

RECHERCHE DU VIRUS DE LA MALADIE DE MAREK PAR PCR : SUR QUEL MATERIEL ? QUAND EFFECTUER LE PRELEVEMENT ?

Nelly Bernardet¹, Eugène Musset¹, Ginette Dambrine¹, Pierrick Thoraval¹, Sylvie Laurent²,
Denis Rasschaert² et Anne-Marie Chaussé¹

INRA, Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie, 37380 Nouzilly

¹Laboratoire de Virologie et Oncologie Aviaire, ²Laboratoire de Virologie et Barrière d'Espèce

Résumé

L'émergence de souches hyper virulentes de virus de la maladie de Marek (MDV) sur le terrain, entraîne la nécessité d'utiliser un test fiable permettant d'identifier le virus MDV sans ambiguïté. La PCR qui est une technique rapide et spécifique peut répondre à ce besoin. Afin d'optimiser ce diagnostic tant sur le plan de la faisabilité que sur le plan de la connaissance des limites du test, différents prélèvements ont été analysés ainsi que différentes méthodes de préparation des échantillons. Nos résultats indiquent que les hampes de plumes sont un matériel de choix : facilité de prélèvement, détection du génome viral 14 jours après l'infection, sensibilité comparable celle obtenue avec l'analyse de prélèvements sanguins ou même de leucocytes purifiés.

Introduction

La maladie de Marek est une maladie lymphoproliférative due à un virus de type herpès (revue de Schat, 1987). Elle a été à l'origine de lourdes pertes économiques au niveau des élevages. Grâce à la vaccination, la fréquence des épidémies a nettement diminué. Cependant, aujourd'hui la vaccination perd de son efficacité en raison de l'émergence en 1985 aux USA puis plus tardivement en Europe de souches virales hypervirulentes. La présence de telles souches a été fortement suspectée en France (Coudert, 1994 a et 1994 b).

Le diagnostic de la maladie de Marek habituellement basé sur une étude macroscopique (observation de l'aspect général du poulet, recherche de tumeurs dans les organes, recherche d'un épaississement du plexus sciatique) et microscopique (recherche d'infiltration lymphocytaire sur coupes histologiques) est rendu difficile en raison de la mortalité précoce induite par les souches virales hypervirulentes qui ne permet pas d'observer ces signes cliniques. D'autre part lors de l'observation clinique, il existe un risque de confusion avec les leucoses lymphoïdes ou les réticulo-endothélioses provoquées par des virus appartenant à la famille des Retroviridae.

La détection d'anticorps chez des animaux infectés par une souche pathogène est incertaine en raison des réactivités croisées importantes qui existent entre les virus utilisés pour la vaccination et les virus pathogènes (Cauchy et Coudert, 1986).

Pour ces raisons, il est intéressant de disposer d'une technique de diagnostic permettant de mettre en évidence le virus de façon spécifique. En répondant à ce critère, la PCR semble une technique de choix pour

le diagnostic (Davidson et al., 1995; Jay et al., 1996). En effet la PCR permet de détecter une séquence d'ADN à partir de très petites quantités de matériel; la spécificité est assurée grâce à des amorces nucléotidiques qui ne reconnaissent que le génome de MDV.

Cependant afin de définir les limites de la technique, il nous a semblé intéressant de préciser certains paramètres susceptibles d'intervenir sur la détection tels que la nature du prélèvement à effectuer, la technique optimale de préparation des échantillons ainsi que la plage temporelle pendant laquelle il est possible de détecter le virus.

Sur des animaux infectés par une souche hypervirulente de la maladie de Marek nous avons étudié la possibilité de détecter le gène gD de MDV en fonction du temps écoulé après la contamination. A un temps donné après l'infection, nous avons comparé quatre types de prélèvements : plume, sang total, leucocytes et sérum. Enfin nous avons effectué la PCR sur différents types de matériel : ADN purifié ou lysat cellulaire.

Matériel et méthodes

Poulets

Vingt poulets de race Leghorn blanche et sensibles à la maladie de Marek (haplotype B13) âgés de 11 semaines ont été répartis en deux lots. Le premier lot a été inoculé par une souche hypervirulente de MDV : RB1B, le deuxième (lot contact) a été mis le jour de l'inoculation, dans le même isolateur, en contact avec les animaux inoculés. Les animaux contact reflètent plus fidèlement les conditions de contamination sur le

terrain. Des prélèvements de sang et de plumes ont été effectués sur chaque poulet du lot contact chaque semaine durant huit semaines et sur chaque poulet du lot inoculé durant trois semaines.

Méthode

1. Préparation des échantillons

a. Obtention de lysats cellulaires

Des lysats cellulaires ont été préparés d'une part à partir du sang total et d'autre part à partir de trois hampes de plumes pour chacun des animaux expérimentaux.

Cette préparation se déroule en deux étapes : une purification des noyaux grâce à un tampon de lyse puis une hydrolyse des protéines par la protéinase K. Les lysats cellulaires peuvent être stockés à -20°C.

b. Extraction d'ADN

Une extraction d'ADN a été réalisée sur du sang total (érythrocytes et leucocytes), du sérum et des leucocytes purifiés (cellules cibles du virus). Les cellules sont lysées par un choc hypertonique et les noyaux sont récupérés par centrifugation. Les noyaux sont incubés en présence de protéinase K puis l'ADN est précipité grâce à l'addition d'éthanol. Après séchage le culot d'ADN est remis en suspension dans de l'eau. L'ADN extrait des plasmas après digestion par la protéinase K a été extrait au phénol chloroforme puis précipité grâce à l'addition d'éthanol. Les ADN peuvent être conservés à +4°C.

2. La PCR

Tous les prélèvements ont été analysés par PCR en utilisant des amorces spécifiques du gène gD du virus RB1B (Ross et al., 1991). La séquence des amorces utilisées est la suivante :

Amorce 1 5' ACGACTGGGTGCTGCAATAA 3'

Amorce 2 5' ATGAAAACCTCCGGGCTACT 3'

Brièvement la réaction de PCR a été réalisée dans les conditions suivantes : 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 1,25 unités de Taq polymérase et 0,2µM de chacune des amorces. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose.

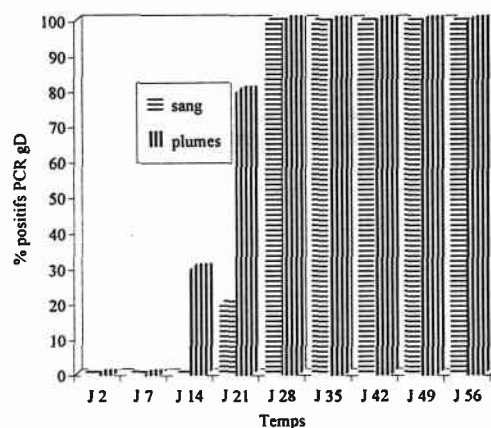
Chacune des PCR effectuée comportait un témoin positif (lysate de plume d'un poulet inoculé RB1B), un témoin négatif (lysate de plume d'un poulet sain) et un témoin permettant de tester l'absence de contamination du mélange réactionnel par de l'ADN viral (eau).

Afin de s'assurer de la présence de matériel susceptible d'être amplifié dans les échantillons n'ayant pas donné de signal lors de la PCR utilisant les amorces gD, une amplification avec un gène cellulaire a été réalisée. Pour cela nous avons utilisé

des amorces spécifiques du gène de la β globuline du poulet.

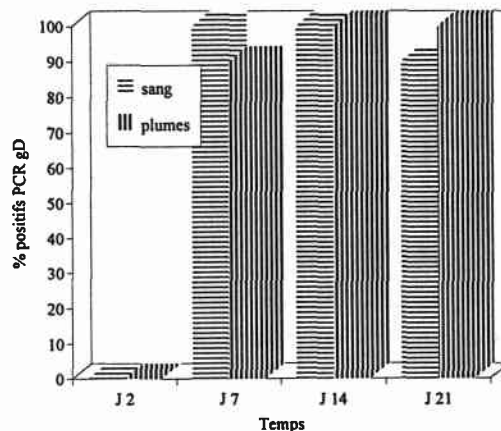
Résultats

FIGURE 1 : Détection du gène gD de MDV en fonction du temps après contamination, dans des lysats cellulaires pour les animaux contact.



Nous avons détecté la présence du gène gD au niveau des plumes 14 jours après la mise en contact avec des animaux inoculés et ce jusqu'à la fin de l'expérimentation (J 56). Dans le sang, cette détection est possible après 21 jours et comme pour les plumes tous les animaux sont positifs à 28 jours après la mise en contact.

FIGURE 2 : Détection du gène gD de MDV en fonction du temps après inoculation, dans des lysats cellulaires pour les animaux inoculés.



Le gène gD est détecté 7 jours après l'inoculation sur la totalité des animaux inoculés au niveau du sang. Pour les plumes nous avons un taux de positivité de 100% après 14 jours.

TABEAU 1 : Détection du génome viral en fonction du type de prélèvement et de la préparation du matériel à 42 jours après contamination.

Poulet	Lysat		ADN		
	sang	plumes	sang	sérum	leucocytes
1	+	+	+/-	+/-	+
2	+	+	+	+/-	+
3	+	+	+	+/-	+
4	+	+	+/-	+/-	+
5	+	+	+/-	+/-	+

La détection est comparable entre le lysat de sang total, le lysat de hampe de plume et l'ADN purifié des leucocytes. En revanche sur l'ADN préparé à partir des sérums et l'ADN préparé à partir du sang le signal obtenu en PCR est faible. Si l'on compare les méthodes de préparation on voit que pour le sang total l'intensité du signal PCR est plus faible après préparation d'ADN en comparaison avec les résultats obtenus pour les lysats cellulaires.

Discussion

A l'issue de cette expérimentation nous voyons qu'il est possible de détecter la présence du gène gD du virus RB1B de MDV au niveau des hampes de plumes ainsi que du sang. Toutefois le gène gD n'est mis en évidence qu'après un délai d'environ 21 jours pour des animaux mis en contact avec des poulets infectés avec un pourcentage de positivité variant de 20 à 80% en fonction du type de prélèvement. Ce délai de 21 jours qui peut paraître long est en partie expliqué par le temps mis par les animaux inoculés pour produire le virus, l'excréter au niveau de leurs plumes et infecter à leur tour les animaux qui sont à leur contact. En effet les animaux inoculés par voie intra-péritonéale nous permettent de détecter dans le sang à un taux de 100% la présence du virus RB1B dès 7 jours après inoculation. Ceci implique que pour effectuer un diagnostic fiable il est nécessaire de réaliser un échantillonnage représentatif et de contrôler tous les résultats négatifs après un délai d'au moins 15 jours. Le prélèvement de plumes à l'avantage d'être facilement mis en oeuvre, cependant un prélèvement de sang à condition de posséder le test approprié permet le diagnostic de diverses pathologies que ce soit par PCR ou par sérologie.

La technique de préparation rapide et simplifiée des lysats cellulaires présente le double avantage de diminuer la manipulation de substances toxiques (phénol, chloroforme, éthanol) ainsi que les risques de perte et de contamination du matériel. Par conséquent, il s'avère être un bon choix pour la préparation de matériel pour la PCR.

En conclusion pour le diagnostic de la maladie de Marek un prélèvement de plume (facilement réalisable) suivi d'une préparation de lysat cellulaire est parfaitement adaptée.

Références

- Cauchy L et Coudert F., 1986. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 5., 1011-1024
Coudert F., 1994 a. L'Aviculteur, (554) 85-87
Coudert F., 1994 b. L'Aviculteur, (557) 61-64
Davidson I., Borovskara A., Perl S., Malkinson M., 1995. Avian Path., 24, 69-94
Jay M.L., Chaussé A.M., Dambrine G., Coudert F., 2. Journées de la Recherche Avicole, 8-10/04/1997, Tome II, 89-91
Ross L.J.N., Binns M.M., Pastorek., 1991. J. Gen. Virol., 72, 949-954
Schat K.A., 1987. Cancer Surv., 6, 1-38