

MISE AU POINT D'UN TEST PCR POUR LE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE DE MAREK CHEZ LE POULET

Jay Marie-Laure, Chaussé Anne-Marie, Dambrine Ginette et Coudert Françoise

INRA, Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie, Laboratoire de Virologie. 37380, Nouzilly, France.

Résumé

La maladie de Marek, chez le poulet, est induite par un virus du groupe herpès : le virus de la maladie de Marek (MDV). Cette maladie peut apparaître difficile à diagnostiquer du fait de la variabilité des signes cliniques, de la forte parenté antigénique qui existe entre les virus oncogènes et vaccinaux et enfin de l'absence de signes cliniques caractéristiques lors de l'infection par des souches hypervirulentes apparues nouvellement sur le terrain. Afin de disposer d'un diagnostic fiable, spécifique et simple à réaliser nous mettons au point un test PCR qui permettra de mettre en évidence le génome viral dans des prélèvements de sang d'animaux inoculés par différents sérotypes de virus MDV.

- Nous avons pu détecter spécifiquement le génome de virus MDV de sérotype 1 chez des animaux inoculés.
- Les leucocytes du sang périphérique semblent être un matériel plus approprié que le sang total pour la détection du virus
- La vaccination semble diminuer la possibilité de détection d'un virus virulent inoculé après vaccination.

Abstract

Setting up a PCR test to diagnose Marek's disease in chicken

Marek's disease in chicken is induced by an herpes virus : the Marek's disease virus (MDV). This disease may appear difficult to diagnose because of the wide variety of clinical signs, because oncogenic and vaccinal strains are antigenically highly related and because infection with the newly appeared hypervirulent strains do not induce classical clinical signs. In order to provide a reliable, specific and simple mean to diagnose the disease, we are setting up a PCR test to detect the viral genome in blood samples from chickens infected with different MDV serotypes.

- We have specifically detected viral genome from chickens infected with MDV serotype 1 virus
- Leucocytes from peripheral blood seem to be more suitable than whole blood cell for the detection of the virus
- Vaccination seems to reduce the possibility to detect a virulent virus inoculated after vaccination.

Introduction

La maladie de Marek, chez le poulet, est induite par un virus du groupe herpès : le virus de la maladie de Marek (MDV). Elle se caractérise sur le plan clinique par le développement d'un lymphome T et une paralysie des animaux (Calnek et Witter 1991). Cette maladie très contagieuse entraîne sur le terrain des pertes qui peuvent être sévères. Dans les années 70, la mise en place d'une vaccination a permis de lutter de façon efficace contre cette pathologie. Cette vaccination consiste en l'inoculation de souches virales vivantes non oncogènes pour le poulet et qui protègent contre le développement des tumeurs. Récemment des souches virales hypervirulentes contre lesquelles la vaccination semble peu efficace sont apparues sur le terrain. Ces souches entraînent une apparition des signes caractéristiques de la maladie. Le diagnostic de la maladie de Marek s'effectue généralement par autopsie des animaux sérotype 1. Dans un premier temps nous avons utilisé des amorces qui permettent d'amplifier une séquence située dans le gène ICP4 (Li et al. 1994) des souches de sérotype 1 (pathogènes + atténuées); ces amorces

morts; cette observation macroscopique peut être complétée par une étude histologique des nerfs. Face à la difficulté d'effectuer ce type de diagnostic dans le cas des souches hypervirulentes il semble nécessaire de développer de nouvelles techniques pour détecter la présence du virus oncogène chez les animaux. Les techniques sérologiques de mise en évidence d'antigènes viraux semblent peu adaptées en raison de la parenté antigénique des souches pathogènes et des souches vaccinales. Face à ces difficultés la mise en évidence du génome viral par la technique de PCR pourrait être la solution permettant d'identifier sans ambiguïté et de façon rapide la présence de souches hypervirulentes utilisées pour la vaccination.

Dans ce but nous mettons au point un test de diagnostic PCR qui permettra de distinguer les souches vaccinales de sérotype 1 atténuées (Rispons) et de sérotype 3 (HVT) des souches pathogènes de

ne reconnaissent pas le virus HVT. Nous avons ici étudié quelle est la fraction du sang la plus appropriée à ce type de test et l'effet de la vaccination sur la détection du virus pathogène. Il convient de

noter que les résultats présentés sont préliminaires et nécessitent d'être confirmés.

Matériel et méthodes

Poulets: Lignée Leghorn blanc homogène pour le complexe majeur d'histocompatibilité d'haplotype B13 qui est très sensible au développement des tumeurs induites par MDV.

Souches virales : Les animaux ont été vaccinés par la souche de sérotype 3 (HVT) . L'infection d'épreuve a été réalisée par RB1-B : souche hypervirulente de sérotype 1.

Amorces pour la PCR : Nous avons utilisé les amorces suivantes : P1 : 5'-GAT CGC CCA CCA CGA TTA CTA CCT-3' et P2 : 5'-AAT GAG CGA ACT GCC TCA CAC AAC-3'. Les produits d'amplification ont été analysés par migration en gel d'électrophorèse. La spécificité des fragments d'amplification a été vérifiée par hybridation avec une sonde ICP4.

Résultats et discussion

Nature du prélèvement à effectuer.

Le sang est un prélèvement simple à réaliser qui ne nécessite pas de sacrifier l'animal ce qui permet éventuellement d'effectuer plusieurs prélèvements afin d'étudier l'évolution du signal d'amplification au cours des différents stades pathologiques. Nous avons examiné si différentes fractions du sang sont équivalentes pour la détection du virus. Nous avons analysé chez des animaux inoculés par la souche pathogène RB1-B la détection du signal d'amplification sur l'ADN extrait à partir du sang total (erythrocytes + leucocytes) ou à partir des leucocytes. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

TABEAU 1

Fraction cellulaire	Niveau de détection
Leucocytes	10/12*
Sang total	2/12*

* : Représente le nombre d'animaux chez lesquels un signal d'amplification est détecté sur le nombre d'animaux inoculés testés.

Le niveau de détection est meilleur lorsque l'on utilise de l'ADN provenant de la fraction leucocytaire que du sang total. Ce résultat traduit vraisemblablement le fait que le virus a pour cible le lymphocyte T qui est largement représenté dans la fraction leucocytaire alors que dans le sang total il ne

représente qu'environ 1/100 des cellules. Dans les conditions que nous avons utilisé, la proportion relative de lymphocytes T hébergeant le virus dans le sang total n'est donc pas suffisante pour permettre une amplification en PCR. Par ailleurs il faut noter, dans cette expérience mais également dans d'autres non décrites ici, que tous les animaux inoculés ne présentent pas d'amplification en PCR. Cette observation pourrait correspondre à une différence de charge virale chez les animaux inoculés. L'absence d'amplification pourrait refléter un stade pathologique précoce où la charge virale serait faible, en effet il semble que le niveau de détection est plus élevé chez les animaux présentant des signes cliniques que chez ceux n'en présentant pas. Alternativement la différence de charge virale pourrait correspondre à des degrés de résistance au développement de la maladie de Marek différents entre les animaux positifs et négatifs.

Effet de la vaccination sur la détection

Nous avons étudié si la vaccination joue un rôle sur la détection d'un virus pathogène. Deux groupes d'animaux ont été réalisés : l'un a été vacciné par HVT puis 4 jours plus tard inoculé par la souche hypervirulente RB1-B, le second a été uniquement inoculé par la souche RB1-B. Pour l'ensemble des 2 groupes des prélèvements ont été effectués entre 6 et 8 jours après l'inoculation de RB1-B et la présence du virus a été analysée par PCR sur de l'ADN extrait à partir de la fraction leucocytaire. Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

TABEAU 2

Traitement		Niveau de détection
HVT	RB1-B	
+	+	3/11*
	+	8/8*

On observe que dans ces conditions la vaccination diminue de façon notable la possibilité de détecter le génome d'un virus infectieux inoculé après vaccination. Cette différence pourrait également refléter une différence de charge virale entre animaux vaccinés puis infectés et animaux uniquement infectés. La vaccination pourrait limiter la multiplication du virus infectieux qui ne serait pas détecté en PCR. Il convient de vérifier cette observation en effectuant en particulier des prélèvements à des dates plus tardives que 8 jours après inoculation pour déterminer si chez les animaux vaccinés il ne s'agit pas simplement d'un retard dans l'apparition et donc dans la détection du virus pathogène.

Conclusions et perspectives

Nous avons mis en place les premiers éléments pour la réalisation d'un diagnostic de la maladie de Marek par PCR. Grâce à des amorces spécifiques il est possible de détecter les virus de sérotype 1. Cependant à l'aide de ces amorces, il n'est pas possible de différencier à l'intérieur du sérotype 1 les virus atténués utilisés pour la vaccination des virus pathogènes. L'atténuation des virus pathogènes par passages en culture successifs s'accompagne de l'amplification d'une séquence de 132 pb; les souches pathogènes présentent de l'ordre de 2 répétitions de la séquence de 132 pb alors que les souches vaccinales présentent de l'ordre d'une dizaine de répétitions de la même séquence. En utilisant des amorces qui flanquent cette séquence de 132 pb Davidson et al. ont pu mettre en évidence cette amplification par migration des produits d'amplification en gel d'agarose. Nous introduirons cette nouvelle PCR afin de préciser le diagnostic et de différencier les animaux vaccinés par une souche atténuée de sérotype 1 des animaux infectés par une souche pathogène de même sérotype.

Tous les animaux infectés par une souche MDV de sérotype 1 ne présentent pas une amplification en PCR. L'absence de signal pourrait correspondre à une différence de charge virale chez les animaux infectés. Au moins 2 facteurs sont susceptibles de modifier cette charge virale. D'une part la vaccination puisque l'on observe un nombre plus élevé de PCR négatives chez les animaux vaccinés puis infectés que chez les animaux uniquement

infectés. Par ailleurs le niveau de résistance au développement des tumeurs de la maladie de Marek pourrait déterminer des charges virales différentes chez les animaux infectés même en l'absence de vaccination. Chez le poulet des lignées génétiquement résistantes ou sensibles à la maladie de Marek ont été développées; nous nous attacherons à déterminer s'il existe, entre ces lignées, une différence de charge virale lors de l'infection par une souche pathogène. Ces études sur l'effet de la vaccination et sur l'influence de la sensibilité à la maladie de Marek sur la détection du virus et sur la charge virale permettront de préciser les mécanismes mis en jeu dans la protection vaccinale et dans la résistance.

La mise au point d'un diagnostic simple et fiable conjugué à une meilleure compréhension des mécanismes de résistance permettront d'améliorer de façon efficace la lutte contre la maladie de Marek.

Références

- Calnek, B.W. et Witter, R.L. 1991. Neoplastic diseases : Marek's disease in Disease of Poultry ninth edition, ed. Calnek, Wolfe Publishing Ltd, Ames, Iowa; pp 342-385.
- Davidson, I., Borovskaya, A., Perl, S., et Malkinson, M., 1995. Avian Path., 24, 69-94.
- Li, D. S., Pastorek, J., Zelnik, V., Smith, G. D., et Ross, L. N. J., 1994. J. Gen. Virol. 75, 1713-1722.