

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

Faculté des Sciences
et Techniques
(FST)



Année : 2010

Ecole Inter-Etats
des Sciences et Médecine
Vétérinaires (EISMV)



N° : 09

ELABORATION D'UN NOUVEAU PROTOCOLE DE VACCINATION CONTRE LA MALADIE DE GUMBORO CHEZ LES POULETS DE CHAIR

MEMOIRE DE DIPLOME DE MASTER II EN SANTE PUBLIQUE VETERINAIRE

**Spécialité : Epidémiologie des maladies transmissibles et gestion des risques
sanitaires**

Option : Epidémiologie et Faune sauvage

Présenté et soutenu publiquement le **07 Août 2010 à 10 heures**

A l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (EISMV) de Dakar

Par :

M. ABDEL-AZIZ ARADA Izzedine

Jury

Président:

M. Louis Joseph PANGUI

Professeur à l'EISMV de Dakar

Membres:

M. Bhen Sikina TOGUEBAYE

Professeur à la FST à l'UCAD

M. Germain Jérôme SAWADOGO

Professeur à l'EISMV de Dakar

Directeur de recherche

M. Ayayi Justin AKAKPO

Professeur à l'EISMV de Dakar

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

DIEU le Tout Puissant, le Miséricordieux, sans lui, rien ne serait possible !

La mémoire de ma mère SADIA ISSA, que Dieu puisse lui accorder son paradis éternel,

La mémoire de ma sœur SALME ARADA IZZEDINE, que son âme repose en paix,

Mon père, mes oncles et tantes, qui n'ont jamais cessé de croire en moi,

Mes frères, sœurs, cousines, cousins, nièces et neveux qui ont toujours fait ma joie,

Mes amis, qui sont toujours là quand j'ai besoin d'eux, plus particulièrement : Dr Mahamat Abdérahim Toko, Dr Ahamat Aboulmali, Ahmat Hassane Moussa, Dr Mahamat Ali, Dr Ahmat Ibrahim, Dr Abakar Mahamat Nour Mallaye, Issa Youssouf, Mihimit Abdoulaye. Que Dieu vous comble de sa bénédiction !

Et à tous ceux qui ont contribué pour que ce travail soit achevé.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord rendre grâce à ALLAH, le Tout Puissant, le Miséricordieux, pour tout ce qu'il fait pour moi.

Je remercie infiniment mes parents de m'avoir donné le maximum d'eux pour que je puisse réussir dans la vie.

Je tiens à remercier de façon particulière :

- M. Ayayi Justin AKAKPO, Professeur à l'EISMV, de m'avoir accepté dans le service de MIPI depuis 2007 et pour avoir dirigé ce travail avec une rigueur scientifique malgré vos multiples occupations. Sans vous, cette étude ne sera pas réalisée. Je vous exprime toute ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements. Que Dieu vous prête une longue vie.
- M. Serge N. BAKOU, Professeur à l'EISMV, pour votre aide très précieuse pendant la réalisation et l'interprétation des coupes histologiques. Merci infiniment.
- M. Moussa SENE, technicien au service de MIPI de l'EISMV, j'ai beaucoup appris auprès de vous. Merci pour votre disponibilité.
- M. Philippe KONE, Maître-assistant au service de MIPI de l'EISMV, pour m'avoir aidé à bien comprendre la biostatistique, mais aussi pour votre sympathie. Sincères remerciements
- M. Alain Richi KAMGA WALADJO, Maître-assistant au service de Chirurgie-Reproduction de l'EISMV, pour vos remarques pertinentes lors de la correction de ce document. Profonde reconnaissance
- M. Adrien MANKOR, Assistant au service d'Economie rurale et Gestion de l'EISMV, pour votre contribution à l'amélioration de la qualité de ce document. Merci beaucoup
- M. Oubri Bassa GBATI, Maître-assistant au service de Parasitologie-Maladies parasitaires-Zoologie appliquée, pour avoir participé à notre formation de master en SPV mais aussi pour votre contribution à l'amélioration de la qualité de ce travail. Merci beaucoup
- M. Aliou NACRO, Agent comptable de l'EISMV, pour vos conseils et encouragements. Merci pour tout

Je remercie également :

Mes ami(e)s : Dr Ahamat Aboulmali Abdelkerim, Ahmat Hassane Moussa, Dr Mahamat Abderahim Toko, Dr Mahamat Ali Mahamat Amine, Mihimit Abdoulaye, Dr Ahmat Ibrahim, Dr Abakar Mahamat Nour Mallaye, Adoum Hassane Mahamat, Yerima Adoum Mangoussi, Anis Moussa, Issa Yousseuf, Abdramane Haliki, Halimé-Sadia Mahamat Amine, Aché Bilah, Dr Frankline Enédé, Mahamat Abdallah Gouroumy, Minda Mahamat Saleh, Abdelaziz Cherif, Dr Elie Badai, Oumar Brahim, Moustapha Oumar, Dr Vounba Passoret, Ganda Adoum Malato, Mahamat saleh Abderahim, Dr Mahamat Abdoulaye Béchir, Dr Oumar Bada Algom, Ismaïl Issa, Abba Idriss, Khidir Idjeimi, Moussa Abdramane, Dr Walbadet lucain, Yousseuf Daoud Kherdja, Yousseuf Moussa Ezaï, Mbailao Ngoussou, Dr Jean-Marc Feussom, Dr Yoboué José Noël Koffi.

A tous ceux qui n'ont pas été cités ici mais que je porte toujours dans mon cœur.

A NOS MAITRES ET JUGES

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY

Le professeur Louis Joseph PANGUI

Honorable maître, vous avez accepté de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Nous avons beaucoup apprécié votre amour pour le travail bien fait. Cela fait de vous un éminent homme de science unanimement reconnu. Soyez assuré de notre profonde reconnaissance.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Le professeur Bhen Sikina TOGUEBAYE

Cher maître, nous avons été impressionnés par la promptitude avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail. Votre disponibilité et votre rigueur scientifique font de vous un maître estimé par ses pairs et respecté par ses élèves. Veuillez recevoir nos profonds remerciements.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Le professeur Germain Jérôme SAWADOGO

Cher maître, nous avons découvert en vous un maître exemplaire. Nul n'est besoin de souligner ici vos qualités humaines et scientifiques, elles font l'unanimité. Veuillez recevoir nos profonds remerciements.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE MEMOIRE

Le professeur Ayayi Justin AKAKPO

Cher Maître, vous nous avez accueillis dans votre laboratoire, nous avons apprécié vos qualités aussi bien scientifiques que sociales. La patience, la compréhension dont vous avez fait preuve en encadrant ce mémoire font de vous une personnalité exemplaire.

Soyez rassuré de notre plus grande admiration et sincère reconnaissance.

Résumé

Ce travail a été réalisé à l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar, et a pour objectif l'élaboration d'un nouveau protocole de vaccination contre la maladie de Gumboro chez les poulets de chair. Il s'est déroulé d'octobre 2007 à août 2008. Au total, 2100 poussins chair constitués en cinq bandes ont été mis en expérimentation et vaccinés avec différents protocoles de vaccination.

Les résultats obtenus montrent que tous les lots des différentes bandes de poulets ont très bien répondu à la vaccination (avec des titres en anticorps supérieurs au seuil de protection), bien que les protocoles vaccinaux utilisés soient différents. En effet, sur le plan statistique, une différence significative a été observée entre les différents protocoles utilisant une association de vaccins (VV+VI) et ceux utilisant uniquement le vaccin vivant une seule fois ($p < 0,05$). L'estimation du coût de la vaccination par protocole a indiqué que, les protocoles utilisant uniquement le vaccin inactivé sont les plus coûteux, donc moins rentables par rapport aux autres protocoles.

Le marquage à l'antigène PCNA a permis de voir les cellules en prolifération. Cependant il n'est pas spécifique aux lymphocytes B et T, c'est ce qui nous a pas permis de déterminer le type des cellules lymphocytaires en prolifération au moment de la chute des anticorps entre le 25^{ème} et le 30^{ème} jour de vie. Il aurait fallu utiliser des marqueurs spécifiques pour les cellules B et T.

Toutefois, l'étude a permis de déterminer la demi-vie des anticorps chez les poussins chair. Cette demi-vie est de 4 jours, comme cela a été décrit dans la littérature. En outre, la nouvelle formule proposée, nous a permis d'établir une table de détermination de l'âge optimal de vaccination contre la maladie chez les poulets de chair standard.

Mots clés : Elaboration- Protocole de vaccination – poulets de chair – maladie de Gumboro.

Abstract

This work was carried out in Inter-States School of Science and Veterinary Medicine of Dakar, and aims to develop a new protocol for vaccination against infectious bursal disease in broilers. This study was conducted October 2007 to August 2008. In total, 2100 chicks reorganized into five bands have been experimenting with different vaccination protocols.

The results show that all the lots of different bands of chickens have responded very well to immunization with antibodies above the threshold of protection, although the vaccination protocols used are different. In fact, statistically, a significant difference was observed between different protocols using a combination vaccine (VV + VI) and those using only a single live vaccine ($p < 0.05$). The estimated cost of the vaccination protocol has shown that protocols using only the inactivated vaccine are more expensive and therefore less profitable compared to other protocols.

The tagging antigen PCNA allowed to see the proliferating cells. However it is not specific to B cells and T is what we were not able to determine the type of lymphocyte cells proliferating at the time of the fall of antibodies between the 25th and 30th day of life. It would have had to use specific markers for B and T cells. However, the study has determined the half-life of antibodies in meat chickens. This half-life is 4 days, as has been described in the literature. Furthermore, the new proposed formula has allowed us to establish a table for determining the optimum age for vaccination against the disease in broilers standard.

Keywords: Development- vaccination Protocol - broilers - Gumboro disease.

Liste des figures

Figure 1 : Coupe longitudinale de la bourse de Fabricius et du cloaque.....	3
Figure 2 : Structure de la bourse de Fabricius.....	4
Figure 3 : Matériel pour l’histologie.....	9
Figure 4 : Evolution des titres en anticorps des poussins témoins des différentes bandes.....	16
Figure 5 : Evolution des titres en anticorps de poulets de chair de la bande N°1..	16
Figure 6 : Evolution des titres en anticorps de poulets de chair de la bande N°2...18	18
Figure 7 : Evolution des titres en anticorps de poulets de chair de la bande N°3...19	19
Figure 8 : Evolution des titres en anticorps de poulets de chair de la bande N°4...19	19
Figure 9 : Evolution des titres en anticorps de poulets de chair de la bande N°5...20	20
Figure 10 : Evolution des titres en anticorps des lots vaccinés avec de vaccins vivants atténués.....	21
Figure 11 : Evolution des titres en anticorps des lots vaccinés avec un vaccin inactivé.....	21
Figure 12 : Evolution des titres en anticorps des lots vaccinés avec de vaccins vivants atténués et vaccin inactivé.....	22
Figure 13 : Prolifération cellulaire dans les lobules bursiques des poulets de chair témoins de la bande N°1.....	22
Figure 14 : Lobules bursiques de poulet de chair témoin de la bande N°1.....	23
Figure 15 : Prolifération cellulaire dans les lobules bursiques des poulets de chair du lot 3 de la bande N°1.....	23
Figure 16 : Prolifération cellulaire dans les lobules bursiques des poulets de chair du lot 5 de la bande N°1.....	24
Figure 17 : Dégénérescence cellulaire au niveau de la médullaire des poulets de chair du lot 5 de la bande N°1 à J27.....	25
Figure 18 : Prolifération cellulaire dans les lobules bursiques des poulets de chair du lot 5 de la bande N°1.....	25
Figure 19 : Prolifération cellulaire au niveau de la médullaire des poulets de chair du lot 6 de la bande N°1 à J30.....	26

Liste des tableaux

Tableau I : Vaccins utilisés.....	8
Tableau II : Protocole de vaccination de la bande de poulets de chair N°1.....	9
Tableau III: Protocole de vaccination de la bande de poulets de chair N°2.....	10
Tableau IV: Protocole de vaccination de la bande de poulets de chair N°3.....	10
Tableau V : Protocole de vaccination de la bande de poulets de chair N°4.....	10
Tableau VI : Protocole de vaccination de la bande de poulets de chair N°5.....	10
Tableau VII: Evaluation du prix des protocoles vaccinaux pour un poussin.....	26

Liste des abréviations

ARN : Acide Ribonucléique

CV : Coefficient de Variation

DAB : Diaminobenzidine

DO : Densité Optique

EISMV : Ecole Inter-Etats des Sciences et de Médecine Vétérinaires

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

FCFA : Franc de la Communauté Financière Africaine

HE: Hémalun Eosine

IgG : Immunoglobuline G

MIPI : Microbiologie Immunologie Pathologie Infectieuse

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCNA : Antigène nucléaire de prolifération cellulaire

SEDIMA : Sénégalaise de Distribution de Matériel Avicole

USA: United States of America

VI : Vaccin Inactivé

VV : Vaccin Vivant

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
PREMIERE PARTIE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	2
I. Généralités sur la maladie de Gumboro.....	2
1.1. Définition et importance	2
1.2. Répartition géographique de la maladie de Gumboro.....	2
1.3. Propriétés biologiques.....	2
1.3.1. Pouvoir pathogène.....	2
1.3.2. Pouvoir antigénique et immunogène.....	3
1.4. Pathogénie.....	3
1.4.1. Mécanisme pathogénique.....	3
1.4.2. Conséquences physiopathologiques.....	4
1.5. Bases de la lutte contre la maladie de Gumboro.....	4
1.5.1. Diagnostic sur le terrain	4
1.5.1.1. <i>Eléments épidémiologiques et cliniques</i>	4
1.5.1.2. <i>Eléments nécropsiques</i>	4
1.5.1.3. <i>Eléments différentiels</i>	4
1.5.2. Diagnostic de laboratoire	5
1.5.2.1. <i>Diagnostic histopathologique</i>	5
1.5.2.2. <i>Diagnostic virologique direct</i>	5
1.5.2.2.1. <i>Inoculation du virus</i>	5
1.5.2.2.2. <i>Immunofluorescence directe</i>	5
1.5.2.3. <i>Diagnostic virologique indirect ou sérologique</i>	5
1.5.3. Prophylaxie contre la maladie de Gumboro.....	5
1.5.3.1. <i>Prophylaxie sanitaire</i>	5
1.5.3.2. <i>Prophylaxie médicale</i>	6

DEUXIEME PARTIE : ELABORATION D'UN NOUVEAU PROTOCOLE DE VACCINATION CONTRE LA MALADIE DE GUMBORO	8
Chapitre 1 : Matériel et méthodes	8
1.1. Zone et période de travail.....	8
1.2. Matériel	8
1.2.1. Matériel animal	8
1.2.2. Matériel de prélèvements	8
1.2.3. Vaccins utilisés.....	8
1.2.4. Matériel de laboratoire	8
1.3. Méthodes.....	9
1.3.1. Protocoles de vaccination.....	9
1.3.2. Calcul du coût de protocoles de vaccination.....	10
1.3.3. Technique de prise de sang	11
1.3.4. Technique de prélèvements de la bourse de Fabricius.....	11
1.3.5. Méthodes de laboratoire.....	11
1.3.5.1. <i>Technique de récolte du sérum</i>	11
1.3.5.2. <i>Analyse sérologique par ELISA indirect</i>	11
1.3.5.3. <i>Techniques d'histopathologie</i>	12
1.3.5.3.1. Technique de fixation des prélèvements.....	12
1.3.5.3.2. Technique de la déshydratation des prélèvements	12
1.3.5.3.3. Technique d'inclusion en paraffine ou enrobage.....	12
1.3.5.3.4. Technique de coupe.....	13
1.3.5.3.5. Séchage des lames.....	13
1.3.5.3.6. Coloration des coupes	13
1.3.6. Analyses statistiques	15
Chapitre 2 : Résultats – Discussion - Recommandations.....	16
2.1. Résultats et discussion.....	16

2.1.1.	Profil sérologique des bandes témoins.....	16
2.1.2.	Profil sérologique de poulets des bandes vaccinées.....	16
2.1.2.1.	<i>Profil sérologique de poulets de chair de la bande N° 1</i>	16
2.1.2.2.	<i>Profil sérologique de poulets de chair de la bande N° 2</i>	18
2.1.2.3.	<i>Profil sérologique de poulets de chair de la bande N° 3</i>	18
2.1.2.4.	<i>Profil sérologique de poulets de chair de la bande N° 4</i>	19
2.1.2.5.	<i>Profil sérologique de poulets de chair de la bande N° 5</i>	20
2.1.3.	Appréciation des différents protocoles en fonction des types de vaccins.....	20
2.1.3.1.	<i>Vaccination avec des vaccins vivants atténués</i>	20
2.1.3.2.	<i>Vaccination avec un vaccin inactivé</i>	21
2.1.3.3.	<i>Vaccination avec une association des vaccins (VV + VI)</i>	21
2.1.4.	Histologie des bourses de Fabricius.....	22
2.1.4.1.	<i>Histologie des bourses de Fabricius de poulets de la bande N°1</i>	22
2.1.4.1.1.	Prolifération cellulaire chez les poulets de chair du lot 1 (témoin).....	22
2.1.4.1.2.	Prolifération cellulaire chez les poulets de chair du lot 3	23
2.1.4.1.3.	Prolifération cellulaire chez les poulets de chair du lot 5	24
2.1.4.1.4.	Prolifération cellulaire chez les poulets de chair du lot 6	25
2.1.5.	Coût de la vaccination par protocole.....	26
2.2.	Recommandations	27
2.2.1.	Aux responsables de laboratoire de MIPI de L'EISMV	27
2.2.2.	Aux techniciens.....	27
2.2.3.	Aux propriétaires des couvoirs.....	28
2.2.4.	Aux éleveurs.....	28
	Conclusion.....	28
	Bibliographie.....	29

Introduction

Au Sénégal, du fait de la croissance démographique, la demande en protéines d'origine animale a fortement augmenté. Pour répondre à ce besoin pressant, l'Etat a opté pour le développement de l'élevage d'espèces à cycle court notamment la volaille. C'est ainsi que l'on assiste à la mise en place de nombreuses unités de production de poulets de chair en zone urbaine et périurbaine de Dakar au cours de ces dernières années.

Cependant, l'intensification de cette production s'accompagne de nombreux problèmes. En effet, la proximité des élevages, la présence fréquente de volailles traditionnelles, la concentration des animaux dans un endroit unique et l'utilisation de souches sélectionnées plus productrices mais plus sensibles ont favorisé le développement de nombreuses maladies dont la maladie de Gumboro. Cette maladie représente une véritable entrave à la rentabilité des élevages à cause de la mortalité et surtout de la morbidité qu'elle provoque dans les élevages avicoles au Sénégal.

De nombreuses études ont été menées sur la vaccination contre cette maladie (CARDINALE et coll., 1998 ; TCHAMDJA, 2001 ; KOUZOUKENDE, 2004 ; ABDELAZIZ ARADA, 2007 ; MOUGANG, 2008). Malgré la vaccination, la maladie de Gumboro continue de sévir dans les élevages vaccinés. Les raisons de l'échec de la vaccination évoquées par ces auteurs sont nombreuses. Le choix de la date de vaccination est l'une des principales raisons évoquées par les auteurs pour expliquer cet échec. C'est dans le but de remédier à ce problème que nous avons entrepris une étude expérimentale pour tester une nouvelle formule de détermination de l'âge optimal de vaccination, puis élaborer un nouveau protocole de vaccination contre la maladie de Gumboro.

L'objectif général de notre travail est de promouvoir la rentabilité de l'élevage avicole par une maîtrise de la couverture sanitaire des oiseaux. Les objectifs spécifiques sont : apprécier la couverture immunitaire des oiseaux suite à l'application des différents protocoles vaccinaux, déterminer la demi-vie des anticorps maternels chez les poussins de lots témoins et proposer un protocole de vaccination fiable.

La première partie bibliographique est consacrée aux généralités sur la maladie de Gumboro. La deuxième partie présentera nos travaux qui portent sur l'élaboration d'un nouveau protocole de vaccination contre la maladie de Gumboro. Les résultats obtenus nous permettront de tirer des conclusions et de faire des recommandations.

PREMIERE PARTIE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Généralités sur la maladie de Gumboro

1.1. Définition et importance

La maladie de Gumboro est une maladie hautement contagieuse, virulente, inoculable, due à un virus à ARN appartenant au genre *Birnavirus*. Elle est aussi appelée Bursite Infectieuse. Cette maladie frappe tous les gallinacés et se caractérise cliniquement par des troubles digestifs (diarrhée blanchâtre), de l'apathie, de l'anorexie, des tremblements musculaires et sur le plan anatomopathologique par une inflammation de la bourse de Fabricius.

Elle a une importance à la fois économique et médicale.

Sur le plan économique, elle entraîne une morbidité moyenne de 20 à 100%. Le taux de mortalité est en général faible. Toutefois, il peut avoir un pic de 5 à 60% (VANMARCK, 1992).

Sur le plan médical, le virus a un effet immunodépresseur marqué, pouvant être à l'origine des échecs vaccinaux contre certaines maladies (GAMBRIONE et coll., 1976).

1.2. Répartition géographique de la maladie de Gumboro

La maladie de Gumboro est une maladie cosmopolite. Des USA, elle s'est propagée dans le reste du monde, à savoir l'Europe via la Grande Bretagne, l'Asie, et l'Afrique où son identification a été tardive. De nos jours, la maladie de Gumboro sévit dans plusieurs pays africains, parmi lesquels le Sénégal.

1.3. Propriétés biologiques

1.3.1. Pouvoir pathogène

Le pouvoir pathogène est variable tant dans les conditions naturelles qu'expérimentales.

Dans les conditions naturelles : le virus est naturellement pathogène pour les oiseaux plus précisément les gallinacés. L'infection entraîne une immunodépression durable. Dans les 3 premières semaines de vie, l'infection précoce provoque une infection subclinique moins grave mais une immunodépression sévère. Les 4^{ème} et 5^{ème} semaines de vie représentent l'âge de la plus grande sensibilité au virus (LEY et coll., 1983). En effet, les poulets âgés de plus de 3 semaines sont beaucoup plus sensibles parce qu'ils ont plus de cellules cibles (lymphocytes B) dans la bourse de Fabricius pour la réplication virale (GAMBRIONE et coll., 1976). Il se développe donc des formes aiguës de la maladie de Gumboro.

Dans les conditions expérimentales : l'embryon de moins de 6 jours est moins sensible au virus que celui de 12 jours. Le passage en série sur une culture cellulaire du virus entraîne l'atténuation de son pouvoir pathogène. Le virus atténué peut être utilisé pour la production des vaccins (GAMBRIONE et coll., 1976).

1.3.2. Pouvoir antigénique et immunogène

Le virus de la maladie de Gumboro possède des antigènes qui induisent la formation des anticorps neutralisants et précipitants qui peuvent être mis en évidence par l'immunofluorescence ou par la technique ELISA indirect (LEY et coll., 1983).

1.4. Pathogénie

1.4.1. Mécanisme pathogénique

Le virus entre dans l'organisme par la voie orale. Il est capté par les cellules macrophagiques ou cellules M du dôme des plaques de Peyer (tissu lymphoïde associé aux muqueuses intestinales) et transféré dans la muqueuse intestinale où il infecte les cellules lymphoïdes. Il emprunte la voie sanguine, parvient au foie et infecte les cellules de Küpffer. A la faveur d'une virémie, le virus arrive dans la bourse de Fabricius et infecte les cellules lymphoïdes de type B.

La bourse de Fabricius est un organe lymphoïde primaire, impair et médian rencontré uniquement chez les oiseaux. Elle présente également certaines propriétés des organes lymphoïdes secondaires. La bourse de Fabricius est un organe creux situé dorsalement au cloaque (figure 1). Son poids relatif augmente jusqu'à la puberté puis régresse (VILLATE, 1997).

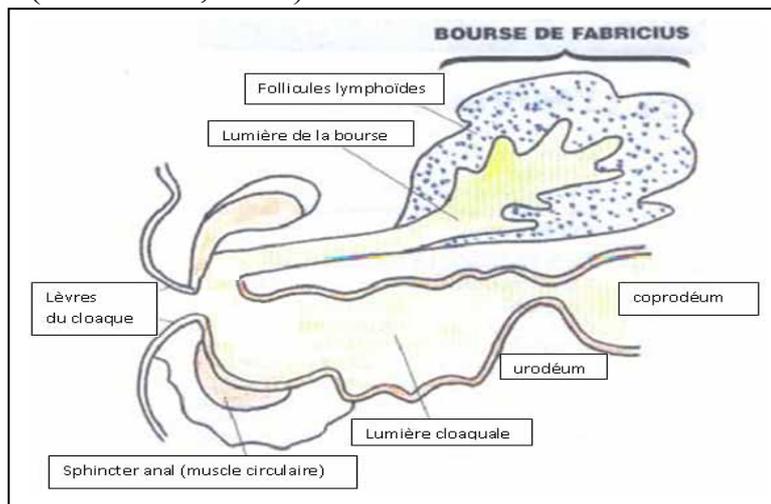


Figure 1 : Coupe longitudinale de la bourse de Fabricius et du cloaque (VILLATE, 1997).

KING et McLELLAND (1984) ont montré que la bourse de Fabricius est entourée d'un épithélium ciliaire simple et le tissu conjonctif sous l'épithélium est plein de follicules. Ce follicule comporte un cortex et une médulla (Figure 2). La population lymphocytaire de la bourse de Fabricius est composée de 85 à 90% de cellules B, moins de 4% de cellules T et d'autres cellules lymphoïdes (KIM et coll., 2000).

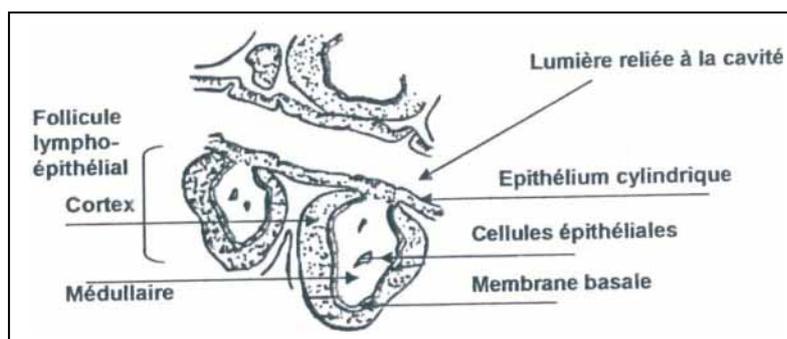


Figure 2 : Structure de la bourse de Fabricius (BACH, 1986).

1.4.2. Conséquences physiopathologiques

Les conséquences physiopathologiques de l'infection sont nombreuses. Il s'agit entre autres de : la diarrhée entraînant des déshydratations, la libération de thromboplastine (coagulation intra vasculaire disséminée), les dépôts d'immuns-complexes au niveau de la paroi vasculaire, les hémorragies musculaires et les lésions rénales ;

1.5. Bases de la lutte contre la maladie de Gumboro

1.5.1. Diagnostic sur le terrain

1.5.1.1. Eléments épidémiologiques et cliniques

La maladie de Gumboro doit être suspectée chaque fois qu'un processus pathologique apparaît brutalement sur les poulets âgés de plus de 3 semaines avec des signes généraux d'abattement, de prostration, des signes digestifs de diarrhée blanchâtre aqueuse pouvant contenir des caillots de sang. L'allure caractéristique de la courbe des mortalités, le taux de mortalité de 5 à 60% et une durée courte de la maladie (5 à 7 jours) sont des éléments à prendre en compte dans la suspicion de la maladie (VANMARCK, 1992).

1.5.1.2. Eléments nécropsiques

A l'autopsie, les lésions hémorragiques au niveau des muscles squelettiques, des cuisses et des pectoraux, aussi une hypertrophie ou une atrophie de la bourse de Fabricius sont observés (HANSON, 1967). Tout cela va renforcer la suspicion de la maladie.

Il faut cependant être prudent pour écarter les affections qui peuvent ressembler à la maladie de Gumboro d'où l'intérêt de prendre en compte les éléments différentiels.

1.5.1.3. Eléments différentiels

Certaines maladies peuvent prêter à confusion avec la maladie de Gumboro soit par les symptômes, soit par le taux et la durée de la mortalité, soit par des lésions observées sur des cadavres. En effet, il faut distinguer la maladie de Gumboro des symptômes toxiques qui certes, apparaissent brutalement mais peuvent entraîner jusqu'à 100% de mortalité mais sans provoquer de lésions caractéristiques. On peut écarter aussi la lipidose hépatorénale, du fait de la faible mortalité qu'elle entraîne sur des sujets de 3 semaines et de ses lésions rénales, mais elle n'entraîne pas de

lésions au niveau de la bourse de Fabricius. Cependant, il y a des affections comme l'avitaminose A, la leucose lymphoïde et la maladie de Marek qui peuvent entraîner des lésions de la bourse de Fabricius mais à l'histologie on s'aperçoit que dans l'avitaminose A, il s'agit d'une métaplasie épithéliale et dans la maladie de Marek et les leucoses, il s'agit des processus tumoraux. Si le doute persiste encore, il faut faire recours au diagnostic de laboratoire.

1.5.2. Diagnostic de laboratoire

1.5.2.1. Diagnostic histopathologique

L'examen histopathologique met en évidence des lésions œdémateuses, hémorragiques et nécrosantes ou l'atrophie folliculaire de la bourse de Fabricius.

1.5.2.2. Diagnostic virologique direct

Deux techniques sont couramment utilisées pour mettre en évidence la maladie de Gumboro. Il s'agit des techniques de l'inoculation et de l'immunofluorescence.

1.5.2.2.1. Inoculation du virus

L'inoculation consiste à inoculer des broyats de bourse de Fabricius suspects aux poulets sensibles (3 à 6 semaines d'âge et dépourvus d'anticorps spécifiques). En effet, après 3 jours d'inoculation, quelques poulets inoculés seront sacrifiés pour rechercher des lésions histopathologiques caractéristiques sur les bourses de Fabricius. Au bout de 6 jours, les poulets inoculés restants seront sacrifiés pour rechercher des lésions macroscopiques sur leurs cadavres.

1.5.2.2.2. Immunofluorescence directe

L'immunofluorescence directe consiste à mettre en évidence les antigènes du virus au niveau de la bourse de Fabricius, grâce à la réaction antigène-anticorps, en utilisant des immunoglobulines antiviral Gumboro marquées par la fluorescéine.

1.5.2.3. Diagnostic virologique indirect ou sérologique

La sérologie met en évidence le passage des antigènes viraux. En effet, des prélèvements de sang seront effectués sur les oiseaux à des intervalles réguliers pour voir la cinétique des anticorps. Trois techniques sont utilisées :

- la technique de précipitation en milieu gélosé : elle est sensible et peu onéreuse ;
- la technique de séroneutralisation : elle est sensible mais délicate et onéreuse ;
- la technique ELISA : elle est facile à mettre en œuvre mais nécessite des Kits ELISA relativement coûteux. Elle donne de très bons résultats.

1.5.3. Prophylaxie contre la maladie de Gumboro

1.5.3.1. Prophylaxie sanitaire

Elle repose sur les règles d'hygiène de base : nettoyage et désinfection, un vide sanitaire de 15 jours au minimum doit précéder l'arrivée d'une nouvelle bande etc.

1.5.3.2. Prophylaxie médicale

La vaccination est actuellement la seule méthode efficace dans la prévention des maladies virales. Elle permet de renforcer les défenses immunitaires de l'individu. Ainsi, la prophylaxie médicale de la maladie de Gumboro est basée d'une part sur l'immunisation des reproductrices afin qu'elles transmettent une immunité passive à leur descendance et d'autre part sur une vaccination des poussins permettant une stimulation active de leur immunité.

1.5.3.2.1. Différents vaccins utilisés

On distingue plusieurs types de vaccins : les vaccins inactivés, vivants atténués et vaccins recombinants.

Les vaccins inactivés : ils sont fabriqués à partir des virus tués. Ces vaccins ne permettent pas la diffusion de la souche vaccinale. DESBORGES (1999) a montré que les vaccins inactivés sont totalement inoffensifs et insensibles aux anticorps maternels des poussins. Ils induisent une protection progressive et durable ;

Les vaccins vivants atténués : fabriqués à base des virus vivants atténués. Ils sont peu onéreux et permettent une administration rapide à un grand nombre d'animaux à travers l'eau de boisson. Ces vaccins induisent une immunité active rapide et moins durable. CONSTANTIN (1988) a montré que les vaccins vivants atténués utilisés très précocement sont neutralisés par les anticorps d'origine maternelle chez les poussins ;

Les vaccins recombinants : ils sont fabriqués à partir des virus vivants codant pour des protéines de la maladie de Gumboro (VAN LOON et coll., 1997).

1.5.3.2.2. Programme de vaccination contre la maladie de Gumboro

En règle générale, tous les reproducteurs sont vaccinés avant l'entrée en ponte (16-18^{ème} semaine) avec un vaccin inactivé, hautement immunogène, leur permettant de transmettre aux poussins des taux en anticorps élevés (WYETH et CULLEN, 1978). Ces anticorps maternels protégeront les poussins pendant les 3 premières semaines de vie. Les poussins dépourvus d'anticorps maternels doivent alors être vaccinés à la naissance avec une souche très atténuée qui n'entraîne ni lésions de la bourse de Fabricius, ni un effet immunodépresseur. Dans le cas contraire, la vaccination doit être soit différée, car les souches vaccinales atténuées sont neutralisées par les anticorps maternels soit pratiquée avec des souches dite « chaudes » (moins atténuées) qui confèrent une bonne protection en présence d'anticorps maternels (FERRE et BELLOC, 2005).

La bonne stimulation immunitaire contre la maladie de Gumboro dépend surtout du niveau du titre en anticorps d'origine maternelle des poussins. En effet, une vaccination est efficace lorsqu'il existe un titre en anticorps d'origine maternelle compatible avec la souche vaccinale, soit un titre de 350 en ELISA pour les vaccins intermédiaires et 500 pour les vaccins à souches dites « chaudes » (kit IDEXX®) (FERRE et BELLOC, 2005). Paradoxalement KOUZOUKENDE (2004), ABDELAZIZ ARADA (2007) et MOUGANG (2008) ont montré qu'une bonne réaction immunitaire est obtenue avec un titre en anticorps d'origine maternelle

beaucoup plus élevé que ceux fixés par les deux auteurs précédents, respectivement 550 et 750 en moyenne.

La vaccination avec le vaccin inactivé peut se faire sans problème à l'âge d'un jour, car ce vaccin inactivé est insensible aux anticorps maternels (DESBORGES, 1999).

Dans la région de Dakar, l'observation de la cinétique des anticorps a révélé que 52,6% des poussins produits avaient un seuil de protection bas à partir de la 3^{ème} semaine (CARDINALE et coll., 1998).

Malgré les mesures sanitaires et médicales mises en place, on constate toujours que la maladie de Gumboro persiste dans les élevages avicoles de la région de Dakar. De nombreuses études ont été menées sur le protocole de vaccination contre cette maladie. TCHAMDJA (2001) a montré qu'une vaccination avec un vaccin vivant atténué à souche dite « intermédiaire », administré une seule fois n'est pas suffisante pour protéger les poussins contre la maladie de Gumboro dans une zone où la pression virale est très élevée. Il faut donc faire nécessairement un rappel vaccinal. KOUZOUKENDE (2004) et MOUGANG (2008) ont montré qu'un protocole de vaccination associant un vaccin inactivé et un vaccin vivant atténué protège mieux les poussins contre cette maladie. Cette association de vaccins permet aux poussins de garder leur titre en anticorps très haut au dessus du seuil de protection qui est de 1250 selon GARDIN (1991). ABDELAZIZ ARADA (2007) a montré que l'une des causes de l'échec de la vaccination contre la maladie de Gumboro est la date fixée par certaines firmes de la place et certains vétérinaires pour vacciner contre cette maladie. Cette date choisie est un peu tardive et ne respectant pas exactement la décroissance réelle des anticorps maternels chez les poussins.

C'est dans le but d'élaborer un nouveau protocole de vaccination pour obtenir une bonne réponse immunitaire que nous avons entrepris une étude comparative des différents protocoles de vaccination contre la maladie de Gumboro en conditions expérimentales. Cette étude permet de retenir le meilleur protocole en relation avec l'image des cellules immunitaires et d'évaluer son coût sur la production finale. Cela fait l'objet de la deuxième partie de notre travail.

DEUXIEME PARTIE : ELABORATION D'UN NOUVEAU PROTOCOLE DE VACCINATION CONTRE LA MALADIE DE GUMBORO

Chapitre 1 : Matériel et méthodes

1.1. Zone et période de travail

Notre élevage expérimental a été conduit dans l'enceinte de l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine Vétérinaires (E.I.S.M.V) de Dakar.

L'expérimentation s'est déroulée d'octobre 2007 à août 2008.

1.2. Matériel

1.2.1. Matériel animal

Le matériel animal est représenté par les poulets de chair de souche Cobb500. Un échantillon de 2100 poussins chair répartis en cinq bandes était mis en expérimentation.

Les poussins d'un jour provenaient du couvoir de la Sénégalaise de Distribution de Matériel Avicole (SEDIMA). Ils ont été élevés dans les bonnes conditions d'élevage et nourris avec de l'aliment industriel provenant également de la SEDIMA.

1.2.2. Matériel de prélèvements

Pour le prélèvement de sang, le matériel utilisé est le suivant : des aiguilles, des tubes VENOJECT[®], des tubes secs et des portes tubes. Des marqueurs ont été utilisés pour identifier les échantillons.

Pour le prélèvement des Bourses de Fabricius, le matériel suivant a été utilisé : une table de dissection, un couteau, une manche de bistouri n°4, une pince de dissection, des lames de dissection n°22, des gants et des bocaux de prélèvements.

1.2.3. Vaccins utilisés

Les différents vaccins utilisés sont ceux disponibles sur le marché de Dakar et ils sont mentionnés dans le tableau I.

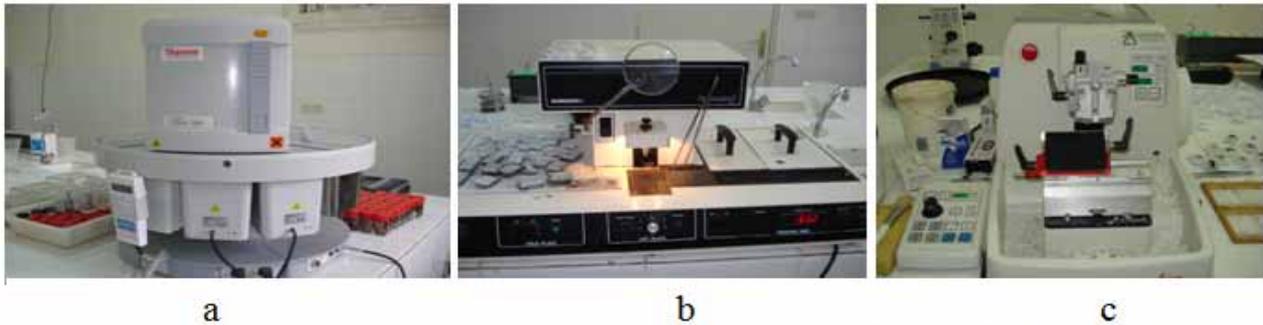
Tableau I : Vaccins utilisés

<i>Nom du vaccin</i>	<i>Caractéristiques du vaccin</i>	<i>N° du vaccin</i>
GUMBOPEST [®]	Vaccin inactivé adjuvé bivalent (antiGumboro et Newcastle)	L191644
AVI IBD inter [®]	Vaccin vivant atténué lyophilisé (souche intermédiaire)	0205P1HKA
CEVAC IBDL [®]	Vaccin vivant atténué lyophilisé (souche chaude)	2305R2S1B

1.2.4. Matériel de laboratoire

Pour la réalisation des coupes histologiques, le matériel classique pour l'histologie a été utilisé (figure 3): bocaux de prélèvements, lames porte-objets, lamelles, formol à 10%, automate SHANDON-CITADEL1000 (figure 3a), histocentre2 (figure 3b), microtome Leica RM 2255 (figure 3c), bain-marie, étuve, microscope photonique de type « Olympus BH-2 » muni d'un appareil microphotographique.

Par ailleurs, les kits suivants ont été utilisés : CIVTEST AVID IBD[®] pour le test ELISA, K0679-DAKO LSABTM+/HRP[®] et K3468-DAKO[®] pour l'immunomarquage.



Photos : ABDEL-AZIZ ARADA

Figure 3 : Matériel pour l'histologie

1.3. Méthodes

1.3.1. Protocoles de vaccination

Les poussins ont été d'abord regroupés en lots identifiables par un marquage à l'aile. Les lots témoins et lots vaccinés ont été élevés dans des bâtiments différents pour éviter la contamination par le virus vaccinal (vaccin vivant atténué).

Le vaccin inactivé a été administré à la dose de 0,3ml/poussin par la voie sous cutanée. Les vaccins vivants atténués lyophilisés ont été reconstitués extemporanément avec de l'eau minérale et administrés par voie oculo-nasale (trempage de bec jusqu'au niveau des yeux).

Plusieurs protocoles de vaccination ont été utilisés lors de cette expérimentation. En effet, pour chaque nouvelle bande, le titre moyen d'anticorps maternels et l'écartype ont été déterminés sur un échantillon de 20 poussins d'un jour. Cela nous a permis de calculer le coefficient de variation ($CV = \frac{\text{Ecartype}}{\text{Moyenne}} \times 100$) pour voir si le lot des poussins

est homogène ou hétérogène. Ensuite, à partir de la nouvelle formule que nous voulons tester, une date optimale de vaccination a été fixée en tenant compte non seulement du niveau de titre moyen d'anticorps maternels de poussins d'un jour, mais aussi de la souche vaccinale et de la demi-vie des anticorps chez les poussins.

Les tableaux (II, III, IV, V et VI) présentent les protocoles de vaccination des différentes bandes de poulets de chair mises en place.

Tableau II : Protocoles de vaccination de la bande de poulets de chair N°1

Lots d'oiseaux	Protocole			Effectif d'oiseaux
	Date de vaccination	Voie d'inoculation	N° de lot du vaccin	
Lot1 (Témoin)	-	-	-	150
Lot2 (VI)	J6	Injection en S/C	L191644***	150
Lot3 (VI+VV)	J6	Injection en S/C	L191644***	150
	J13	Oculo-nasale	2305R2S1B*	
Lot4 (VV)	J7	Oculo-nasale	0205P1HKA**	150
	J13	Oculo-nasale	2305R2S1B*	
Lot5 (VV)	J10	Oculo-nasale	0205P1HKA**	150
	J13	Oculo-nasale	2305R2S1B*	
Lot6 (VV)	J13	Oculo-nasale	2305R2S1B*	150

VV = vaccin vivant ; VI = vaccin inactivé ; S/C = sous cutanée ; * = N° du vaccin vivant atténué à souche dite « chaude » ; ** = N° du vaccin vivant atténué à souche dite « intermédiaire » ; *** = N° du vaccin inactivé ; J6 = 6^{ème} jour de la vie ; J7 = 7^{ème} jour de la vie ; J10 = 10^{ème} jour de la vie ; J13 = 13^{ème} jour de la vie.

Tous les lots de cette bande sont homogènes, (CV <30%).

Tableau III : Protocole de vaccination de la bande de poulets de chair N°2

<i>Lots d'oiseaux</i>	<i>Protocole</i>			<i>Effectif d'oiseaux</i>
	<i>Date de vaccination</i>	<i>Voie d'inoculation</i>	<i>N° de lot du vaccin</i>	
Lot1 (Témoin)	-	-	-	150
Lot2 (VV)	J19	Oculo-nasale	0205P1HKA**	150
	J27	Oculo-nasale	2305R2S1B*	

VV = vaccin vivant ; * = N° du vaccin vivant atténué à souche dite « chaude » ; ** = N° du vaccin vivant atténué à souche dite « intermédiaire » ; J19 = 19^{ème} jour de la vie ; J27 = 27^{ème} jour de la vie

Les lots de la bande N°2 sont hétérogènes (CV > 30%).

Tableau IV : Protocole de vaccination de la bande de poulets de chair N°3

<i>Lots d'oiseaux</i>	<i>Protocole</i>			<i>Effectif d'oiseaux</i>
	<i>Date de vaccination</i>	<i>Voie d'inoculation</i>	<i>N° de lot du vaccin</i>	
Lot1 (Témoin)	-	-	-	150
Lot2 (VV)	J16	Oculo-nasale	2305R2S1B*	150

VV = vaccin vivant ; * = N° du vaccin vivant atténué à souche dite « chaude » ; J16 = 16^{ème} jour de la vie.

Les lots de cette bande sont homogènes (CV < 30%).

Tableau V : Protocoles de vaccination de la bande de poulets de chair N°4

<i>Lots d'oiseaux</i>	<i>Protocole</i>			<i>Effectif d'oiseaux</i>
	<i>Date de vaccination</i>	<i>Voie d'inoculation</i>	<i>N° de lot du vaccin</i>	
Lot1(Témoin)	-	-	-	100
Lot2 (VV)	J8	Oculo-nasale	0205P1HKA**	100
	J17	Oculo-nasale	0205P1HKA**	
Lot3 (VV+VI)	J8	Oculo-nasale	0205P1HKA**	100
	J10	Injection en S/C	L191644***	
	J17	Oculo-nasale	0205P1HKA**	

VV = vaccin vivant ; VI = vaccin inactivé ; ** = N° du vaccin vivant atténué à souche dite « intermédiaire » ; *** = N° du vaccin inactivé ; S/C = sous cutanée ; J8 = 8^{ème} jour de la vie ; J10 = 10^{ème} jour de la vie ; J17 = 17^{ème} jour de la vie.

Dans la bande N°4, les lots sont hétérogènes (CV > 30%).

Tableau VI : Protocole de vaccination de la bande de poulets de chair N°5

<i>Lots d'oiseaux</i>	<i>Protocole</i>			<i>Effectif d'oiseaux</i>
	<i>Date de vaccination</i>	<i>Voie d'inoculation</i>	<i>N° de lot du vaccin</i>	
Lot1 (Témoin)	-	-	-	100
Lot2 (VI)	J15	Injection en S/C	L191644***	100
Lot3 (VI)	J15	Injection en S/C	L191644***	100
	J22	Injection en S/C	L191644***	

VI = vaccin inactivé ; S/C = sous cutanée ; *** = N° du vaccin inactivé ; J15 = 15^{ème} jour de la vie ; J22 = 22^{ème} jour de la vie

Tous les lots de cette bande sont hétérogènes (CV > 30%).

1.3.2. Calcul du coût de protocoles de vaccination

Une estimation simple du coût de protocoles de vaccination a été réalisée. Cette estimation a pris en compte le prix d'achat du vaccin et la prestation du vétérinaire.

1.3.3. Technique de prise de sang

Dans chaque nouvelle bande, 10 poussins ont été sacrifiés à 1 jour d'âge, par décapitation, pour récupérer du sang dans le but de connaître le niveau en anticorps maternels à la naissance avant toute vaccination.

Les autres séances de prises de sang ont commencé à partir du 5^{ème} jour après la 1^{ère} prise à 1 jour. En effet, les prélèvements ont été effectués sur 20 poulets dans chaque lot aussi bien chez les poulets témoins que chez les poulets des lots vaccinés. Ces prélèvements ont été réalisés au niveau de la veine alaire à l'aide d'une aiguille montée sur un tube VENOJECT[®]. Ainsi, les prises de sang ont été faites tous les 5 jours de J1 à J65 (soit 15 prélèvements), cela permet de tracer la cinétique des anticorps. Cependant, la prise de sang effectuée à J27 chez tous les lots de chaque bande permet de voir la quantité des anticorps produite entre J25 et J30.

Par ailleurs, d'autres prélèvements sanguins ont été réalisés sur 20 poulets uniquement chez les lots témoins de chaque bande, dans un intervalle de 4 jours de J1 à J57 (soit 15 prélèvements), cela permet de déterminer la demi-vie des anticorps.

1.3.4. Technique de prélèvements de la bourse de Fabricius

Les 10 poussins sacrifiés à 1 jour d'âge dans chaque bande lors de la prise de sang ont été disséqués pour récupérer les bourses de Fabricius dans le but de connaître l'état des cellules lymphocytaires avant toute vaccination.

La bourse de Fabricius a été prélevée soigneusement afin d'éviter le risque d'écrasement. Elle a été ensuite immergée dans un fixateur (formol 10%) contenu dans un bocal étiqueté.

Les autres prélèvements de la bourse de Fabricius ont été effectués à : J5, J15, J25, J27, J29 et J30 et ont porté sur 5 poulets sacrifiés de chaque lot de la bande de poulets de chair N°1. Ces prélèvements ont permis de connaître l'état des cellules lymphocytaires avant et après la vaccination, mais surtout dans l'intervalle de J25 à J30. En effet, dans cet intervalle nous avons constaté lors des nos études antérieures une chute du niveau de titre d'anticorps chez les poussins.

1.3.5. Méthodes de laboratoire

1.3.5.1. Technique de récolte du sérum

Après rétraction du caillot, les échantillons sont centrifugés à 3000 tours pendant 5 minutes. Les sérums sont recueillis dans des cryotubes identifiés puis congelés.

1.3.5.2. Analyse sérologique par ELISA indirect

Le test ELISA indirect a été utilisé pour le titrage des anticorps. C'est une technique de dosage immuno-enzymatique qui a été réalisée au laboratoire sérologique du service de Microbiologie Immunologie Pathologie Infectieuse (MIPI) de l'EISMV. Le mode opératoire de ce test est le suivant :

L'antigène spécifique de la maladie de Gumboro est fixé sur une plaque. Après incubation, les anticorps spécifiques du virus présents dans les sérums suspect se fixent sur l'antigène et les composants biologiques en excès sont évacués par lavages. Ensuite, le conjugué est ajouté et se fixe aux anticorps préalablement fixés à l'antigène. Le conjugué en excès est évacué par lavages et le substrat chromogène est

distribuée dans les microcupules. Le changement de couleur indique une réaction positive. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques de la maladie de Gumboro présents dans les sérums dilués. L'intensité de la réaction colorée est donnée sous forme de densité optique (DO) par un lecteur de plaque ELISA.

Pour l'interprétation de résultats, le sérum est positif si son titre en anticorps est ≥ 357 , il est négatif si son titre est ≤ 268 . Cependant, si son titre est compris entre 269 et 356, le sérum est suspect (kit CIVTEST AVID IBD[®]).

1.3.5.3. Techniques d'histopathologie

La réalisation et la coloration des coupes histologiques ont été faites au laboratoire d'Histopathologie animale de l'EISMV de Dakar.

1.3.5.3.1. Technique de fixation des prélèvements

La fixation a pour but d'éliminer le risque de rétraction et de distorsion, de protéger les organes contre les attaques bactériennes et de s'opposer à l'autolyse (action enzymatique). Les prélèvements d'organes ont été plongés dans du formol à 10% pendant 72 heures.

1.3.5.3.2. Technique de la déshydratation des prélèvements

Les échantillons recoupés en fragments de petite taille (2 à 3 cm de côté et 3 mm d'épaisseur) ont été placés dans des cassettes en plastique.

Les cassettes ont été rangées dans un panier métallique. Ce panier a été ensuite accroché à un dispositif dans l'automate qui, après un réglage préalable, le transporte d'un bain à un autre. Les fragments des organes séjournent successivement dans : le formol à 10% (2 heures), l'eau courante (2 heures), l'alcool à 70° (2 heures), l'alcool à 80° (2 heures), l'alcool à 95° (2x2 heures), l'alcool absolu (2x2 heures), le toluène (2x2 heures) et la paraffine (2x2 heures). Le passage dans l'automate permet la déshydratation, l'éclaircissement et l'imprégnation du fragment d'organe par la paraffine.

La déshydratation consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient. Cette déshydratation se fait par un passage du tissu dans des bains d'alcool de concentrations croissantes.

L'éclaircissement consiste à remplacer l'alcool dans le tissu par un solvant. Ce solvant est le toluène.

L'imprégnation du fragment d'organe par la paraffine va entraîner un durcissement tissulaire.

1.3.5.3.3. Technique d'inclusion en paraffine ou enrobage

L'enrobage consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc fait de milieu d'inclusion.

Avec l'appareil à émulsion de type Histocentre 2, une petite quantité de paraffine est coulée dans un moule en inox (sorte d'assiette en métal de taille variable). Le prélèvement est ensuite déposé au milieu du moule en se servant d'une pince. La pièce est placée et orientée de telle sorte que la surface de coupe permette une bonne orientation du prélèvement pour la mise en évidence de toutes les structures de

l'organe sur la lame. Le moule est ensuite laissé sur la plaque à réfrigérer (équipement de l'appareil à émulsion de type Histocentre 2). Lorsque la paraffine commence à se solidifier, on ajoute encore de la paraffine jusqu'à ce que le moule soit rempli. Ensuite les attaches en plastiques (cassettes), sur lesquelles sont inscrits les numéros des pièces prélevées, sont déposées sur le moule.

L'ensemble est laissé sur la plaque métallique réfrigérée pendant 20 à 30 minutes pour refroidissement facilitant ainsi le démoulage et la coupe des blocs. Ensuite on détache les moules après un refroidissement complet. La coupe des blocs au microtome après démoulage peut se faire le même jour ou les jours suivants.

1.3.5.3.4. Technique de coupe

La réalisation des coupes histologiques s'est effectuée à l'aide d'un microtome. Le rasoir ou la lame étant placé horizontalement, on commence les coupes au réglage de 35 microns d'épaisseur pour dégrossir jusqu'à atteindre 4 microns d'épaisseur. Après avoir réalisé plusieurs bandes tissulaires de cette épaisseur, les meilleures coupes ont été retenues pour une fixation sur les lames.

Les étapes suivantes ont été effectuées:

- le montage du bloc sur son support : le bloc doit rester parallèle à la lame ;
- le dégrossissage au microtome permet d'éliminer la paraffine qui se trouve en avant du prélèvement pour obtenir une coupe entière du tissu à colorer ;
- la coupe proprement dite s'obtient par passage régulier de la pièce à couper devant le rasoir ou couteau du microtome ;
- le collage des coupes sur une lame porte-objet. Il faut noter que sur chaque lame porte-objet est gravé le numéro d'identification du bloc.

1.3.5.3.5. Séchage des lames

Le séchage des lames se fait à l'étuve à une température de 37°C pendant 24h, les coupes se trouvent alors recouvertes d'une lamelle qui les met à l'abri de l'air et se conservent indéfiniment.

1.3.5.3.6. Coloration des coupes

1.3.5.3.6.1. Coloration topographique à l'hémalum éosine (HE)

La coloration à l'hémalum éosine constitue la coloration topographique de référence en histologie. Elle permet une étude des caractéristiques morphologiques des tissus et des organes.

Son principe consiste à faire agir successivement sur les tissus un colorant nucléaire basique, l'hémalum et un colorant cytoplasmique acide, l'éosine-érythrosine. Cette coloration permet de révéler les noyaux des cellules en bleu et les cytoplasmes des cellules en rose à rouge. Cependant, cette coloration ne permet pas de bien caractériser le tissu conjonctif qui est plutôt mis en évidence par le safran.

1.3.5.3.6.2. Immunomarquage

Dans cette étude, le PCNA/Cyclin (antigène nucléaire de prolifération cellulaire) a été utilisé pour marquer les cellules lymphocytaires de la bourse de Fabricius, afin de juger de l'activité proliférative de ces cellules suite à une vaccination contre la

maladie de Gumboro. Aussi, la technique immunoenzymatique indirecte streptavidine-biotine sur coupe à la paraffine a été utilisée dans cette étude pour détecter le PCNA/Cyclin. Les fixations non spécifiques sont supprimées avec l'apport du sérum de chèvre dilué dans 1% de PBS sur les coupes de bourses de Fabricius. Elles sont ensuite incubées dans l'anticorps primaire monoclonal anti-souris PCNA-PC10 dilué au 1/50 pendant 1 heure à 37°C. L'incubation avec l'anticorps de liaison anti-souris (IgG biotinylée) dilué au 1/200 pendant 30 minutes à température ambiante est suivie avec l'adjonction d'une solution de streptavidine marquée par la peroxydase diluée au 1/200 dans du PBS. Trente minutes après, l'activité enzymatique de la peroxydase est révélée par adjonction du mélange DAB - Substrachromogène. Suite à cette réaction, les noyaux activés (phase G₁ et S) apparaissent bruns alors que la chromatine des noyaux au repos est bleue.

Pour l'interprétation de résultats, les lymphocytes actives sont colorés en brun.

1.3.5.3.6.3. Montage des lamelles

Après coloration, les lames sont couvertes de lamelles couvre-objet à l'aide d'une goutte de milieu de montage (EukittND), et sont ensuite laissées au séchage pendant au moins une heure de temps. Elles sont alors prêtes pour être observées au microscope.

1.3.5.3.6.4. Observation des lames

L'observation des lames a été faite à l'aide d'un microscope de type « Olympus BH-2 ». Les lames sont examinées d'abord aux faibles grossissements (objectifs 4X et 10X) pour l'étude de l'architecture générale des bourses de Fabricius, puis aux forts grossissements (40X et 100X) pour l'appréciation quantitative des cellules.

1.3.5.3.6.5. Etude de l'architecture générale des bourses de Fabricius

L'observation des coupes histologiques aux faibles grossissements a permis d'apprécier la forme, la taille des organes et l'agencement des différents tissus fondamentaux (cortex, médullaire, basale, l'axe conjonctif grêle, les lymphocytes et autres types cellulaires).

1.3.5.3.6.6. Etude quantitative des lymphocytes B

L'étude quantitative est réalisée sous microscope optique aux forts grossissements. Elle a consisté dans un premier temps, à l'appréciation de la densité des lymphocytes B présents dans 5 champs microscopiques pris au hasard à l'objectif 10X.

Dans un second temps, les cellules présentes dans ces champs sont observées et dénombrées afin de déterminer le taux de prolifération cellulaire.

Cette étude est réalisée par des méthodes semi-automatiques utilisant un analyseur d'image à haute résolution (MVC2000 et VEDn-2, Motic China Group Co, Ltd, version 2001-2206). Ce système d'analyse d'image est composé par un ordinateur de marque FUJITSHI équipé des logiciels MVC2000 et VEDn-2, respectivement pour l'acquisition de l'image et son traitement ; d'une caméra vidéo numérique montée sur un microscope de type « Olympus BH-2 ».

1.3.6. Analyses statistiques

Les données récoltées ont été saisies et analysées par le tableur EXCEL de Microsoft version 2007 et par le logiciel R-Commander. Les comparaisons des moyennes de différents lots ont été faites par le test de Fisher au seuil de 5%.

L'analyse de nos données et prélèvements, ont permis d'obtenir des résultats qui seront présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre 2 : Résultats – Discussion - Recommandations

2.1. Résultats et discussion

2.1.1. Profil sérologique des bandes témoins

La figure 4 montre une décroissance des titres en anticorps des lots témoins des différentes bandes.

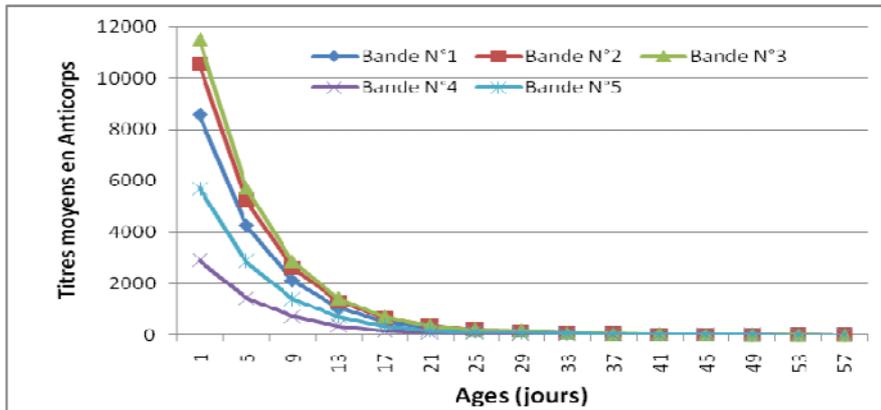


Figure 4 : Evolution des titres en anticorps des poussins témoins des différentes bandes

Les lots témoins n'ont jamais été vaccinés. Ils étaient isolés dans un bâtiment différent de ceux des lots vaccinés. Cette procédure permet d'éviter une éventuelle transmission du virus vaccinal par les poussins vaccinés. Une décroissance du titre en anticorps maternels a été observée dans tous les lots témoins. Nous avons constaté que, tous les 4 jours, le titre en anticorps maternels diminuerait de moitié dans tous les lots témoins. Nos résultats confirment ceux de MERIAL (1999), d'INTERVET (2001) et de LEMIERE (2003). La différence observée entre les lots n'est pas significative ($p > 0,05$).

2.1.2. Profil sérologique de poulets des bandes vaccinées

2.1.2.1. Profil sérologique de poulets de chair de la bande N° 1

Les évolutions des titres en anticorps de tous les lots (1 à 6) de poulets de chair de la bande N°1 sont illustrées par la figure 5.

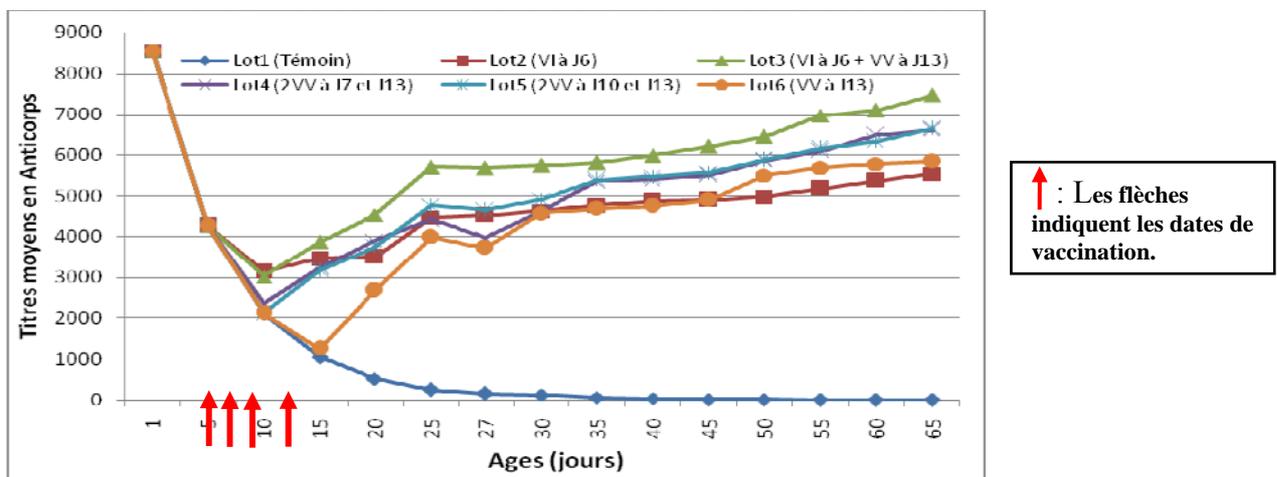


Figure 5 : Evolution des titres en anticorps de poulets de chair de la bande N°1

Les résultats sérologiques montrent que tous les lots ont un titre en anticorps maternels de 8550 à J1. Cependant, chez le lot témoin qui n'a pas été vacciné, une chute est observée. Le titre en anticorps maternels de 8550 à J1 a atteint 129 à J30. Les autres lots ont très bien réagi à la vaccination. Nous avons constaté que, chez les lots 2 et 3, le titre en anticorps d'origine maternelle de 4185 à J6 n'a pas interféré avec le vaccin inactivé. Cela confirme les travaux de DESBORGES (1999). Ce dernier a montré que le vaccin inactivé est insensible aux anticorps maternels chez les poussins. Egalement, nos résultats sont comparables aux travaux de KOUZOUKENDE (2004) qui, a aussi observé une augmentation du titre en anticorps après la vaccination, bien qu'il ait vacciné ses poussins à J1 avec un vaccin inactivé. Une baisse des anticorps a été observée après la première vaccination à J7 et J10 respectivement pour les lots 4 et 5. Cette baisse du titre en anticorps pourrait être due à une neutralisation du vaccin vivant atténué par les anticorps d'origine maternelle. En effet, au moment de la vaccination avec le vaccin vivant atténué, le niveau du titre en anticorps était encore élevé (4002 à J7 pour le lot 4 et 2128 à J10 pour le lot 5). Nos résultats confirment ceux obtenus par TCHAMDJA (2001). Ce dernier a noté aussi après vaccination à l'aide d'un vaccin vivant une baisse des anticorps à cause de la neutralisation de l'antigène vaccinal par les anticorps d'origine maternelle dont le niveau était élevé (6480). Il faut rappeler que dans ces lots, les dates de vaccinations (J7 et J10) ont été choisies volontairement au moment où le niveau du titre en anticorps était encore élevé pour voir si les anticorps maternels chez les poussins peuvent neutraliser les antigènes vaccinaux.

Le lot 6 a été vacciné une seule fois à J13 avec un vaccin vivant atténué à souche dite « chaude ». La réponse immunitaire observée après la vaccination est bonne. Le niveau des anticorps maternels de 1096 à J13 est compatible avec cette vaccination. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus par KOUZOUKENDE en 2004. Ce dernier a obtenu une bonne immunité avec un vaccin vivant atténué à souche dite « chaude » en présence d'un taux en anticorps maternels de 1368 à J1.

Il faut noter que la courbe des anticorps des poussins du lot 3 est au dessus des autres courbes. Cela s'explique par le fait que ce lot a reçu une association de vaccins (vaccin inactivé à J6 et vaccin vivant atténué à J13). Nos résultats sont semblables aux travaux des auteurs suivants : KOUZOUKENDE (2004) et ABDELAZIZ ARADA (2007). Ces derniers ont aussi observé une montée considérable du titre en anticorps en appliquant un protocole associant un vaccin vivant atténué à un vaccin inactivé.

La différence observée entre les lots de poulets vaccinés de cette bande n'est pas significative ($p > 0,05$).

Par ailleurs, nous avons constaté qu'il y a eu une légère chute du taux en anticorps chez les poussins des lots (3, 4, 5 et 6) après la vaccination à J27 (cette chute du titre en anticorps n'est pas significative, $p > 0,05$). Cela peut être dû à une diminution du nombre des lymphocytes B. Cette observation a été également faite par d'autres auteurs : TCHAMDJA (2001), KOUZOUKENDE (2004) et ABDELAZIZ ARADA

(2007). En effet, ces auteurs ont observé une chute d'anticorps après la vaccination dans l'intervalle du 25 au 30^{ème} jour de vie, ce qui a motivé nos recherches sur le plan histologique.

2.1.2.2. Profil sérologique de poulets de chair de la bande N° 2

La figure 6 montre l'allure des courbes des anticorps des lots 1 et 2 de poulets de chair de la bande N°2.

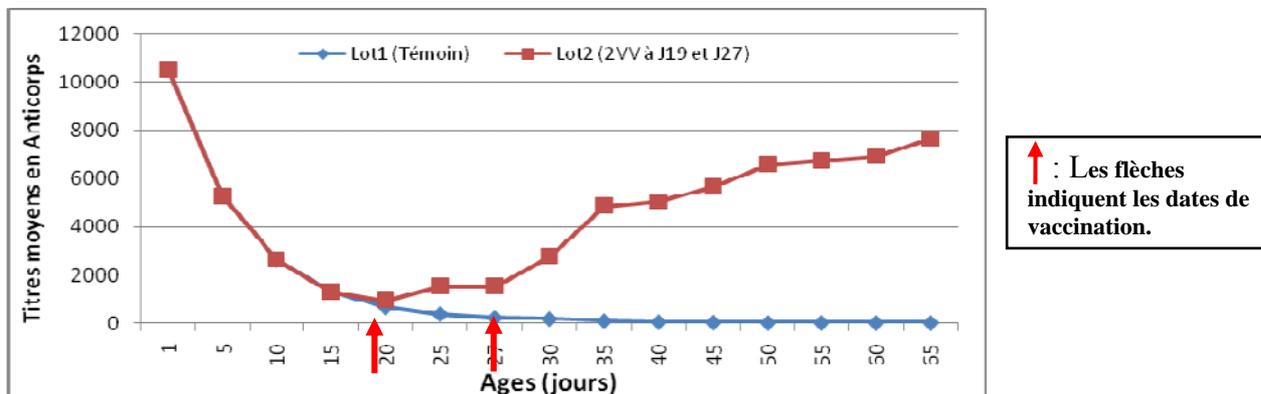


Figure 6 : Evolution des titres en anticorps de poulets de chair de la bande N°2

Le lot 1 (témoin) a un titre en anticorps maternels de 10535 à J1. Ce titre a chuté pour atteindre 155 à J30. Cette observation confirme les résultats de CONSTANTIN en 1988. Ce dernier situe la date d'épuisement des anticorps maternels entre les 3^{ème} et 4^{ème} semaines de vie.

Le lot 2 de cette bande qui, a reçu deux vaccinations avec un vaccin vivant atténué à souche dite « intermédiaire » à J19 et un autre vaccin vivant atténué à souche dite « chaude » à J27, a connu une augmentation brusque du titre en anticorps après la vaccination à partir de J30. Il faut noter qu'au moment de la vaccination à J19, le niveau des anticorps maternels était de 756. Ce niveau est donc compatible avec la souche vaccinale. Cependant, une légère chute du titre en anticorps chez les poussins du lot 2 a été observée à J27 (le niveau du titre en anticorps a baissé de 1535 à J25 à 1528 à J27). Dans une étude antérieure, nous avons obtenu les mêmes résultats (ABDELAZIZ ARADA, 2007).

2.1.2.3. Profil sérologique de poulets de chair de la bande N° 3

La cinétique des anticorps des lots 1 et 2 de poulets de chair de la bande N°3 est présentée par la figure 7.

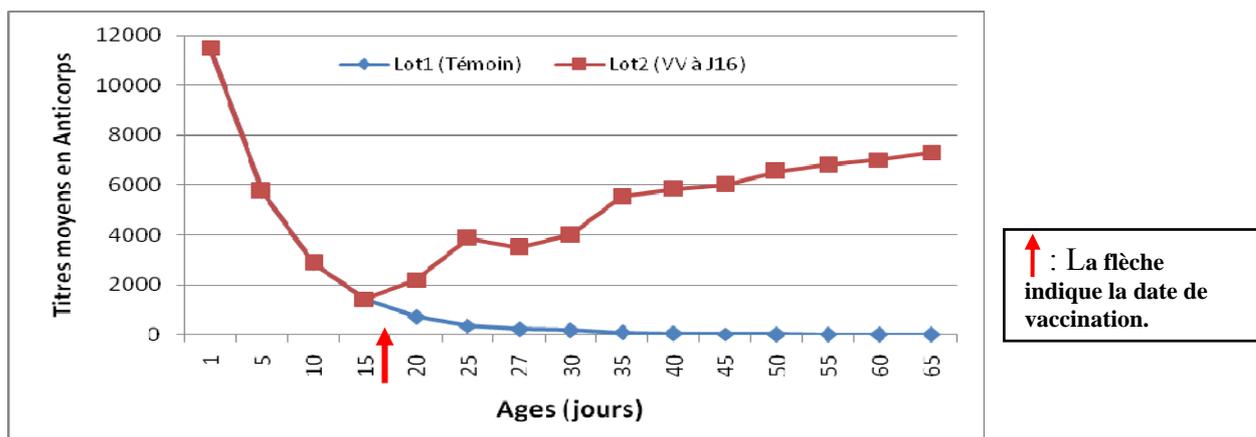


Figure 7 : Evolution des titres en anticorps de poulets de chair de la bande N°3

Le témoin n'a pas été vacciné. Son titre en anticorps maternels est passé de 11502 à J1 à 173 à J30.

Le titre en anticorps d'origine maternelle du lot 2 au moment de la vaccination à J16 était de 1176. Ce niveau est compatible avec la vaccination. Une montée brusque et progressive a été observée après la vaccination avec un vaccin vivant atténué à souche dite « chaude ». Toutefois, une chute du niveau de titre en anticorps a été observée chez le lot 2 à J27. Cette chute du taux d'anticorps pourrait être due à une diminution du nombre des lymphocytes B. Ces résultats sont comparables aux résultats que nous avons obtenus dans une étude antérieure semblable (ABDELAZIZ ARADA, 2007). Ces observations ont été également faites par d'autres auteurs (TCHAMDJA, 2001 et KOUZOUKENDE, 2004).

2.1.2.4. Profil sérologique de poulets de chair de la bande N° 4

La figure 8 montre les courbes des titres en anticorps de poulets de chair de la bande N°4.

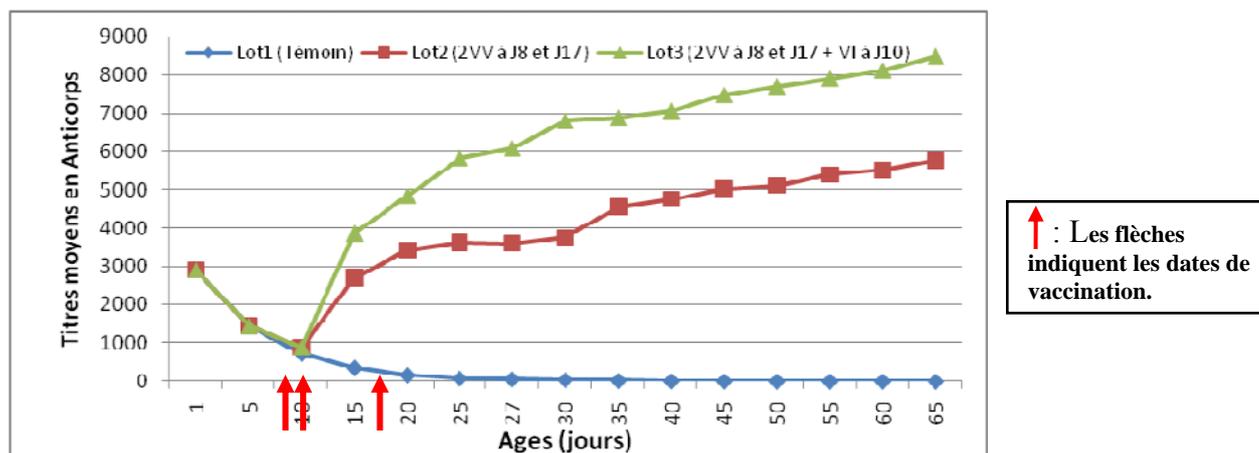


Figure 8 : Evolution des titres en anticorps de la bande de poulets de chair N°4

Le lot 1 (témoin) non vacciné voit son titre en anticorps baisser considérablement de 2695 à 40 de J1 à J30.

Les résultats sérologiques de poulets du lot 2 vaccinés à J8 puis à J17 avec un vaccin vivant atténué à souche dite « intermédiaire » et ceux du lot 3 vaccinés avec le même vaccin à J9 et J17, puis avec un vaccin inactivé à J10, montrent que les poulets ont

très bien répondu à la vaccination. On observe une séroconversion précoce. Le niveau du titre en anticorps d'origine maternelle était de 762 à J8 au moment de la vaccination. Ce titre est compatible avec la souche vaccinale. Ces résultats sont similaires à ceux que nous avons obtenus dans une étude antérieure (ABDELAZIZ ARADA, 2007).

La différence observée entre les lots vaccinés (2 et 3) est significative ($p < 0,05$). En effet, le protocole du lot 3 est plus meilleur que celui du lot 2.

2.1.2.5. Profil sérologique de poulets de chair de la bande N° 5

La figure 9 montre l'évolution des titres en anticorps de poulets de chair de la bande N°5.

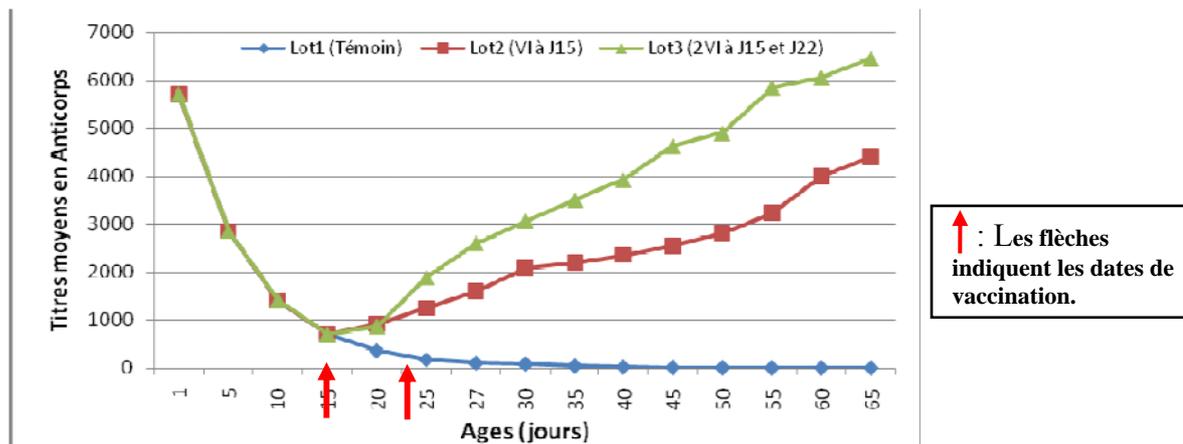


Figure 9 : Evolution des titres en anticorps de poulets de chair de la bande N°5

Le lot 1 (témoin) n'a reçu aucune vaccination. Son titre en anticorps maternels de 5713 à J1 a chuté pour atteindre 83 à J30. On constate que les lots 2 et 3 ont très bien réagi à la vaccination. Il faut noter qu'au moment de la vaccination à J15 le niveau du titre en anticorps maternels était de 703. On observe que, la courbe des anticorps du lot 3 est nettement supérieure à la courbe des anticorps du lot 2. Cela s'explique par le fait que le lot3 a reçu deux fois le vaccin inactivé à J15 et J22 alors que le lot 2 n'a reçu qu'une seule fois ce vaccin inactivé à J15. Nos résultats corroborent ceux de DESBORGES (1999) qui a montré que le vaccin inactivé est insensible aux anticorps maternels.

La différence observée entre les lots vaccinés de cette bande est significative ($p < 0,05$).

2.1.3. Appréciation des différents protocoles en fonction des types de vaccins

2.1.3.1. Vaccination avec des vaccins vivants atténués

La figure 10 montre la cinétique des anticorps des différents lots de poussins vaccinés avec des vaccins vivants atténués (vaccin vivant intermédiaire et vaccin vivant chaud).

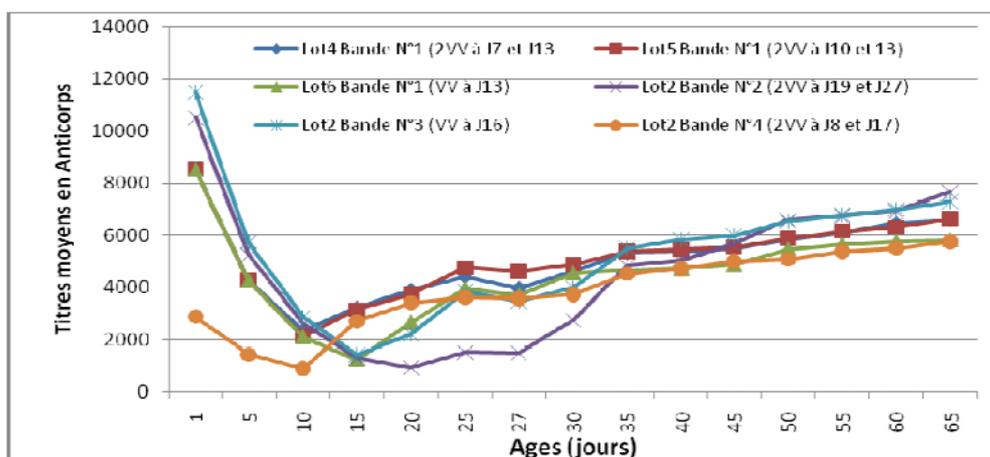


Figure 10 : Evolution des titres en anticorps des lots vaccinés avec de vaccins vivants atténués

Tous les lots des différentes bandes, bien que vaccinés avec des protocoles différents, ont très bien répondu à la vaccination. La différence observée entre ces lots n'est pas significative ($p > 0,05$). Ces résultats sont semblables à ceux que nous avons obtenus antérieurement (ABDELAZIZ ARADA, 2007).

2.1.3.2. Vaccination avec un vaccin inactivé

La figure 11 montre l'évolution des titres en anticorps des différents lots de poussins vaccinés avec un vaccin inactivé.

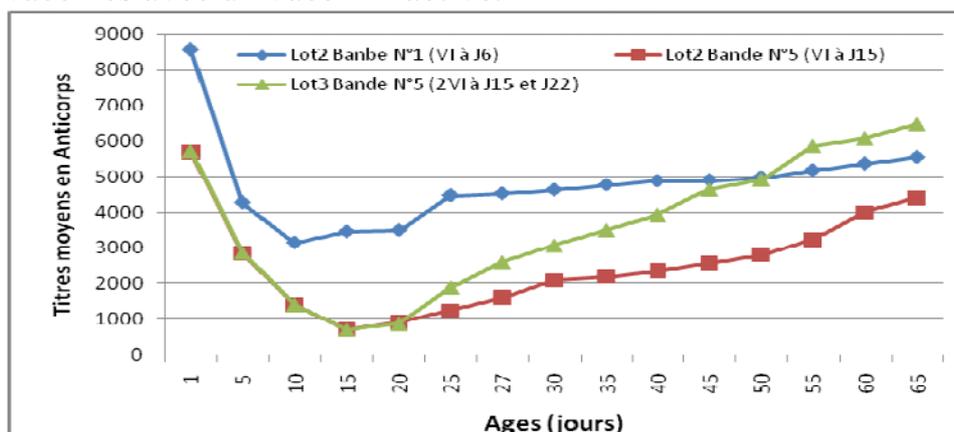


Figure 11 : Evolution des titres en anticorps des lots vaccinés avec vaccin inactivé

Les lots des différentes bandes vaccinés avec un vaccin inactivé ont très bien réagi à la vaccination, bien que vaccinés à des dates différentes. Une différence significative ($p < 0,05$) a été observée entre les lots. Ces résultats sont semblables à ceux que nous avons obtenus dans une étude antérieure (ABDELAZIZ ARADA, 2007) mais également à ceux obtenus par MOUGANG (2008).

2.1.3.3. Vaccination avec une association des vaccins (VV +VI)

La figure 12 présente l'évolution des titres en anticorps des différents lots de poussins vaccinés avec une association des vaccins (vaccin inactivé + vaccin vivant atténué).

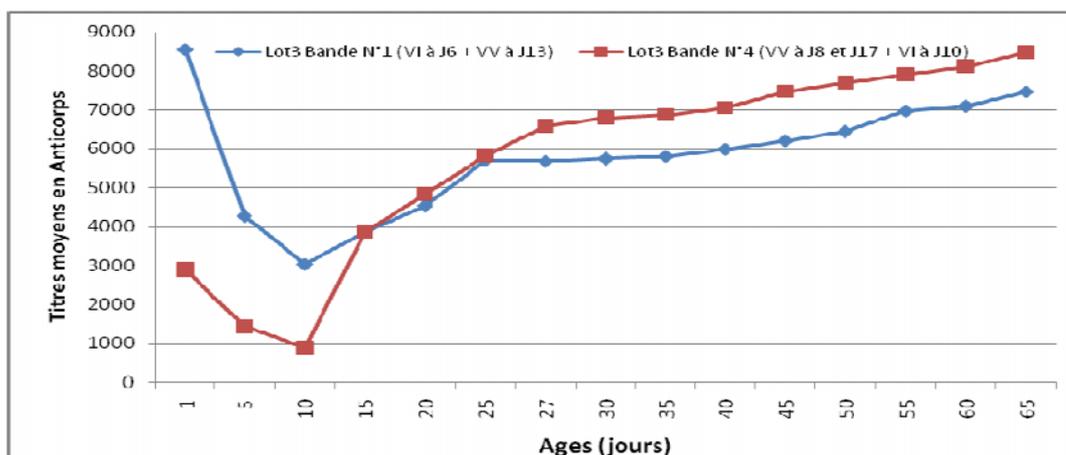


Figure 12 : Evolution des titres en anticorps des lots vaccinés avec des vaccins vivants atténués et vaccin inactivé

Dans le lot 3 de la bande de poulets de chair N°1 vacciné à J6 avec un vaccin inactivé puis revacciné à J13 avec un vaccin vivant atténué à souche dite « chaude » et le lot 3 de la bande des poulets de chair N°4 qui a été vacciné à J8 puis revacciné à J17 avec un vaccin vivant atténué à souche dite « intermédiaire » et qui a reçu également un vaccin inactivé à J10, une très bonne réaction immunitaire a été observée. Leur titre en anticorps a été gardé très au dessus du seuil de protection durant toute la durée de l'élevage. Ce seuil de protection est fixé à 1250 selon GARDIN (1991).

La différence observée entre les lots de cette bande n'est pas significative ($p > 0,05$). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par MOUGANG en 2008.

2.1.4. Histologie des bourses de Fabricius

2.1.4.1. Histologie des bourses de Fabricius de poulets de la bande N°1

2.1.4.1.1. Prolifération cellulaire chez les poulets de chair du lot 1 (témoin)

La prolifération cellulaire a été observée uniquement au niveau de la corticale des lobules de la bourse de Fabricius. Aussi, cette prolifération cellulaire augmente considérablement avec le temps (figure 13).

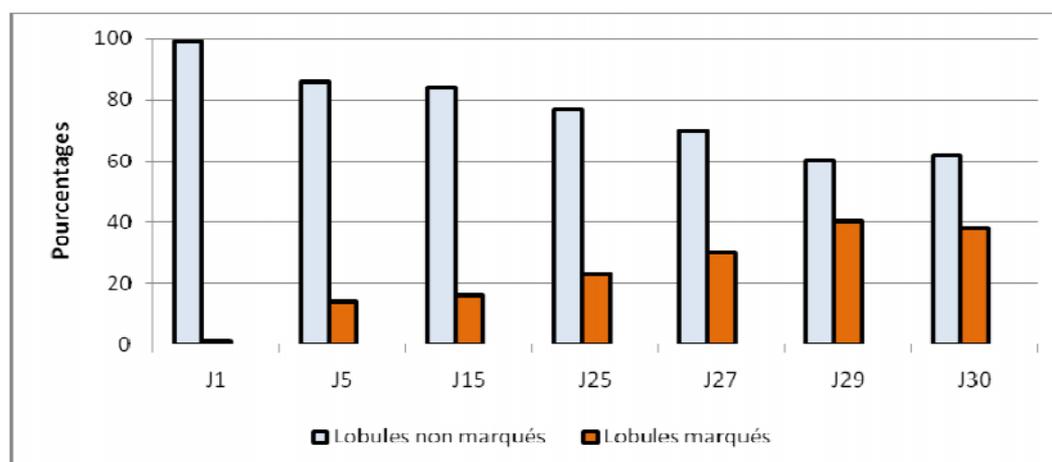


Figure 13: Prolifération cellulaire dans les lobules bursiques des poulets de chair témoins de la bande N°1

Le marquage de l'antigène PCNA de la corticale s'explique par le fait que cette dernière est le lieu de départ de la multiplication lymphocytaire au cours de la différenciation des lymphocytes B.

La figure 14 montre une coupe de la bourse de Fabricius. L'aspect histologique de cette bourse apparaît normal. Ainsi, chaque follicule possède une zone corticale et une zone médullaire bien délimitée.

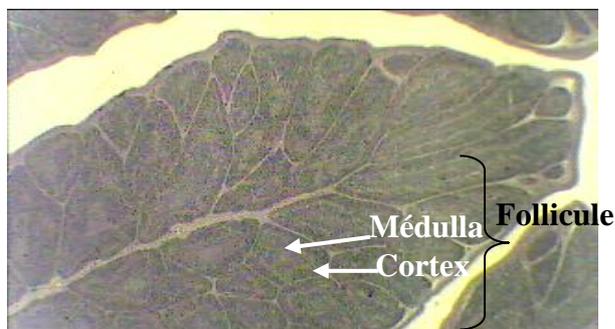


Figure 14: Lobule bursique de poulet de chair témoin de la bande N°1 à J5 (coloration Hémalun Eosine) (*Grossissement 10X*)

Le cortex et la médulla contiennent quelques plasmocytes, des lymphocytes, des macrophages et des cellules réticulaires. La coloration plus intense du cortex par rapport à la médulla se justifie par le fait qu'il contient un grand nombre de petits lymphocytes accompagnés de lymphoblastes et de macrophages.

2.1.4.1.2. Prolifération cellulaire chez les poulets de chair du lot 3

Les poulets du lot 3 ont reçu une association des vaccins (vaccin inactivé et vaccin vivant atténué à souche dite « chaude »). Une bonne prolifération cellulaire a été observée aussi bien au niveau de la corticale qu'au niveau de la médullaire à J1, J5, J15, J25, J27, J29 et J30 (figure 15).

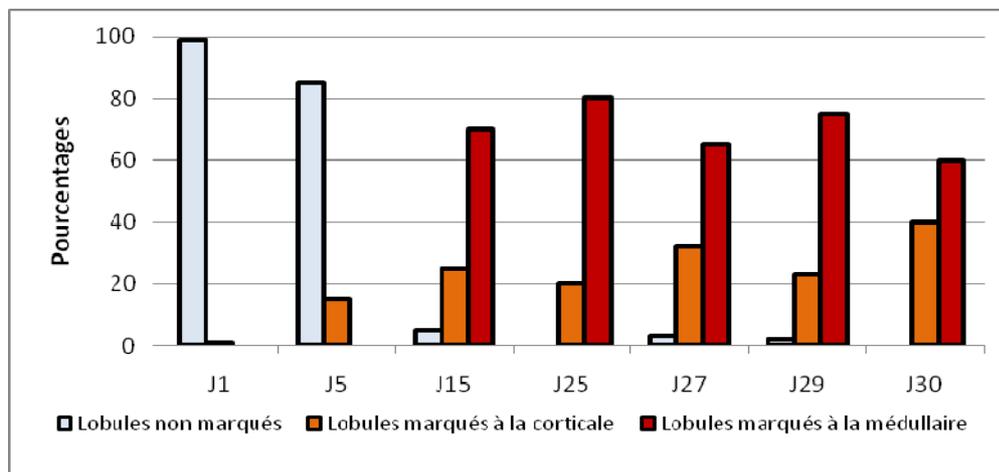


Figure 15: Prolifération cellulaire dans les lobules bursiques des poulets de chair du lot 3 de la bande N°1 ($VI_{J6} + VV_{J13}$)

On constate qu'il y a eu prolifération cellulaire dans le cortex et la médulla. La prolifération cellulaire dans la médullaire semble être induite par le virus vaccinal. Bien qu'il y ait une bonne prolifération cellulaire au niveau de la médullaire, nous avons observé une légère diminution du titre en anticorps à J27. Cette diminution

serait due à une réduction du nombre des lymphocytes B. En effet, lors d'une infection virale ou lors d'une vaccination avec un vaccin vivant atténué à souche dite « chaude », on peut avoir une diminution de nombre de lymphocytes B corrélée à une augmentation de nombre des lymphocytes T (KIM et coll., 2000). Ces lymphocytes T sont responsables de l'immunité à médiation cellulaire. Elles permettent également avec la sécrétion de cytokine d'activer la prolifération des lymphocytes B. Nos résultats sont semblables à ceux obtenus par KIM et coll. (2000). Ces derniers ont fait une infection expérimentale et ont obtenu un taux de 7% pour les lymphocytes B (7 jours post-inoculation) et de 65% pour les lymphocytes T.

Les marquages montrent que les cellules lymphoïdes sont en prolifération, mais nous n'avons pas pu caractériser le type de lymphocytes en prolifération (B ou T). Pour cela il aurait fallu avoir des anticorps anti-lymphocytes T et anti-lymphocytes B pour pouvoir les différencier.

2.1.4.1.3. Prolifération cellulaire chez les poulets de chair du lot 5

Les poulets du lot 5 de la bande de poulets de chair N°1 ont reçu deux vaccinations avec des vaccins vivants atténués (à souche dite « intermédiaire » puis à souche dite « chaude »). On constate une bonne prolifération cellulaire au niveau de la corticale et une très faible prolifération au niveau de la médullaire (figure 16).

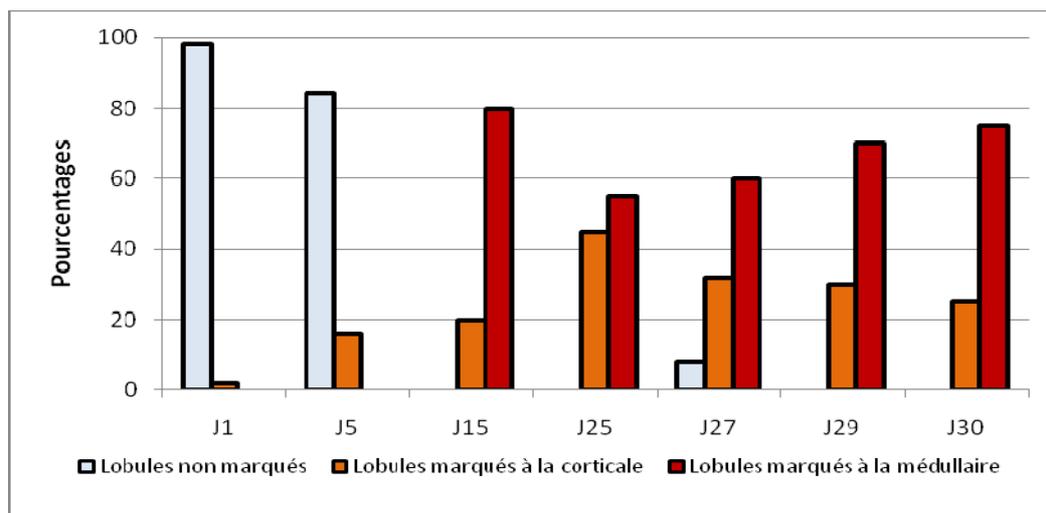


Figure 16 : Prolifération cellulaire dans les lobules bursiques des poulets de chair du lot 5 de la bande N°1 (VV_{J10} + VV_{J13})

Le marquage du cortex et de la médulla traduit une prolifération des cellules en activité. Bien qu'il y ait une prolifération cellulaire au niveau de la corticale et de la médullaire, une baisse du niveau de titre en anticorps à J27 a été observée. Cette baisse du taux d'anticorps serait due à une réduction du nombre des lymphocytes B.

La figure 17 illustre une dégénérescence cellulaire au niveau de la médullaire des poulets de chair du lot 5 de la bande N°1 à J27.

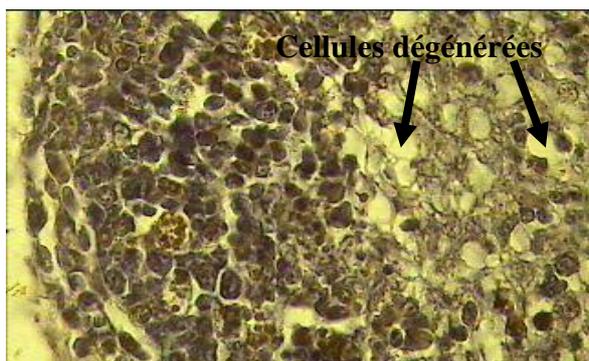


Figure 17 : Dégénérescence cellulaire au niveau de la médullaire des poulets de chair du lot 5 de la bande N°1 à J27 (*Grossissement 40X*)

La dégénérescence cellulaire observée serait due au virus vaccinal à souche dite « chaude ». Cela a été démontré aussi par BRUCE et coll., 1992. Ces derniers ont également observé une dégénérescence cellulaire associée à une réduction du nombre de lymphocytes B après une vaccination avec un vaccin vivant atténué à souche dite « chaude ». Par ailleurs, il faut noter qu'au niveau de la corticale, on observe bien quelques cellules marquées.

2.1.4.1.4. Prolifération cellulaire chez les poulets de chair du lot 6

Les poulets du lot 6 ont été vaccinés une seule fois à J13 avec un vaccin vivant atténué à souche dite « chaude ». Un marquage cellulaire a été observé au niveau de la corticale et de la médullaire (figure 18)

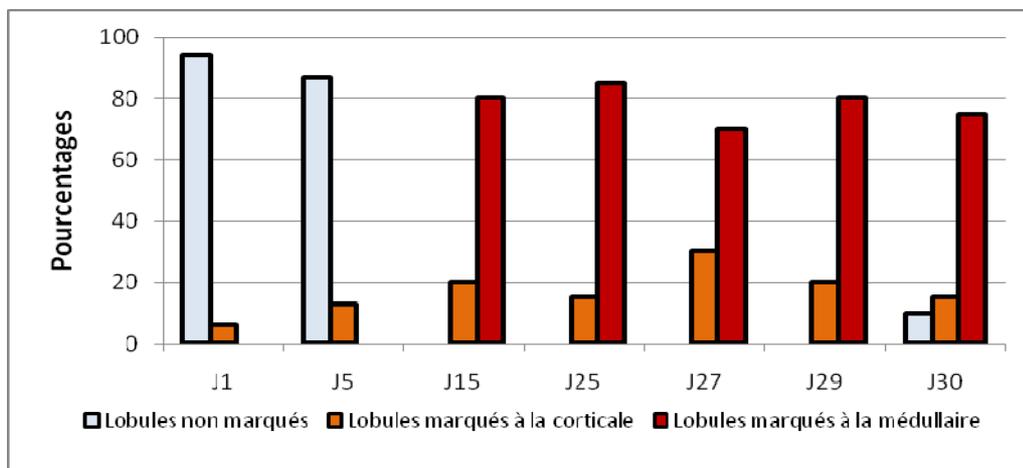


Figure 18 : Prolifération cellulaire dans les lobules bursiques des poulets de chair du lot 6 de la bande N°1 (VV_{J13})

Le marquage montre toujours que les lymphocytes sont en activité. Une baisse du niveau de titre en anticorps à J27 a été observée, bien qu'il y ait une prolifération cellulaire. Cette baisse du taux d'anticorps pourrait être due à une réduction du nombre des lymphocytes B.

La figure 19 présente une prolifération cellulaire au niveau de la médullaire des poulets de chair du lot 6 à J30. Les cellules en prolifération sont colorées en brun.



Figure 19: Prolifération cellulaire au niveau de la médullaire des poulets de chair du lot 6 de la bande N°1 à J30 (*Grossissement 40X*)

2.1.5. Coût de la vaccination par protocole

Le tableau VII présente une estimation du coût de la vaccination pour chaque protocole donné. L'estimation du prix de la dose vaccinale a été faite en fonction du prix d'achat du vaccin et de la prestation du vétérinaire. En effet, le prix moyen de la dose vaccinale est de 10 FCFA, 12,5 FCFA et 40 FCFA respectivement pour le vaccin vivant atténué à souche dite « intermédiaire », le vaccin vivant atténué à souche dite « chaude » et le vaccin inactivé. Le coût de la prestation du vétérinaire varie selon le type de la voie d'inoculation du vaccin, il s'élève à 10 FCFA pour les vaccins vivants atténués (oculo-nasale) et 15 FCFA pour le vaccin inactivé (injection sous cutanée).

Tableau VII : Evaluation du prix des protocoles vaccinaux pour un poussin

Différents protocoles utilisés	Coût de la de vaccination (FCFA)						Coût du protocole (FCFA)
	VV intermédiaire		VV chaud		VI		
	Prix de la dose	Prestation du vétérinaire	Prix de la dose	Prestation du vétérinaire	Prix de la dose	Prestation du vétérinaire	
Prot.1 (2 VV)	10	10	12,5	10	-	-	42,5
Prot.2 (2 VV)	10	10	-	-	-	-	40 (2x20)
Prot.3 (1 VV)	-	-	12,5	10	-	-	22,5
Prot.4 (2VI)	-	-	-	-	40	15	110 (2x55)
Prot.5 (VI + VV)	-	-	12,5	10	40	15	77,5
Prot. (VI + VV)	10	10	-	-	40	15	75

VV = vaccin vivant ; VI = vaccin inactivé ; Prot. = protocole.

Nous avons constaté que tous les protocoles vaccinaux utilisés ont très bien protégé les poussins contre la maladie de Gumboro durant toute la durée de l'élevage, mais à des coûts différents. En effet, la protection vaccinale avec le vaccin inactivé utilisé 2 fois, a coûté 110 FCFA/poussin. Ce coût est environ 5 fois plus élevé que celui avec le vaccin vivant chaud. Il faut souligner que le coût de la vaccination peut varier, en fonction de l'effectif d'oiseaux à vaccinés et en fonction du conditionnement du vaccin. Ce coût sera plus élevé si on utilise un conditionnement de 1000 doses pour 300 à 400 poussins par exemple, car les vaccins lyophilisés au départ, ne peuvent être conservés après reconstitution.

Au terme de ce travail, nous tenons à faire quelques recommandations à l'endroit des différents acteurs impliqués dans la lutte contre la maladie de Gumboro en vue d'assurer sa meilleure maîtrise.

2.2. Recommandations

2.2.1. Aux responsables de laboratoire de MIPI de L'EISMV

- ☞ Comme la maladie de Gumboro persiste dans les élevages avicoles de la région de Dakar malgré la vaccination, nous suggérons la réalisation d'une étude pour isoler le virus afin de le comparer aux souches virales européennes utilisées dans la fabrication des différents vaccins.
- ☞ Le type de lymphocytes en prolifération n'ayant pas pu être différencié par le marquage à l'antigène PCNA, nous suggérons qu'une autre étude puisse être effectuée, en utilisant des marqueurs spécifiques pour les lymphocytes B et T afin de pouvoir les différencier. Cela permettra d'expliquer mieux la prolifération cellulaire pendant la chute des anticorps entre les 25^{ème} et 30^{ème} jours après la vaccination.

2.2.2. Aux techniciens

Pour une meilleure protection des volailles contre la maladie de Gumboro, nous proposons :

- l'association d'un vaccin vivant atténué à un vaccin inactivé dans les zones infectées;
- la vaccination avec un vaccin vivant atténué à souche dite « chaude » en présence d'un taux élevé d'anticorps maternels ;
- l'utilisation de la nouvelle formule de détermination de l'âge optimal de vaccination.
- adapter la formule vaccinale en fonction de la spéculation de production mais aussi en fonction de la durée des anticorps protecteurs.

- **La nouvelle formule :**

La formule de KOUWENHOVEN et VAN DEN BOS (1992) utilisée sur le terrain par certaines fermes pour la détermination de l'âge optimal de vaccination, donne des dates assez tardives.

Nous proposons donc une nouvelle formule qui permet de donner de meilleures dates de vaccination à savoir : $X = \left[\left(\frac{T_m}{R_v} + D \right) \times 0,76 + J \right]$

X = date optimale de vaccination en jours ; T_m = Titre moyen en anticorps maternels chez les poussins ; R_v : référence du niveau de titre en anticorps du vaccin (550 pour vaccin vivant « souche intermédiaire » et 750 pour vaccin vivant « souche chaude »); D = Demi-vie des anticorps maternels chez les poussins ; J = n^{ième} jour de prélèvement du sang ; 0,76 = Coefficient d'optimisation.

Cette formule est simple et facile à appliquer. Elle a été déjà testée sur plusieurs bandes de poussins dans plusieurs fermes de la région de Dakar. En effet, si le lot de poussins est homogène (CV < 30%), vacciner une seule fois à la date cible de vaccination indiquée. Par contre, si le lot de poussins est hétérogène (CV > 30%), il faut nécessairement faire une deuxième vaccination, une semaine plus tard. Les résultats que nous avons obtenus ont été très satisfaisants.

A partir de cette formule, nous avons établi une table de détermination de l'âge optimal de vaccination pour le poulet de chair standard (Annexe 1).

2.2.3. Aux propriétaires des couvoirs

- Les couvoirs de la place doivent mettre à la disposition des éleveurs et vétérinaires prescripteurs, le niveau du titre moyen en anticorps maternels des poussins à chaque éclosion ou celui des reproductrices pour que ceux-ci puissent déterminer la date de vaccination.
- Les couvoirs de la place peuvent proposer aux éleveurs au moment de l'achat des poussins un calendrier de vaccination en utilisant la nouvelle formule de détermination de l'âge optimal de vaccination.

2.2.4. Aux éleveurs

- lutter contre la pression virale, par une hygiène rigoureuse dans les élevages.
- choisir la date de vaccination en tenant compte du niveau du titre en anticorps maternels chez les poussins et de la souche vaccinale.
- avoir pour chaque bande de poussins mise en place une date de vaccination.
- administrer le vaccin vivant atténué par la voie oculo-nasale pour s'assurer que chaque poussin ait reçu sa dose vaccinale.
- ne pas utiliser le vaccin inactivé seul chez les poussins surtout en primo-vaccination. Car il est non seulement coûteux mais procure aussi une immunité lente, bien qu'elle soit durable.
- Il est important de dire qu'il faut faire une seule vaccination avec un vaccin vivant atténué à une date optimale qui protège bien les poussins que de faire deux vaccinations dont le coût peut être très élevé.

Conclusion

La détermination de la date optimale de vaccination contre la maladie de Gumboro chez les poulets de chair constitue un point essentiel pour la réussite du programme vaccinal.

Cette étude, nous permet de dire que tous les protocoles vaccinaux utilisés sont efficaces. Les poulets vaccinés ont eu un titre en anticorps très au-dessus du seuil de protection (1250 selon GARDIN, 1991). Néanmoins leurs coûts sont variables. En effet, la protection vaccinale avec le vaccin inactivé utilisé deux fois, a coûté 110 FCFA/poussin. Ce coût est cinq fois plus élevé que celui avec le vaccin vivant à souche dite « chaude ».

Par ailleurs, le type de cellules lymphocytaires en prolifération au moment de la chute des anticorps entre le 25^{ème} et 30^{ème} jour de vie, n'a pas pu être déterminé par le marquage à l'antigène PCNA. Enfin, l'étude a permis de déterminer la demi-vie des anticorps maternels chez les poulets de chair témoins. Cette demi-vie est de 4 jours, comme cela a été décrit dans la littérature.

Les résultats obtenus par la nouvelle formule de détermination de l'âge optimal de vaccination sont satisfaisants. Ainsi, cette nouvelle formule a permis de proposer une table de détermination de l'âge optimal de vaccination pour les poulets de chair standard.

Bibliographie

1. **ABDELAZIZ ARADA I., 2007.** - Contribution à la lutte contre la maladie de Gumboro : Détermination d'un meilleur protocole de vaccination à partir des vaccins disponibles sur le marché à Dakar (SENEGAL). Thèse: Méd.Vét. : Dakar ; 48
2. **BACH J.F., 1986.** - Immunologie. 3^{ème} édition. Flammarion médecine-sciences. Edition Paris,- 190p.
3. **BRUCE L. H., GARY D.B., RICHARD D.M., ALFREDO F.R., 1992.** - Sibclinical infectious bursal disease in an integrated broiler production operation. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4** : 406- 411.
4. **CARDINALE E., ARBELOT B., KABORET Y., DAYON J.F., BIAOU C., BADA ALGOM O., 1998.** - La maladie de Gumboro dans les élevages semi-industriels de la région de Dakar. *Rev. Elev. Méd.Vét. Pays trop.*, **51(4)**: 293-296.
5. **CONSTANTIN A., 1988.** - Le système immunitaire des oiseaux. Revue du Syndicat National des Vétérinaires Inspecteurs du Ministère de l'Agriculture français, 100 (103) : 455-475.
6. **DESBORGES P., 1999.** - Gallivac IBD : détermination de la date de vaccination. – Lyon : MERIAL.–(Information des Services Techniques Aviaires de MERIAL), 4p.
7. **FERRE J., BELLOC C., 2005.** - Détermination de la date de vaccination contre la maladie de Gumboro en élevage de poulets label. In : « *Sixièmes journées de la Recherche Avicole* », Saint Malo, France, 30 et 31 mars : 370-374
8. **GAMBRIONE J.J., EIDSON C.S., PAGE R.K., FLETCHER O.J., BARGER B.O., KLEVEN S. H., 1976.** - Effect of infevtious bursal agent on the response of chickens to Newcastle disease and Marek'disease vaccination. *Avian Disease*, **20** : 534-544
9. **GARDIN Y., 1991.** - Monitoring infectious bursal disease vaccination using ELISA serology. *Zootechnica International*: 68-76
10. **HANSON B.S., 1967.** - Post mortem lesion diagnostic of certain poultry disease. *Vet. Rec.*, **80**:109-122.
11. **INTERVET, 2001.** -Vaccin GUMBORO NOBILIS souche 228 E : à propos de la détermination de l'âge à la vaccination. Note tech. INTERVET, France. 8p
12. **KIM I.J., YOU S.K., KIM H., YEH H.Y., SHARMA J.M., 2000.** - Characteristics of bursal T lymphocytes induced by infectious bursal disease virus. *Journal of Virology*, 74 (19): 884-892
13. **KING A.S., McLELLAND J., 1984.** - Birds: their structure and function. Second Ed. London (England)- 334 p.
14. **KOUWENHOVEN B., VAN DEN BOS J., 1992.** - Control of very virulent IBD in the Netherlands with the so called hot vaccines. "Proceedings of the 19th World's Poultry Congress, Amsterdam", The Netherlands, 19-24

- 15.KOUZOUKENDE T.N., 2004.** - Contraintes liées à la durée de production de poulets de chair en période de chaleur : adaptation du protocole de vaccination contre la vaccination de la Maladie de Gumboro. Mémoire DEA: Productions Animales: Dakar (EISMV); 13
- 16.LEMIERE S., 2003.** - Présentation d'un modèle permettant de déterminer la date de vaccination contre la maladie de Gumboro du poulet de chair utilisant un vaccin vivant a souche « intermédiaire ». In : « *Cinquièmes Journées de la Recherche Avicole* », Tours - France, 26 et 27 mars, 4p.
- 17.LEY D. H., YAMAMOTO R., BICKFORD A. A., 1983.** - The pathogenesis of infectious bursal disease: serologic, histopathologic, and clinical chemical observations. *Avian Disease*, **27** : 1060 –1085
- 18.MERIAL, 1999.** - GALLIVAC®IBD. Détermination de la date de vaccination. Fiche tech. MERIAL, Laboratoire MERIAL, France, 8p.
- 19.MOUGANG F.J., 2008.** - Contribution à la vaccination des volailles contre la maladie de Gumboro à l'aide des vaccins inactivés et vivants disponibles sur le marché de Dakar. Thèse : Méd.Vét. : Dakar ; 42
- 20.TCHAMDJA E., 2001.** - Evaluation de la protection vaccinale contre la maladie de Gumboro et de la maladie de Newcastle chez les poulets de chair et les poules pondeuses dans les élevages semi industriel de la région de Dakar : Détermination expérimentale du meilleur protocole vaccinal. Thèse : Méd.Vét. : Dakar; 19.
- 21.VAN LOON A.A.W.M., DERKS M., CLAESSENS J.A.J., SANDERS E.H.M., LÜTTICKEN D., 1997.** - Comparative protection studies with bursal disease variant-E antigens expressed in different systems. In : “*11th International congress of the WVPA*”, 8
- 22.VANMARCK E. J., 1992.** - La maladie de Gumboro : la vaccination précoce. *Afrique agriculture*, (197) : 59-61.
- 23.VILLATE D., 1997.** - Maladie des volailles, 2^{ème} édition. Chapitre 2, Anatomie des oiseaux. Edition France Agricole.
- 24.WYETH P.J., CULLEN G.A., 1978.**-Transmission of immunity from inactivated infectious bursal disease oil-emulsion vaccinated parent chickens to their chicks. *Vet. Rec.*, **102** : 362-363

ANNEXE

ANNEXE 1

Détermination des dates optimales de vaccination contre la maladie de Gumboro chez le Poulet de chair standard selon notre formule

<i>Titre moyen en anticorps maternels de poussins d'un Jour (J1)</i>	<i>Age de vaccination avec un vaccin vivant atténué à souche dite « chaude »</i>	<i>Age de vaccination avec un vaccin vivant atténué à souche dite « intermédiaire »</i>
12000	J16	J21
11500	J16	J20
11000	J15	J19
10500	J15	J19
10000	J14	J18
9500	J14	J17
9000	J13	J16
8500	J13	J16
8000	J12	J15
7500	J12	J14
7000	J11	J14
6500	J11	J13
6000	J10	J12
5500	J10	J12
5000	J9	J11
4500	J9	J10
4000	J8	J10
3500	J8	J9
3000	J7	J8
2500	J7	J7
2000	J6	J7

Remarque :

- *Si le lot de poussins est homogène (CV < 30%), vacciner une seule fois à la date cible de vaccination indiquée.*
- *Si le lot de poussins est hétérogène (CV > 30%), il faut nécessairement faire une deuxième vaccination, une semaine plus tard.*