



Université Sidi Mohamed Ben Abdellah
Faculté des sciences et techniques-Fès
Département des sciences de la vie



Projet de fin d'études
Licence sciences et techniques
Sciences biologiques appliquées et santé

Recherche des Salmonelles et Mycoplasmes chez les poules SPF

Présenté par : Mlle Malak Louali

Encadré par :

- ✚ Pr. Amar Omar (ONSSA, Rabat)
- ✚ Pr. Bahafid Wifak (FST, Fès)

Soutenu le : 17/06/2015.

Devant le jury composé de :

- ✚ Pr. Wifak Bahafid (FST, Fès)
- ✚ Pr. Amar Omar (ONSSA, Rabat)
- ✚ Pr. Manni Laila : (FST, Fès)

Année Universitaire : 2014-2015

Dédicaces

❖ *À la mémoire de mon père*

❖ *À ma mère*

❖ *À Ma grand-mère, Mon frère et Ma sœur*

*Ce travail comme une infime partie de l'amour et de l'immense
gratitude que je leur témoigne*

En remerciement de votre soutien inconditionnel.

❖ *À Mes amis et tous ceux qui m'ont soutenue tout au long de ma
formation.*

Je vous aime énormément.

Remerciements

Tout d'abord je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience et la volonté d'entamer et de terminer ce travail.

Après l'accomplissement de ce travail, mon devoir est d'exprimer ma vive reconnaissance à :

- ❖ M.OMAR AMAR qui m'a guidé dans ce travail et qui a supervisé mon stage au jour le jour.*
- ❖ Mme WIFAK BAHAFID qui m'a offert la possibilité de m'encadrer et d'assurer la charge de diriger ce projet de fin d'études, pour son soutien, ses conseils précieux, sages et pertinents.*
- ❖ Mme MANNI LAÏLA de l'honneur qu'elle m'a faite d'être membre du jury et d'avoir accepté d'examiner ce travail.*
- ❖ Aux Docteurs KHADIJA ID SIDI YAHIA et SAMI DARKAOUI respectivement chef de la DPIV et chef SCE d'avoir accepté de m'accueillir au sein du laboratoire de bactériologie.*
- ❖ Ma chère cousine Docteur SAMIRA ABGHOUB pour son soutien, son encouragement, ses conseils précieux, sages et pertinents.*

Mes remerciements s'adressent également à M. Le Doyen de la FSTF, M.ABDELALI TAZI Chef de la filière, M.RACHID BENCHEIKH chef du département des sciences de la vie et à tous nos professeurs pour leur générosité et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles puis à toute l'équipe de la section de microbiologie à la DPIV car chacun a su trouver un peu de temps pour m'aider dans la réalisation de ce travail.

Sommaire

Liste des abréviations

Présentation de la Division de la Pharmacie et des Intrants

Vétérinaires (DPIV)

Introduction générale

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. ELEVAGE SPF A LA DPIV.....	2
1.1 Définition des poulets SPF.....	2
1.2 Zone SPF de la DPIV	2
1.3 Intérêts des élevages SPF.....	3
1.4 Contrôle de la zone SPF	3
2. Maladies aviaires.....	4
2.1. Salmonellose	5
2.2. Mycoplasmoses.....	6

MATERIEL ET METHODES

1. Recherche des salmonelles	10
1.1 Prélèvement	10
1.2 Méthode d'analyse	10
2. Recherche des Mycoplasmes.....	13
2.1 Prélèvements	13
2.2 Méthode d'analyse	13

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Cas des Salmonelles.....	16
2. Cas des Mycoplasmes.....	19

Conclusion Générale 22

Annexe 24

Références bibliographiques..... 27

Liste des abréviations

- ONSSA** : Office National de Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires
- DPIV** : Division de la Pharmacie et des Intrants Vétérinaires
- LNCMV** : Laboratoire National de Contrôle des Médicaments Vétérinaires
- SPF** : Specific Pathogen Free
- EOPS** : Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique
- SEI** : Service de l'Enregistrement et de l'Inspection
- SCE** : Service de Contrôle et d'Expertise
- ARL** : Agglutination Rapide sur Lame
- Agg** : Agglutination
- IHA** : Inhibition de l'Hemagglutination
- ELISA** : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- OIE** : Organisation Internationale des Epizooties
- AMM** : Autorisation de Mise en Marché

Présentation de la Division de la Pharmacie et des Intrants
Vétérinaires (DPIV)

L'ONSSA est un établissement public qui exerce, pour le compte de l'état, les attributions relatives à la protection de la santé du consommateur, des animaux et des végétaux. L'ONSSA regroupe trois directions dont la direction des services vétérinaires relève la DPIV. (Voir organigramme fonctionnel)

La DPIV dont l'effectif est une quarantaine de personnes, comprend deux Services dont les activités réalisées au sein de chaque service sont présentées dans le tableau 1(1) :

Tableau 1 : Les activités réalisées dans chaque service à la DPIV

Services de la DPIV	Activités
Enregistrement et Inspections (SEI)	<ul style="list-style-type: none"> • Gestion des demandes d'AMM des médicaments vétérinaires. • Gestion des demandes d'homologation des désinfectants. • Gestion des demandes d'autorisation des additifs de l'alimentation animale. • Suivi de l'instruction des dossiers d'AMM • Gestion des activités d'inspection des établissements pharmaceutiques vétérinaires. • Assurance de la pharmacovigilance vétérinaire.
Contrôle et Expertises (SCE)	<ul style="list-style-type: none"> • Enregistrement, identification et diffusion des échantillons pour analyses. • Expertise analytique et microbiologique des médicaments vétérinaires. • Recherche des résidus de médicaments vétérinaires dans les échantillons de denrées animales. • Analyse des biocides d'élevage et des désinfectants de l'hygiène alimentaire • Contribution aux travaux de recherches dans le domaine de la pharmacie vétérinaire. • Assurance de la pharmacovigilance. • Assurance du diagnostic de certaines maladies animales.

➤ Organigramme

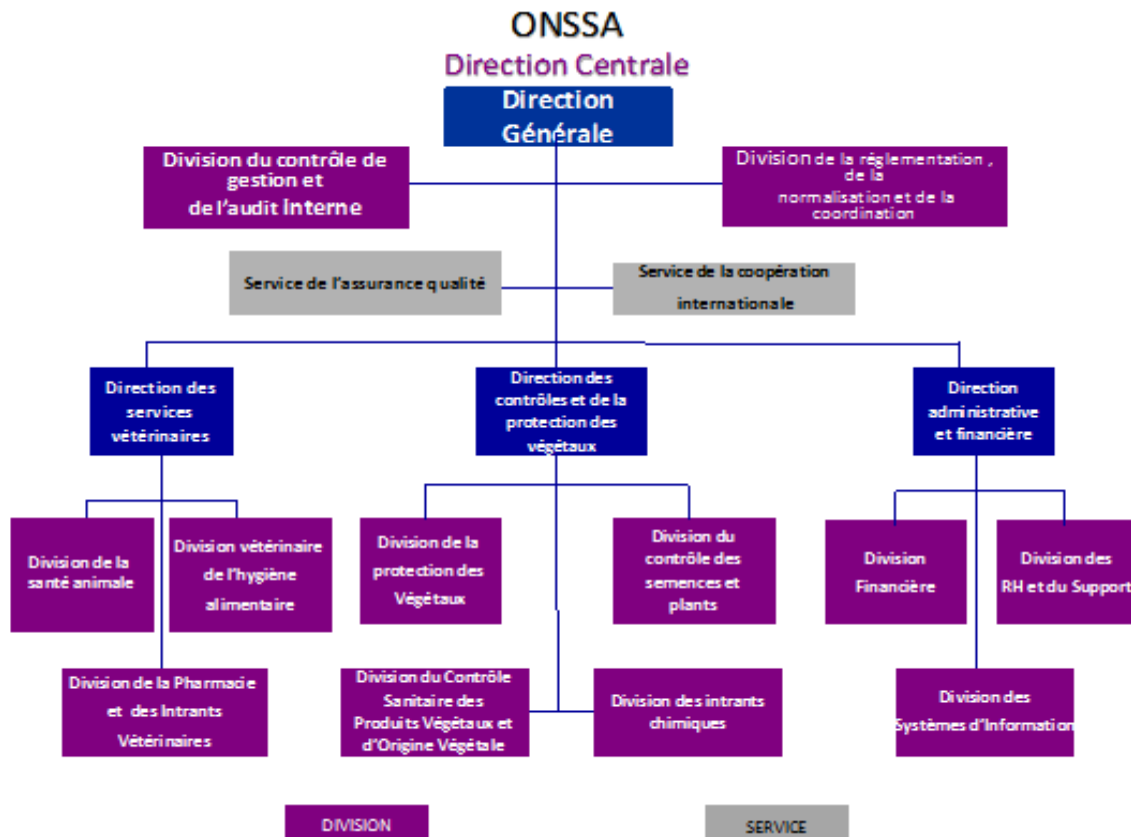


Figure 1 : Organigramme des Directions de l'ONSSA

Introduction générale

Depuis de nombreuses années, les maladies aviaires virales et bactériennes sont répandues dans le monde entier. Elles affectent tous les types d'élevages causant, ainsi, des maladies humaines très graves liées à la consommation des poules et en particulier les œufs.

Parmi les mesures de prévention et de lutte contre ces maladies on trouve la vaccination. Cependant, il est souvent mis en cause la qualité des vaccins utilisés, d'où la nécessité de les contrôler avant leur mise en marché.

Par ailleurs, la réalisation des travaux de recherche en ce sens nécessite l'utilisation des œufs exempts de microorganismes contaminants nommés des œufs SPF. Ainsi une unité d'élevage de poules SPF reproductrices a été créée dans le but de fournir ces œufs SPF.

Or, la pharmacopée européenne exige un contrôle bactériologique et sérologique périodique et régulier des œufs et des poules SPF qui ne doivent contenir aucune trace d'anticorps vis-à-vis de ces maladies.

Ce présent travail s'inscrit dans ce cadre et consiste à réaliser un contrôle bactériologique et sérologique des poules SPF. Afin de répondre aux exigences de la pharmacopée européenne, nous nous sommes intéressés précisément à la recherche des Salmonelles et des Mycoplasmes.

Ce travail est divisé en trois parties. Dans un premier lieu, nous proposons une synthèse bibliographique concernant l'élevage des poulets SPF et les maladies aviaires. Dans une deuxième partie nous décrivons les méthodes de diagnostics utilisés pour la recherche des Salmonelles et des Mycoplasmes. Puis, une dernière partie consacrée aux résultats obtenus.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. ELEVAGE SPF A LA DPIV

1.1. Définition des poulets SPF

Un poulet SPF est défini comme étant un poulet exempt d'agent pathogène c'est-à-dire qu'il ne contient aucune trace d'anticorps vis-à-vis des maladies aviaires. Ce poulet est isolé stérilement du milieu extérieur par un système de filtration et ventilation d'air afin d'empêcher tout agent pathogène d'y entrer.

1.2. Zone SPF de la DPIV

Selon la pharmacopée européenne (2008), un élevage SPF est défini comme étant un groupe d'oiseaux exempts d'agents pathogènes partageant un environnement commun et ayant son propre éleveur qui n'a aucun contact avec des élevages non SPF. Pour cette fin, le laboratoire de la DPIV est doté d'une zone d'élevage de poules SPF reproductrices et qui fournissent tout au long de l'année, des œufs SPF en quantités suffisantes (2).

En effet, l'unité d'élevage SPF est constituée de 6 salles, un SAS matériel, un SAS personnel et d'une toilette celle-ci est entourée d'un couloir appelé zone grise qui joue un rôle de barrière et de biosécurité. Dans les salles appropriées de l'unité sont produites les opérations suivantes: l'incubation des œufs SPF jusqu'à éclosion, élevage des poussins, des poulettes et des coqs reproducteurs. L'unité est dotée aussi d'un système de traitement d'air spécial (ventilation et filtration) qui confère aux salles une pression positive. Le SAS matériel est équipé des lampes UV pour la stérilisation du matériel et les surfaces, tandis que le SAS personnel est équipé d'une douche qui est considérée comme obligatoire à l'entrée.

Les locaux dans lesquels est installé l'élevage sont situés à distance de tout élevage d'oiseaux non SPF. En outre, des mesures appropriées sont prises pour empêcher l'entrée de rongeurs, d'oiseaux sauvages et d'insectes et pour interdire l'accès au personnel non autorisé. Un registre permanent de la santé générale de l'élevage est tenu à jour, et toute anomalie fait l'objet d'une investigation (2).

1.3. Intérêts des élevages SPF

Les œufs embryonnés de poules SPF, seront utilisés aussi bien pour le diagnostic que pour la production et le contrôle des vaccins contre plusieurs maladies virales. Toutefois, la réalisation des travaux de recherche en ce sens nécessite l'utilisation des œufs SPF en grande quantité.

Ainsi, la nécessité de mettre à la disposition de l'utilisateur des produits doués de l'efficacité et de l'innocuité requise était à l'origine de la création du La DPIV à Rabat qui joue un rôle important dans le contrôle et l'homologation des vaccins aviaires.

1.4. Contrôle de la zone SPF

Conformément aux directions et normes internationales (pharmacopée européenne), des contrôles microbiologiques réguliers sont effectués au SCE pour s'assurer en permanence du statut SPF des poules. On distingue :

- Les kits sérologiques qui s'intéressent à la recherche des anticorps anti- IBD (Maladie de Gumboro), anti-IBV (Maladie de Bronchite infectieuse), anti-NDV (Maladie de Newcastle) et anti *Mycoplasme Gallisepticum* et *Mycoplasme Synoviae*.
- Les tests bactériologiques plus précisément la recherche des Salmonelles.

Tous ces examens se font selon la norme internationale. Le tableau 2 montre les maladies recherchées et les tests respectifs effectués pour les diagnostics (2).

Tableau 2 : Contrôles effectuées sur les poulets SPF.

Maladie	Contrôle effectué	Nature du prélèvement
La Maladie de Newcastle	Recherche d'Ac anti NDV par IHA	Sérum
La Maladie de Bronchite infectieuse	Recherche d'Ac anti IBV par ELISA	Sérum
La maladie de Gumboro	ELISA	Sérum
La Maladie de Marek	ELISA	Sérum
Mycoplasmoses	Recherche d'Ac anti Ag par ARL	Sérum
Salmonellose	Culture	Ecouvillons

Par conséquent, si les résultats montrent l'existence d'une contamination lors de l'élevage, les produits issus de l'élevage dans les 4 semaines précédant (la date pendant laquelle l'échantillon positif a été prélevé) et les contrôles effectués sont considérés comme non conformes. La section animalerie doit notifier l'existence d'une contamination aux utilisateurs de tous les œufs dès que possible après sa découverte.

2. Maladies aviaires

Il existe de nombreuses maladies aviaires de type viral et bactérien :

- ✓ Maladies virales : Gumboro, Newcastle, Bronchite infectieuse, Marek...etc.
- ✓ Maladies bactériennes : Mycoplasmoses, Salmonellose... etc.

Parmi ces maladies on s'intéresse spécifiquement aux maladies bactériennes dont les plus répandus sont Salmonellose et Mycoplasmoses.

2.1. Salmonellose

2.1.1. Définition de la maladie

La salmonellose aviaire est essentiellement définie comme étant une maladie contagieuse des oiseaux domestiques, causée par une bactérie appartenant au genre *Salmonella* dont les plus fréquentes sont *Salmonella Gallinarum* et *Salmonella Pullorum* (3).

Parmi les maladies causées par ce genre de bactérie on trouve :

- **La pullorose** du poulet. Celle-ci est due à *S.Pullorum* et considérée première maladie infectieuse importante qui a causé de lourdes pertes au début de l'industrialisation de l'élevage de volailles (3).

La forme aiguë de cette maladie est spécifiquement une affection septicémique chez les poussins. Le gibier à plumes, les oiseaux sauvages et les volailles de basse-cour sont les principaux réservoirs de l'infection, jouant ainsi un rôle important dans l'épidémiologie de la maladie (4).

- **La typhose**, dite aussi maladie de Klein, ou typhoïde aviaire, est causée par *S.Gallinarum*. Elle attaque les poulets, les dindons et plus souvent observée chez des oiseaux plus âgés ou adulte (4).

2.1.2. Description de la maladie

Les infections à *S.pullorum* et à *S.gallinarum* entraînent une mortalité importante chez les jeunes poulets de moins de 3 semaines d'âge. Chez les poussins et les dindonneaux, la maladie se caractérise par une anémie, une anorexie, une respiration laborieuse, une diarrhée, une déshydratation, de l'apathie et la mort. Chez les oiseaux adultes, la maladie est moins sévère où l'on peut observer une diminution du taux de ponte, un faible taux d'éclosion et une augmentation du taux de mortalité (4).

2.1.3. Transmission de la maladie

La transmission de *S.pullorum* et *S.gallinarum* peut être directe par deux voies :

- Verticale par contamination de l'oviducte et l'œuf; contiguïté des sacs aériens et de l'oviducte, passage dans le sang et /ou contamination du sperme
- Horizontale par contact direct en animaux malades ou porteurs et animaux sensibles ; contamination par voie respiratoire, conjonctivale ou génitale,

aérosols, sécrétions oculaires ou sexuelles, principalement lors de la phase aiguë de l'infection.

Quant à la transmission indirecte, elle se fait par l'intermédiaire des oiseaux sauvages, des insectes, des rats, de l'homme, du matériel d'élevage, des débris et des poussières.

La maladie peut se propager d'une ferme à l'autre si les mesures de biosécurité sont inadéquates (5).

2.1.4. Identification de l'agent pathogène

Salmonella est une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet (0,7-1,5 2,0-5,0 µm), généralement mobile et pourvue de flagelles à l'exception de *S.Gallinarum* et *S.Pullorum*. Cette bactérie est facultativement anaérobie, facultativement intracellulaire et appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* (3).

Le diagnostic est basé sur l'isolement dans l'organisme à partir soit de fientes ou de fèces ou par écouvillonnage au niveau rectal, soit des œufs ou des embryons. Le prélèvement peut être réalisé également à partir du terrain (en particulier, la poussière et les restes de coquilles) ou des produits alimentaires (4).

Des milieux d'enrichissement sélectifs et non sélectifs et des milieux gélosés sont utilisés pour l'isolement et l'identification préliminaire des Salmonelles. Toutefois, plusieurs tests biochimiques sont appliqués pour obtenir une confirmation finale de la souche isolée (6).

2.2. Mycoplasmoses

2.2.1. Définition de la maladie

Les Mycoplasmoses aviaires sont des maladies insidieuses, courantes, qui entraînent de lourdes pertes économiques. La Mycoplasmoses aviaire est causée par plusieurs *Mycoplasmes* pathogènes parmi lesquels, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) et *Mycoplasma synoviae* (MS) sont les plus importants (3).

2.2.2. Description de la maladie

Les Mycoplasmoses aviaires sont des infections respiratoires, génitales ou articulaires dont les principaux agents étiologiques sont: *M. gallisepticum* et *M. synoviae* (7).

M. gallisepticum est responsable d'une maladie respiratoire chronique chez le poulet et une sinusite infectieuse chez la dinde. Chez le poulet la maladie se caractérise par des râles, du coryza, des éternuements, et de la dyspnée. Alors que chez la dinde, une sinusite infra-orbitaire uni- ou bilatérale conduisant à la fermeture des paupières peut être observée.

En outre, la présence d'un stress lié à la conduite d'élevage ou d'autres agents pathogènes (virus ou bactéries) peut aggraver la maladie et conduire à l'apparition de lésions sévères des sacs aériens et par conséquent, des pertes de production (7).

M. synoviae est plutôt responsable d'une synovite infectieuse qui se traduit par des atteintes articulaires (articulations des ailes et des pattes enflées, retards de croissance, fientes vertes et boiteries) (7). En outre, le pouvoir pathogène de *M. synoviae* peut être exacerbé lors d'association à des virus ou des bactéries, ainsi, des retards de croissance, boiteries et pâleur des crêtes sont observés (8).

2.2.3. Transmission de la maladie

La transmission du *Mycoplasme* se fait d'une manière directe et indirecte comme il a été précédemment mentionné dans le cas de *Salmonelle*.

La persistance des *Mycoplasmes* dans l'environnement fait partie aussi de la transmission indirecte (terre, aliment, eau de boisson, eau de puits, plumes....etc.) (7).

2.2.4. Identification de l'agent pathogène

Le *Mycoplasme* est une petite bactérie sans paroi. Elle n'est pas visible en microscopie optique.

La méthode de référence pour le diagnostic des Mycoplasmoses aviaires repose sur l'isolement et l'identification des *Mycoplasmes* (MG et MS) à partir d'animaux vivants (écouvillonnages de la trachée, des fentes palatines, des cloaques et collecte de sperme) ou morts (écouvillonnage de la trachée, des sacs aériens, des poumons, des oviductes, du vitellus ou des oropharynx d'embryons ou de poussins, des articulations, etc.) (7).

En effet, après l'isolement des *Mycoplasmes* sur des milieux liquides et gélosés spécifiques, MG et MS peuvent être identifiés à l'aide de plusieurs méthodes biochimiques, immunologique ou même moléculaires.

Les tests biochimiques de base ne peuvent être utiles que pour une classification préliminaire des isolats. Cependant l'identification finale des *Mycoplasmes* repose soit sur des épreuves immunologiques dont les plus satisfaisantes étant les épreuves d'immunofluorescence ou d'immuno-peroxydase. Soit sur des techniques de biologie moléculaire (PCR) permettant la mise en évidence de leur ADN. Des épreuves sérologiques peuvent également être utilisées pour l'identification des *Mycoplasmes* telles que :

L'agglutination rapide sur lame (ARL), l'inhibition d'hémagglutination (IHA) et la méthode immuno-enzymatique (ELISA) (9).

**MATERIEL
ET
METHODES**

1. Recherche des salmonelles

1.1. Prélèvement

Nos échantillons se présentent sous forme d'écouvillons cloacaux prises de poules SPF (environ 15% du nombre total des poules). Le nombre de prélèvements est de 10 écouvillons par semaine. Les prélèvements sont acheminés au laboratoire, conditionnés et maintenus à 4°C.

Les 10 écouvillons sont répartis en 2 pools (deux flacons) à raison de 5 échantillons par pool.

1.2. Méthode d'analyse

La recherche des *Salmonelles* se fait selon la norme NF U 47-101 qui comprend les 4 étapes suivantes :

✓ **Pré-enrichissement**

Le nombre de salmonelles dans la plus part des échantillons prélevés reste faible, d'où l'intérêt d'utiliser des milieux de pré-enrichissement pour pouvoir les isoler.

L'eau peptonnée tamponnée (EPT) est utilisée pour cette fin. Ce milieu permet de revivifier et de multiplier le nombre des salmonelles préexistant. Toutefois, ce milieu reste non sélectif, ainsi, parallèlement à la multiplication des *Salmonelles*, d'autres types de bactéries éventuellement associées au prélèvement peuvent croître.

Le pré-enrichissement est réalisé comme suite :

Chaque lot de 5 écouvillons est mis dans un flacon contenant 200mL d'EPT. Les flacons sont ensuite incubés à 37°C pendant 18 à 24h.

✓ **Enrichissement sélectif**

Les milieux utilisés dans cette phase sont des milieux liquides sélectifs permettant la croissance sélective de *Salmonelles* et l'inhibition des autres bactéries.

Comme le stipule la norme, la recherche de tout sérovar de *Salmonelle* exige l'utilisation de 3 milieux : RSV (bouillon rappaport soya Vassiliadis), SC (milieu sélénite-cystine) et MKTT (Müller-Kauffmann tétrathionate).

Ainsi, des tubes contenant 20mL de chacun de ces 3 milieux sontensemencés par 2mL de la culture de pré-enrichissement.

Les bouillons sont ensuite incubés à 42°C dans le cas de RVS et MKTT et à 37°C dans le cas de Sélénite-cystine pendant un temps de 18 à 24 heures.

La sélectivité des bouillons utilisés et la température d'incubation relativement élevée favorise l'élimination d'une grande partie de la flore d'accompagnement et la croissance des *Salmonelles*.

✓ Isolement sélectif

L'isolement des salmonelles se fait sur des géloses sélectives solides. Ces derniers inhibent la croissance des autres bactéries d'origine intestinale et donnent des informations sur les principales caractéristiques biochimiques différentielles des *Salmonelles*.

Conformément à la norme deux géloses sélectives sont utilisées :

- **Milieu XLD (obligatoire):** Celui-ci présente trois caractéristiques pour différencier les colonies de salmonelle: la formation d'acide lors de l'utilisation des sucres contenus dans le milieu, la décarboxylation de la lysine en cadavérine et la production d'hydrogène sulfuré à partir de thiosulfate de sodium en présence de citrate ferrique ammoniacal.
Sur ce milieu, les colonies de *Salmonella* sont roses à rouges avec ou sans centre noir.
- **Milieu Hektöen (au choix):** Ce milieu d'isolement contient trois sucres (lactose, saccharose et salicine) qui, associés à deux indicateurs colorés, permettent de différencier plus facilement les colonies lactose+ et lactose-. la production d'hydrogène sulfuré à partir de thiosulfate de sodium en présence de citrate ferrique ammoniacal permet aussi la caractérisation des colonies de salmonelle.

L'aspect des colonies de *Salmonella* est vert bleuâtre avec ou sans centre noir.

Ainsi, la culture contenue dans chacun des trois tubes (de l'enrichissement sélectif) est ensemencé sur deux boîtes l'une avec XLD et l'autre avec Hektöen et incubées à 37°C pendant 24h.

Au terme de cette incubation, les colonies suspectes d'être des *Salmonelles* sont repiquées et purifiées sur gélose inclinée GTS pour une étude des caractères biochimiques.

Les pentes ainsi ensemencées sont placées à 37°C pendant 24h.

✓ Identification biochimique

Différents tests biochimiques sont réalisés pour la recherche des *Salmonelles*. Parmi ces tests on cite :

➤ Test Urée-Indole :

Des colonies suspectes sont prélevées à partir des pentes GTS et mises sur des tubes contenant 1ml du milieu Urée-indole (couleur orange). Les tubes sont incubés à 37°C et la lecture se fait chaque 30 minute. Si aucun virage de couleur n'est observé après 4h, l'incubation est poursuivie jusqu'au lendemain.

Ce milieu permet de mettre en évidence les caractères suivants :

- Présence d'une uréase,
- Présence d'une tryptophanase,
- Présence d'un tryptophane désaminase.

Interprétation :

- Absence de virage de couleur à l'issue de 24h : Il s'agit d'un microorganisme à uréase, donc suspicion de *Salmonelle*.
- Virage du milieu au rouge pourpre : le microorganisme possède une uréase et donc absence de *Salmonelle*.

Le test indole est réalisé pour les cultures uréase -. Une goutte du réactif de Kovacs est ajoutée au tube contenant le milieu Urée-Indole avec la suspension bactérienne, la lecture est immédiate :

Interprétation :

- Présence d'un anneau rouge à la surface du milieu : Indole+ donc absence de *Salmonelle*.
- Absence de virage de couleur (toujours orange) : forte suspicion de *Salmonelle*.

2. Recherche des Mycoplasmes

2.1. Prélèvements

19 échantillons de sang sont prélevés à partir de la veine ailaire d'un échantillon de poule SPF. Après centrifugation (1500rpm/10minutes), les sérums sont transmis dans des tubes eppendorf et stockés à la réfrigération.

2.2. Méthode d'analyse

Dans cette étude, la recherche des mycoplasmes fait appel à un kit commercialisé sous le nom « Soleil MG RPA-Test ». C'est un test qui permet de diagnostiquer rapidement la présence des mycoplasmes dans les sérums des sujets testés.

Ce test est fait selon la notice du fabricant qui s'inspire totalement de la norme NF-U47-012.

Principe du kit: il s'agit d'une épreuve sérologique (ARL) utilisée pour détecter la présence des anticorps anti-MG et anti-MS. Cette technique est basée sur le principe d'agglutination d'anticorps, produits par la volaille infectée, avec la suspension d'antigène correspondant (réactifs). L'apparition d'une agglutination signifie la présence d'anticorps circulant.

Les réactifs du kit doivent être à température ambiante (faire sortir le kit du réfrigérateur au moins 30 minutes avant le test). Après avoir bien mélangé les réactifs (antigène coloré de MG ou de MS) 30µL de celui-ci et 30µL du sérum sont déposés séparément sur une plaque blanche propre. À l'aide d'une baguette propre le sérum et l'Ag sont mélangés sur une surface circulaire. La plaque est agitée pendant 2min. Une agglutination est indiquée par la floculation de l'antigène.

La lecture se fait dans les 30 secondes qui poursuivent les 2min d'agitation.

Les contrôles positifs et négatifs sont réalisés et serviront à la validité des tests.

Interprétation :

- Agglutination : floculation de l'antigène et présence d'anticorps circulant.
- Pas d'agglutination : absence d'anticorps circulant.

En cas d'une agglutination douteuse, et comme le stipule la norme NF U 47-012, le sérum douteux est décomplémenté par une dilution au 1/5 dans l'eau physiologique puis incubé 30min à 56°C ensuite testé à nouveau vis à vis de l'antigène.

**RESULTATS
ET
DISCUSSION**

1. Cas des Salmonelles

A partir des deux prélèvements réalisés, plusieurs colonies d'aspect différent ont pu être isolées sur les deux milieux XLD et Hektöen. Le nombre de colonies obtenues sur chacun des milieux est présenté dans les tableaux ci-dessous:

Tableau 3 : Résultats des prélèvements du 13/04/2015.

	Pool 1			Pool 2		
	MKTT	RVS	SC	MKTT	RVS	SC
XLD	*(1)	-	*(3)	*(5)	-	*(5)
HEKTOEN	*(2)	-	*(4)	-	-	*(6)

* : Présence de colonies suspectes d'être Salmonelle.

- : Absence de colonies suspectes d'être Salmonelle.

Tableau 4 : Résultats des prélèvements du 20/04/2015.

	Pool 1			Pool 1		
	MKTT	RVS	SC	MKTT	RVS	SC
XLD	*(7)	*(9)	-	*(11)	*(12)	-
HEKTOEN	*(8)	*(10)	-	-	*(13)	-

* : Présence de colonies suspectes d'être Salmonelle.

- : Absence de colonies suspectes d'être Salmonelle.

Les caractéristiques macroscopiques et biochimiques des différentes colonies isolées sur les deux milieux XLD et HEKTOEN sont présentées dans le tableau 5 :

Tableau 5 : Aspect morphologique et biochimique des colonies isolées.

Milieux	Morphologie des colonies	Caractéristiques biochimiques	Microorganismes
XLD	Colonies jaunes	LDC (-) H ₂ S (-)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Klebsiella</i>
	Colonies rouges	LDC (+) H ₂ S (-)	<i>Shigella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Salmonella</i>
	Colonies rouges à centre noir	LDC (+) H ₂ S (+)	<i>Salmonella</i> , <i>Arizona</i> , <i>Edwardsiella</i>
HEKTOEN	Colonies jaunes saumon	Glucides+ H ₂ S-	<i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Arizona</i> , <i>Serratia</i>
	Colonies jaunes saumon à centre noir	Glucides+ H ₂ S+	<i>Proteus vulgaris</i>
	Colonies vertes à centre noir	Glucides- H ₂ S+	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella</i>
	Colonies vertes ou bleuâtres	Glucides- H ₂ S-	<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Proteus morgani</i> , <i>Proteus rettgeri</i>
	Petites colonies bleues ou brunâtres	H ₂ S- Oxydase positive	<i>Pseudomonas</i>

D'après les résultats présentés aux tableaux ci-dessus, les colonies développées sur le milieu XLD ont présenté des caractères biochimiques variés notamment : (LDC-/H₂S+), (LDC+/H₂S-), (LDC+/H₂S+). Alors que celles développées dans le milieu HEKTOEN ont présenté d'autres caractéristiques tel que : (Glucide+ ; H₂S-), (Glucide+ ; H₂S+), (Glucide- ; H₂S+), (Glucide- ; H₂S-).

Selon la norme ISO 6579 seules les colonies présentant les caractères biochimiques suivants : Glucide- (lactose - / saccharose - / salicine -) ; H₂S +/-; LDC +, peuvent correspondre aux bactéries du genre *Salmonella*. Ces caractères se manifestent par l'apparition de colonies avec une couleur rouge à centre noir dans le cas du milieu XLD, et des colonies bleues à vertes à centre noir dans le cas du milieu HEKTOEN.

En effet, le milieu XLD contient la xylose, qui après son utilisation on aura une acidification initiale peu importante mais suffisante pour induire l'expression de la lysine-décarboxylase (LDC). *Salmonella* décarboxyle la lysine en cadavérine par l'intermédiaire de son (LDC), ce qui provoque une ré-alkalinisation du milieu et donnant ainsi aux colonies la couleur rouge en présence de rouge de phénol (indicateur coloré de pH de couleur rouge à pH neutre ou alcalin). Les colonies présentant un caractère LDC- sont plutôt de couleur jaune (ex : *E. coli*).

En outre, en milieu alcalin, la réduction du thiosulfate en présence de citrate de fer ammoniacal par les *Salmonella* productrices de sulfure d'hydrogène, se manifeste par un noircissement dû à l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies, Tandis qu'en milieu acide la coloration noire n'apparaît pas.

D'autre part, lors de l'utilisation du milieu HEKTOEN, le principe de lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine). Les microorganismes qui fermentent au moins l'un d'entre eux forment des colonies de couleur "saumon" (glucides +), les autres donnant des colonies bleues ou vertes (glucides-). Outre, en présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène donnent, avec le citrate ferrique, des colonies à centre noir (H₂S+).

Ces constats nous permettent, donc, de nous orienter vers le genre *Salmonella*. Selon les résultats trouvés nous pouvons suggérer la présence de *salmonella* dans nos échantillons. Toutefois, d'autres bactéries appartenant à la famille des entérobactéries comme *Shigella*, *Providencia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, peuvent donner des colonies identiques à celles des

Salmonella sur les milieux sélectifs utilisés, d'où l'intérêt d'effectuer d'autres tests biochimiques spécifiques à *Salmonella*.

Ainsi, pour pouvoir faire la distinction, les colonies suspectes obtenues sur les deux milieux précités subissent une identification biochimique en utilisant le milieu Urée-Indole. En effet les genres bactériens *Proteus*, *Providencia*, et *Morganella* présentent une forte activité uréase (uréase dite rapide) alors que les *Salmonella* sont uréase -. Ces tests sont effectués sur des colonies suspectes (glucides -, H₂S +/-, LDC+).

Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Résultats du Test Urée

Numéro de colonie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Test urée	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Au terme de cet essai et d'après les résultats obtenus, tous les tubes ont présenté une coloration rouge pourpre, ce qui signifie que les microorganismes isolés possèdent une uréase.

Nous pouvons donc conclure qu'aucune des souches isolées ne correspond à une Salmonelle.

2. Cas des Mycoplasmes

Le test sérologique utilisé pour l'identification des *Mycoplasmes* chez les poules SPF a pour but de rechercher des anticorps circulant dans le sérum. La présence d'anticorps anti-Mycoplasmes est traduite par une agglutination du complexe Ag-Ac.

La réaction est considérée négative si aucune agglutination n'est détectée après 2 minutes.

Par ailleurs, les tests positifs donnent une agglutination bien visible. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6 :

Tableau 6 : Résultats des sérums témoins et sérums testés par les antigènes inactivés de *M.Gallisepticum* et *M. Synoviae* :

Les sérums témoins et les sérums analysés	<i>M.Gallisepticum</i>	<i>M.Synoviae</i>
Contrôle positif MG	Positif	*
Contrôle positif MS	*	Positif
Contrôle négatif	Négatif	Négatif
1	Négatif	Négatif
2	Négatif	Négatif
3	Négatif	Négatif
4	Négatif	Négatif
5	Négatif	Négatif
6	Négatif	Négatif
7	Négatif	Négatif
8	Négatif	Négatif
9	Négatif	Négatif
10	Négatif	Négatif
11	Négatif	Négatif
12	Négatif	Négatif
13	Négatif	Négatif
14	Négatif	Négatif
15	Négatif	Négatif
16	Négatif	Négatif
17	Négatif	+/-
18	Négatif	Négatif
19	Négatif	Négatif

D'après les résultats présentés dans le tableau 6, on remarque que les sérums analysés sont tous négatifs (aucune agglutination n'est observée) à l'exception du sérum 17 qui a montré une légère agglutination vis à vis de l'antigène. Ainsi et comme le stipule la norme NF U47-012 en cas de sérum douteux, le sérum est décomplémenté 30min à 56°C et dilué au 1/5 dans

l'eau physiologique puis testé à nouveau vis à vis du même antigène (MS). Le résultat obtenu par la suite n'a montré aucune agglutination ce qui confirme sa négativité.

Les résultats obtenus lors de cette étude ont montré que tous les prélèvements analysés, selon les normes officielles, sont exempts de Salmonelles (pour les écouvillons) et de Mycoplasmes (sérums). Ce qui confirme que les poules au sein de la DPIV gardent leur statut SPF.

D'autres contrôles sérologiques destinés à la vérification de certains virus aviaires (NDV, Bronchite infectieuse, Gumboro) sont effectués en parallèle à ceux que j'ai réalisés. Les résultats obtenus ont également révélé une totale négativité au niveau des sérums analysés. Ces différents contrôles qui étaient mensuels au départ sont devenus maintenant trimestriels. Ceci est le fruit de différentes mesures d'hygiène et de sécurité strictement appliqués au niveau de la zone d'élevage de la DPIV.

Ces résultats satisfaisants, permettront ainsi de qualifier l'élevage des poulets SPF au niveau de la DPIV et par conséquent de produire et de livrer aux sections techniques des œufs et des poussins SPF sur lesquels le contrôle des médicaments vétérinaires pourrait être effectué en toute sécurité.

Ainsi, des résultats sûrs et fiables seront donnés aux établissements pharmaceutiques vétérinaires et des vaccins contrôlés et conformes à la réglementation de la pharmacopée seront mises sur le marché.

.

Conclusion générale

Le présent travail a été réalisé au sein de la DPIV dérivant de l'ONSSA dans le cadre de projet de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme en licence sciences et techniques en sciences biologiques appliquées et santé.

Ce travail avait pour objectif la vérification de l'état de santé du poulet SPF sain afin de fournir aux sections techniques des œufs et des poussins SPF qui serviront au contrôle des médicaments vétérinaires.

Cette vérification consiste à réaliser deux contrôles. Le premier était un contrôle bactériologique permettant l'isolement des Salmonelles. Tandis que le deuxième était un test sérologique pour la révélation des mycoplasmes.

Les résultats obtenus ont montré que les deux contrôles bactériologique et sérologique sont négatifs confirmant, ainsi, que le poulet SPF garde son statut.

Ce présent travail nous permet de conclure que les poules et les œufs SPF produites au niveau de la DPIV présentent une garantie fidèle par laquelle passera la vérification de la fiabilité des vaccins aviaires.

Annexe

1. Milieu gélosé non sélectif :

Gélose GTS (gélose Tryptone Soja) est composée de :

-Tryptone	15g
-Peptone papaïnique de soja	5 g
-Chlorure de sodium5 g
-Agar agar bactériologique	15 g

Préparation : Mettre en suspension 40,0 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée puis porter à ébullition.

2. Milieu de préenrichissement non sélectif : eau peptonée tamponnée composé de :

- Peptone.....	10,0 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Phosphate disodiquedodécahydraté.....	9,0 g
- Phosphate monopotassique	1,5 g

Préparation : Mettre en solution 25,5 g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillé puis porter à ébullition.

3. Milieux d'enrichissement sélectifs

3.1. Bouillon de Rappaport-Vassiliadis modifié – Peptone de soja/chlorure de magnésium/vert malachite, bouillon RVS) est composé de :

- Peptone papaïnique de soja.....	4,50 g
- Chlorure de sodium	7,20 g
- Phosphate monopotassique	1,26 g
- Phosphate dipotassique	0,18 g
- Chlorure de magnésium anhydre	13,40 g
- Vert malachite (oxalate).....	36,0 mg

Préparation : Mettre en solution 26,6 g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée puis porter à ébullition.

3.2. Bouillon au tétrathionate (Müller-Kauffmann) est composé de :

- Tryptone.....	8,45 g
- Extrait de viande	4,23 g
- Bile de boeuf bactériologique	4,75 g
- Chlorure de sodium	2,54 g
- Carbonate de calcium.....	38,04 g
- Thiosulfate de sodium anhydre.....	30,27 g
- Vert brillant.....	9,50 mg

Préparation : Mettre en suspension 89,4 g du milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée puis porter à ébullition.

3.3. Bouillon au sélénite-cystine est composé de :

-Tryptone.....	5,0 g
-Lactose	4,0 g
-Phosphate disodique	10,0 g
-Hydrogénosélénite de sodium.....	4,0 g
-L-cystine.....	10,0 mg

Préparation : Mettre en suspension 23,0 g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée puis porter à ébullition.

4. Milieux d'isolement sélectifs solides

4.1.Gélose XLD (Xylose Lysine Désoxycholate) est composée :

- Extrait autolytique de levure.....	3,0 g
- L-Lysine	5,0 g
- Lactose.....	7,5 g
- Saccharose	7,5 g
- Xylose	3,5 g
- Désoxycholate de sodium.....	2,5 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Thiosulfate de sodium.....	6,8 g

- Citrate ferrique ammoniacal..... 0,8 g
- Rouge de phénol..... 80,0 mg
- Agar agar bactériologique..... 13,5 g

Préparation : Mettre en suspension 55,2 g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée puis porter à ébullition.

4.2.Gélose Hektöen

- Peptone pepsique de viande..... 12,0 g
- Extrait autolytique de levure..... 3,0 g
- Lactose..... 12,0 g
- Saccharose 12,0 g
- Salicine..... 2,0 g
- Sels biliaires 9,0 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g
- Thiosulfate de sodium 5,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal 1,5 g
- Bleu de bromothymol 65 mg
- Fuchsine acide 40 mg
- Agar-agar bactériologique 13,5 g

Préparation : Mettre en suspension 75,1 g de milieu déshydraté dans un litre d'eau distillée puis porter à ébullition.

Références bibliographiques

1. Manuel qualité de la DPIV
2. Pharmacopée européenne année 2008 édition 6.1.
3. Pierré, Geerinkx (2011), plan d'action salmonelles (PAS). Lutte contre les salmonelles zoonotiques chez les poulets de chair et les dindes d'engraissement 5-6.
4. Wray c. & wray A.(EDS) (2000), Salmonella in Domestic Animals. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, 407-427.
5. Ziegler, A.F, S.Davison, H.Acland, & R.J. Ekroqde (1999), Charasteristics of H7N2 (non-pathogenic) avian influenza virus infection in commercial layers, in Pernnsylva (1997-98). Avian Diseases 43: 142-149.
6. Voogt N., Raes.M, Wannet WJ & Henken AM (2000), Comparison of selective enrichment media for the detection of Salmonella in poultry faeces.
7. Kempf I. (1998), DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis.
8. Kleven S.H. (2003), Mycoplasma Synoviae infection. In: Diseases of Poultry, Saif Y.M, Barnes H.J, Glisson J.R, Fadly AM., McDougald L.R & Swayne D.E, eds. Iowa States University Press, Ames, Iowa, USA, 756-766.
9. Czifra, G., B.Sundquist B. Tuboly T. & STIPKOVITS, L. (1993), Evaluation of a monoclonal blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Mycoplasma gallisepticum-specific antibodies. Avian Dis. 37: 680-688.