

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Situation géographique des zones ciblées, dans le cadre de la surveillance de la grippe aviaire au Sénégal.

Figure 2 : Carte mondiale des pays touchés par le virus H5N1 (3 février 2007)

Figure 3: Structure et organisation d'une particule d'influenzavirus de type A.

Figure 4 : Influenzavirus de type A au microscope électronique.

Figure 5 : Hémorragies du gésier chez le poulet.

Figure 6 : hémorragie au niveau des pattes.

Figure 7 : œdème sous-cutané de la tête, du cou et de la caroncule.

Figure 8 : aérosacculites caséuses chez la dinde.

Figure 9 : trachéites caséuses chez la dinde.

Figure 10 : Choix des gènes utilisés pour la RT-PCR.

Figure 11 : Evolution de la température et des différents types de brins d'ADN au cours des 4 premiers cycles de la PCR.

Figure 12 : Photographie du gel, après électrophorèse des produits de la PCR.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif des cas humains de grippe A (H5N1) confirmés biologiquement et notifiés à l'OMS.

Tableau 2 : Situation de l'IAHP en Afrique au mois de Mars 2007.

Tableau 3 : Aperçu schématique des étapes de diagnostiques conduisant à la confirmation de l'IA.

Tableau 4 : Equipements utilisés pour l'extraction de l'ARN viral.

Tableau 5 : volumes des différents réactifs utilisés dans la PCR.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

AGID : Agar Gelose Immunodiffusion

β-ME : β-mercaptopropanoïlique

CONAGA : Comité National de lutte contre la Grippe Aviaire au Sénégal

dNTPs : déoxynucléotides Triphosphates (acides nucléiques)

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EOPS : Exempts d'organismes Pathogènes Spécifiés

H ou HA : Hémagglutinine

IHA : Test d'inhibition de l'hémagglutinine A

IAHP : Influenza Aviaire Hautement Pathogène

IAFP : Influenza Aviaire Faiblement Pathogène

IPIV : Indice de Pathogénicité Intra Veineuse

IA : Influenza Aviaire

ISRA : Institut Sénégalais de Recherche Agricole

IZS : Istituto Zooprofilattico Sperimentale : laboratoire de référence internationale pour la grippe aviaire

LCR : liquide céphalo-rachidien

LNERV : Laboratoire National d'Elevage et de Recherche Vétérinaire

M (M1 et M2) : Protéine de matrice,

N ou NA : Neuraminidase

NP : Nucléoprotéine.

NS1 (NS1 et NS2) : Protéine Non Structurale.

OIE : Organisation International des Epizootie

PIB : produit intérieur brute

PB (PB1 et PB2) Polymerase Binding Protein (sous unité de la polymérase).

PCR : Polymerase Chain Reaction

RT-PCR : Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction

Rpm : round Per Minute : Tpm

Rnasin : RNase inhibitor (inhibiteur d'RNase)

TAE: Tris-acéteate d'EDTA

Tpm : Tour par minute

UV : Ultra violet

vRNA : ARN viral.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	4
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	6
I - LA GRIPPE AVIAIRE : ETAT DES CONNAISSANCES	7
1.1. DEFINITION	7
1.2. HISTORIQUE	7
1.3. ETIOLOGIE	11
1.3.1. CLASSIFICATION DE L'AGENT CAUSAL DE LA GRIPPE AVIAIRE	11
1.3.2. STRUCTURE ET ORGANISATION DES INFLUENZAVIRUS DE TYPE A	12
1.3.3. VIRULENCE DE L'AGENT ETIOLOGIQUE.	14
1.3.4. RESISTANCE DU VIRUS AUX AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES	14
1.4. EPIDEMIOLOGIE	15
1.4.1. LES HOTES	15
1.4.2. LA TRANSMISSION	16
1.4.3. SOURCE DU VIRUS	16
1.5. PREVENTION - TRAITEMENT	17
1.5.1. PROPHYLAXIE SANITAIRE	17
1.5.2. PROPHYLAXIE MEDICALE	18
1.5.3. TRAITEMENT	18
1.6. DIAGNOSTIC DE LA MALADIE	18
1.6.1. SIGNES CLINIQUES DE LA MALADIE	18
1.6.2. LES LESIONS	19
II - DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE DE LA MALADIE	23
2.1. AUTOPSIE	23
	10

2.1.1. TECHNIQUE D'AUTOPSIE	23
2.1.2. MODE OPERATOIRE	24
2.2. PRELEVEMENT	25
2.2.1. DISPOSITION GENERAL	25
2.2.2. TECHNIQUES DE PRELEVEMENT	26
2.2.2.1. CHEZ LES OISEAUX	26
2.2.2.2. CHEZ L'HOMME	27
2.3. TRANSPORT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS	28
2.4. LES METHODES D' ANALYSE AU LABORATOIRE	28
2.4.1. LA SEROLOGIE	31
2.4.1.1. LE TEST AGID	31
2.4.1.2. ELISA	31
2.4.2. LA VIROLOGIE	32
2.4.3. LA TECHNIQUE PCR	33
2.4.3.1. LA METHODE PCR STANDARD	34
2.4.3.1.1. PRINCIPE	34
2.4.3.1.2. LES DIFFERENTES ETAPES DE LA PCR	35
2.4.3.2. LA RT-PCR : UNE VARIANTE DE LA PCR STANDARD	39
DEUXIEME PARTIE : APPLICATION DE LA RT-PCR AU DIAGNOSTIC DE LA GRIPPE AVIAIRE A PARTIR D' ECHANTILLONS ANIMAUX SUSPECTS	40
INTRODUCTION	41
I. MATERIELS ET METHODES	42
1.1. EXTRACTION	42
1.1.1. MATERIELS	42
1.1.2. METHODE	44

1.2. REALISATION DE LA RT-PCR	46
1.2.1. SYNTHESE DE L'ADNc	46
1.2.1.1. MATERIELS	46
1.2.1.2. METHODE	46
1.2.2. AMPLIFICATION DES cDNA :	48
1.2.2.1. MATERIELS	48
1.2.2.2. MODE OPERATOIRE	49
1.2.3. IDENTIFICATION DES AMPLICONS PAR ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE	51
II RESULTATS	53
III. DISCUSSIONS	54
3.1. EXTRACTION	54
3.2. RT-PCR	54
CONCLUSION- PERSPECTIVES	55
BIBLIOGRAPHIE	56

INTRODUCTION GENERALE

Au Sénégal, le sous-secteur de l'élevage occupe une place importante dans l'économie nationale avec 35 % de la valeur ajoutée du secteur agricole et 7,5 % dans la formation du PIB national. L'élevage composé d'une grande variété d'espèces animales connaît un taux de croissance d'environ 6 % par an.

Au sein de l'élevage, l'aviculture (surtout moderne) constitue une activité porteuse de croissance.

Sa contribution socio-économique en milieu rural, n'est plus à démontrer. De plus, elle joue un rôle extrêmement important, par son apport en protéine (viande, œuf) dans la lutte contre les malnutritions⁹.

Le système d'élevage avicole dit moderne, emploie de façon directe plus de dix mille personnes, et procure à l'économie nationale un chiffre d'affaire annuel de près de quarante milliards de francs. Le secteur avicole rural, avec un effectif estimé à près de 1,5 milliard de sujets constitue sans doute l'activité agricole la mieux répartie dans le pays¹¹.

De ce fait, pour nourrir correctement la population qui croît rapidement et faire contribuer largement l'aviculture à la production de richesse, il faut enrayer toutes les contraintes à son développement. Au nombre des contraintes, il convient de citer les problèmes liés à l'alimentation et les maladies.

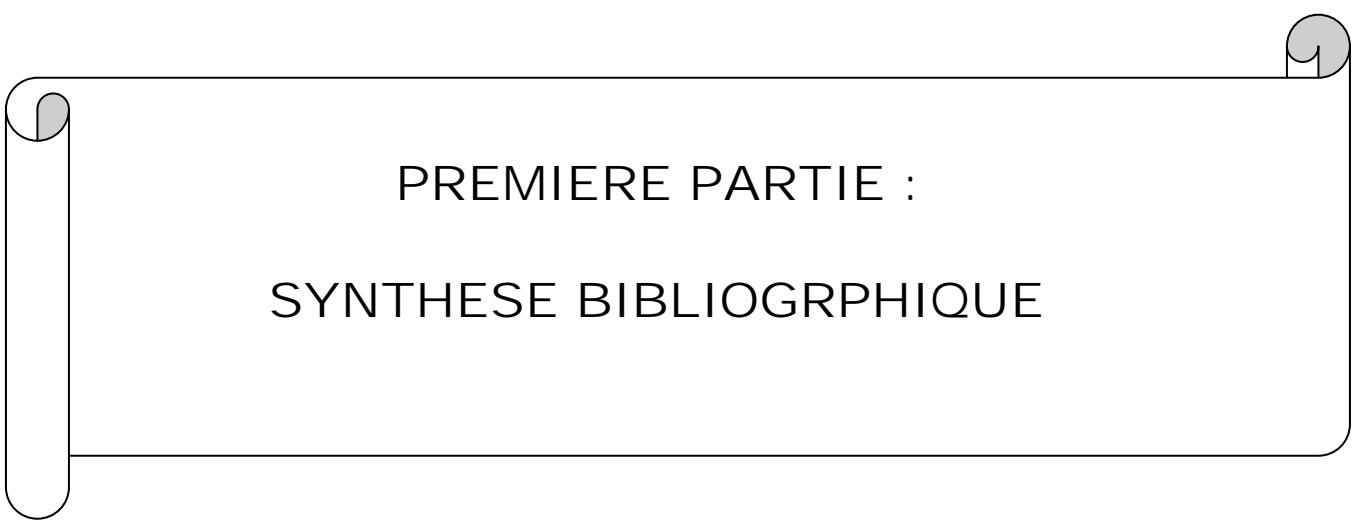
En effet, les maladies aviaires sont une contrainte majeure, surtout dans des zones écologiquement chaudes et humides. En particulier la grippe aviaire, qui constitue une préoccupation mondiale de nos jours, est un frein et une menace majeurs pour le développement d'une filière aussi dynamique et prometteuse.

Les conséquences socio-économiques d'une panzootie et d'une pandémie grippales seraient considérables. C'est pourquoi, tous les acteurs de la filière avicole se sont mobilisés pour protéger le Sénégal de ce fléau ou à défaut, maîtriser son impact et réduire ses conséquences.

A cet effet, les efforts sont concentrés sur les programmes de contrôle et de prévention des foyers de la maladie. En pratique, il s'agit d'abord d'identifier et de caractériser les principaux types biologiques de ce pathogène, car du degré de précision du diagnostic et de la caractérisation précoce du pathogène responsable, dépendra l'efficacité des moyens de luttes engagés.

Les techniques d'identification et de caractérisation des agents pathogènes ont beaucoup évolué au cours des dernières décennies. Cette évolution découle de l'amélioration des connaissances des gènes des micro-organismes notamment leurs structures, leurs organisations et leurs fonctionnements. Parmi ces techniques, on peut citer par exemple les anticorps monoclonaux et la PCR.

Dans ce présent travail, il sera proposé dans un premier temps, un rappel des connaissances acquises sur la grippe aviaire dans le cadre d'une synthèse bibliographique. Nous rapporterons ensuite, dans une deuxième partie, les résultats de notre contribution au diagnostic courant de la grippe aviaire au laboratoire, entrepris au Sénégal dans le cadre de la surveillance passive de cette maladie. Ceci à l'aide de la technique bio-moléculaire : la RT-PCR. Nous proposerons après les conclusions et des perspectives de recherche.



PREMIERE PARTIE :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I - LA GRIPPE AVIAIRE : ETAT DES CONNAISSANCES

1.1. DEFINITION

L'influenza aviaire (IA) communément appelé grippe aviaire, est une affection virale cosmopolite à tropisme respiratoire, entérique ou nerveux; atteignant les oiseaux domestiques et sauvages. Elle est due à des virus grippaux de type A hautement pathogène.

Elle sévit sous différentes formes, avec des symptômes très variés. La forme la plus grave se manifeste par une maladie aiguë et généralisée, causant une très forte mortalité chez les oiseaux. Cette mortalité peut aller jusqu'à 100%. Cette forme grave est appelée « peste aviaire » en raison d'une mortalité élevée rappelant les pestes humaines⁵⁰.

C'est une zoonose virale et une zoo-anthroponose, car elle affecte aussi bien les animaux que les hommes et est transmissible de l'animal à l'homme. On parle d'épidémie (épidémie chez l'homme) de grippe aviaire, lorsque la maladie touche brutalement un grand nombre d'animaux à la fois dans une région donnée. On parle de pandémie (pandémie chez l'homme), lorsque la maladie se propage un peu partout dans le monde.

1.2. HISTORIQUE

Swayne et Halvorson³⁵ écrivent dans la 11^e édition de 'Diseases of Poultry', que la peste aviaire a été observée et décrite pour la première fois, comme une maladie grave de la volaille par Perroncito en Italie, en 1878. L'origine virale de la peste aviaire a été découverte en 1901 par Centanni et Savunozzi⁴, mais ce n'est qu'en 1955 que les agents ont été caractérisés et identifiés comme étant des virus influenza de type A⁸.

La distribution des virus de l'IA est clairement liée à celle des oiseaux domestiques et sauvages, à l'emplacement des installations d'élevage, aux parcours migratoires des oiseaux, et aux saisons.

Partout dans le monde, il n'est pas rare qu'on trouve des virus de l'influenza aviaire chez des oiseaux aquatiques migrateurs, des oiseaux de rivage et des oiseaux marins apparemment en bonne santé³¹.

L'incidence épidémiologique de ce phénomène, en rapport avec les flambées survenant chez la volaille domestique, semblerait indiquer que les oiseaux aquatiques et certains autres oiseaux migrateurs sont un réservoir d'IA et contribue ainsi à la dissémination de la maladie⁴⁰.

Ce qui signifie que le Sénégal n'est pas à l'abri d'une contamination, car le pays abrite d'importants parcs et réserves où les oiseaux migrateurs provenant de zones à risques séjournent saisonnièrement. Ces parcs qui peuvent être des portes d'entrée de la maladie au Sénégal sont : le parc de Djoudj et le parc de la langue de Barbarie (dans la région de St-Louis), la réserve de Guembel, la dépression du Ngaél, la réserve d'avifaune de Maka Diama (dans la région de Saint Louis également), le Ferlo, la réserve de biosphère du delta du fleuve Saloum (dans la région de Fatick), la lagune de Somone (dans le département de Mbour), le parc zoologique de Hann et le parc des îles de la Madeleine (à Dakar) et le parc de la Basse Casamance, la réserve de Kalisaye (à Ziguinchor).

Rappelons que le Comité National de Prévention et de Lutte contre la Grippe Aviaire (CONAGA), entre autres mesures, a en charge la surveillance épidémiologique permanente de ces zones.



Figure 1 : Situation géographique des zones ciblées, dans le cadre de la surveillance de la grippe aviaire au Sénégal.

Une infection directe de l'homme par le virus de la grippe aviaire de type A (H5N1), a été constatée pour la première fois au cours de la flambée qui a sévi en 1997 à Hong Kong en Chine. Depuis 2003, la propagation de la grippe aviaire s'est faite de manière inexorable, avec des conséquences humaines et économiques souvent catastrophiques : plus de 19 pays touchés et plus de 150 millions de poulets et de canards tués ou abattus.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des cas humains de grippe A (H5N1) confirmés biologiquement et notifiés à l'OMS ⁴⁶

Pays	2003		2004		2005		2006		2007		Totaux au 31 octobre 2007		
	cas	décès	cas	décès									
Azerbaïdjan							8	5			8	5	62,5%
Cambodge				4	4	2	2	1	1	7	7	100,0 %	
Chine	1	1		8	5	13	8	3	2	25	16	64,0%	
Djibouti						1	0			1	0	0,0%	
Égypte						18	10	20	5	38	15	39,5%	
Indonésie			19	12	56	46	36	31	111	89		80,2%	
Irak					3	2			3	2		66,7%	
Laos							2	2	2	2		100,0%	
Nigeria							1	1	1	1		100,0%	
Thaïlande		17	12	5	2	3	3			25	17	68,0%	

Turquie						12	4			12	4	33,3%	
Viêt Nam	3	3	29	20	61	19			7	4	100	46	46,0%
Total	4	4	46	32	97	42	116	80	70	46	333	204	61,3%



→ Pays dont la volaille ou les oiseaux ont été atteints.

→ Pays dont la population humaine a été atteinte.

Figure 2 : Carte mondiale des pays touchés par le virus H5N1 (3 février 2007)⁷⁰

En ce qui concerne l’Afrique, le premier foyer de grippe aviaire hautement pathogène H5N1 a été confirmé le 6 février 2006 dans l’Etat de Kaduna, au nord du Nigeria. Par la suite, la maladie a été confirmée dans 7 pays en l’espace de 3 mois : Burkina Faso, Cameroun, Côte d’Ivoire, Djibouti, Egypte, Niger, Soudan.

Tableau 2 : Situation de l'IAHP en Afrique au mois de Mars 2007¹⁸

Pays	Date du 1 ^{er} Foyer	Date du dernier Foyer	Volaille (V) /Avifaune (S)	Cas humain / Décès humain
Burkina Faso	1 Mars 06	20 Mai 06	V+S	0/0
Cameroun	21 Février 06	28 Mars 06	V+S	0/0
Côte d'Ivoire	30 Mars 06	9 Nov. 06	V+S	0/0
Djibouti	6 Avril 06	6 Avril 06	V	1/0
Egypte	17 Février 06	15 mars 07	V+S	24/13
Niger	6 Février 06	1 Juin 06	V	0/0
Nigeria	16 Janvier 06	Février 07	V+S	1/1
Soudan	25 Mars 06	4 Août 06	V	0/0

1.3. ETIOLOGIE

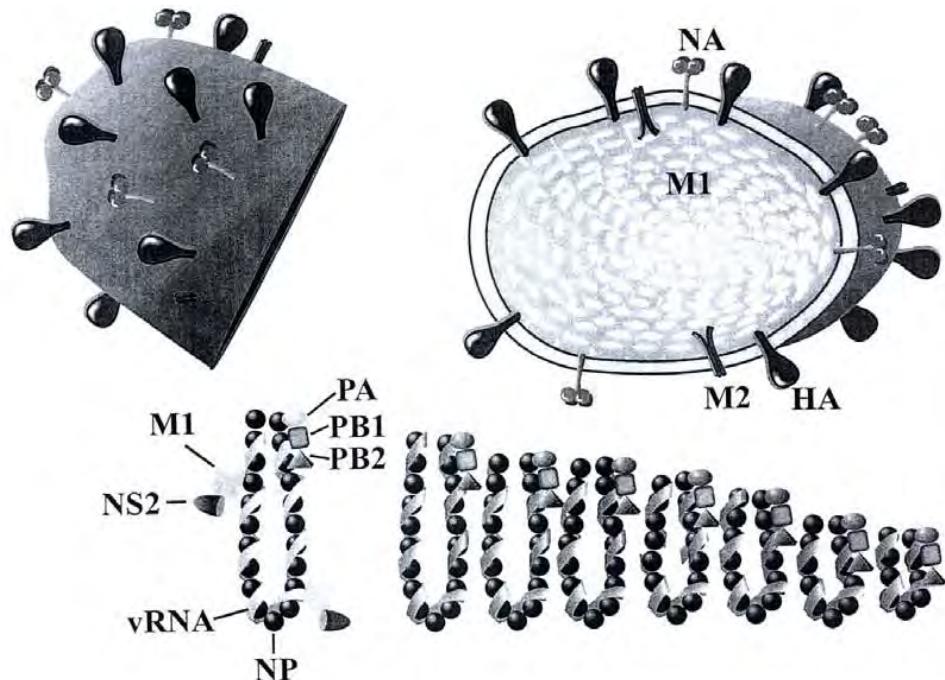
1.3.1. CLASSIFICATION DE L'AGENT CAUSAL DE LA GRIPPE AVIAIRE

L'agent causal appartient au règne des virus. Ce sont des virus à ARN simple brin et à polarité négative. Il fait parti des virus,

- de la famille des *Orthomyxoviridae*,

- au genre Influenzavirus de type A. Ce taxon est subdivisé en sous-types de H1 à H16, dont les plus pathogènes sont H5, H7 et H9. Rappelons dans la famille des *Orthomyxoviridae*, on trouve les genres Influenzavirus de types B et C.

1.3.2. STRUCTURE ET ORGANISATION DES INFLUENZAVIRUS DE TYPE A



PB2 : Sous unité de la polymérase. **PB1** : Sous unité catalytique de la polymérase. **PA** : Sous unité de la polymérase : active pour la synthèse de l'ARN viral. **HA** : Hémagglutinine: attachement au récepteur cellulaire et fusion membranaire. **NP** : Nucléocapside. **NA** : Neuraminidase : hydrolyse du récepteur lors du bourgeonnement de la particule virale. **M1** : Protéine de matrice. **M2** : Canal à ions. **NS1** et **NS2** : sont des protéines non structurales.

Figure 3 : Structure et organisation d'une particule d'influenzavirus de type A²².

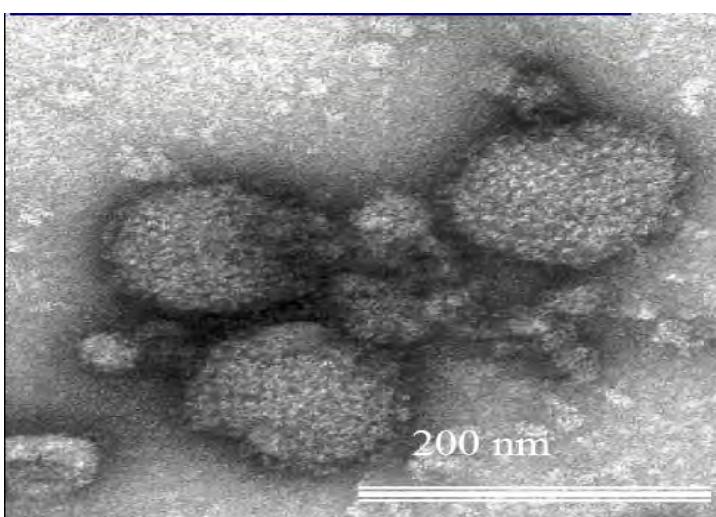


Figure 4 : Influenzavirus de type A au microscope électronique.

Les virus influenza A ont une forme sphérique ou filamenteuse, leur diamètre variant de 80 à 120 nm. Les particules virales sont constituées d'une matrice protéique, qui entoure huit nucléocapsides de symétrie hélicoïdale, constituées de l'association dans la particule virale des huit segments génomiques, chacun entouré par la nucléoprotéine virale notée NP (Figure 3).

On distingue, au sein de la particule virale des protéines M1 et M2. Les M1 sont des protéines de matrice : on parle également de gène M1 par extension au gène codant ces protéines. Les M2 sont des protéines constituant les canaux ioniques : on parle comme précédemment de gènes M2 par extension aux gènes de ces protéines.

L'extérieur de la matrice protéique est enveloppé par une membrane lipidique, dont la surface externe est couverte de deux types d'antigènes constituées, l'un d'une glycoprotéine virale dotée d'une activité hémagglutinante et d'une activité de fusion (ou hémagglutinine, notée HA ou H), l'autre d'une glycoprotéine virale dotée d'une activité neuraminidase (ou neuraminidase, notée NA ou N)¹⁹.

L'hémagglutinine (HA) est une glycoprotéine antigénique présente à la surface du virus de la grippe, et est responsable de la fixation de la particule virale à un récepteur situé sur la cellule cible. Le nom hémagglutinine provient donc de la faculté de la protéine à agglomérer les érythrocytes.

La neuraminidase est une classe d'enzymes de type glycoprotéine. C'est un antigène trouvé sur la surface des virus de l'influenza A. Elle fait partie de la famille des glycosilases et de la sous-famille des glycosidases qui comprend aussi les amylases (enzymes humaines digestives décomposant les longues chaînes glycosées comme l'amidon).

Ce sont ces antigènes qui sont utilisés pour la classification des différents sous-types. Seize sous-types de HA (H1 à H16) et neuf sous-types de NA (N1 à N9) ont été identifiés. Ces antigènes peuvent avoir toutes les combinaisons possibles. Ainsi, 16 hémagglutinines multipliées par 9 neuraminidases donnent 144 combinaisons possibles³⁵. Ce qui témoigne de l'extrême variabilité antigénique, qui caractérise les Influenzavirus de type A.

Pour exemple, l'appellation H5N1 fait référence à deux sous-types d'antigènes présents à la surface du virus, l'hémagglutinine (HA) de type 5 et la neuraminidase (NA) de type 1.

1.3.3. VIRULENCE DE L'AGENT ETIOLOGIQUE.

La virulence est l'aptitude d'un agent infectieux à se multiplier dans un organisme vivant et à y entraîner des manifestations morbides. Elle traduit le pouvoir invasif de l'agent pathogène. Il existe une grande variabilité dans la virulence des virus Influenza de type A. Leur degré de pathogénicité dépend de la souche virale et de l'espèce aviaire en jeu.

La virulence des Influenzavirus A, est déterminée à l'aide du test de l'indice de pathogénicité intraveineuse (IPIV). L'indice de pathogénicité est obtenu par inoculation par la voie intraveineuse, à des poussins âgés de 4 à 8 semaines, d'une solution physiologique stérile de liquide allantoïdien frais, infecté par le virus à étudier.

Selon le degré de la rapidité de l'évolution vers la mort de ces poussins, un index de pathogénicité est calculé. Le virus est hautement pathogène (IAHP) si cet index est supérieur ou égal à 1,2. S'il est inférieur à cette valeur, le virus est dit faiblement pathogène (IAFP).

Toutes les flambées d'influenza aviaire signalées depuis 1955 étaient causées par des virus de sous-type H5 ou H7³⁴. Cependant toutes les souches des sous-types H5 et H7 ne sont pas hautement pathogènes, mais la plupart peuvent potentiellement le devenir : du fait que les virus grippaux sont génomiquement très instables.

Ce risque a poussé l'Organisation mondiale de la santé animale (l'Office internationale des épizooties (OIE)), à redéfinir ses exigences en matière de rapportage de cas d'influenza aviaire. L'expression « influenza aviaire notifiable (IAN) » englobe maintenant tous les virus de l'influenza de type A et de sous-type H5 ou H7, qu'ils soient faiblement ou hautement pathogènes.

1.3.4. RESISTANCE DU VIRUS AUX AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

- DANS L'ENVIRONNEMENT

- Température : Le virus est naturellement adapté au froid : il peut en effet, vivre longtemps dans un milieu froid et humide comme le lisier. Ce qui explique pour partie la prédominance épidémique en saisons d'hiver. Dans les matières fécales, le virus conserve son infectivité durant 30 à 35 jours à 4 °C⁶.

Les virus grippaux sont réputés ne pas résister à la chaleur. Dans les matières fécales, les virus conservent leur infectivité durant 7 jours à 20 °C⁶. Ils sont inactivés à 56 °C en 3 heures ou à 60 °C en 30 minutes et aussi par la sécheresse.

- pH : le virus est inactivé à pH acide.

- Agents chimiques : le virus est inactivé par les agents oxydant, les conditions non isotoniques, les solvants des lipides, la bêtapropriolactone, etc.

- Désinfectants : le virus est inactivé par le formol et les composés iodés, les solutions d'hypochlorite de sodium, le formaldéhyde. Les meilleurs désinfectants sont l'eau savonneuse et les détergents.

- Résistance : le virus résiste pendant de longues périodes dans les tissus, les fèces et l'eau.

- **DANS LES PRODUITS :**

Dans les carcasses de viande : la survie du virus de l'IA est de quelques jours à température ambiante, jusqu'à 23 jours en réfrigération à +4 °C. A une température à cœur de 70 °C, il est détruit. Les emballages peuvent également être contaminés.

- **DANS LES OEUFS :**

Les œufs pondus par les poules infectées pendant la phase précoce de la maladie peuvent comporter du virus dans le blanc, le jaune et la surface de la coquille. Le virus résiste dans l'œuf entier à 60 °C pendant 210 secondes.

1.4. EPIDEMIOLOGIE

1.4.1. LES HOTES

La maladie est surtout décrite chez les poulets et les dindes (à impacts économiques les plus importants), mais aussi chez les pintades, les cailles, les autruches, etc.

Les canards sont généralement porteurs asymptomatiques du virus, de même que les oiseaux sauvages.

Le virus influenza aviaire peut infecter aussi le porc et d'autres mammifères, y compris l'homme.

1.4.2. LA TRANSMISSION

- TRANSMISSION

- Transmission directe : elle nécessite des contacts fréquents et rapprochés. Le virus est transmis par l'intermédiaire des sécrétions respiratoires (gouttelettes de respiration), buccales (écoulements du bec), oculaires (larmoiements des yeux). Les déjections (fientes) d'animaux infectés (morts ou vivants) assurent aussi la transmission directe.

- Transmission indirecte : elle est réalisée à l'occasion de contacts fréquents et rapprochés avec des surfaces contaminées (litière) ou des matières contaminées par l'intermédiaire de la nourriture, l'eau, le matériel ou les mains et vêtements souillés. Les œufs contaminés cassés peuvent infecter les poussins dans les couveuses.

- Voies de contamination chez l'homme : elle se fait par voie oculaire ou nasale essentiellement à l'occasion de contact direct avec les fèces et les sécrétions des oiseaux infectés, ou une contamination indirecte par les aliments, l'eau, le matériel ou les vêtements contaminés. Les voies de pénétration sont digestives et/ou respiratoires.

- PRINCIPAUX RISQUES D'INTRODUCTION DU VIRUS DANS UN ELEVAGE.

Ils sont liés à différents facteurs :

- l'introduction d'oiseaux vivants contaminés,
- l'introduction de matériels ou équipements contaminés (cages, aliments pour animaux),
- l'introduction de personnes avec chaussures ou vêtements souillés (contaminés par des fientes),
- l'entrée de véhicules en provenance de marchés d'oiseaux ou d'autres fermes avicoles,

1.4.3. SOURCE DU VIRUS

Les sources du virus sont principalement :

- les fientes qui peuvent contenir jusqu'à $10x^7$ particules virales infectieuses par gramme,

- les sécrétions oculo-nasales (sur des animaux guéris : le portage du virus peut aller jusqu'à 30 jours après infection),

- les tissus,

- les œufs.

Il est à noter que, les virus hautement pathogènes peuvent résister pendant de longues périodes dans les matières fécales infectées, ainsi que les tissus et l'eau.

1.5. PREVENTION - TRAITEMENT

La prévention de la grippe aviaire repose sur la mise en œuvre d'un plan de prophylaxie, à la fois sanitaire et médicale.

1.5.1. PROPHYLAXIE SANITAIRE

Elle est fondée sur l'observation d'un certain nombre de principes :

- Eviter tout contact entre la volaille domestique et les oiseaux sauvages, notamment les oiseaux aquatiques dans les zones à risque.

- Ne pas introduire dans les élevages des oiseaux dont l'état sanitaire n'est pas connu.

- Surveiller les contacts avec les personnes.

- Procéder à des nettoyages et désinfections corrects.

- Préférer la présence d'une seule classe d'âge dans une exploitation.

En cas de foyer de grippe aviaire :

- Abattage de tous les oiseaux.

- Élimination des carcasses et de tous les produits d'origine animale.

- Nettoyage et désinfection.

- Respect d'un délai de 21 jours avant l'introduction de nouveaux oiseaux.

1.5.2. PROPHYLAXIE MEDICALE

La prophylaxie médicale repose sur la vaccination. Par le passé, il était conseillé de ne pas vacciner, certains individus pouvant être contaminés et disséminer des virus virulents malgré la vaccination.

Des épisodes récents ont amené à utiliser des vaccins inactivés pour combattre rapidement la propagation de la maladie.

1.5.3. TRAITEMENT

Il n'existe pas de traitement efficace contre la maladie.

1.6. DIAGNOSTIC DE LA MALADIE

La période d'incubation est généralement comprise entre 3 et 5 jours, mais peut être plus long et atteindre 21 jours, délai maximal, selon l'OIE.

1.6.1. SIGNES CLINIQUES DE LA MALADIE

- CHEZ LES POULETS ET LES DINDES.

On peut constater les symptômes suivants isolés ou associés :

- Dépression sévère, diminution de l'appétit, anorexie.
- Forte baisse de production d'œufs.
- Signes respiratoires, sinusites.
- Pétéchies des muqueuses internes.
- Écoulements lacrymaux excessifs.
- Œdème facial, crête et caroncule cyanosés et tuméfiés, diarrhée.
- Mort subite (avec ou sans autres symptômes, la mortalité peut atteindre 100%).

Rappelons que l'isolement du virus est indispensable pour confirmer le diagnostic clinique.

- CHEZ LE CANARD.

Chez les canards infectés, les signes cliniques ou lésionnels peuvent être inexistant : ce sont des porteurs asymptomatiques.

- DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL D'AVEC D'AUTRES MALADIES AVIAIRES.

- Newcastle : les signes cliniques de la grippe aviaire ne sont pas différenciables de ceux de la maladie de Newcastle.
- Bronchites infectieuses.
- Choléra aviaire.

Toutefois, lors d'une première apparition de la grippe aviaire hautement pathogène sur un territoire, chez des animaux n'ayant aucune immunité vis-à-vis du virus de l'IA, les formes suraiguës sont les plus fréquentes (mortalité brutale et massive, souvent supérieure à 80%).

- SYMPTOMES CHEZ L'HOMME :

- Incubation de 1 à 2 semaines avant les premiers symptômes.
- Fièvre élevée.
- Maux de tête.
- Douleurs musculaires.
- Fatigue.
- Toux et gène respiratoire.
- Evolution rapidement vers de graves troubles respiratoires.

1.6.2. LES LESIONS

Des lésions sont observées chez les poulet et dinde atteints de grippe aviaire, mais elles peuvent être absentes en cas de mort subite. Les lésions essentielles sont les suivantes :

- péritonite,
- exsudats muqueux importants dans la lumière trachéale ou trachéite hémorragique,
- congestion sévère des muscles,
- déshydratation,
- œdème sous-cutané de la tête, du cou et de la caroncule,

- congestion sévère de la conjonctive parfois avec pétéchies,
- aérosacculite et congestion pulmonaire,
- pétéchies à la surface interne du sternum, sur les séreuses, la graisse abdominale et dans la cavité splanchnique,
- congestion rénale sévère,
- hémorragies et dégénérescence ovarienne,
- hémorragies et érosions de la muqueuse de l'estomac glandulaire et du gésier,
- foyers hémorragiques sur les tissus lymphoïdes de la muqueuse intestinale.

Ci-après, sont proposées quelques illustrations des principales lésions observées chez le poulet et la dinde⁷.



Figure 5 : Hémorragie du gésier chez le poulet.



Figure 6 : hémorragie au niveau des pattes.



Figure 7 : œdème sous-cutané de la tête, du cou et de la caroncule.



Figure 8 : aérosacculites caséeuses chez la dinde.

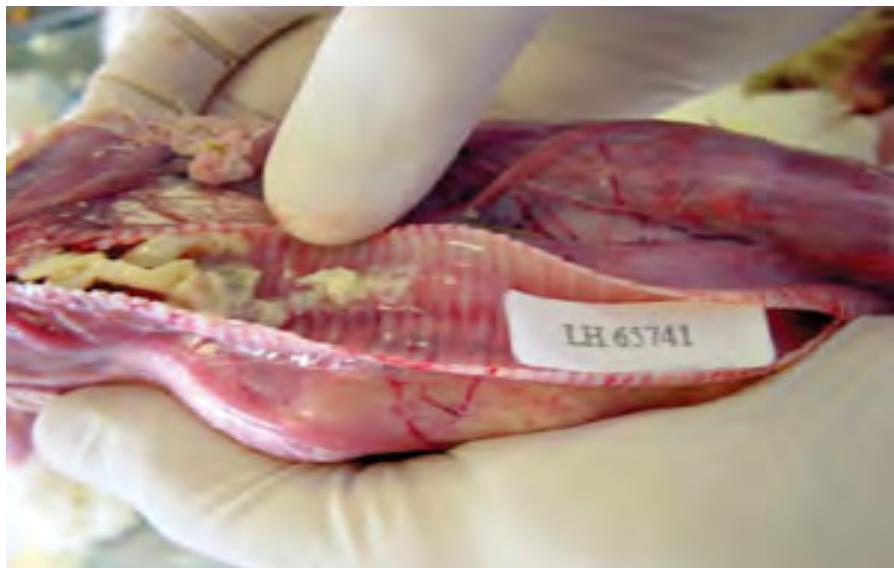


Figure 9 : trachéites caséeuses chez la dinde.

II - DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE DE LA MALADIE

Le diagnostic rapide de l'IAHP ou de l'IAFP causée par les sous-types H5, H7 et H9, revêt une importance capitale pour une lutte rapide contre la maladie et son éradication. De plus la grande variabilité des symptômes et l'existence de lésions non spécifiques rencontrées au cours de cette maladie démontrent surtout les difficultés du diagnostic clinique de cette affection et la nécessité de recourir au laboratoire pour confirmer une suspicion dans les plus brefs délais. L'on évite ainsi de retarder la mise en œuvre des moyens permettant de circonscrire et d'éteindre les foyers de la maladie.

Il est nécessaire de reconnaître d'abord, s'il s'agit d'un virus influenza et de vérifier la virulence de celui-ci (il est important de savoir si on a affaire à une influenza hautement ou faiblement pathogène). Il faut aussi déterminer le sous-type de celui-ci, qu'il soit hautement pathogène ou non. Rappelons que les sous-types H5, H7 et H9 sont potentiellement pathogènes.

Les oiseaux morts de façon suspecte doivent être autopsiés, pour permettre après observation et étude des lésions *in situ*, d'effectuer des prélèvements idoines, sur les tissus et organes lésés ou non, aux fins d'analyses au laboratoire.

2.1. AUTOPSIE

2.1.1. TECHNIQUE D'AUTOPSIE²⁴

- Dispositions générales : il convient d'observer les impératifs suivants.
 - Autopsie immédiate en cas de mort subite ; les sujets à comportement anormal seront sacrifiés et autopsiés.
 - Disposer de local spécialement aménagé, assurant une non dissémination d'éléments pathogènes ou contaminés : local bien séparé des bâtiments d'élevage, de nettoyage et désinfection aisés, disposé à proximité d'espace d'incinération des cadavres, des plumages et des viscères des animaux autopsiés.
 - Les opérateurs doivent prendre toutes les dispositions relatives à leur protection
- Matériel d'autopsie
 - Grand plateau en inox ou en matière plastique pouvant contenir un cadavre d'oiseau, et autres plateaux de même nature.

- Ciseaux, couteaux, bistouris à lames stériles et interchangeables.
- Pinces costotomes et pince à dents de souris.
- Flacons stériles pour recueillir les prélèvements.
- Flacons à col large contenant du liquide de fixation (formol neutralisé à 10 %, liquide de Bouin, etc.).
- Lames et lamelles propres.
- Tubes secs.
- Seringues et aiguilles stériles à usage unique.
- Un grand bac de liquide désinfectant pour recueillir les instruments souillés.
- Tenue d'autopsie et de protection : blouse, tablier lavable, gants en latex, bottes en caoutchouc, calotte, lunette et masque.

2.1.2. MODE OPERATOIRE

- Examen du cadavre avant autopsie.
 - Disposer le cadavre sur le plateau et examiner : orifice cloacal, crête, barbillons, yeux, membres (articulations, doigts, griffes).
 - Maintenir en décubitus dorsal et écarter latéralement les membres postérieurs jusqu'à désarticuler les hanches.
- Ouverture du cadavre et éviscération.
 - Ouvrir le bec et examiner rapidement la cavité buccale.
 - Inciser aux ciseaux la peau, sur le plan médian, longitudinalement de la gorge au cloaque en passant par le bréchet.
 - Récliner latéralement le revêtement cutané, puis le plan musculaire pour mettre à nu les organes thoraco-abdominaux.
 - Isoler et examiner cœur et foie puis sectionner trachée et œsophage pour sortir la masse digestive et disséquer séparément ; isoler la rate, décoller les poumons de la paroi thoracique.

- Fendre l'œsophage sur toute la longueur et recueillir le contenu du j abot à examiner.
 - Ouvrir provencule et gésier, examiner leur muqueuse.
 - Examiner l'appareil génital, spécialement volumineux chez les poules pondeuses, chez laquelle examiner systématiquement ovaires, oviductes.
 - Examiner les reins en place, les surrénales et uretères chez le jeune sujet, examiner avec soin la bourse de Fabricius au fond du cloaque (régressant naturellement entre le deuxième et le cinquième mois d'age).
 - Examiner le système nerveux.
- Procéder à la collecte et au conditionnement approprié et soigné de prélèvements destinés aux analyses de laboratoire.

2.2. PRELEVEMENT

La fiabilité du diagnostic de laboratoire repose sur la qualité des prélèvements effectués à cet effet, soit sur des animaux malades ou suspects (sang, fèces, écouvillons, pour la recherches d'anticorps spécifiques par les tests sérologique et immunologique), soit sur des cadavres suspects (organes de diverses natures, écouvillons, pour la mise en évidence de l'ARN génomique du virus ou d'antigènes spécifiques).

2.2.1. DISPOSITIONS GENERALES

- Le succès d'un diagnostic de laboratoire dépend de la qualité, des conditions de transport et de conservation des prélèvements.
- Principes généraux : les prélèvements sont représentatifs de l'affection sévissant dans l'effectif atteint. Dans un effectif important, prélever quelques morts, quelques malades, quelques sujets vivants à sac rifier. Ces derniers n'ayant de préférence pas reçus de traitement au préalable.
- En cas de maladie :
 - Les prélèvements destinés à l'isolement de virus sur cultures cellulaires ou par inoculation d'œufs embryonnés, tout comme ceux destinés à la détection directe

d'antigènes ou d'ARN viraux, sont généralement collectés durant les trois premiers jours suivant l'apparition des signes cliniques de la maladie.

- Chez les mammifères comme l'homme, le porc, le cheval, la grippe est d'abord une infection du tractus respiratoire, tandis que chez les oiseaux elle peut être une infection à la fois respiratoire et du gros intestin.

- Les prélèvements effectués sur les sujets vivants, en l'occurrence, le sang prélevés à la veine alaire, rentrent dans le cadre de la surveillance active de poulaillers sentinelles et sont destinés aux études sérologiques principalement et éventuellement aux études antigéniques et virologiques.

- Les prélèvements sur cadavres (d'oiseaux morts subitement ou provoquée) relèveront principalement de la surveillance passive et porteront sur divers organes destinés aux analyses histologiques, antigéniques et virologiques.

► Les prélèvements sont accompagnés d'une fiche de renseignement dûment remplie pour orienter les analyses de laboratoire.

2.2.2. TECHNIQUES DE PRELEVEMENT

2.2.2.1. CHEZ LES OISEAUX

► Prélèvements pour isolement du virus :

C'est essentiellement des écouvillonnages trachéaux et cloacaux, des fèces (chez les oiseaux vivants ou récemment sacrifiés), des organes et fèces regroupés (chez les oiseaux morts) :

- Ecouvillonnage trachéale : la trachée des oiseaux vivants est raclée par introduction d'un coton sec ou d'un écouvillon de polyester et fortement soigneux de la paroi. L'écouvillon est ensuite placé dans un milieu de transport et identifié. La trachée d'animaux morts (y compris le porc) est prélevée après isolement de la trachée et des poumons. La trachée est tenue dans une main gantée et l'écouvillon introduit au maximum de sa longueur en frottant vigoureusement la paroi puis placé dans le milieu de transport.

- Ecouvillonnage cloacal : introduire profondément l'écouvillon dans le cloaque d'oiseaux vivant et frottés vigoureusement les parois. L'écouvillon doit être suffisamment

imprégné de matière fécale et est ensuite placé dans un milieu de transport comme ci-dessus.

- Prélèvement de fèces : les échantillons de fèces ramassés dans la cage (poulaillers sentinelles) ou sur le sol (oiseaux sauvages) doivent être fraîchement émis, pour que l'écouvillon soit suffisamment chargés de matières et ensuite placé dans un milieu de transport.

- Prélèvement d'organes et de tissus : cerveau, foie, rate, cœur, poumon, trachée, pancréas, rein, sont immédiatement congelés de préférence sans milieu de transport, et seront utilisés plus tard pour l'inoculation des œufs ou les cultures cellulaires et les tests virologiques. Les échantillons de tissus de petites tailles sont mis en suspension dans un milieu de transport.

► Prélèvement pour tests sérologiques.

- Deux prélèvements de sang sont à effectués, l'un précoce, tôt après l'apparition des signes cliniques (3 à 5 ml de sang total), mais pas au-delà de 7 jours ; le second tardif collecté 2 à 4 semaines plus tard.

- Pour la surveillance épidémiologique (oiseaux domestiques et sauvages) un échantillon unique de sérum est valable.

- Le sérum est extrait par centrifugation à 2500 tpm/15 minutes.

- Si les prélèvements ne peuvent arriver au laboratoire dans les 48 heures, il faut envoyer du sérum et non du sang total qui deviendrait rapidement inutilisable.

2.2.2.2. CHEZ L'HOMME

► Chez le patient vivant.

- Les prélèvements se font idéalement dans les trois jours suivant le début des symptômes.

- Ecouvillonnage de la gorge (oropharynx).

- Ecouvillonnage nasopharyngé.

- Sang pour les anticorps (sérum de cas sévère et de convalescent, ou ARN viral).

- Prélèvement trachéal.

- Prélèvement fécal, si le malade présente des diarrhées.
- Chez le patient décédé
- Aspiration d'aiguille des poumons.
 - Ecouvillonnage (oropharynx).
 - Organes internes (foie, rate, reins).

2.3. TRANSPORT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Le transport se fait comme suit.

- Réfrigérer les échantillons entre 2 à 8 °C.
- Pour le transport : le principe du triple emballage est adopté dans une boite de styrémousse ou une glacière avec bloc réfrigérant ensuite étiqueté et pré-adressé.
- Les échantillons destinés à la détection directe de l'antigène viral (immunofluorescence et autres tests), doivent être gardés dans de la glace et être analysés dans les deux heures suivant le prélèvement.
- Les échantillons destinés à l'isolement du virus sont congelés immédiatement, et inoculés à des cellules sensibles, et œufs embryonnés EOPS dès que possibles. Si le prélèvement ne peut être traité dans les 48 heures, il est conservé à -70 °C.
- Eviter les cycles congélation/décongélation pouvant entraîner une perte d'infectivité des virus.
- Les sérums peuvent être gardé pendant une semaine environ à +4 °C, au-delà, il faut les conserver à -20 °C.
- Plus les délais sont courts plus les chances de détection du virus sont grandes.

2.4. LES METHODES D'ANALYSE AU LABORATOIRE

La variabilité des signes cliniques de la grippe aviaire est telle, qu'il est impossible d'établir des orientations clairement définies pour les foyers suspectés. Une mortalité élevée, subite, chez des volailles, accompagnée ou non des signes cliniques décrits ci-dessus, doit faire l'objet d'une enquête, consistant notamment en l'envoi d'échantillons pour des recherches en

laboratoire. Car un diagnostic rapide d'une infection causée par les sous-types H5 et H7 revêt une importance capitale pour une lutte rapide contre la maladie et son éradication.

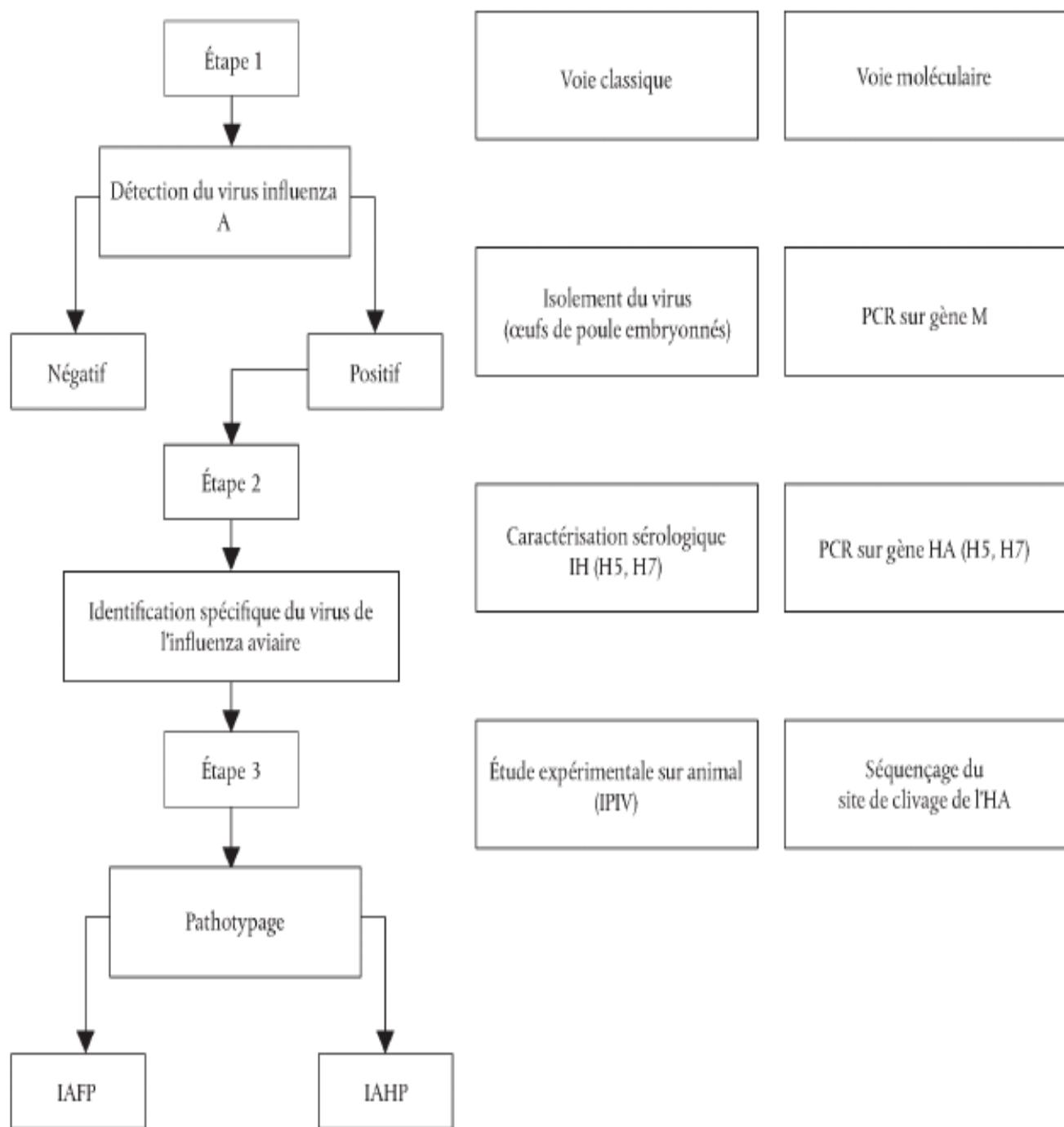
L'influenza aviaire est diagnostiquée au laboratoire, soit par la mise en évidence d'anticorps ou d'antigènes spécifiques du virus (tests AGID, IHA, ELISA-Ac), soit par détection directe et caractérisation (isolement et identification du virus, détermination de l'IPIV) ou indirecte (recherche d'antigènes : ELISA-Ag, AGID, IHA). Les tests rapides fondés sur la sérologie ou la virologie constituent les méthodes de premier recours.

Cependant les tests diagnostiques sont effectués sur différents types de prélèvements en fonction de la symptomatologie observée.

- Chez l'homme, en cas de signes respiratoires, une aspiration naso-pharyngée, une expectoration, un prélèvement de gorge ou un liquide de lavage broncho-alvéolaire pourra être analysé. En cas de diarrhée, un prélèvement rectal et de selles doit être testé. Chez les patients présentant une encéphalopathie, l'étude du liquide céphalo-rachidien (LCR) et du sérum peuvent permettre le diagnostic de la cause.
- Chez les oiseaux en cas de signes respiratoires un écouvillonnage trachéal pourra être analysé. En cas de diarrhée un écouvillonnage cloacal, ou des prélèvements de fèces pourra être analysés.

En résumé le schéma si dessous montre les différentes étapes d'un diagnostic pouvant conduire à la confirmation de la présence d'IA.

Tableau 3 : Aperçu schématique des étapes de diagnostiques conduisant à la confirmation de l'I.A.



2.4.1. LA SEROLOGIE

Le diagnostic sérologique nécessite classiquement l'analyse des sérum s prélevés. Il est basé sur le principe d'agglutination antigène-anticorps. Pour les influenzavirus, sont recherchés les antigènes nucléoprotéiniques ou matriciels.

Les tests sérologiques recherchant des anticorps dirigés contre le virus ont un intérêt rétrospectif et servent pour les études épidémiologiques. La méthode d'inhibition de l'hémagglutinine (IHA) est la méthode standard pour le diagnostic sérologique des infections grippales : les anticorps développés par un sujet infecté inhibent l'activité hémagglutinante de l'hémagglutinine virale. Cependant, les tests d'inhibition de l'hémagglutinine actuellement disponibles semblent peu sensibles en raison, soit de la faible immunogénicité des virus aviaires, soit de la faible avidité des anticorps produits, soit de la difficulté de détecter des taux faibles d'anticorps.

La recherche d'antigènes viraux par des tests utilisant des kits commerciaux, met en œuvre la méthode d'immunofluorescence. Dans un premier temps, la présence de la nucléoprotéine (NP) des virus influenza A est recherchée, puis en cas de positivité, la recherche des antigènes HA permet de préciser le sous-type viral présent. Cette méthode est moins sensible et moins spécifique que la détection du génome viral par isolement en culture cellulaire. La méthode sérologique peut être également utilisée en cas de signes cliniques patents de la maladie.

Ainsi la détection d'anticorps anti-A se fait par les tests suivants selon le protocole OIE/FAO⁵⁸ pour la sérologie :

2.4.1.1. LE TEST AGID

AGID pour *Agar Gélose Immunodiffusion*, est un test réservé à l'analyse de sérum s de poulet ou de dinde, non de sérum s d'oiseaux d'eau (ces oiseaux n'élaborent pas d'anticorps précipitants). Le test est très spécifique, mais peu sensible.

2.4.1.2. ELISA

ELISA pour *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, est un test très sensible mais peu spécifique. Il en existe plusieurs variantes dont l'ELISA indirecte (limité à une catégorie de sérum s), l'ELISA de compétition (utilisable pour tout sérum de toute espèce).

En cas de séropositivité à ces tests, il faut procéder à l'identification du sous-type H par le test IHA avec au moins des antigènes H5 et H7 c'est à dire H5N1, H5N9 et H7N1, H7N3.

Demander ensuite la confirmation du test à un laboratoire de référence OIE.

2.4.2. LA VIROLOGIE

Le diagnostic virologique de l'infection repose sur la mise en évidence du virus lui même (isolement) ou d'un de ses constituants (antigènes, fragment d'ARN).

L'isolement viral est obtenu par culture sur des cellules de rein de chien (MDCK), accessoirement sur des cellules de rein de singe Rhésus (LLC-MK2), ou encore par l'inoculation d'œufs embryonnés de poulet.

Son identification se fait, à partir des cellules en culture par immunofluorescence, utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine NP. Il est ainsi défini le sous-type A de la souche virale.

Pour réaliser la culture sur œuf embryonné, on inocule entre 0,1 à 0,2 ml du surnageant clarifié de la suspension virale dans la cavité allantoïdienne d'au moins quatre œufs de poule embryonnés, qui seront ensuite mis à incuber pendant neuf à onze jours. Les œufs utilisés doivent être stériles (exempt d'organismes pathogènes spécifiques : EOPS), à défaut, utiliser des œufs reconnus exempts d'anticorps anti-IA.

Les œufs inoculés sont conservés à 37 °C et mirés quotidiennement. Au fur et à mesure, les œufs contenant des embryons morts ou mourants et tous les œufs restant après six jours d'inoculation, doivent être réfrigérés à 4 °C et leur liquide allantoïdien ou amniotique doit être testé par hémagglutination.

En l'absence d'hémagglutination, cette procédure doit être répétée en utilisant comme inoculum le liquide allantoïdien ou amniotique non dilué.

Lorsqu'il y a hémagglutination, la présence de bactéries contaminantes doit être exclue par culture. Si des bactéries sont mises en évidence, il est admis de passer le liquide dans un filtre à membrane pourvu de pores de 450 nm, d'ajouter un complément d'antibiotiques et d'inoculer ce liquide dans les œufs embryonnés comme indiqué ci-dessus.

En cas de positivité de la virologie, les tests suivants peuvent être réalisés pour identification :

- Réalisation d'une RT-PCR.
- Mise en évidence de l'activité hémagglutinante (IHA).
- Confirmer la présence virale par test AGID.
- Déterminer le sous-type à l'aide d'antisérum monospécifiques (H1-H16 et N1-N9) par immunodiffusion.
- Evaluer la virulence de la souche par détermination de l'indice de pathogénicité intraveineuse (IPIV), chez des poulets de 4 à 8 semaines.

En résumé l'inoculation par la voie allantoïdienne, d'œufs embryonnés de poule, âgés de 9 à 11 jours, reste la méthode officielle. On observe généralement, une mortalité embryonnaire en moins de 6 jours, si le virus est hautement pathogène. S'il y a absence de pouvoir pathogène trois passages sur œuf embryonné sont nécessaires pour infirmer toute suspicion. Rappelons qu'en cas de mortalité embryonnaire, il faut vérifier que le virus est hémagglutinant. Dans ce cas, il faut le différencier du virus de la maladie de Newcastle (également hémagglutinant), par un test d'inhibition de l'hémagglutinine (IHA) spécifique.

2.4.3. LA TECHNIQUE PCR

L'ARN viral est mis en évidence par une RT-PCR spécifique du virus A. C'est un test très spécifique, son seul inconvénient est le coût. Différentes stratégies sont actuellement développées pour la mise en œuvre de ce test :

- amplification d'un fragment du gène de matrice M, commun aux virus influenza de type A,
- puis en cas de positivité, détermination du sous-type par l'amplification d'un fragment du gène de l'hémagglutinine (H5, H7, H1, H3 et H9).

Rappelons enfin qu'en cas de positivité de la RT-PCR, il est toujours nécessaire de vérifier la virulence de la souche virale. Il importe de savoir si l'on a affaire à un influenza hautement ou faiblement pathogène par le test de l'IPIV.

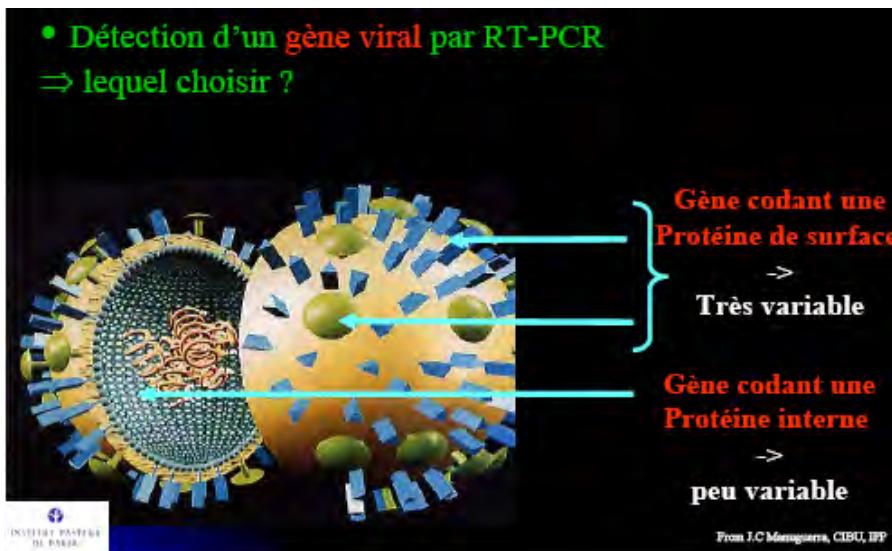


Figure 10 : Choix des gènes utilisés pour la RT-PCR⁵⁹ (On choisit les gènes peu variables : les gènes de matrices (M1 et M2 par exemple)).

2.4.3.1. LA METHODE PCR STANDARD

2.4.3.1.1. PRINCIPE

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est une technique de biologie moléculaire d'une puissance exceptionnelle, permettant d'amplifier spécifiquement et d'une manière exponentielle, une séquence d'ADN donné.

La PCR, permet d'amplifier spécifiquement une région de l'ADN double brin de quelques centaines de paires de bases. Cet ADN (génomique ou ADNc), doit d'abord être séparé en simples brins (dénaturation à 95° C) pour servir de matrice.

On ajoute à l'ADN de départ une large quantité d'amorces (oligonucléotides synthétiques complémentaires des deux extrémités de la région à amplifier), qui vont s'hybrider à 50-60 °C environ avec la séquence complémentaire sur chacun des brins d'ADN. On ajoute également les quatre dNTPs qui serviront de substrats.

On soumet le tout à l'activité d'une ADN polymérase (Taq polymérase), qui synthétise à 72 °C un brin complémentaire à partir de l'extrémité 3'OH de l'amorce hybridée. On obtient ainsi quatre brins d'ADN.

On recommence à dénaturer ces 4 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour aboutir à 8 brins d'ADN.

On recommence à dénaturer ces 8 brins, puis on les laisse s'hybrider avec les amorces (toujours en excès) et la polymérase entre en action pour synthétiser 16 brins d'ADN.

Et ainsi de suite 30 à 40 fois, ce qui aboutit à 34 millions de brins d'ADN, donc une quantité plus que suffisante pour étudier le fragment d'ADN amplifié.

Le résultat de la PCR est qu'à la fin de n cycles, on dispose d'un nombre théorique d'amplicons de 2^n , spécifiques de la séquence encadrée par les amorces⁷⁰.

2.4.3.1.2. Les différentes étapes de la PCR

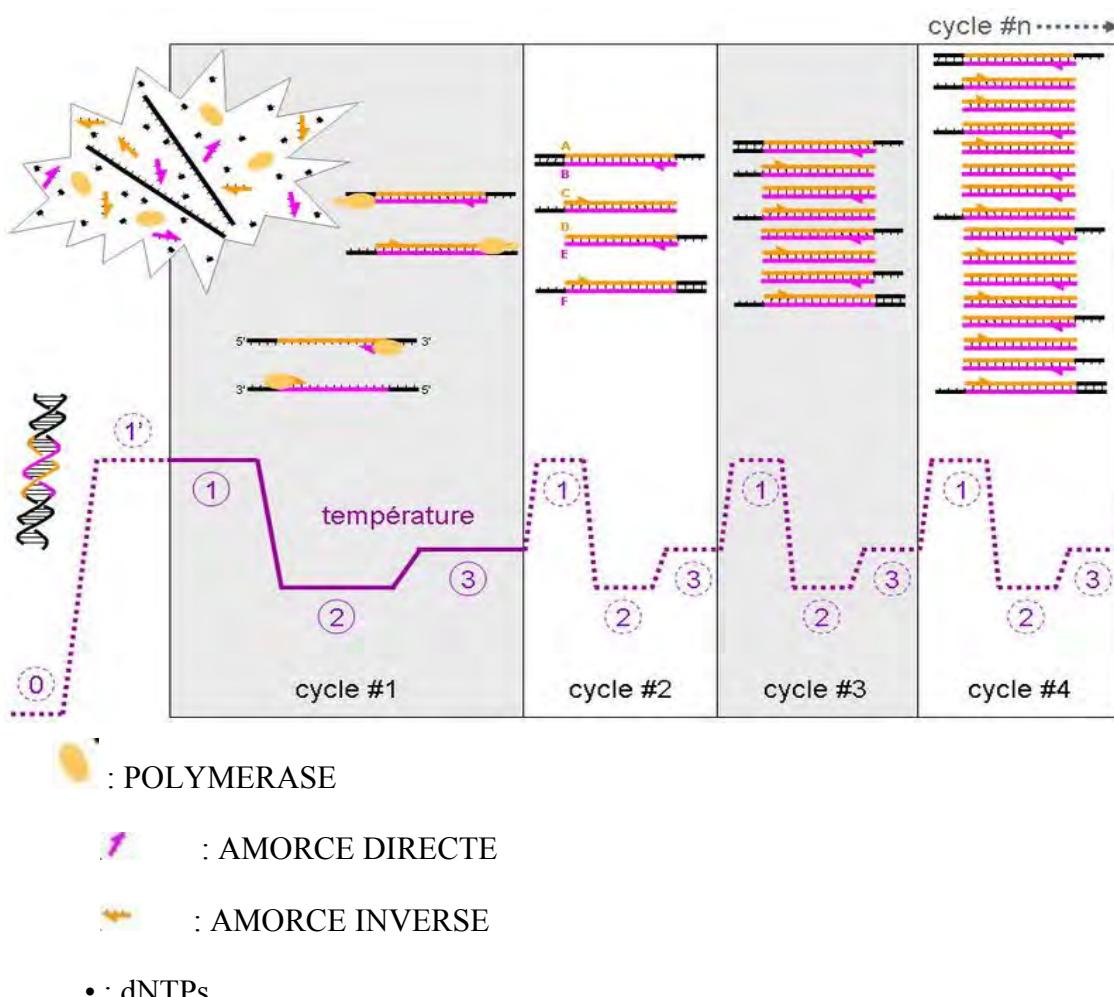


Figure 11 : Evolution de la température et des différents types de brins d'ADN au cours des 4 premiers cycles de la PCR⁷⁰.

♦ CONDITIONS NATIVES (0 SUR LE SCHEMA)

Cette étape se fait généralement à température ambiante. L'ADN bicalénaire adopte une conformation en double hélice. Dans cet exemple, il est considéré qu'il n'y a qu'une molécule initiale d'ADN double brin dans la solution ; la zone colorée (rose et orange) correspondant aux amplicons c'est-à-dire la zone à amplifier.

♦ DENATURATION INITIALE (1' SUR LE SCHEMA)

Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage (généralement 10 à 15 minutes à 95 °C) est réalisée. Cette étape permet de déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases, de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution (transcriptase inverse).

♦ PHASE DE DENATURATION (1 SUR LE SCHEMA)

Cette étape (généralement 0 à 1 minute à 95 °C) permet de déshybrider les ADN et les amplicons, de « décrocher » les polymérases, qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

♦ PHASE D'HYBRIDATION OU D'APPARIEMENT DES AMORCES (2 SUR LE SCHEMA)

Cette étape (généralement 2 à 60 secondes à 50-64 °C), permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrice à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Peu de brins d'ADN matrice peuvent s'hybrider avec leur brin complémentaire, ce qui empêcherait la fixation des amorces, car ces dernières sont bien plus courtes et en concentration bien plus importante.

♦ PHASE D'ELONGATION (3 SUR LE SCHEMA)

Cette étape (généralement 4 à 1 20 secondes à 72 °C) permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice, à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon.

♦ EVOLUTION DE L'ADN AU COURS DES QUATRE PREMIERS CYCLES

Cycle #1

Lors de la phase 1, l'ADN initial adopte une conformation « linéaire » (sans structure secondaire) et se présente en simple brin. Les amorces, les dNTPs et les polymérases sont en large excès et répartis de façon homogène dans la solution.

Lors de la phase 2, une des amorces sens s'hybride avec sa séquence complémentaire sur le brin sens (en rose), l'amorce anti-sens se liant elle au brin anti-sens (en orange). Deux polymérases peuvent alors interagir avec les deux complexes amorces/ADN matrice.

Lors de la phase 3, les polymérases parcourent leur brin matrice de son extrémité 3' vers son extrémité 5' tout en synthétisant le brin complémentaire. Elles s'arrêteront à la fin du cycle, décrochées par la phase de dénaturation du cycle suivant. Les ADN néo-synthétisés sont donc précisément définis à leur extrémité 5', mais pas à leurs extrémités 3' (parties noires). Les ADN sont alors bicaténaires sur une longueur plus ou moins importante.

A la fin de l'étape 3, deux brins d'ADN matrice et deux brins (un sens et un anti-sens) d'ADN précisément définis à leur extrémité 5' uniquement, sont obtenus.

Cycle #2

Les trois phases se déroulent de la même manière qu'au cycle #1, sauf que deux polymérases arrivées au bout de leur ADN matrice, se décrochent spontanément. À la fin de la phase 3, il est obtenu tous les types d'ADN, qui existeront lors de la PCR, à savoir :

- un brin d'ADN natif anti-sens (A),
- deux brins d'ADN sens précisément définis à leur extrémité 5' uniquement (B),
- un brin d'ADN anti-sens correspondant à l'amplicon, c'est-à-dire précisément défini à ses deux extrémités (C),
- deux brins d'ADN anti-sens précisément définis à leur extrémité 5' uniquement (D),
- un brin d'ADN sens correspondant à l'amplicon, c'est-à-dire précisément défini à ses deux extrémités (E),
- un brin d'ADN natif anti-sens (F),

Cycle #3

Il est comparable au cycle 2. A la fin de la phase 3, il est observé un brin des types A et F, 3 des types B et D, et 4 des types C et E, de même que l'apparition de deux molécules d'ADN double brins C-E correspondant à l'amplicon.

Cycle #4

Il est comparable aussi au cycle 2. A la fin de la phase 3, sont observés 1 brin des types A et F, 4 des types B et D, et 11 des types C et E : l'amplicon devient la combinaison majoritaire.

Cycles au delà du Cycle # 4

Au-delà de quatre cycles, l'on observe que :

- les natifs A et F ne sont plus dupliqués,
- les molécules précisément définies à leur extrémité 5' uniquement (B et D) augmentent de manière linéaire (de 1 par cycle sauf si l'ADN natif se dégrade).
- Le nombre de molécules simple ou double brin augmente selon une exponentielle d'ordre 2.
- Les molécules contenant la séquence exacte à amplifier (C et E), apparaissent dès le deuxième cycle et augmentent selon une suite arithmétique, qui tend vers une exponentielle d'ordre 2 lorsque le nombre de cycles augmente. Ils deviennent majoritaires au fur et à mesure de la réaction.

Ces valeurs ont été obtenues en partant d'une seule molécule initiale d'ADN double brins. A un cycle donné, la quantité d'ADN dépend donc du nombre initial de matrices. En revanche, quel que soit sa concentration initiale, il est théoriquement possible d'obtenir n'importe quelle quantité en ajustant le nombre de cycles.

La PCR est donc théoriquement régie par la loi : $[ADN]_{cycle\ n} = [ADN]_{initiale} \times E^n$

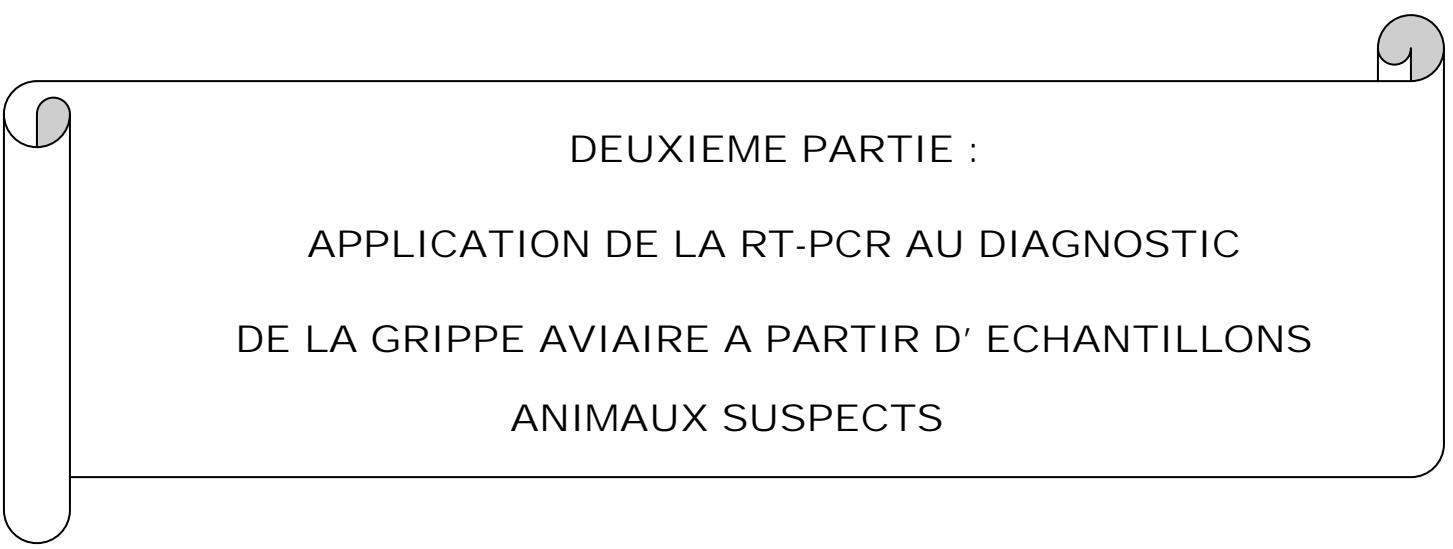
La PCR est donc un outil formidable qui permet de déceler un ADN recherché parmi des millions. Ainsi, avec quelques molécules d'ADN initiales, il est possible d'obtenir des millions de copies spécifiques. Cet amplicon peut ensuite être facilement détecté, lors d'un diagnostic par des sondes spécifiques.

2.4.3.2. LA RT-PCR : UNE VARIANTE DE LA PCR STANDARD

La PCR standard s'applique à l'ADN et aux génomes de type ADN. A partir de ce principe de base, plusieurs variantes ont été conçues, toutes aux fins d'améliorer la spécificité et la sensibilité de la technique, notamment dans le cadre du diagnostic des agents infectieux. Par exemple, la RT-PCR, permet l'amplification de génome de type ARN préalablement transformé en ADN (ou ADNc).

La RT-PCR (*Reverse Transcriptase PCR*) est une technique qui comporte deux étapes, la première permettant de transformer l'ARN génomique en ADN (appelé ADN complémentaire ou ADNc) et la seconde étape amplifiant alors, cet ADNc par une PCR standard

La transcriptase inverse (RT pour *Reverse Transcriptase*) est une enzyme (une ADN polymérase particulière), qui permet de synthétiser un brin ADN complémentaire d'un brin ARN (génomique ou non) par polymérisation de désoxyribonucléotides : la transcriptase inverse est donc une ADN polymérase ARN-dépendante.



DEUXIEME PARTIE :
APPLICATION DE LA RT-PCR AU DIAGNOSTIC
DE LA GRIPPE AVIAIRE A PARTIR D' ECHANTILLONS
ANIMAUX SUSPECTS

INTRODUCTION

La grippe aviaire est une maladie redoutable, par les pertes en vie humaine et surtout par les pertes économiques qu'elle peut provoquer, au regard de l'importance et des potentialités du secteur avicole dans notre pays. Pour protéger le pays de ce fléau, des mesures de protection et de renforcement de la sécurité sanitaire des populations et de l'économie de la filière avicole, ont été prises. Les mesures mises en œuvre concernent essentiellement la surveillance passive et active des oiseaux, la prévention et la lutte contre toute extension de pandémie de la grippe aviaire au Sénégal.

Ce présent travail rentre dans le cadre de la prévention et de la surveillance passive de la maladie au Sénégal. Ainsi la RT-PCR est utilisée, pour la détection précoce de tout cas de grippe aviaire à partir d'échantillons animaux.

Ces travaux se sont déroulés au sein du Laboratoire National d'Elevage et de Recherche Vétérinaire (LNERV), de l'Institut Sénégalais de Recherche Agricole (ISRA), qui est le laboratoire de référence national de la grippe aviaire pour les animaux. Cette structure prend en charge les échantillons animaux, provenant d'un peu partout sur le territoire national : notamment les parcs nationaux, les élevages à grandes échelles et les poulaillers sentinelles établis dans les zones à risques (parcs et réserves).

Dans ce travail, il s'agit de faire une surveillance passive de la maladie, au sein du parc zoologique de Hann. En effet, le parc de Hann, abrite beaucoup d'oiseaux concernés par la maladie. Il s'agit de faire un diagnostic systématique de la maladie chez tout oiseau mort suspect. L'analyse particulière, qu'il nous a été donnée d'effectuer concerne des oiseaux morts, suspects, ramassés au parc zoologique de Hann.

La mise en œuvre de ce test de diagnostic se déroule comme détaillé ci-dessous.

I. MATERIELS ET METHODES

La méthodologie consiste à :

1. l'extraction de l'ARN viral de l'I.A, à partir des échantillons suspects, par un mini kit d'extraction,
2. la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc), à partir de l'ARN viral de l'I.A,
3. l'amplification l'ADNc par PCR.

Pour ces différentes étapes, le kit Qiagen est utilisé. Enfin, nous procérons à la visualisation des amplicons par électrophorèse sur gel d'agarose.

1.1. EXTRACTION

C'est une technique, qui permet l'extraction d'ARN à partir d'organe, de cellules, et d'autres extraits. L'ARN obtenu est importante, de bonne qualité, et ne nécessite pas un traitement spécifique de décontamination.

L'ARN génomique viral à étudier est donc obtenu par extraction, à partir des échantillons d'organes. L'extraction nécessite donc de casser l'organe, pour libérer la particule virale contenant l'ARN recherché.

1.1.1. MATERIELS

♦ MATERIELS BIOLOGIQUES

Le matériel biologique est composé de deux types d'échantillons : des poumons et des trachées, qui ont été prélevés sur des oiseaux morts, suspects, ramassés au parc zoologique de Hann. Ces oiseaux appartiennent aux espèces suivantes : *Corvus albus* (corbeau pie), *Egretta sp* (aigrette), *Necrosyrtes monachus* (vautour charognard).

Rappelons que les oiseaux ont été autopsiés comme décrit à la page 24, pour recueillir des échantillons d'organes susceptibles de contenir des influenzavirus A. C'est ainsi que les 8 échantillons de poumons et de trachées ont été obtenus.

♦ MATERIEL D'EXTRACTION

- Equipements nécessaires

Tableau 4 : Equipements utilisés pour l'extraction de l'ARN viral

Equipement	Spécification	Marque	Localisation
Réfrigérateur	+2° C à +6° C	General electric	Salle#5 Labo PCR
Réfrigérateur	+2° C à +6° C	Arthur Martin	Salle#6 extraction
Congélateur1	-50° C à -70° C	REVCO	Entrée
Congélateur2	-15° C à -20° C	Brandt	Couloir
Vortex		Fisher	Salle#6 extraction
Centrifugeuse	3K	Sigma 3K 15	Salle#6 extraction
Spectrophotomètre	260 et 280 nm	Genesys	salle#8 Chambre noire
Jeux de pipettes spéciales ARN		Nichiped et Br	Salle#6 extraction
Petits matériel de labo	Embouts, eppendorf, tubes		Salle#6 extraction

- Réactifs d'extraction

- Kit d'extraction d'ARN Qiagen.
- Tampon de lyse RLT.
- β -mercaptoethanol.
- Ethanol.
- Tampon de lavage RW1.
- Tampon de lavage RPE.
- Eau de qualité moléculaire (Rnase free).

- Equipement de sécurité et règles de précaution

- Port de blouse, de gants impératif.
- Décontamination des produits de lavage.
- Respect des parcours entre les différentes salles.
- Utilisation de poubelles haute sécurité.
- Non recyclage des embouts de pipettes.
- Travailler sous une hotte à flux laminaire.

- Paramètres environnementaux

Les extractions se font dans le Laboratoire 6, où se trouve la salle d'extraction. La salle est équipée d'une hotte à flux laminaire. Elle est dotée de paillasse lavable, avec éclairage adéquat, air conditionné (température moyenne de 22 à 25 °C), filtre à air et lampes UV. La paillasse de travail est recouverte de papier filtre absorbant, avec un film en plastique isolant changé après chaque extraction.

1.1.2. METHODE

Les méthodes employées se réfèrent aux indications accompagnant les kits commerciaux utilisés pour les extractions, donc variables selon les marques. En ce qui nous concerne, le kit d'extraction Qiagen a été utilisé. Le processus d'extraction se résume comme suit :

- Lyse des cellules par désorganisation des membranes.
- Elimination, des sels, des protéines par lavages successifs.
- Concentration de l'ARN viral par précipitation.

♦ PREPARATION DES REACTIFS

- Tampon RLT (solution de lyse)
- Ajouter 10 μ l de β -mercaptoethanol (β -ME) par ml de RLT.
- On prépare la quantité nécessaire au nombre d'échantillons à tester.
- Prendre un tube à centrifuger stérile de 12 ml. Calculer la quantité nécessaire : 600 μ l de tampon RLT contenant 10 % de β -mercaptoethanol pour chaque 10-20 mg d'organe.

- Le β -ME est toxique, utiliser des masques et travailler sous la hotte à flux laminaire.
- Tampon de lavage RW1 : près à l'utilisation.
- Tampon de lavage RPE : près à l'utilisation.

♦ PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons de poumons et de trachées sont traités comme suit :

- 10 mg de chacun des échantillons d'organes sont coupés et pesés. A chaque fois il faut éviter la décongélation, à cet effet, la boîte de Pétri est placée sur la glace pilée.
- Ensuite déposer les échantillons dans un mortier stérile.
- Ajouter immédiatement, 600 μ l de tampon de lyse RLT (contenant 10% de β -mercaptoethanol).
- Ajouter une petite quantité de poussière de quartz.
- A l'aide d'un pilon, les échantillons d'organe sont broyés pour les réduire en purée.

♦ EXTRACTION DES ARN TOTAUX

Après avoir réduit les échantillons de trachée et de poumon en purée :

- utiliser une seringue de 1 ml pour homogénéiser les broyats.
- transférer chaque broyat, dans un tube eppendorf de 2 ml, centrifuger 3 minutes à 14.000 rpm.
- recueillir le surnageant sans toucher le culot dans un nouveau tube eppendorf.
- ajouter 500 µl d'éthanol (70 %) au surnageant et mélanger immédiatement.
- transférer 700 µl dans une colonne placée dans un tube collecteur (fournit avec le kit), fermer, centrifuger à 10.000 rpm 15 s,
- ajouter 500 µl de tampon de lavage RW1 à la colonne, fermer et centrifuger 15 s à 10.000 rpm pour laver une première fois.
- transférer la colonne dans un tube eppendorf de 2 ml. Ajouter 500 µl de tampon

RPE, fermer la colonne, centrifuger 15 s à 10.000 rpm.

- jeter le liquide, ajouter à nouveau 500 µl de tampon RPE et centrifuger à nouveau 15 s à 10.000 rpm pour le second lavage.
 - Ajouter 500 µl de tampon RPE à la colonne et centrifuger 2 mn à 10 000 rpm pour le dernier lavage et le séchage de la colonne.
 - sortir doucement la colonne de l'éppendorf en évitant tout contact avec le liquide de centrifugation. Transférer dans un nouveau tube collecteur de 1.5 ml fournit dans le kit (RNase free) et ajouter 40 µl de RNase free water à la colonne (laisser tomber les gouttes au milieu de la membrane). Fermer la colonne et centrifuger à 10.000 rpm, 1 minute pour éluer l'ARN.
- jeter la colonne et garder cette fois ci le liquide de centrifugation.

1.2. REALISATION DE LA RT-PCR

1.2.1. SYNTHESE DE L'ADNc

1.2.1.1. MATERIELS

♦ MATERIELS BIOLOGIQUES

Le matériel biologique est composé des échantillons d'ARN extraits si dessus (trachées et poumons).

♦ EQUIPEMENT

- Tubes stériles pour microcentrifugation de 0.5 ml.
- Pipettes ajustables de 10, 20 et 100 μ l et embouts.
- Microcentrifugeuse ajustable à 13 000 tpm.
- Vortex.
- Thermocycleur pour PCR.
- Glace.

♦ REACTIFS

- Un mélange de 10 mM de dNTPs.
- Eau de qualité moléculaire.
- Amorce directe.
- Amorce inverse.
- Tampon 5x Reverse Transcriptase.
- 40 unités/ μ l d'inhibiteur de Rnase.

1.2.1.2. METHODE

- Avant de commencer le test, il faut procéder comme suit :

- vérifier dans le registre des prélèvements, le nombre de prélèvements à tester : les échantillons sont regroupés par type (poumons et trachée). Donc deux types d'échantillons extraits ont été traités.

- porter une blouse blanche lavable et des gants,
 - remplir les bacs à glace,
- Au moment de faire le test :
 - Aller directement à la salle PCR1 et mettre une blouse à usage unique par dessus la blouse lavable, et de nouveaux gants.
 - Sortir tous les réactifs pour le cDNA (amorces, tampons, enzymes, dNTP...).
 - Préparer le mélange pour chaque échantillon.
 - Commencer la réaction de cDNA.
 - Conserver les cDNA dans le réfrigérateur F#3 à -20° C : il est préférable de faire le test en deux étapes : la synthèse de la cDNA un jour et la PCR lendemain.
- Mode opératoire

Toutes les manipulations se font sur les bacs de glace.

- 1- Marquer chaque tube de microcentrifugation de 0.5 ml utilisé pour chaque échantillon de RNA extrait.
- 2- Ajouter 0.5 µl d'amorce dans chaque 4 µl d'échantillon de RNA.
- 3- Incuber pendant 5 minutes à 72°C.
- 4- Faire le mélange suivant :
 - 1.5 µl de H₂O.
 - 2.0 µl de tampon de transcriptase inverse.
 - 0.5 µl d'un mélange de 10 mM de dNTPs.
 - 0.5 µl de Rnasin (inhibiteur de RNase).
 - 1.0 µl de transcriptase inverse.
- 5- Mettre ce mélange dans chaque tube expérimental placé sur la glace (1 tube pour chaque type d'échantillon).

6- Incuber le mélange RNA/Primer et cocktail, volume total de 10 μ l, à 50 °C pendant 30 minutes et 94 °C pendant 15 minutes.

7- Arrêter ensuite la réaction en incubant pendant 5 minutes à 95 °C.

Attendre le lendemain pour faire la PCR (tous les échantillons sont conservés à -20 °C).

1.2.2. AMPLIFICATION DES cDNA :

1.2.2.1. MATERIELS

♦ MATERIEL BIOLOGIQUE

- ADNc synthétisé si dessus pour les deux types d'échantillons (poumons et trachées) à partir de l'ARN extrait.
- le contrôle positif est facultatif.

♦ EQUIPEMENT

- Tubes de microcentrifugation stérile de 0.5 ml.
- Pipettes ajustables et embouts de 10, 20, et 100 μ l.
- Microcentrifugeuse ajustable à 13 000 rpm.
- Vortex.
- Thermocycleur pour la PCR.
- Glace.

♦ REACTIFS

- DNA Polymerase (5 units/ μ l, Promega Cat #M1901).
- Tampon 10x PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, 1.0% Triton, pH 9.0).
- MgCl₂, 25 mM.
- Mélange des 4 dNTPs, 10 mM.
- H₂O de qualité moléculaire et Rnasin.
- Amorce direct : M25F provenant de l'IZS (laboratoire de référence mondiale).

- Amorce inverse : M124R provenant de l'IZS (laboratoire de référence mondiale).

1.2.2.2. MODE OPERATOIRE

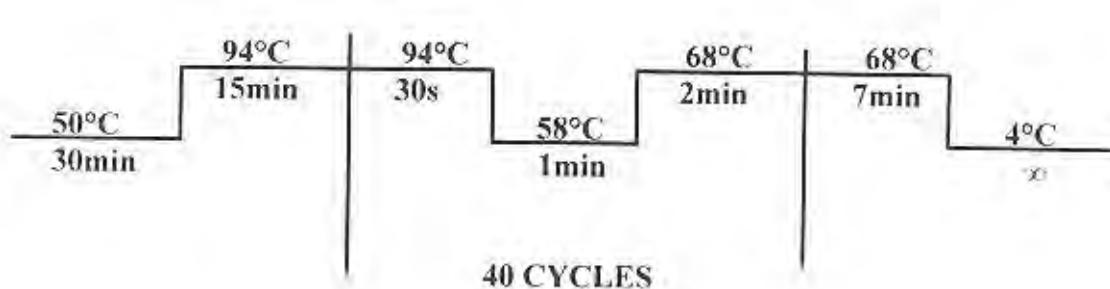
- Avant de préparer le mélange de la réaction, il est nécessaire de calculer les volumes corrects de réactifs qui doivent être utilisés (voir les volumes réactionnels dans le tableau 5).
- Pour assurer une distribution homogène des réactifs dans tous les aliquotes, on mélange tous les réactifs dans un seul tube de réaction (solution mère).
- Toutes les solutions stocks des réactifs pour PCR sont conservées à -20 °C.
- Les enzymes (transcriptase inverse et DNA polymérase) sont sortis du congélateur, seulement au moment de leur emploi.
- Le volume total est contenu dans un tube stérile approprié.

La procédure complète de préparation du mélange réactionnel est la suivante (voir les quantités dans le tableau 5) :

- Décongeler tous les réactifs, à l'exception de la polymérase inverse, dans la glace.
- Ajouter le H₂O.
- Ajouter le tampon PCR.
- Ajouter le MgCl₂
- Ajouter les dNTPs.
- Ajouter l'amorce directe.
- Ajouter l'amorce inverse.
- Ajouter la polymérase inverse.
- Vortexer la solution.
- Distribuer le volume de réaction dans les tubes PCR stériles.
- Ajouter les échantillons aux tubes de PCR, dans une pièce séparée.
- Mettre les tubes sur le bloc thermique du thermocycleur (RT-PCR plate-forme) et

- Avant de lancer la réaction, programmer le thermocycleur comme suit:

- 1- 94 °C ; 30 secondes
- 2- 58 °C ; 1 minutes
- 3- 68 °C ; 2 minutes
- 4- 68 °C ; 7 minutes
- 5- Nombre de cycle : 40.



A la fin de l'amplification, placer le mélange réactionnel à 4 °C avant de procéder à la visualisation des produits sur gel d'agarose.

Tableau 5 : volumes des différents réactifs utilisés dans la PCR.

Réactifs	Volume en μ l x 1 réaction	Nombre de réactions	Total μ l
Eau (grade BM)	28.8	9	259.2
5X tampon QIAGEN RT-PCR	10	9	90
dNTPs 10 Mm	2	9	18
Amorce direct M25F (5 μ M)	1	9	9
Amorce inverse M124R (5 μ M)	1	9	9
Inhibiteur de la RNase 40U/ μ l	0.2	9	1.8
Mélange d'enzyme One step RT-PCR (Qiagen kit)	2	9	1.8
Volume total			405
Quantité du mix			405//9 = 45 μl
Quantité d'ARN			5 μl
Volume réactionnel			50 μl

1.2.3. IDENTIFICATION DES AMPLICONS PAR ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE.

♦ MATERIELS

- Plateau support de gel d'agarose et peigne pour micropuits, cuve d'électrophorèse et alimentation électrique.
- Table avec lampe UV (302 nm).
- Appareil photo Polaroid.
- Pipette ajustable et embouts de 10 μ l.
- Microtubes contenant le mélange réactionnel amplifié.
- Générateur.

♦ Matériel biologique

Les échantillons à visualiser sont les amplicons de poumons et de trachées, le témoin négatif, et le contrôle positif H9 provenant de l'IZS (laboratoire de référence mondiale).

♦ REACTIFS

- Gel d'agarose.
- Tampon 1 x TAE).
- Bromure d'éthidium à 10 µg/µl.
- Marqueur de taille moléculaire (Low DNA Mass Ladder, Gibco) ; entre 100 et 1000 pb.

♦ Opérer comme suit :,

- Préparer le gel d'agarose en le mélangeant avec du tampon TAE (2 g d'agarose pour 100 ml de volume final). Dissoudre complètement l'agarose dans le tampon, en plaçant l' erlenmeyer au four, et en agitant de temps en temps. L'agarose est totalement dissout lorsque les grains, initialement visibles sous forme de petites lentilles, ont complètement disparu.

- Couler l'agarose dans le moule avec le peigne et laisser refroidir.
- remplir la cuve de tampon TAE,
- Juste avant d'effectuer l'électrophorèse, placer le moule dans la cuve et s'assurer qu'il est complètement recouvert de tampon,
- retirer ensuite le peigne,
- charger le marqueur de poids moléculaire et les produits de la PCR,
- passer à la révélation en lumière UV (302 nm) : la méthode la plus utilisée est la révélation au Bromure d'éthidium ou BET. Le bromure d'éthidium est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN.

II – RESULTATS

La taille attendue des produits de la PCR pour le gène M de la grippe A/H9 est de 383 pb, repérable à l'aide de l'échelle de taille moléculaire.

La photographie ci dessous montre la visualisation obtenue, par électrophorèse sur gel d'agarose des bandes du marqueur de taille moléculaire et des échantillons de la PCR.

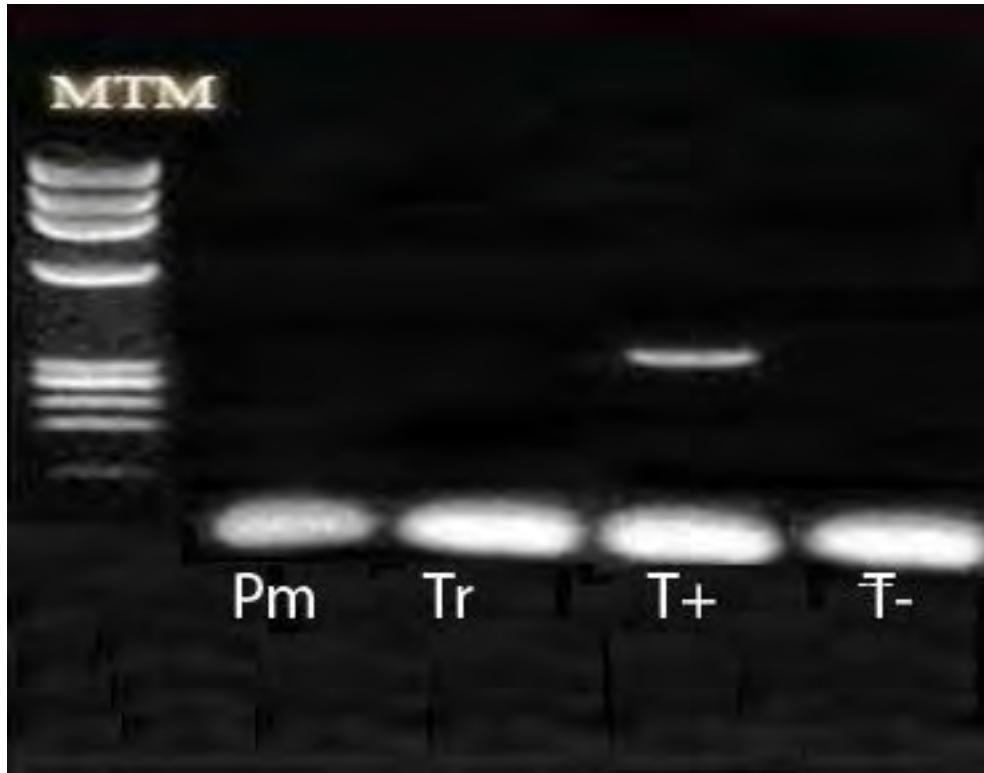


Figure 12 : Photographie du gel après électrophorèse des produits de la PCR.

- Puit 1 (MTM) : échelle de marqueur de taille moléculaire comprise entre 100 et 900 pb
- Puit 2 (Pm) : correspondant aux échantillons de poumons.
- Puit 3 (Tr) : correspondant aux échantillons de trachées.
- Puit 4 (T+) est le témoin positif.
- Puit 5 (T-) est le témoin négatif.

III. DISCUSSIONS

3.1. EXTRACTION

Les résultats de l'extraction, sont vérifiables par dosage au spectrophotomètre à 260 nm. Le rapport des dosages à 260/280 nm doit être compris entre 1,7 et 1,9. Un rapport plus petit indique une contamination par des protéines et des sels. Pour l'extraction nous n'avons pas pu faire la vérification au spectrophotomètre.

3.2. RT-PCR

La taille du témoin positif est comprise entre 300 et 400 pb correspondant à la taille du produit attendu. Les échantillons de trachées et de poumons montrent qu'aucun fragment de cette taille n'a été mis en évidence par comparaison avec le témoin positif.

De même les bandes des échantillons (trachées et poumons) correspondent bien au témoin négatif.

En conséquence aucun des oiseaux morts n'est infecté par des influenzavirus A.

CONCLUSION- PERSPECTIVES

En corrélant ce résultat avec les données du terrain, comme par exemple la mortalité chez les oiseaux du parc zoologique de Hann, on peut écarter toute suspicion d'influenza aviaire. En effet, aucune mortalité suspecte d'oiseaux n'a été signalée après le mois de juin.

Cependant plusieurs semaines après, une nouvelle mortalité suspecte d'oiseaux a été constatée dans le parc de Hann, au mois de septembre. Elle a concerné les espèces suivantes : *Struthio camelus* (autruche), *Phalacrocorax africanus* (cormoran), *Egretta sp* (aigrette), *Haliaeetus vocifer* (aigle pécheur). Tous les oiseaux ont été autopsiés pour prélever des échantillons de poumons et de trachées. Ces derniers ont été testés par la même technique RT-PCR, comme dans le premier cas, pour rechercher des influenzavirus A.

La recherche du gène M de la grippe A/H9, a abouti à des résultats négatifs, confirmant ainsi l'issue de tous les diagnostics de la grippe aviaire, qui ont été entrepris au Sénégal jusqu'ici.

Les échantillons peuvent également être testé par les autres méthodes citées dans la bibliographie comme la culture virale, la sérologie, l'immunofluorescence pour confirmer les résultats obtenus avec la méthode RT-PCR.

Ce type d'étude peut être appliqué aux autres parcs ou réserves, notamment ceux du nord et du centre du Sénégal, dans le cadre d'une surveillance épidémiologique saisonnière de la maladie, pendant l'afflux d'oiseaux migrateurs au niveau des sites avifaunes.

Pour lutter contre les pathogènes des animaux et effectuer une surveillance sanitaire, il est nécessaire d'utiliser des instruments fiables et performants. Ces méthodes bio-moléculaires sont fondées sur une meilleure connaissance génétique des pathogènes.

Elles ont permis un diagnostic plus précis et une discrimination beaucoup plus aisée, entre des virus autrefois difficiles à différencier. Mais ces techniques ne sont pas suffisamment employées pour beaucoup de maladie en Afrique, donc des études doivent être menées dans ce sens, c'est à dire adapter ces techniques dans le contexte, l'environnement et les spécificités de nos pays et réduire leur coût.

BIBLIOGRAPHIE

- 1. A. BENKIRANE, M.M. RWEYEMANU, K.J. WOJCIECHOWSKI, Y. CHENEAU., 1994.** Biotechnologie du diagnostic et de la prévention des maladies animales. Ed. AUPELF-UREF.
- 2. ABERNATHY R.A., LUX., COX N.J., FUKUDA K., 2000.** *Risk of influenza A (H5N1) infection among health care workers exposed to patients with influenza A (H5N1), Hong Kong. J. Infect. Dis., 181, 344.*
- 3. ACHA ET SZYFRES, 2004.** *Animal Health Risk Assessment.*
- 4. AFSSA, 2002.** Rapport du groupe de travail sur le risque de transmission à l'homme des virus influenza aviaires ». AFSSA, Paris, 95 pages.
- 5. ARTOIS M, MANWELL, R. FROMONT, E.. SCHWEYER J.B., 2002.** *Serosurvey for Newcastle Disease and Avian Influenza A Virus Antibodies in Great Cormorants from France. J. of Wildlife Diseases, 38, 169-171*
- 6. BEARD CW., BRUGH M. & JOHNSON DC., 1984.** *Laboratory studies with the Pennsylvania avian influenza viruses (H5N2). Proceedings of the U.S. Animal Health Association 88, 462-473.*
- 7. CAPUA. I, ALEXANDER D. J., 2002.** *Avian influenza and human health. Acta Tropica, 83,16.*
- 8. CAHIERS SANTE VOL. 17, N° 1, janvier-février-mars 2007.**
- 9. CNA (MINISTERE DE L'ELEVAGE / DIREL.** Statistiques de la filière avicole moderne de 1992 à 2005. Direl, Dakar.
- 10. De Jong JC, Claas EC, Osterhaus AD et al., 1997.** *A pandemic warning. Nature. 389,554.*
- 11. DIAGNE B. M., 2004.** Etude de l'impact économique des importations de poulets entiers et en morceaux sur le développement de la filière avicole au Sénégal. Rap de consultation Oxfam International, Dakar, 65 p.
- 12. DIRECTION ELEVAGE (MIN. ELEVAGE), 2004.** Rapport annuel, Direl, 37, Av Pasteur Dakar 137 p.

- 13. D.J., PARSONS G., AND MANVELL, R.J., 1986.** *Experimental assesment of the pathogenicity of eight avian influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quail.* *Avian Pathology* 15, 647-662.
- 14. DOCUMENT DU COMITE NATIONAL DE LUTTE CONTRE LA GRIPPE AVIAIRE (CONAGA), février 2006.**
- 15. EUROPEAN COMMISSION. SCIENTIFIC COMMITEE ON ANIMAL HEALTH AND ANIMAL WELFARE. 2003.** *Diagnostic techniques and vaccines for foot-and-mouth disease, classical swine fever, avian influenza and some other important OIE list Adiseases : report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare.*
- 16. ELYSE POITRAS ET ALAIN HOUDE.** La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology (Canada).* Vol.2, No 2, December 2002. pp.2-11
- 17. FERGUSON NM, FRASER C, DONNELLY CA et al., 2004.** *Public health risk from the avian H5N1 influenza epidemic.* *Science*, , 304, 968-9.
- 18. (FAO ECTAD HPAI SITUATION** *Update March 14, 2007, No134 88)*
- 19. FOUCHIER R.A.M., MUNSTER V., WALLENSTEN A. et al. 2005.** *Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls'.* *Paru dans J. Virology.* Vol. 79, n°5, pp.2814-2822.
- 20. FRIEDBERG EC.,2006.** *The eureka enzyme: the discovery of DNA polymerase.* *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Feb;7(2):143-7.
- 21. GUEYE E. F. 1998.** *Village egg and fowl meat production in Africa. Regional report.* *Poultry Sci. J.*, 54 : 73-86.
- 22. HORIMOTO, T., AND KAWAOKA, Y, 2001.** *Pandemic threat posed by avian influenza A viruses;* *Clinical Microbiology Reviews* 14, 129-149.
- 23. HIGUCHI R, DOLLINGER G, WALSH PS, GRIFFITH R., 1992.** *Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.* 1992. *Biotechnology*; 10:413–7.
- 24. KONTE, M., 2006.** Fiches techniques sur la grippe aviaire : autopsie, prélèvements, diagnostic (Document CONAGA) – 20p.

- 25. LEE CW, SUAREZ DL, 2004.** *Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. Journal of Virological Methods*, 119:151–158.
- 26. LENNETTE EH, SCHMIDT NJ, EDS (1979).** *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, 5th ed. Washington, DC, American Public Health Association.*
- 27. OMS, 2002, WHO.** *Manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Genève, Organisation mondiale de la Santé* (document WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev.1,
- 28. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE.** Le point sur les épidémies. Grippe A (H5N1), Hong Kong, Région administrative spéciale de la Chine : mise à jour. *Relev. Epidémiol. Hebd.*, 2003b, 78, 57-58.
- 29. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE.** Le point sur les épidémies. Grippe aviaire A (H5N1). *Relev. Epidémiol. Hebd.*, 2004b, 79, 43-64.
- 30. SHORTRIDGE K.F., ZHOU N.N., GUAN Y., GAO P., ITO T., KAWAOKA A Y., KODIHALLI S., KRAUSS S., MARKWELL D., MURTI K.G., NORWOOD M., SENNE D., SIMS L., TAKADA A., WEBSTER R.G.** *Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. Virology*, 1998, 252, 331-342.
- 31. STALLKNECHT, D.E. (1998).** *Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations.*
- 32. SPACKMAN ET AL. (2002).** *Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. Journal of Clinical Microbiology*, 40:3256–3260.
- 33. SUBBARAO, K., AND KATZ, J. (2000).** *Review : avian influenza viruses infecting humans. Cellular and molecular life sciences* 57, 1770-1784.
- 34. SWAYNE D.E. & SUAREZ D.L. (2 000).** *Highly pathogenic avian influenza. Rev. sci. tech. Off. int. epiz.*, 20, 463–482.
- 35. SWAYNE DE. & HALVORSON DA., 2003.** *Avian influenza. In Diseases of poultry. 11th edition* Saif YM. et al. (eds). Iowa State University Press, Ames, IA. p. 135-160.

36. TAUBENBERGER, J. K., REID, A. H., KRAFFT, A. E., BIJWAARD, K. E., AND FANNING, T. G. (1997). *Initial, Genetic Characterization of the 1918 Spanish Influenza Virus*. *Science* 275(5307), 1793-1796.
37. TANGX, TIAN G, ZHAO J, ZHOU KY. *Isolation and characterization of prevalent strains of avian influenza viruses in Chin*. *Chin J Anim Poult Infect Dis*. 1998, 20, 1-5.
38. TAUBENBERGER JK, REID AH, WANG R et al. *Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes*. *Nature*, 2005, 437, 889-93.
39. TUMPEY TM, BASLER CF, AGUIKAR PV ET AL. *Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus*. *Science*. 2005, 310, 77-80.
40. WANG M., DI B., ZHOU DH., ZHENG BJ., J H., LIN YP., LIU YF., WU XW., QIN PZ., WANG YL., JIAN LY., LI XZ., XU JX., LU EJ., LI TG. & XU J., 2006. *Food markets with live birds as source of avian influenza*. *Emerg. Infect. Dis*. 12 (11), 1773-1775.
41. WEBSTER, R. G., SHARP, G. B., AND CLAAS, E. C. (1995). *Interspecies transmission of influenza viruses*. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* 152(4 Pt 2), S25-30.
42. WRIGHT KE ET AL. (1995). *Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1180–1184.
43. YUEN KY ET AL. (1998). *Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus*. *Lancet*, 351:467–471.
44. ZAMBON, M. (1998). *Sentinel Surveillance of influenza in Europe, 1997/1998*. *Eurosurveillance* 3, 29-31.
45. ZHOU, N. N., SENNE, D. A., LANDGRAF, J. S., SWENSON, S. L., ERICKSON, G., ROSSOW, K., LIU, L., YOON, K., KRAUSS, S., AND WEBSTER, R. G. (1999). *Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs*. *Journal of Virology* 73(10), 8851-6.

LISTE DES SITES INTERNET CONSULTES

- 46.** http://www.oie.int/eng/AVIAN_INFLUENZA/home.htm
- 47.** http://www.oie.int/downld/AVIAN%20INFLUENZA/A_AI-Asia.htm
- 48.** <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/maps.html>
- 49.** http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/health/diseases-cards/special_avian.html
- 50.** http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/avian_faqs/fr/index.html
- 51.** http://www.who.int/csr/don/2006_02_21/en/index.html
- 52.** http://europa.eu.int/comm/food/animal/diseases/controlmeasures/avian/index_en.htm
- 53.** <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/060209.asp>
- 54.** <http://www.cdc.gov/flu/avian/index.htm>
- 55.** <http://www.cvm.umn.edu/ai/>
- 56.** http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_204_11/e/
- 57.** http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/
- 58.** <http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/science-viral-ai-reflab.htm>
- 59.** http://www.oie.int/eng/AVIAN_INFLUENZA/home.htm
- 60.** http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/Guidance_sharing_viruses_specimen_en/index.html
- 61.** http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_GIP_2005_5/en/index.html
- 62.** <http://www.cvm.umn.edu/ai/> (USDA document)
- 63.** <http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs20025rev.pdf>
- 64.** http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/index.html
- 65.** http://europa.eu.int/comm/health/ph_threats/com/Influenza/images/pathogenic.jpg
- 66.** http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scrah/out93_en.pdf
- 67.** <http://www.agriculture.gouv.fr>

68. <http://www.cvm.umn.edu/ai/> (photos)

69. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/handlingspecimens/en/index.html

70. http://www.fr.wikipedia.org/wiki/image:global_spread_of_H5N1_map.PNG.

Titre : Méthode de diagnostic bio-moléculaire des maladies animales : diagnostic de la grippe aviaire par la technique PCR.

Nom du candidat : Khalidou Abou Dieng

Nature du mémoire : DEA de Biologie Animale

JURY :

<u>Président</u> :	Mr Mady	NDIAYE	FST/UCAD
<u>Membres</u> :	Mr Mamady	KONTE	LNERV/ISRA Dakar
	Mr Cheikh Tidiane	BA	FST/UCAD
	Mr Mbacké	SEMBENE	FST/UCAD
	Mr Louis Joseph	PANGUI	EISMV/Dakar

Directeur de Mémoire: Dr Mamady KONTE

Résumé :

Au Sénégal, l'aviculture (surtout moderne) constitue une activité porteuse de croissance. Le système d'élevage avicole dit moderne, emploie de façon directe, plus de dix milles personnes et procure à l'économie nationale, un chiffre d'affaires annuel de près de quarante milliards de francs.

Pour préserver un secteur aussi dynamique, il faut enrayer tous les périls qui peuvent freiner son développement. Parmi ces menaces, il convient de citer les maladies aviaires et en particulier la grippe aviaire. En effet, cette maladie causée par des Influenzavirus de type A est devenue un péril majeur. La grippe aviaire s'est propagée dans beaucoup de pays en espace de quelques années, avec des conséquences néfastes.

Pour protéger le Sénégal de ce fléau, des mesures ont été prises. Les mesures mises en œuvre concernent entre autres la surveillance active et passive de la volaille domestique et sauvage au niveau des zones à risque comme les parcs et les réserves avifaunes.

Le travail que nous avons effectué rentre dans le cadre de la prévention et de la surveillance passive de la maladie. Il s'agit de faire une surveillance passive de la grippe aviaire au sein du parc zoologique de Hann. Ceci en diagnostiquant systématiquement la maladie chez tout oiseau mort suspect.

L'analyse qu'il nous a été donnée d'effectuer concerne des oiseaux morts, suspects, ramassés au parc zoologique de Hann. C'est ainsi que des échantillons de poumons et de trachées ont été prélevés sur ces oiseaux pour le diagnostic de la maladie.

La méthode de diagnostic utilisée est la RT-PCR : les échantillons de poumons et de trachées ont été traités pour rechercher le gène M commun à toutes les souches des Influenzavirus de type A.

Après révélation sur gel d'agarose, le gène M n'a pas été retrouvé sur aucun des échantillons. Les recherches ont abouti par conséquent à des résultats négatifs, confirmant l'issue de toutes celles qui ont été entreprises au Sénégal jusqu'ici.

Mots clés : grippe aviaire, Influenzavirus A, H9, H5N1, diagnostic, gène M, RT-PCR.