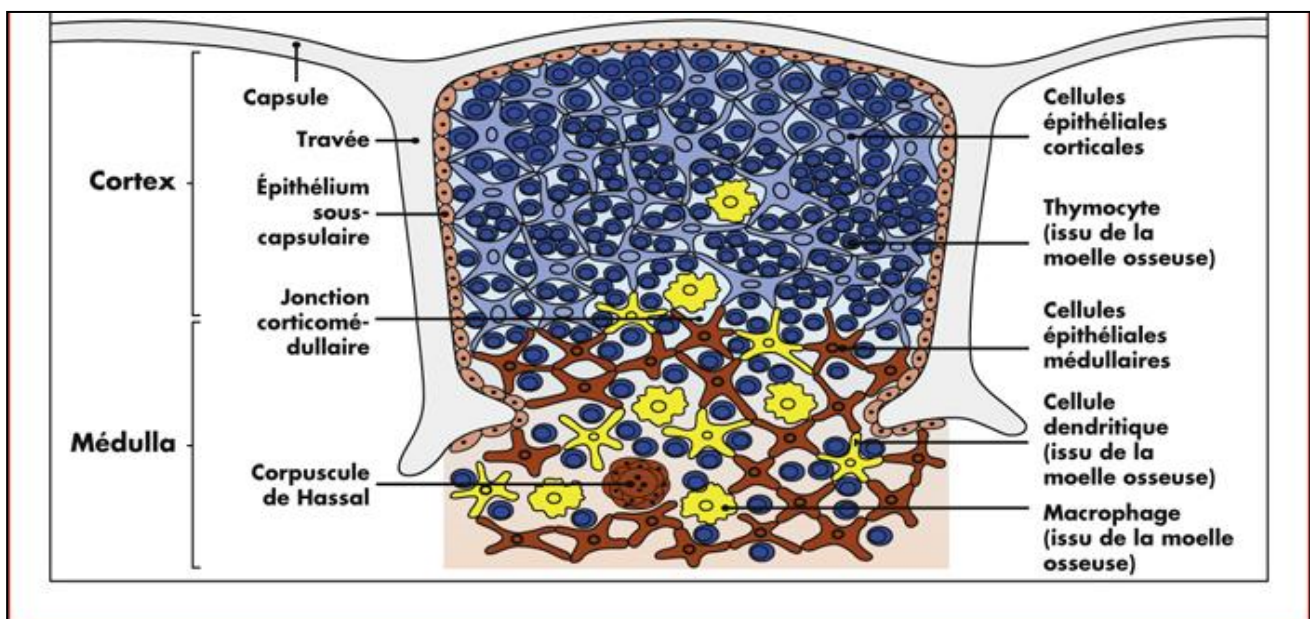
#### 2.1.1 Organe lymphoïde primaire

C'est le site de différenciation et de maturation des Lymphocytes B et des Lymphocytes T.

##### 2.1.1.1 Thymus

Le thymus est le site de production des Lymphocytes T, responsables de l'immunité à médiation cellulaire. Il présente une structure allongée, d'une forme multi-lobulaire (7 lobes chez le poulet) située le long des deux côtés de la trachée, quelques lobes s'étendant jusqu'à la cavité thoracique. Chaque lobe est encapsulé dans un tissu conjonctif et divisé en lobules multiples. Chaque lobule est constitué d'un cortex où les lymphocytes sont très denses et d'une

zone médullaire avec moins de lymphocytes « **Figure 1** », quelques LB migrent aussi vers le thymus après l'éclosion (**Brugère-picoux et Vaillancourt, 1989**).



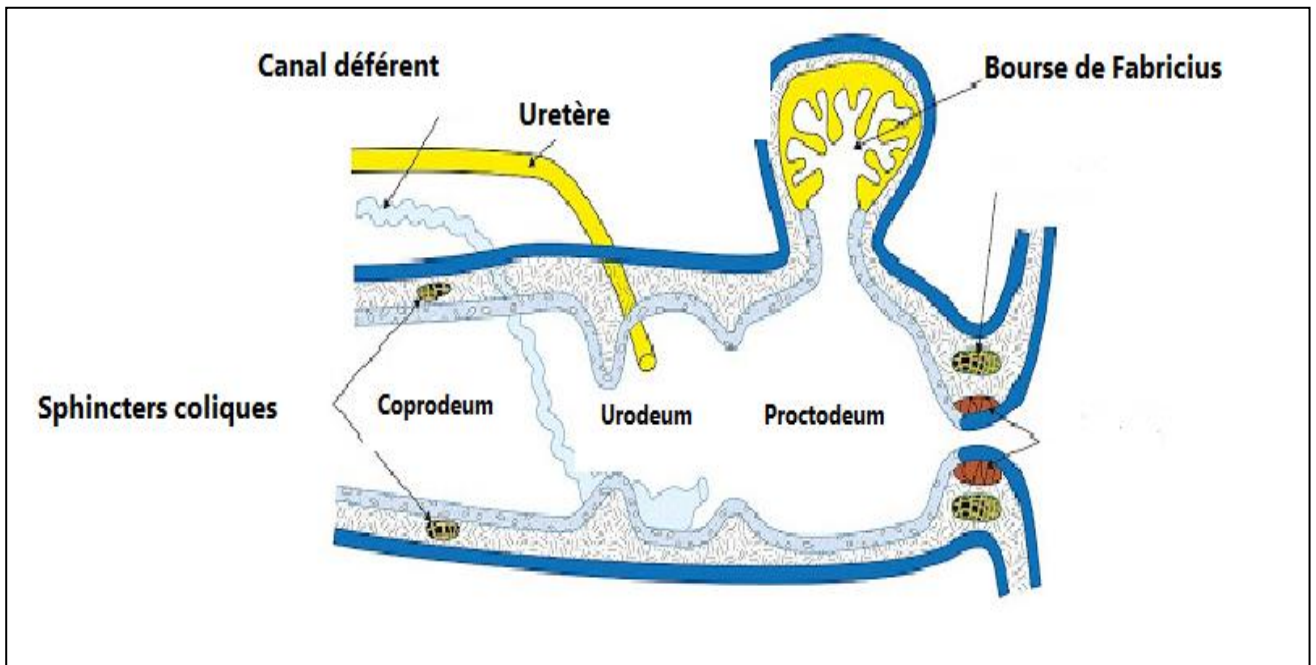
**Figure 1** : Schémas histologique du Thymus. (**Bachra et Kaïss., 2012**)

### 2.1.1.2 Bourse de Fabricius

Chez les oiseaux, les LB se différencient et se développent dans la bourse de Fabricius (BF), d'où le terme de LB, alors que chez les mammifères ces cellules se développent dans la moelle osseuse. La bourse est une extension modifiée de la paroi dorsale du cloaque « **Figure2** » formant un diverticule de couleur crème (**Brugère-picoux et Vaillancourt, 1989**).

Chaque follicule est rempli avec des LB, et comme dans le thymus, les LB sont disposées dans le cortex périphérique et la médullaire centrale. Outre les LB, la BF contient aussi des LT, des plasmocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et des réticulocytes. La présence de LT et des plasmocytes montre bien que la bourse est un organe lymphoïde primaire qui peut aussi prendre au piège l'antigène et entreprendre une production limitée d'anticorps, probablement comme une mesure d'autodéfense. La bourse produit quelques hormones dont la plus importante est la bursine, un tripeptide qui a un rôle régulateur dans le développement et la différenciation des LB. Chez le poulet, la bourse est bien développée à l'éclosion; elle atteint sa taille maximale autour de 4 à 12 semaines d'âge et au-delà, elle commence une involution, cette dernière s'achevant à la maturité sexuelle. Une bursectomie avant le 17ème jour d'incubation induit une absence totale d'immunoglobulines (agammaglobulinémie), avec l'absence de centres germinatifs et de plasmocytes dans les organes lymphoïdes périphériques (**Brugère-picoux et Vaillancourt, 1989**).





**Figure 2 :** Schémas de la bourse de Fabricius (Meyer C, 2021).

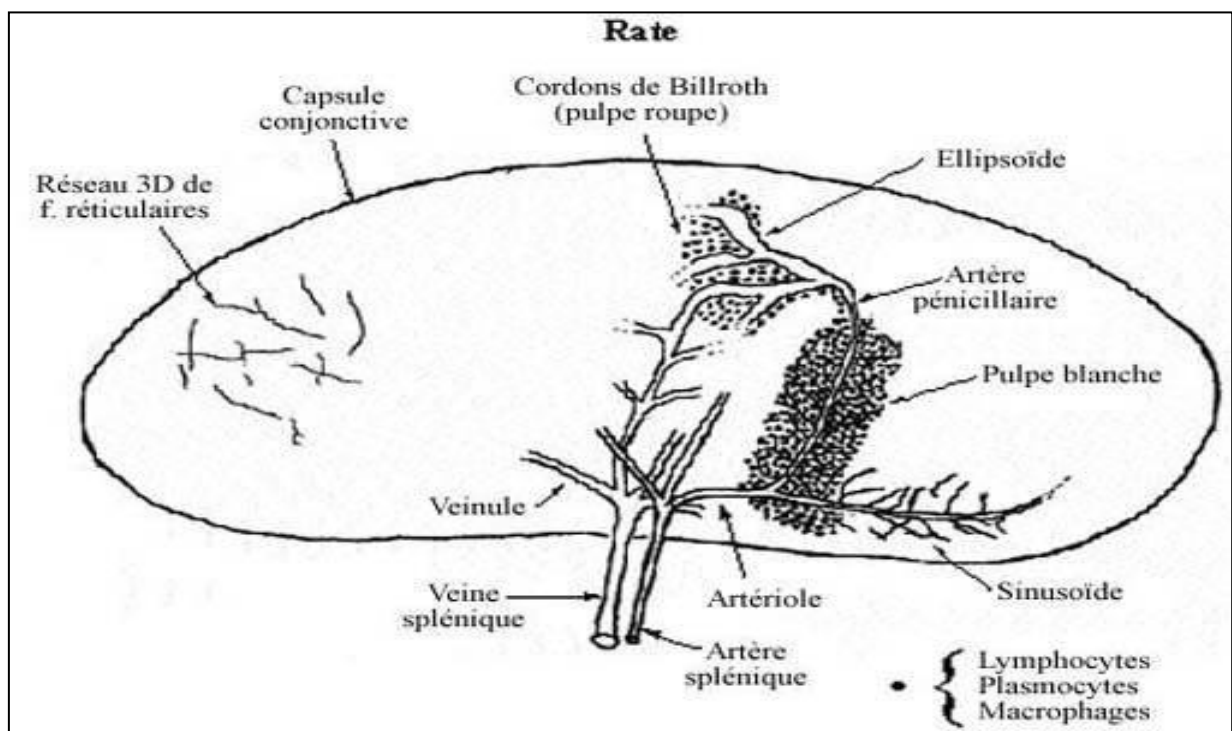
### 2.1.2 Organe lymphoïde secondaire

Ils représentent les sites principaux des réactions immunitaires induites par les antigènes, les organes lymphoïdes et les tissus lymphoïdes périphériques sont caractérisés par des agrégats de lymphocytes et des cellules présentatrices d'antigène (CPA) qui sont dispersés dans tout l'organisme, Ils comprennent la rate, la moelle osseuse et la glande de Harder. En outre, les oiseaux ont des foyers de tissus lymphoïdes secondaires qui sont nommés en fonction de leur localisation, comme les tissus lymphoïdes associés à la tête (Head-associated lymphoid tissues ou HALT), les tissus lymphoïdes associés aux bronches (Bronchus-associated lymphoid tissues ou BALT), et les tissus lymphoïdes associés aux intestins (Gut-associated lymphoid tissues ou GALT), ces derniers comprenant les amygdales œsophagiennes, le diverticule de Meckel, les plaques de Peyer, les amygdales cœcales, ainsi que les bandes annulaires du canard.

### 2.1.2.1 Rate

La rate du poulet est le premier tissu lymphoïde secondaire à être colonisé par les cellules lymphoïdes chez l'embryon âgé de 10 à 11 jours. Elle est située autour d'une artériole centrale, constituant la gaine lymphoïde périartérielle. Cette gaine comporte une zone T et une zone B. Les LT sont localisés autour de l'artériole, tandis que les LB sont à l'extérieur de cette zone, organisés en follicules primaires et secondaires « **Figure 3** ». Suite à la stimulation par les antigènes, les follicules développent des centres germinatifs riches en LB, avec quelques CPA comme les macrophages et les cellules dendritiques. L'augmentation du nombre des centres germinatifs après la vaccination ou une infection nécessite une coopération entre les LB, les LT et les CPA. La pulpe rouge est constituée de veinules sinusoides bordées par des macrophages, des thrombocytes, des lymphocytes et de nombreux plasmocytes. La rate est aussi un réservoir de thrombocytes, d'érythrocytes et de granulocytes (**Brugère-picoux et Vaillancourt, 1989**).

La rate répond essentiellement aux antigènes présents dans le sang. Les antigènes entrant dans la rate sont captés par les cellules dendritiques dans la zone marginale et dans les sinusoides de la pulpe rouge. Les cellules transportent ensuite les antigènes captés vers les follicules lymphoïdes primaires où les centres germinatifs se développent rapidement pour accueillir l'afflux des antigènes. En quelques jours, des plasmocytes producteurs d'anticorps se forment et commencent à migrer vers la zone marginale et la pulpe rouge de la rate. C'est aussi dans ces régions que la production d'anticorps est détectée en premier (**Brugère-picoux et Vaillancourt, 1989**).



**Figure 3** : la rate

(<http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2412/Chapitre11.html>)

### 3 Aperçu générale sur les différentes lésions des organes hématopoïétiques et diagnostique différentiel

#### 3.1 Thymus et bourse de Fabricius

##### 3.1.1 Hémorragies et granulomes de la bourse

**Tableau 1:** Principales maladies accompagnées par une hémorragie et des granulomes de la bourse de Fabricius et du thymus (Venne et al., 1989).

Espèces affectées	Principaux signes cliniques et lésionnels	Etiologie
Toutes les espèces	Apparition soudaine (mortalité jusqu'à 100%), chute de ponte, signes respiratoires ; sinusite, œdème facial. Hémorragies, cyanose, diarrhée, encéphalite, pancréatite	Virus influenza aviaire hautement pathogène
Poulet, gibier, pigeon, etc...	Mort subite, taux de mortalité élevé, lésions hémorragiques dans le tractus intestinal, encéphalite	Maladie de Newcastle (Paramyxovirus 1 vélogène)
Poule	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Forme aiguë: picage cloacal, diarrhée, mortalité (10-90%), inflammation de la bourse, œdématiée au début puis atrophiée plus tard, pétéchies et hémorragies (muscles, foie), rein avec des dépôts d'urate</li> <li>• Forme modérée: immunodépression</li> </ul>	Maladie de Gumboro (Avibirnavirus)

Dindon, poulet, etc...	Aucun signe clinique à une diarrhée sévère et mortelle, associé à l'hépatite vibrionienne, une chute de ponte (oiseaux immunodéprimés), granulome dans la bourse	Campylobactériose (Campylobacter spp.)
Toutes les espèces	Hyperkératose (cornée, bouche, œsophage), néphropathie nutritionnelle, plumes ébouriffées, lésions nerveuses, chute de ponte	Carence en vitamine A
Oiseaux aquatiques	Diarrhée verdâtre sanglante, mortalité élevée, conjonctivite, œsophagite, anneaux hémorragiques intestinaux, chute de ponte (25-40%), rate atrophiée	Entérite à virus du canard (Anatid herpesvirus 1)

### 3.1.2 Atrophie

**Tableau 2** : Principales maladies accompagnées par une atrophie de la bourse de Fabricius et du thymus (Venne et al., 1989).

Espèces affectées	Principaux signes cliniques et lésionnels	Etiologie
Toutes les espèces	Diarrhée aqueuse, lésion rénale, refus de l'abreuvement ou privation d'eau, coccidiose, dépôt viscéral de cristaux d'urates, etc...	Déshydratation Privation d'eau
Poulet	Conjonctivite, trachéite, pneumonie, néphrite, salpingite (anomalies de la	Bronchite infectieuse

	coquille et de l'albumine des œufs), chute de ponte (>50%), fausses pondeuses (Aspect du pingouin), entérite	(Coronavirus)
Poulet, etc...	Mort subite (2-30%), pâleur, léthargie, plumes ébouriffées, anorexie, fientes jaunes, hépatite, hémorragies, hydropéricarde, pancréatite, anémie	Hépatite à corps d'inclusion (Aviadenovirus)
Dindon, poulet, canard, oie	Retard de croissance, pâleur, emplumement anormal, boiterie, atrophie du thymus et de la bourse, hypertrophie des nerfs périphériques (marginal), proventriculite, entérite, hépatomégalie, splénomégalie, autres tumeurs (gonades, pancréas, rein, cœur)	Réticuloendothéliose (Gammaretrovirus)
Dindon	Dindons âgés de 8 à 10 semaines; mortalité (jusqu'à 25%); rate marbrée et hypertrophiée; tumeurs (foie, thymus, gonades, pancréas, reins, intestin, poumon, cœur)	Maladie lymphoproliférative (Retrovirus)
Dindon	Forte morbidité, dépression (mortalité âge <6 semaines), chute de ponte, fientes mucoïdes, intestins remplis d'une matière liquide et gazeuse, bourse atrophiée	Coronavirus du dindon (Coronavirus)
Faisan, etc...	Encéphalite, mortalité accrue, chute de ponte (dindes reproductrices)	Encéphalite équine de l'Est
Poulet, dindon, etc...	Arthrite, synovite, ampoules du bréchet, signes respiratoires, chute de ponte (anomalies de l'apex de la coquille),	Synovite infectieuse (Mycoplasma synoviae)

	ténosynovite; salpingite, aérosacculite	
Dindon, poulet, etc.	Mort subite d'oiseaux en bonne condition, le jabot encore rempli d'aliment, hépatite (hypertrophie du foie coloré en vert par les pigments biliaires), splénomégalie	Colisepticémie aiguë (Escherichia coli)
Dindon	Sévère retard de croissance, mortalité élevée, "oiseaux hélicoptères", atrophie du thymus (et moins sévèrement, atrophie de la bourse et de la rate)	Syndrome entéritique mortel du dindonneau

### 3.1.3 Hypertrophie de la bourse de Fabricius

**Tableau 3** : Principales maladies accompagnées par une hypertrophie de la bourse de Fabricius et du thymus (Venne et al., 1989).

Espèces affectés	Principaux signes cliniques et lésionnels	Etiologie
Poulet	Forme aiguë: picage cloacal; diarrhée; mortalité (10-90%); inflammation de la bourse, œdématiée au début puis atrophiée plus tard; pétéchies (muscles, foie); rein avec des dépôts d'urate; forme modérée: immunodépression	Maladie de Gumboro (Avibirnavirus)
Poulet (dindon)	Dépression; perte de poids; diarrhée; lymphomes diffus ou nodulaires dans les viscères (foie, rate, ovaire, rein, proventricule, cœur, bourse) et parfois dans la peau (follicules plumeux) et les muscles squelettiques	Maladie de Marek Forme aiguë (Mardivirus très virulent)

Poule	Dépression; pâleur; tumeurs nodulaires ou diffuses du foie, de la rate, de la bourse et d'autres organes; infection subclinique sans lésion; chute de ponte	Leucose lymphoïde (Retrovirus VLA-A) I
Poulet	Leucose myéloïde diffuse: pâleur; foie et rate hypertrophiés et aspect granuleux du foie; bourse parfois tumorale; infiltration tumorale de la moelle osseuse; leucémie myéloblastique; autres tumeurs (ovaire, reins, bourse)	Leucose myéloïde Myéloblastose (Retrovirus VLA-J)

### 3.2 Rate

**Tableau 4** : Principales maladies causant des lésions de la rate (Venne et al., 1989).

Espèces affectées	Principaux signes cliniques et lésionnels	Etiologie
Poulet	Splénomégalie	Aviadenovirus
Dindon, Outarde	Mort subite ; fientes sanglantes ; anorexie ; mortalité de 10 à 15% (jusqu'à 60%) ; intestin grêle violet foncé, gonflé et rempli d'un contenu sanglant ; rate tachetée hypertrophiée puis atrophiée ; hépatomégalie	Entérite hémorragique du dindon (Siadenovirus)
Poulet	Pâleur ; mort subite ; chute de ponte (jusqu'à 20%) ; œufs anormaux ; caillot sanguin dans la cavité abdominale et/ou sur le foie ; hépatite ; rate pâle et	Hépatite E (Hepevirus)

	hypertrophiée	
Faisan, dindon, pintade	Mort subite ; dépression ; rate hypertrophiée présentant des foyers grisâtres de nécrose ; congestion pulmonaire aiguë ; hépatomégalie	Maladie de la rate marbrée (Siadenovirus)
Poule, dinde	Crête pâle et rétrécie ; chute de ponte ; régression de l'ovaire formant de petits nodules ; hépatite ; oophorite ; salpingite ; foyers blanchâtres sur les testicules	Typhose (Salmonella Gallinarum-pullorum)
Dindon, poulet, canard, oie, etc	Mort subite ; septicémie ; hémorragies (cœur, gésier, graisse abdominale) ; oophorite ; nécrose cutanée ; hypertrophie et nécrose du foie et de la rate ; péritonite	Choléra aviaire aigu (Pasteurella multocida)
Dindon, poulet, canard, pigeon, etc.	Diarrhée ; dyspnée ; fientes jaune-verdâtre ; boiterie ; conjonctivite ; granulomes : foie, rate, poumons, cœur, reins, articulations ; ostéomyélite	Yersiniose (Yersinia pseudotuberculosis)
Poulet, dindon, canard, etc	Diarrhée (fientes jaunâtres, mousseuses et/ou mucoïdes) ; chute de ponte (œufs de mauvaise qualité) ; retard de croissance ; cæcums dilatés	Spirochétose intestinale aviaire (Brachyspira spp.)



## 4 Critères de validation des méthodes sérologiques

Une épreuve sérologique est considérée comme validée lorsqu'elle produit des résultats de test discernant la présence ou l'absence d'une substance « Analyte » dans le sérum à un niveau déterminé de confiance statistique. Des déductions à partir des résultats de l'essai peuvent alors être faites sur le statut des animaux au regard de l'infection (**Jacobson, 1998**).

### 4.1 Facteurs de variations

Les facteurs affectant la concentration et la composition de l'analyte dans l'échantillon de sérum sont essentiellement imputables à l'hôte et sont, soit inhérents (par exemple : âge, sexe, race, statut nutritionnel, gestation, réponse immunitaire) soit acquis (par exemple : immunité passive, immunité active obtenue par vaccination ou infection). Les facteurs non liés à l'hôte, tels que la contamination ou la détérioration de l'échantillon peuvent également avoir une incidence sur l'analyte de l'échantillon.

Les facteurs susceptibles d'affecter l'exactitude analytique de l'épreuve peuvent provenir des instruments utilisés ou d'une erreur du technicien, du choix du réactif et de l'étalonnage, des contenants de la réaction, de la qualité de l'eau, du pH et de l'ionisation des solutions tampons et diluants, des températures et durées d'incubation, ainsi que d'erreurs introduites par la détection d'analytes étroitement apparentés tels que des anticorps qui croisent avec différents agents pathogènes ou micro-organismes, du facteur rhumatoïde ou d'anticorps hétérophiles.

Les facteurs qui déterminent la capacité du résultat du test à permettre de tirer des conclusions précises sur l'infection de l'hôte ou le statut de l'analyte chez cet hôte sont la sensibilité diagnostique, la spécificité diagnostique et la prévalence de la maladie au sein de la population ciblée par l'épreuve. Les termes « positif » et « négatif » ont été réservés aux résultats des tests ; ils ne font jamais référence à l'infection ou au statut anticorps/antigène de l'hôte. Chaque fois qu'il est fait allusion aux mots « infection » ou « analyte », il est entendu que tout mode d'exposition à un agent infectieux peut être détecté par une méthode directe (par exemple, antigène) ou indirecte (par exemple, anticorps). La sensibilité et la spécificité diagnostiques découlent des résultats de tests effectués sur des échantillons obtenus à partir d'animaux de référence sélectionnés. Le degré de représentativité des animaux de référence pour toutes les variables liées à l'hôte ou à l'environnement dans la population ciblée par l'épreuve a une incidence majeure sur l'exactitude de l'interprétation des résultats du test. Par

exemple, les diagnostiqueurs avertis savent qu'une épreuve validée à partir d'échantillons provenant de bovins du nord de l'Europe, risque de ne pas donner des résultats valables pour différentes populations de bovidés en Afrique (**Jacobson, 1998**).

## **4.2 Critères de validation**

### **4.2.1 Spécificité analytique**

La spécificité et la propriété qui fait qu'une méthode d'analyse rend compte sans ambiguïté de la substance analysée en présence d'autres composantes normalement présentes. Elle peut aussi être définie comme un indice qui mesure l'aptitude de l'épreuve à éliminer la maladie ou à ne pas détecter l'analyte marqueur de la maladie quand elle n'existe effectivement pas (**Jean, 2014**).

Ce critère permet de :

- Faire la discrimination analyte /substances interférentes
- Garantir que le résultat de l'analyse exprime l'analyte
- Dire qu'il y'a absence d'interférences
- Elaborer un profil d'impuretés

**Impuretés :** Ajouts dosés impuretés disponibles sur composé ou formulation (**Marie-Dominique, 2010**).

### **4.2.2 Sensibilité analytique**

La sensibilité analytique peut être définie comme un indice qui mesure l'aptitude de l'épreuve à détecter l'analyte marqueur de la maladie quand il existe réellement (**Jean, 2014**).

### **4.2.3 Linéarité**

Capacité dans un intervalle donné d'obtenir des résultats de dosage directement proportionnels à la concentration ou à la quantité d'analyte dans l'échantillon (**Marie-Dominique, 2010**).

### **4.2.4 Exactitude (Justesse)**

Etroitesse d'accord entre la valeur trouvée et la valeur acceptée soit comme valeur conventionnellement vraie soit comme valeur de référence (**Marie-Dominique, 2010**).

#### **4.2.5 Fidélité**

Etroitesse d'accord entre une série de mesures obtenues dans des conditions prescrites à partir de prises d'essais multiples provenant d'un même échantillon homogène **(Marie-Dominique, 2010)**.

Elle nous indique les erreurs aléatoires d'une méthode, et elle nous renseigne sur :

##### **4.2.5.1 Répétabilité**

La répétabilité exprime la fidélité évaluée dans des conditions opératoires identiques (même analyste, même équipement, même laboratoire,...) et dans un court intervalle de temps **(Marie-Dominique, 2010)**.

##### **4.2.5.2 Fidélité intermédiaire**

La fidélité intermédiaire exprime la variabilité intra-laboratoire : jours différents, analystes différents, équipements différents, etc... **(Marie-Dominique, 2010)**.

##### **4.2.5.3 Reproductibilité**

La reproductibilité exprime la variabilité inter laboratoires (études collaboratives) habituellement appliquées à la standardisation de la méthodologie **(Marie-Dominique, 2010)**.

##### **4.2.5.4 Précision**

Écart-type  $s$  (standard déviation) **(Marie-Dominique, 2010)**.

#### **4.2.6 Intervalle de validité**

Intervalle compris entre la concentration (quantité) la plus élevée et la plus faible de l'échantillon dans lequel il a été démontré que la méthode d'analyse présente une fidélité, une exactitude et une linéarité satisfaisante. **(Marie-Dominique, 2010)**.

#### **4.2.7 Limite de détection :**

La limite de détection d'une méthode d'analyse est la plus petite quantité d'analyte qui peut être détectée mais pas nécessairement quantifiée comme une valeur exacte **(Marie-Dominique, 2010)**.

#### **4.2.8 Limite de quantification**

Quantité la plus faible d'analyte dans un échantillon qui peut être déterminée quantitativement avec une fidélité et une exactitude appropriée **(Marie-Dominique, 2010)**.

#### **4.2.9 Robustesse**

Mesure de la capacité d'un protocole à ne pas être affectée par des variations faibles, mais délibérées, des paramètres de la méthode. La robustesse fournit une indication sur la fiabilité de la méthode dans les conditions normales d'utilisation (**Jean, 2014**).

#### **4.2.10 Stabilité des solutions**

Dans le cas de réactifs fabriqués par le laboratoire, celui-ci devra établir les conditions de stabilité (température, durée de conservation...). Une vérification des conditions suggérées par le fabricant peut être envisagée selon le risque (**Jean, 2014**).

## 5 Méthodes sérologiques

### 5.1 Réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IHA)

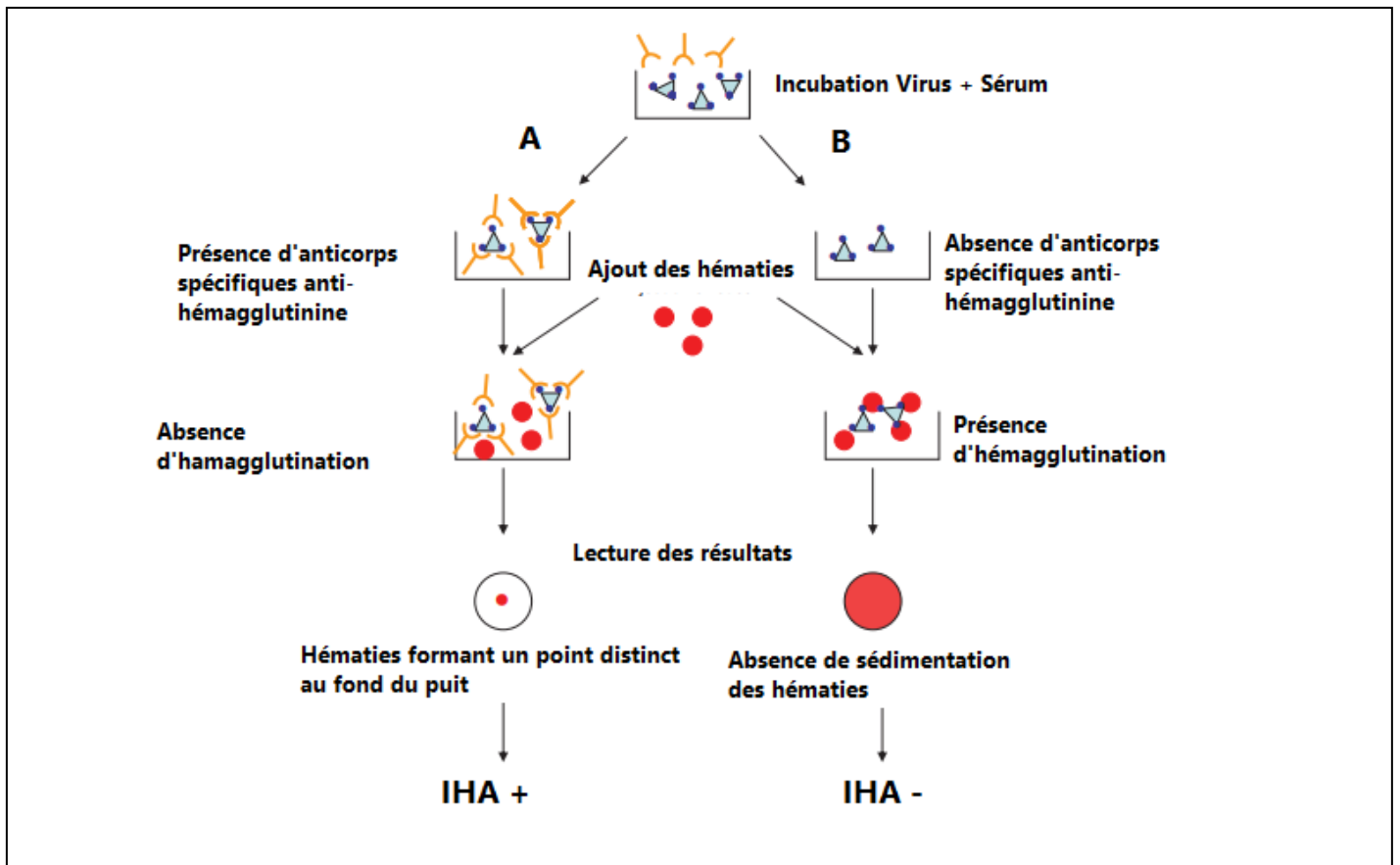
Le test d'inhibition de l'hémagglutination a été initialement décrit par Hirst (1942) et puis modifié plus tard par Salk (1944) (**Organization, 2011**).

Il est le test le plus fréquemment utilisé pour l'analyse antigénique des isolats de virus influenza et est également largement utilisé pour la détection et le dosage des anticorps dirigés contre de nombreux virus aviaires dont le virus de la maladie de Newcastle, le virus de la grippe aviaire, le virus de la bronchite infectieuse, l'adénovirus hémagglutinant (EDS'76) et le circovirus des Psittacidae (**Cross, 2002**).

#### 5.1.1 Principe de la réaction

Cette technique se base sur la propriété que possède certains virus d'agglutiner les hématies de différentes espèces animales de façon quantitative et visible macroscopiquement. Dans le cas du virus influenza, l'agglutination est due à l'attachement des molécules d'hémagglutinine par leur site de liaison aux récepteurs des hématies. Ces récepteurs sont des acides sialiques portés par des sialoglycoprotéines et des sialolipides ou gangliosides. Comme l'hémagglutinine est un antigène de surface de la particule virale, l'évaluation de sa quantité permet d'apprécier celle du virus grippal dans une suspension. C'est le principe de la réaction d'hémagglutination.

Des anticorps spécifiques de l'hémagglutinine virale peuvent inhiber la réaction d'hémagglutination. Cette propriété constitue la base du test d'inhibition de l'hémagglutination « **Figure 4** ». Cependant, le sérum de la plupart des espèces animales contient un certain nombre d'inhibiteurs non spécifiques pouvant provoquer des résultats faux positifs. Ces inhibiteurs sont des glycoprotéines plus ou moins analogues aux récepteurs spécifiques du virus qui se trouvent sur la membrane des hématies ou des cellules sensibles. Pour titrer le taux d'anticorps spécifiques, il convient donc de se débarrasser auparavant des inhibiteurs non spécifiques. Notons cependant que les sérums aviaires contiennent rarement de tels inhibiteurs (**Palmer et al., 1975**). Il est également recommandé d'éliminer des sérums les agglutinines naturelles pour les globules rouges de l'espèce utilisée pour le test, par une étape d'adsorption. Les inhibiteurs non spécifiques peuvent être inactivés par chauffage ou par traitement avec du Kaolin, de la trypsine ou de la neuraminidase bactérienne (**Bachir-Pacha et al., 2014**).



**Figure 4 :** Principe de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination (Bernard, 2011).

### 5.1.2 Réalisation pratique :

En pratique, la réaction d'IHA se déroule dans les puits d'une microplaque. Le principe du test est de déterminer, par des dilutions successives, le taux d'anticorps capable d'empêcher l'agglutination d'une concentration standard d'hématies, dans le sérum à tester. Ainsi, une suspension de virus influenza est tout d'abord mise en incubation avec le sérum à tester. Puis, des globules rouges sensibles au virus dans les conditions du test sont ensuite ajoutés dans les puits et l'incubation est poursuivie. Si une agglutination des hématies se produit, cela signifie que le sérum ne contient pas d'anticorps spécifiques du virus. Sur la microplaque de titrage, les hématies forment alors un film qui couvre les côtés et le fond des puits. Inversement, si l'on n'observe pas d'agglutination, le sérum contient des anticorps spécifiques. Les hématies qui n'ont pas été agglutinées tombent au fond des puits et l'observation de la microplaque montre des points distincts au fond des puits (Cross, 2002). Il est important de noter que les virus influenza ne réagissent qu'avec les globules rouges de certaines espèces animales, et ceci seulement dans des conditions rigoureuses de pH, de force ionique et de concentration en globules rouges (Cross, 2002). Le délai d'apparition des anticorps IHA post-infection est plus tardif qu'en IDG (environ 10 jours). D'autre part, chez certaines espèces aviaires, les canards en particulier, la réponse IHA est faible et concerne peu d'individus dans un troupeau (AFSSA,

**2008**). Cependant, l'IHA est toujours considérée comme la méthode de référence pour la détection d'anticorps spécifiques anti-virus influenza aviaire dans les sérums d'oiseaux (**KAMPS et al., 2006**) et est encore employée pour des diagnostics sérologiques de routine (**OIE, 2009**).

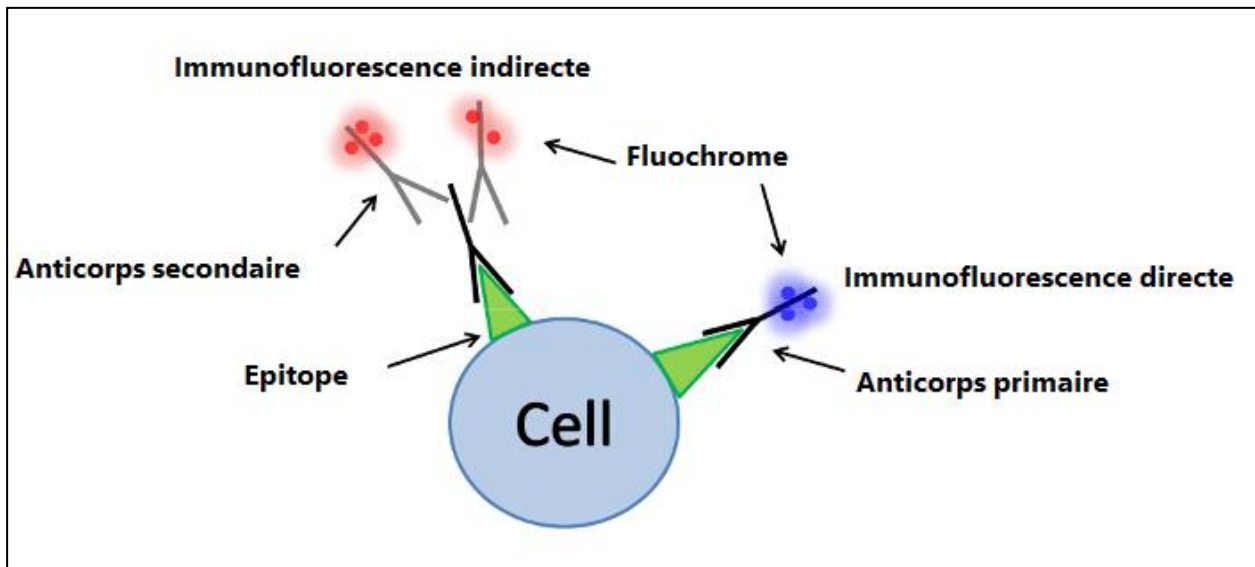
## **5.2 Réaction d'Immunofluorescence indirecte**

### **5.2.1 Principe de la méthode**

L'immunofluorescence indirecte consiste à utiliser des anticorps marqués par un fluorochrome et dirigés contre les anticorps que l'on veut tester. Les anticorps marqués seront choisis de manière à avoir une forte affinité pour les anticorps testés. Une fois liés à ces derniers, les anticorps marqués émettront de la fluorescence qui pourra être mesurée. Cette méthode « **Figure 5** » est plus sensible mais l'interprétation de la fluorescence, qui permet d'évaluer le titre en anticorps, reste subjective (**Ide, 1982**).

### **5.2.2 Réalisation pratique**

Les cellules infectées par un agent spécifique sont fixées à une glissière ou au fond d'un puits dans une Plaque 96 puits. Des dilutions multiples des sérums à tester sont incubées avec les cellules et sont ensuite lavées. Un anticorps secondaire marqué à la fluorescéine est ensuite incubé avec les cellules et sont à nouveau lavées. Les puits sont ensuite vus sous un microscope qui génère une longueur d'onde de la lumière ultraviolette. Si l'échantillon est positif, l'anticorps secondaire se liera à l'anticorps primaire qui est déjà lié à l'antigène et les cellules deviendront fluorescentes. Si l'échantillon est négatif, les cellules ne tacheront pas. Encore une fois, pour cela pour être utile, l'anticorps secondaire doit reconnaître l'anticorps primaire de nombreuses espèces d'oiseaux ou plusieurs anticorps secondaires doivent être utilisés. La sensibilité et la spécificité de ce type de test dépendra de l'agent infectant et la conception du test (**Phalen, 2001**).



**Figure 5** : Schéma comparatif entre l'IFI et IFD (Jove Journal)

### 5.3 Réaction de séroneutralisation

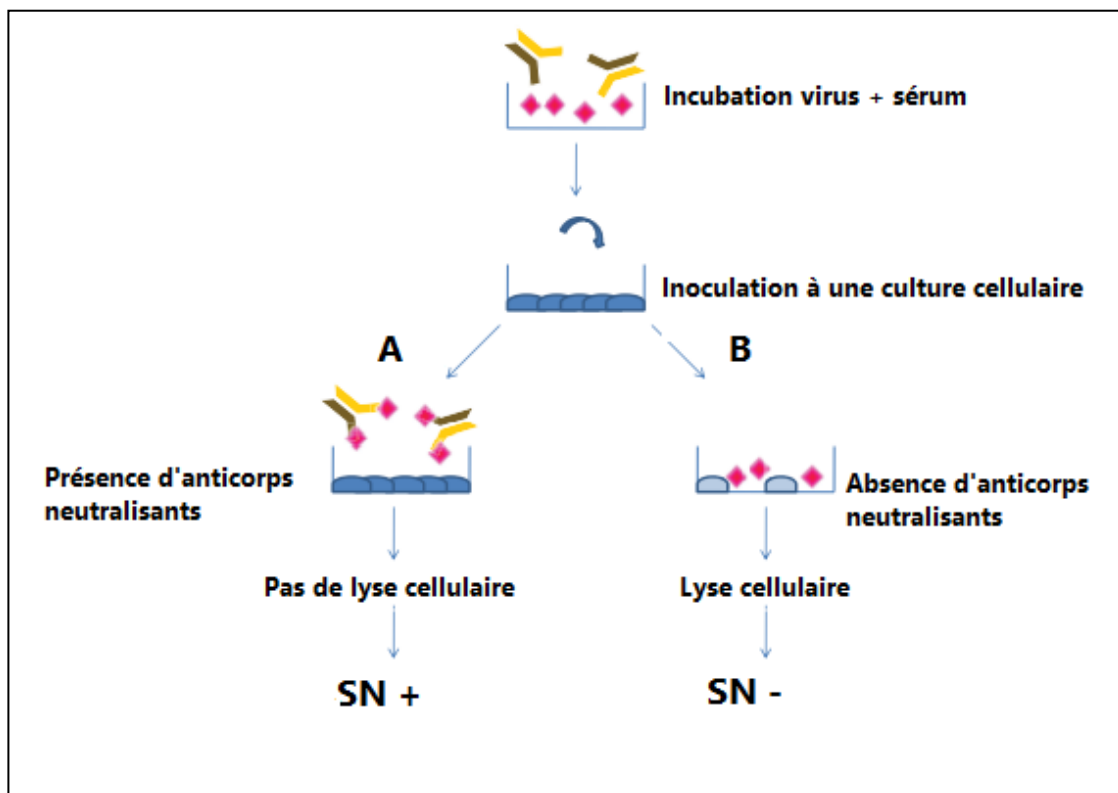
#### 5.3.1 Principe de la réaction

La séroneutralisation est une technique quantitative qui permet de mettre en évidence les éventuels anticorps neutralisants présents dans un sérum. Le principe repose sur l'interaction d'anticorps contre les protéines externes du virus. Ces anticorps préviennent la pénétration et donc la multiplication du virus dans les cellules sensibles (Bernard, 2011).

#### 5.3.2 Réalisation pratique

Pour mettre en œuvre la réaction, des quantités constantes de virus sont mises en contact avec des dilutions en série du sérum à tester puis inoculées à une culture cellulaire sur microplaques et incubées 3 à 5 jours. Le virus appartient le plus souvent à une souche cytopathogène (c'est le cas du virus influenza). L'absence d'effet cytopathogène traduit donc la présence d'anticorps neutralisants dans le sérum testé « **Figure 6** ». Lorsque la souche virale n'est pas cytopathogène, la neutralisation virale est appréciée par l'absence de virus d'épreuve lors de détection par immunofluorescence par exemple. Cette technique peut être appréciée par la séroneutralisation par réduction de plage de lyse.





**Figure 6 :** Principe de la réaction de séroneutralisation (Bernard, 2011)

### 5.3.3 Séroneutralisation par réduction de plage de lyse

Les étapes de cette technique sont les suivantes :

- Le sérum à tester est mis en présence de souches d'un virus connu et le mélange est mis à incuber.
- Après incubation, le mélange est inoculé à une culture cellulaire pour évaluer la pathogénicité du virus après neutralisation par les anticorps.

Deux options sont alors possibles :

- ✓ Utilisation d'un sérum connu pour déterminer le sérotype du virus que l'on teste.
- ✓ Utilisation d'une souche connue pour tester un sérum.

Dans le deuxième cas, on utilise des dilutions successives et on observe la réduction de l'effet cytopathogène (plages de lyses).

La concentration de sérum qui réduit de 50% les plages de lyse (par rapport au virus seul) permet de déterminer le titre en anticorps neutralisants dans le sérum.

## 5.4 Test de précipitation de double diffusion en gel (réaction d'Ouchterlony)

### 5.4.1 Principe de la réaction

Le principe de l'AGID (Agar Gel Immunodiffusion assay) est de visualiser la réaction d'immuno-précipitation de l'anticorps et de l'antigène du virus après diffusion dans une matrice d'agar, bien que l'AGID soit le plus largement utilisé dans un diagnostic réglage pour détecter l'anticorps à l'aide d'un antigène de référence, il peut également être utilisé pour détecter l'antigène de la grippe de type A en utilisant un anticorps de référence, tel que pour confirmer le virus influenza aviaire dans le liquide allantoïque de poulet embryonnaire œufs isolés du virus. AGID est peu coûteux et simple à exécuter et fonctionne pas besoin de fournitures inhabituelles ou d'équipement coûteux. Cependant, la préparation des réactifs avec une assurance qualité adéquate est coûteuse et prend du temps; par conséquent, de nombreux laboratoires utilisent des réactifs produites par des laboratoires de référence. Additionnellement L'AGID nécessite des compétences modérées pour interpréter les résultats des tests. Les résultats peuvent être lus en 24 heures, mais le test peut prendre jusqu'à 48 heures pour détecter des faibles positives réactions (**Spackman et al., 2008**).

Le test d'immunodiffusion est une méthode simple et dosage précis. Son inconvénient majeur est son manque de sensibilité (**Ritchie et al., 1992**).

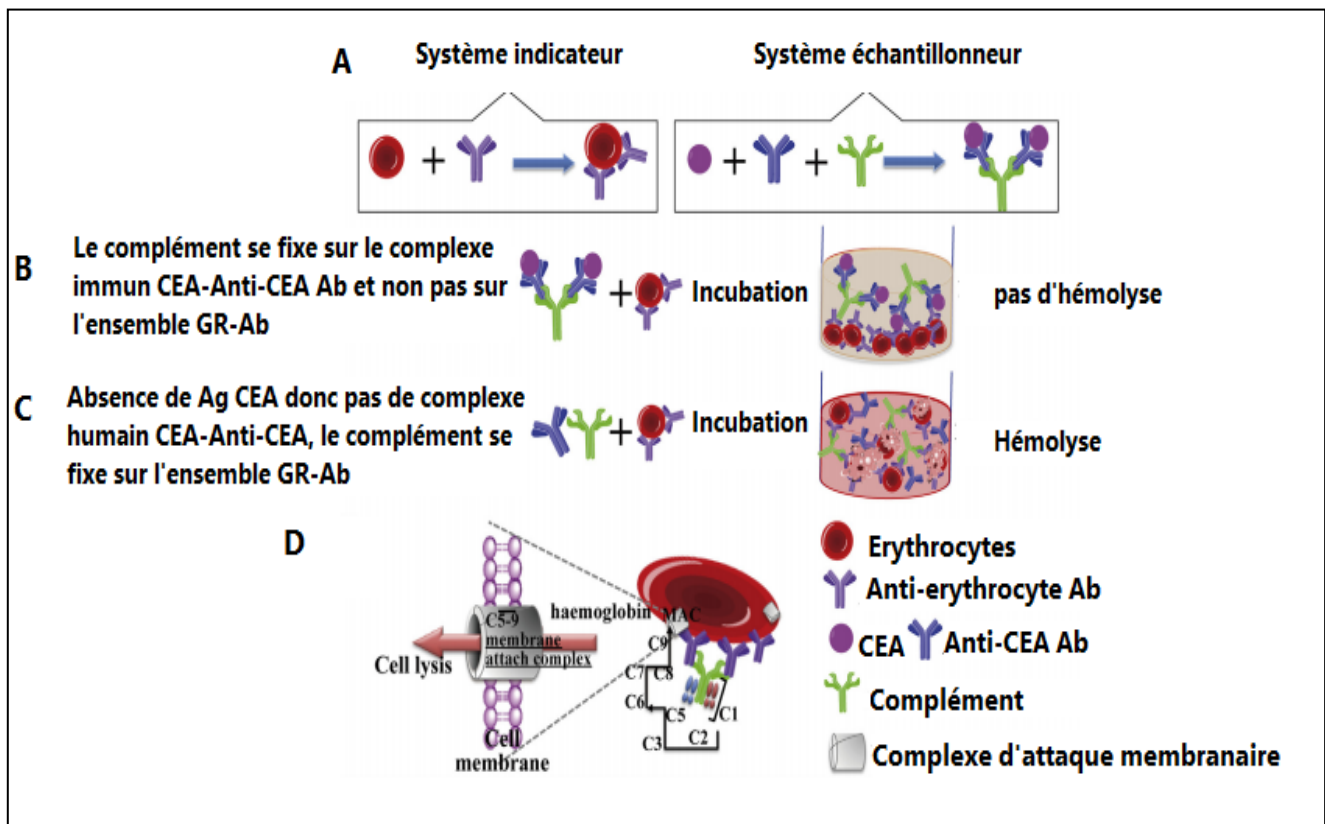
### 5.4.2 Réalisation pratique

Le sérum et solubilisé, l'antigène est placé dans des puits adjacents découpés en couche d'agar. La plaque d'agar est ensuite laissée pour un maximum de 48 heures pendant que l'antigène et le sérum se diffusent l'un vers l'autre. Si le sérum contient un anticorps précipitant en concentration suffisante, alors l'antigène et l'anticorps se réticuleront et précipiteront en formant une ligne blanche discrète dans la gélose (**Phalen, 2001**).

## 5.5 Fixation du complément :

### 5.5.1 Principe de la réaction :

Le test de fixation du complément (CFT) tire parti du fait que le complément, lorsqu'il est activé par un anticorps lié à un globule rouge, provoquer la lyse des globules rouges. Dans ce test, plusieurs dilutions de sérum sont incubées avec le test antigène et complément. Si le sérum contient l'anticorps cible, les complexes immuns seront formés et le complément de la solution se lie aux complexes antigène-anticorps. Pour ça solution sont ajoutés des globules rouges de mouton lavés et un anticorps qui les liera. Dans le cas d'un échantillon de sérum positif, tout le complément sera fixé et le complément sera insuffisant pour provoquer la lyse des globules rouges. Si le sérum ne contient pas d'anticorps contre l'antigène, le complément reste libre est fixé par les anticorps présent sur les globules rouges, et provoque la lyse des globules rouges « **Figure 7** ». Un inconvénient majeur de ce test est que certains sérums seront anticomplémentaires et ne peuvent pas être utilisés dans ce test. Quand soigneusement conçu, le CF a prouvé sa sensibilité et test spécifique (Phalen, 2001).



**Figure 7** : Principe de la méthode de fixation du complément (Li et al., 2016)

Il existe deux systèmes de réaction dans CFT: A, B, C et D ; A) le système d'échantillonneur et le système d'indicateur. B) Lorsqu'il y a un antigène / anticorps cible dans le système d'échantillonneur, le complexe Ag-Ab formé fixera / activera le complément. Ensuite, aucun complément ne sera disponible pour lyser les érythrocytes dans le système indicateur C) Quand il n'y a pas d'antigène cible dans le système d'échantillonnage, le complément sera activé par un érythrocyte recouvert d'Ab et conduira à une hémolyse.

D) L'anticorps lié à la membrane cellulaire interagit avec le composant complémentaire 1 (C1), et ceci déclenche l'activation de séquence du composant 3-9 (C3-C9). Ces composants forment le complexe d'attaque membranaire (MAC), qui se compose de C5b-C6-C7-C8-C9 (noté C5-9), ce qui provoque une fuite ou une lyse des cellules **(Li et al., 2016)**.

### 5.5.2 Réalisation pratique

Le test de fixation du complément n'a été appliqué qu'à un degré très limité dans l'étude et le diagnostic de l'infection aviaire pour deux raisons probables ;

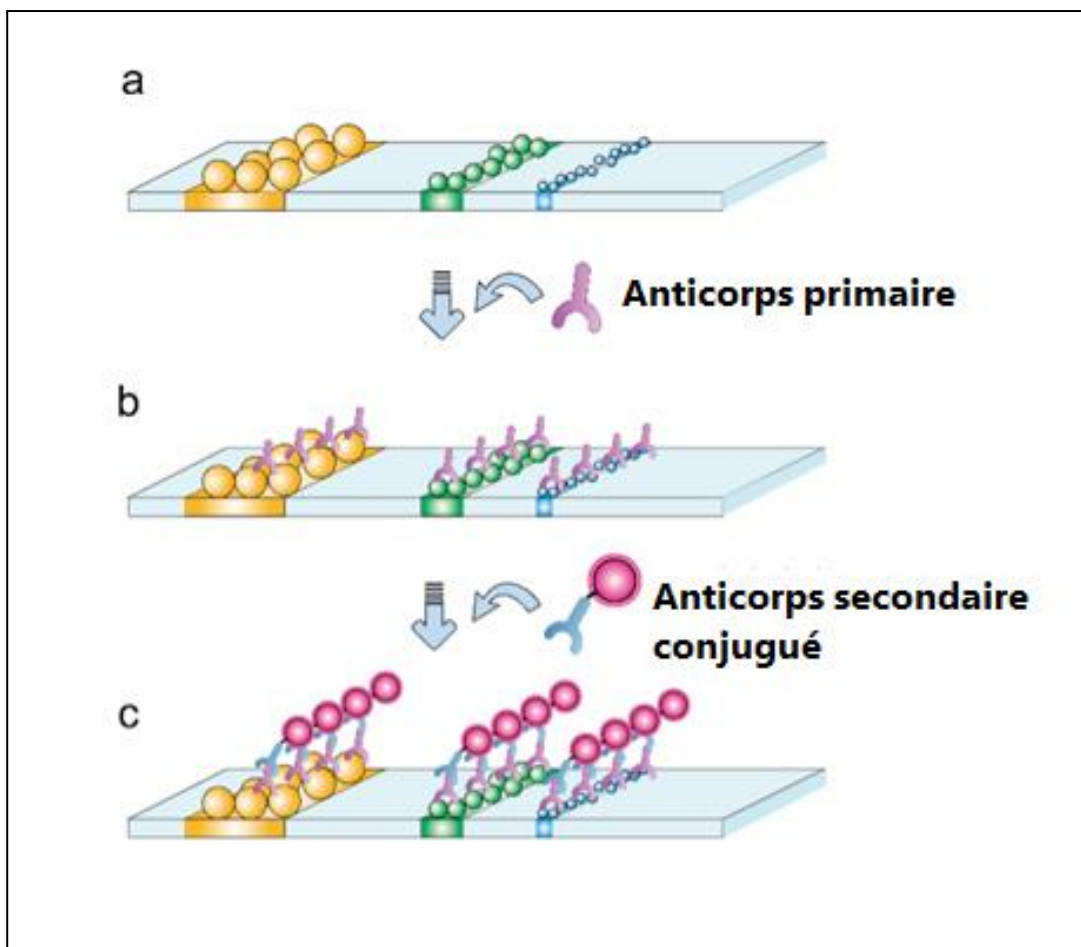
- ✓ que les difficultés techniques et les dépenses impliquées en ont fait une méthode moins attractive du point de vue économique que l'agglutination,
- ✓ que les résultats n'ont pas été trop encourageants dans l'ensemble ;
  - soit en raison de certaines particularités inhérentes au comportement de fixation du complément de ces sérums
  - soit parce que les antigènes utilisés n'ont pas été adéquats.

Une revue de la littérature suggère que la deuxième raison était peut-être la plus importante des deux. La fixation du complément a été utilisée avec des résultats variables dans le diagnostic de tuberculose et de maladie du pullorum chez les poulets. Il a été appliqué plus largement dans la détection de la présence ou du passé contact avec le virus de la psittacose (ornithose) chez les perroquets et les pigeons. De faibles réactions avec ces virus ont été rapportées chez des dindes, canards et divers oiseaux sauvages; le test n'a pas été satisfaisant cependant avec du sérum de poulet, L'étude de la maladie de Newcastle en les poulets n'ont pas été aidés par la fixation du complément, une preuve supplémentaire de l'échec du sérum de poulet à fixer le complément avec un antigène homologue a été obtenu chez des oiseaux immunisés avec le vaccin contre le virus de la grippe. Alors que ces antisérums à haute dilution inhibaient l'agglutination des globules rouges de poulet par le virus de la grippe du type homologue, ils ne fixent pas le complément avec cet antigène. En bref, par conséquent, la

fixation complémentaire avec du sérum aviaire semble se produire de manière irrégulière et est fréquemment de faible degré (Rice, 1947).

## 5.6 Western blot

On fait migrer les protéines virales dans un gel de polyacrylamide et on les transfère sur une feuille de nitrocellulose. Cette dernière est ensuite découpée et chaque bandelette obtenue est mise en présence de l'échantillon de sérum à tester. L'ajout d'une antiglobuline (anticorps secondaire) couplé à une enzyme va conduire à une réaction immuno-enzymatique mettant en évidence la réaction protéines virales-anticorps « **Figure 8** ». Cette technique est plus sensible que l'immunofluorescence indirecte (Endo-Munoz, 1990).



**Figure 8** : Principe de la réaction Western blot (Creative diagnostics).

## 5.7 Test ELISA

### 5.7.1 Principe du test

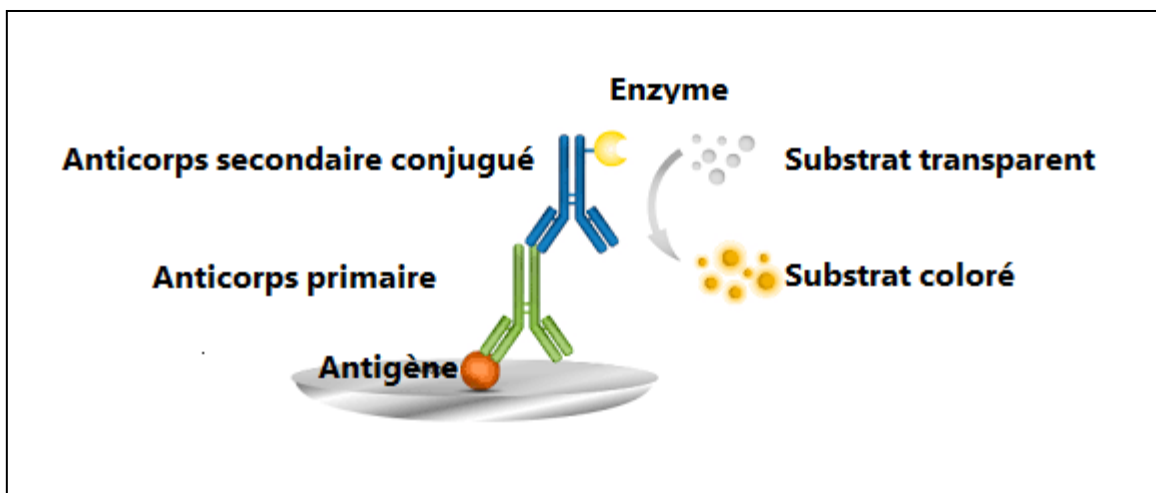
Il existe plusieurs protocoles ELISA « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay », c'est-à-dire dosage immuno-enzymatique sur support solide. Le principe consiste à visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat, d'une enzyme préalablement fixée à un anticorps secondaire. L'ELISA pouvant être utilisé tant pour évaluer la présence d'un antigène que celle d'un anticorps dans un échantillon, c'est un outil efficace à la fois pour déterminer des concentrations sériques d'anticorps, que pour détecter la présence d'un antigène. Il a également trouvé des applications dans l'industrie de l'alimentation, afin de détecter des allergènes alimentaires, comme le lait, les cacahuètes, les noix et les œufs.

([http://fr.wikipedia.org/wiki/Enzymelinked\\_immunosorbent\\_assaywikipedia](http://fr.wikipedia.org/wiki/Enzymelinked_immunosorbent_assaywikipedia)).

Ces tests existent en deux formats différents : un ELISA indirect et un ELISA compétitif.

### 5.7.2 ELISA indirect :

L'ELISA indirect utilise des anticorps secondaires anti-immunoglobuline d'espèce, ce qui rend ce test spécifique d'espèce « **Figure 9** ».



**Figure 9** : Schémas de l'ELISA indirect (**Molecular devices**).

Le dosage immuno-enzymatique (ELISA) est un test très sensible pour la détection des anticorps. En raison de la sensibilité de ce test, si pas soigneusement contrôlé, il peut manquer de spécificité. Dans ce test, l'antigène est autorisé à s'adsorber sur une surface en plastique, généralement le fond d'un 96 puits plaque de polystyrène. Le sérum de test correctement dilué est puis incubé dans le puits enduit d'antigène et le puits est lavé. Si le sérum contient un anticorps qui reconnaît l'antigène, des complexes antigène-anticorps se forment.

Si le sérum ne contient pas d'anticorps capables de reconnaître l'antigène, les complexes ne se forment pas. Dans la deuxième étape, une solution contenant un anticorps secondaire fabriqué pour reconnaître l'anticorps primaire est ajouté au puits, incubé, et le puits est lavé. L'anticorps secondaire est lié de manière covalente à une enzyme. Des échantillons de sérum positifs en résultent alors dans la formation d'un complexe d'antigène à 3 couches, anticorps primaire et anticorps secondaire. En revanche les échantillons de sérum négatifs ne forment pas de complexes et l'anticorps secondaire sera emporté. Dans la dernière étape, un substrat est ajouté que, lorsqu'il est modifié par l'enzyme de tuile attachée à l'anticorps secondaire, produit une couleur visible à l'œil nu et quantifiée par spectroscopie. Ainsi, les échantillons positifs donnent des puits colorés et des échantillons négatifs résultent en des puits clairs. Le test ELISA est un test quantitatif et peut être utilisé pour estimer la quantité relative d'anticorps présents dans le sérum. Une augmentation logarithmique du changement de couleur est attendue à mesure que le titre d'anticorps augmente et que la couleur change peut plafonner à des concentrations plus élevées d'anticorps. Par conséquent, même si un ELISA plus élevé la lecture signifie une concentration d'anticorps plus élevée.

Une autre considération à prendre est que même le sérum négatif entraînera un léger changement de couleur. Par conséquent, un point de coupure doit être soigneusement déterminé pour chaque ELISA.

Pour que ce soit précis, c'est nécessaire d'avoir un anticorps secondaire qui reconnaît systématiquement l'anticorps primaire. Étant donné qu'il existe de nombreuses espèces d'oiseaux les vétérinaires voudront peut-être tester un anticorps secondaire fabriqué contre l'immunoglobuline d'une espèce d'oiseaux, en particulier le poulet, une réaction croisée est imprévisible avec les anticorps d'autres espèces. Ce n'est que maintenant que les anticorps secondaires spécifiques aux différentes espèces sont développés (**Phalen, 2001**).

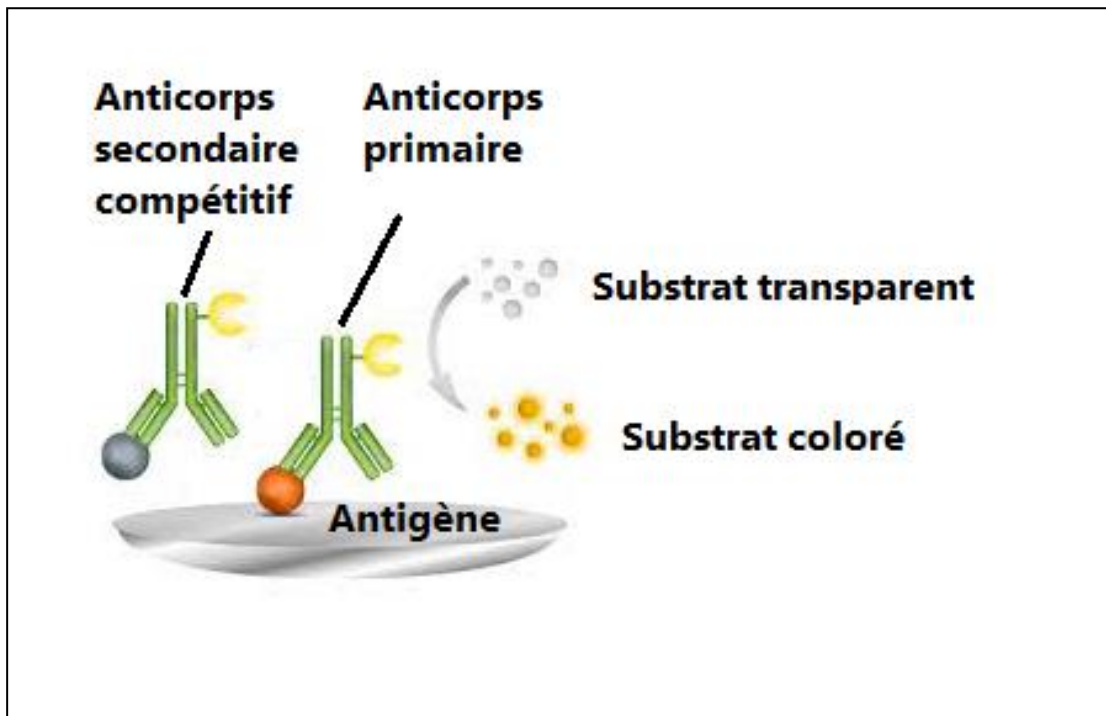
### 5.7.3 Réalisation pratique d'un test ELISA indirect au laboratoire

En pratique, la réaction se déroule dans les puits d'une microplaque. L'échantillon biologique à tester est déposé dans un puits où sont adsorbés les antigènes viraux permettant ainsi aux anticorps spécifiques de se fixer aux antigènes. Un lavage de la plaque est ensuite réalisé afin d'éliminer les anticorps non liés. Des anticorps secondaires anti-partie constante des immunoglobulines de l'espèce sont ajoutés dans les puits afin de détecter les complexes immuns formés. Ces anticorps secondaires sont conjugués à une enzyme qui a pour propriété de réagir avec un substrat incolore à l'état initial pour donner un produit de réaction coloré. Les anticorps secondaires libres sont éliminés par lavage et le substrat chromogène de l'enzyme est ajouté. On obtient alors un signal lumineux qui est proportionnel à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon. Ce signal lumineux est mesuré par sa densité optique grâce à un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption du composé lumineux produit (**Bernard, 2011**).

### 5.7.4 ELISA compétitif

Au fur et à mesure de l'évolution de la science, cette ELISA indirecte a été légèrement modifiée, l'ELISA compétitif, quant à lui, utilise des anticorps monoclonaux de souris qui entrent en compétition avec les anticorps du sérum à tester pour la liaison avec l'antigène spécifique « **Figure 10** ». Des anticorps secondaires sont ensuite dirigés contre les anticorps monoclonaux de souris. Ainsi, un sérum positif aura une valeur d'absorbance plus faible. Le principal avantage de l'ELISA compétitif est qu'il peut analyser des échantillons de sérum de multiples espèces d'oiseaux et de mammifères, excepté la souris (**Suarez et Schultz-Cherry, 2000**).





**Figure10** : Schémas d'un test ELISA compétitif (Molecular devices)

### 5.7.5 ELISA capture IgM (ou MAC-ELISA : IgM Antibody-Capture ELISA)

Il permet de déceler les infections aiguës puisqu'il détecte assez tôt les anticorps dans les sérums. Le MAC-ELISA utilisé pour la détection des arbovirus par exemple présente une sensibilité relative et spécificité relative augmentées (Long et al., 2006).

Le MAC-ELISA reste un test de choix pour la détection des infections aiguës en raison de la difficulté de la détection des IgM par le test de séroneutralisation ou par le test d'inhibition d'agglutination (Hobson-Peters, 2012) et présente aussi moins de réactions croisées pour la recherche des IgG (Niedrig et al., 2007). Cependant, ce test présente des limites d'utilisation par manque de conjugués pour certaines espèces (notamment aviaires) (Dauphin et Zientara, 2007).

### 5.7.6 ELISA capture IgG :

Comme le MAC-ELISA, ce test exige l'utilisation des anticorps anti-espèces conjugués adaptés pour chaque espèce. Les IgG sont décelables 2 semaines post-infection et y persistent pendant plusieurs années. Cette technique est largement répandue pour la détermination du statut immunitaire dans le sérum chez les animaux suspects ou asymptomatiques, pour des fins épidémiologiques (Gaibani et al., 2012). Cependant, le manque de spécificité de cette approche due aux nombreuses réactions croisées signalées rend la confirmation des résultats en associant ce test à la technique de référence sérologique obligatoire. Les valeurs relatives

rapportées de spécificité et de sensibilité des techniques ELISA disponibles sur le marché, sont aussi élevées (**Niedrig et al., 2007**).

## **5.8 Réaction d'agglutination :**

Les réactions d'agglutination sont des tests simples qui peuvent donner des résultats immédiats. Quand ils sont utilisés pour détecter les anticorps antibactériens, une suspension de bactéries est directement mélangée au sérum à tester. Si des anticorps spécifiques sont présents à des quantités suffisantes, les anticorps réticulent la bactérie provoquant la formation de touffes visibles (agglutinines). Pour faciliter la visualisation des bactéries agglutinées, les bactéries peuvent être colorées avant de les utiliser dans ce test (**Ritchie et al., 1992**).

Les tests d'agglutination peuvent également être adaptés pour détecter les anticorps contre certains virus et antigènes solubles. Dans ces tests, un exemple de ce qui est le test d'agglutination au latex (LA) (**Grims et Arizmendi., 1990**). L'antigène est d'abord incubé avec des perles visibles à l'œil nu. Les billes recouvertes d'antigène sont ensuite incubées avec des sérums de différentes concentrations. Si les perles s'agglutinent, alors l'échantillon de sérum est positif.

Le sérum négatif ne provoque pas de réaction d'agglutination. Ces dosages sont à la fois spécifiques et sensibles.

## 5.9 Tests sérologiques de référence de certaines maladies bactériennes aviaires

**Tableau 5 :** Tests sérologiques de références de certaines maladies bactériennes selon l'OIE ;

RWBA : Rapide Wall Blood Agglutination, RSA : Rapide Séroagglutination, IPI :

Immunoperoxydase indirecte, IC : Inhibition de la croissance.

Maladie	Tests sérologiques
<b>Mycobactériose</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ELISA</li> <li>• Fixation du complément</li> </ul> <p>Avec une confirmation par une PCR ou un isolement directe dans les fèces</p>
<b>Pullorose aviaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RWBA</li> <li>• RSA</li> <li>• Microagglutination test (MAT)</li> <li>• ELISA avec l'antigène polysaccharidique (la plus sensible) <b>(USDA, 1996)</b></li> </ul>
<b>Chlamydieuse</b> <b>« Psittacose »</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fixation du complément detecte les Ig G</li> <li>• ELISA (plus sensible et plus spécifique détectant les Ig M, les Ig G et les Ig A. <b>(Grimes &amp; Arizmendi, 1996)</b>)</li> </ul>
<b>Mycoplasmoses</b> à <i>Mycoplasma gallisepticum</i> et <i>Mycoplasma synoviae</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IFI <b>(Rosendal et Black, 1972)</b></li> <li>• IPI <b>(Kotani et McGarrity, 1985)</b></li> <li>• IC <b>(Clyde, 1983)</b></li> </ul>

## 5.10 Tests sérologiques de référence de certaines maladies virales aviaires

**Tableau 6** : Tests sérologiques de références de certaines maladies virales selon l’OIE, (AGID ; Agar Gel Immunodiffusion assay)

Maladies	Tests sérologiques
Bronchite infectieuse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ELISA indirecte</li> <li>• Inhibition de l’hémmagglutination (<b>Alexander et al., 1983</b>)</li> </ul>
Maladies de Gumboro	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AGID (<b>Cullen et Wyeth, 1975</b>)</li> <li>• ELISA indirect</li> <li>• Neutralisation du virus (<b>Marquardt et al., 1980</b>)</li> </ul>
Influenza A hautement pathogène chez les oiseaux autres que la volaille	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition de l’hémmagglutination (<b>Capua et al., 2003</b>)</li> </ul>
Laryngotrachéite infectieuse	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ELISA</li> <li>• Neutralisation du virus</li> </ul>

### 5.11 Epreuve d'immunoperoxydase indirecte :

Cette épreuve est basée sur un principe similaire à celui de l'IFD à ceci près que la fixation des anticorps spécifiques aux colonies in situ est détectée en ajoutant un conjugué anti-immunoglobulines de lapin marqué par l'enzyme peroxydase. Une réaction positive se développe ensuite lorsqu'on ajoute un substrat approprié, qui une fois oxydé, produit des colonies colorées. Une épreuve d'immuno-empreinte (ou Immunobinding) peut également être utilisée et consiste à appliquer les colonies à identifier sur un filtre de nitrocellulose (**Kleven and al., 1972**) qui est ensuite traité de manière similaire. Comme pour le test d'IFI, un sérum polyclonal doit être utilisé pour sérotyper les isolats par IP. L'avantage de l'épreuve d'IP par rapport à l'épreuve d'IFI est que l'épreuve d'IP ne nécessite pas un coûteux microscope à fluorescence.

### 5.12 Epreuve d'inhibition de la croissance

Dans l'épreuve d'IC, la croissance des mycoplasmes est inhibée par un antisérum spécifique, ce qui permet l'identification de l'espèce. Cette épreuve est relativement peu sensible et les sérums doivent être de titre élevé, monospécifiques, et préparés sur mammifères car les sérums de volailles n'inhibent pas toujours suffisamment la croissance des mycoplasmes. Le micro-organisme à tester doit être en culture pure (cloné), et plusieurs dilutions doivent être testées ; une concentration de 10<sup>4</sup> unités formant colonies (UFC/ml) est optimale. La vitesse de croissance du micro-organisme peut influencer l'inhibition de croissance et il est judicieux de retarder la croissance au départ en incubant à 27 °C pendant 24 h, puis de poursuivre ensuite l'incubation à 37 °C (**Razin and al., 1983**).

## Conclusion

Le souhait du praticien est qu'un test de diagnostic sérologique détecte tous les animaux infectés et les différencier des non infectés, qu'il ne soit pas cher et qu'il soit rapide et fiable.

Plusieurs facteurs qui prêtent confusion ; le temps que prend l'immunité pour s'installer, l'impossibilité de détecter certains anticorps de certaines espèces d'oiseaux, la capacité d'un test à détecter les IgM, les IgG ou les deux, la persistance de l'immunité malgré la disparition de l'infection, et la possibilité qu'un sujet infecté ne s'immunise guère ou qu'il présente une immunité insuffisante au-dessous du seuil de détectabilité et la non différenciation entre un sujet infecté et un sujet vacciné, mais cela ne veut pas dire que le diagnostic sérologique n'est pas fiable, au contraire, des fois c'est un diagnostic extrêmement valable, il nous rend des services lorsque aucun diagnostic ne pourra détecter l'étiologie, néanmoins, nul test sérologique qu'il soit ou non, ne doit absolument être interpréter sans les données épidémiocliniques et lésionnelles.

## Références bibliographiques

- AFSSA, 2008. Rapport sur l'influenza aviaire hautement pathogène à virus H5N1 d'origine asiatique. In, City, p. 164.
- 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., Wilding, G.P. (1983). A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Vet. Rec.*, 113, 64.
- Bachir-Pacha, M., Abdul-Hussain, A.S., Triki-Yamani, R.R., 2014. Manuel des pathologies aviaires.
- Bachra, C., Kaïss, L., 2012. Thymus et allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. *Hématologie* 18, 272-282.
- Bernard, M., 2011. Analyse de la réponse sérologique de canards (*Anas platyrhynchos*) infectés expérimentalement par des virus influenza H7N1 faiblement pathogènes: comparaison de trois méthodes d'analyses sérologiques. In, City.
- Brugère-Picoux, J., Vaillancourt, J.-P., 1989. Manuel de pathologie aviaire. In, City.
- Capua, I., Terregino C., Cattoli G., Mutinelli F., Rodriguez J.F., 2003. Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.*, 32, 47–55.
- Creative diagnostics ,<https://www.creative-diagnostics.com/The-Basis-of-Western-Blot.htm>
- Cross, G., 2002. Hemagglutination inhibition assays. In: *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, pp. 15-18.
- Clyde, W.A., JR, 1983. Growth inhibition tests. In: *Methods in Mycoplasmaology*, Vol. 1, Razin S. & Tully J.G., eds. Academic Press, New York, USA, and London, UK, 405–410.
- Cullen, G.A., Wyeth, P.J., 1975. Quantitation of antibodies to infectious bursal disease. *Vet. Rec.*, 97, 315.
- Dauphin, G., Zientara, S., 2007. West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine* 25, 5563-5576.
- Endo-Munoz, L.B., 1990. A western blot to detect antibody to avian reovirus. *Avian Pathology* 19, 477-487.

- Gaibani, P., Pierro, A., Alicino, R., Rossini, G., Cavrini, F., Landini, M.P., Sambri, V., 2012. Detection of Usutu-virus-specific IgG in blood donors from northern Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12, 431-433.
- Grimes, J., Arizmendi, F., 1990. Serology, culture and antigen capture in the diagnosis of chlamydial infection in psittacine birds. In: *Proc. Annu. Conf. Assoc. Avian Vet*, pp. 2-278.
- Grimes, J.E., Arizmendi, F., 1996. Usefulness and limitations of three serologic methods for diagnosing or excluding chlamydiosis in birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 209, 747–750.
- Hobson-Peters, J., 2012. Approaches for the development of rapid serological assays for surveillance and diagnosis of infections caused by zoonotic flaviviruses of the Japanese encephalitis virus serocomplex. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012.
- Kotani, H., McGarrity, G.J., 1985. Rapid and simple identification of Mycoplasmas by immunobinding. *J. Immunol. Methods*, 85, 257–267.
- Ide, P., 1982. Avian reovirus antibody assay by indirect immunofluorescence using plastic microculture plates. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 46, 39.
- Jacobson, R., 1998. Validation des épreuves sérologiques pour le diagnostic des maladies infectieuses. *Rev. Sci. Tech. Epiz* 17, 487-506.
- Jean, L., 2014. VÉRIFICATION ET VALIDATION DES MÉTHODES ANALYTIQUES, 14.
- Kamps, B.S., Hoffmann, C., Preiser, W., 2006. Influenza Report 2006. In, *City*, p. 225.
- Kleven, S.H., King, D.D., Anderson, D.P., 1972. Airsacculitis in broilers from Mycoplasma synoviae: effect on air-sac lesions of vaccinating with infectious bronchitis and Newcastle virus. *Avian diseases*, 915-924.
- Li, M., Shi, Z., Fang, C., Gao, A., Li, C.M., Yu, L., 2016. Versatile microfluidic complement fixation test for disease biomarker detection. *Analytica Chimica Acta* 916, 67-76.
- Long, M.T., Jeter, W., Hernandez, J., Sellon, D.C., Gosche, D., Gillis, K., Bille, E., Gibbs, E.P., 2006. Diagnostic performance of the equine IgM capture ELISA for serodiagnosis of West Nile virus infection. *Journal of veterinary internal medicine* 20, 608-613.
- Marie-Dominique, B., 14 octobre 2010 Validation des méthodes d'analyse, 40.
- Marquardt, W.W., Johnson, R.B., Odenwald, W.F., Schlotthober, B.A., 1980. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 24, 375–385.
- Meyer C, ed. sc., 2021, Dictionnaire des Sciences Animales. [On line]. Montpellier, France, Cirad. [29/06/2021]. <URL : <http://dico-sciences-animales.cirad.fr/> >



- Molecular devices, <https://fr.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa#gref>
- Niedrig, M., Mantke, O.D., Altmann, D., Zeller, H., 2007. First international diagnostic accuracy study for the serological detection of West Nile virus infection. *BMC Infectious Diseases* 7, 1-5.
- Organization, W.H., 2011. WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. World Health Organization 252.
- Palmer, D., Dowdle, W., Coleman, M., Schild, G., 1975. Haemagglutination inhibition test. *Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis: procedural guide* 25.
- Phalen, D.N., 2001. The use of serologic assays in avian medicine. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 10, 77-89.
- Razin, S., Tully, J.G., 1983. *Methods in mycoplasmaology*, Vol. 1. Academic Press New York.
- Rice, C.E., 1947. Avian Complement-Fixation Tests. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science* 11, 236.
- Ritchie, B., Niagro, F., Latimer, K., Steffens, W., Pesti, D., Campagnoli, R., Lukert, P., 1992. Antibody response to and maternal immunity from an experimental psittacine beak and feather disease vaccine. *American Journal of Veterinary Research* 53, 1512-1518.
- Rosendal, S., Black, F.T., 1972. Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B]*, 80, 615–622.
- Spackman, E., Suarez, D.L., Senne, D.A., 2008. Avian influenza diagnostics and surveillance methods. *Avian influenza* 1.
- Suarez, D., Schultz-Cherry, S., 2000. Immunology of avian influenza virus: a review. *Developmental & Comparative Immunology* 24, 269-283.
- Venne, D., Bouzouaia, M., Brugère-Picoux, J., 1989. Manuel de pathologie aviaire. In: Brugère-Picoux, J., Vaillancourt, J.-P. (Eds.), City.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA), 1996. Auxiliary Provisions on National Poultry Improvement Plan. Code of Federal Regulations, Title 9, Part 147, 717–727.

