

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR  
\*\*\*\*\*  
ECOLE INTER - ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE  
VETERINAIRES  
(E.I.S.M.V.)



ANNEE 2014

N°04

**RECHERCHE PAR RT-PCR DES VIRUS APPARTENANT A LA  
FAMILLE DES *PARAMYXOVIRIDAE* AU SEIN DES SITES DE  
CONSERVATION DE PRIMATES NON HUMAINS AU GABON**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement **le 08 mars 2014 à 10h00** devant la Faculté de Médecine, de  
Pharmacie et d'Odontologie de Dakar pour obtenir le grade de

**DOCTEUR VETERINAIRE**

(DIPLÔME D'ETAT)

Par

**Thierry Audrey Gaël TSOUMBOU**

Né le 27 Janvier 1986 à Franceville (GABON)

---

**JURY**

---

**Président :**

**Mr Bernard Marcel DIOP**  
Professeur à la Faculté de Médecine, de  
Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar

**Directeur et rapporteur de Thèse :**

**Mme. Rianatou BADA ALAMBEDJI**  
Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

**Membres:**

**Mr Moussa ASSANE**  
Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

**Mr Yalacé Yamba KABORET**  
Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

---

**Co-Directeur de thèse :**

**Mr Barthélémy NGOUBANGOYE**  
Docteur Vétérinaire au CIRMF GABON



# **ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES DE DAKAR**

**BP: 5077-DAKAR (Sénégal)**

**Tel: (00221) 33 865 10 08 Télécopie (221) 825 42 83**

---

**COMITE DE DIRECTION**

---

**LE DIRECTEUR GENERAL**

Professeur Louis Joseph PANGUI

**LES COORDONNATEURS**

Professeur Germain Jérôme SAWADOGO

Coordonnateur des Stages et de la  
Formation Post-Universitaire

⌘ Professeur Serge Niangoran BAKOU  
Coordonnateur des Etudes

⌘ Professeur Yalacé Yamba KABORET  
Coordonnateur de la Coopération Internationale

⌘ Professeur Yakouba KANE  
Coordonnateur de la Recherche/Développement

# PERSONNEL ENSEIGNANT

❖ PERSONNEL ENSEIGNANT DE L'E.I.S.M.V

❖ PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV

**A. DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET  
PRODUCTIONS ANIMALES**

CHEF DE DEPARTEMENT : Papa El Hassane DIOP, Professeur

**SERVICES**

**1. ANATOMIE-HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE**

Serge Niangoran BAKOU	Maître de conférences agrégé
Gualbert Simon NTEME ELLA	Assistant
M. Jean Narcisse KOUAKOU	Moniteur

**2. CHIRURGIE –REPRODUCTION**

Papa El Hassane DIOP	Professeur
Alain Richi KAMGA WALADJO	Maître - Assistant

**3. ECONOMIE RURALE ET GESTION**

Cheikh LY	Professeur (en disponibilité)
M. Walter OSSEBI	Assistant

**4. PHYSIOLOGIE-PHARMACODYNAMIE-THERAPEUTIQUE**

Moussa ASSANE	Professeur
Rock Allister LAPO	Maître – Assistant

**5. PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

Germain Jérôme SAWADOGO	Professeur
Adama SOW	Assistant

**6. ZOOTECHNIE-ALIMENTATION**

Ayao MISSOHO	Professeur
Simplice AYSSIWEDE	Maitre - Assistant

**B. DEPARTEMENT DE SANTE PUBLIQUE ET  
ENVIRONNEMENT**

**CHEF DE DEPARTEMENT** : Rianatou BADA ALAMBEDJI,  
Professeur

**SERVICES**

**1. HYGIENE ET INDUSTRIE DES DENREES ALIMENTAIRES  
D'ORIGINE ANIMALE (HIDAOA)**

Serigne Khalifa Babacar SYLLA	Maître - Assistant
Bellancille MUSABYEMARIYA	Maître - Assistante

**2. MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-PATHOLOGIE  
INFECTIEUSE**

Rianatou BADA ALAMBEDJI	Professeur
Philippe KONE	Maître - Assistant
Mlle Marie Fausta DUTUZE	Docteur Vétérinaire
Mlle Bernadette YOUGBARE	Monitrice

**3. PARASITOLOGIE-MALADIES-PARASITAIRES-ZOOLOGIE  
APPLIQUEE**

Louis Joseph PANGUI	Professeur
Oubri Bassa GBATI	Maître - Assistant
M. Laibané D. DAHOUROU	Moniteur

**4. PATHOLOGIE MEDICALE-ANATOMIE PATHOLOGIQUE-  
CLINIQUE AMBULANTE**

Yalacé Yamba KABORET	Professeur
Yaghoubia KANE agrégé	Maître de conférences
Mireille KADJA WONOU	Maître - Assistante
M. Akafou Nicaise AKAFU	Moniteur

M. Souahibou Sabi SOUROKOU	Moniteur
Mr Omar FALL Vacataire	Docteur Vétérinaire
Mr Alpha SOW Vacataire	Docteur Vétérinaire
Mr Abdoulaye SOW Vacataire	Docteur Vétérinaire
Mr Ibrahima WADE Vacataire	Docteur Vétérinaire
Mr Charles Benoît DIENG Vacataire	Docteur Vétérinaire

## **5. PHARMACIE-TOXICOLOGIE**

Assiongbon TEKO AGBO	Chargé de recherche
Dr Gilbert Komlan AKODA	Maître - Assistant
Abdou Moumouni ASSOUMY	Assistant

## **C. DEPARTEMENT COMMUNICATION**

**CHEF DE DEPARTEMENT** : Professeur Yalacé Yamba KABORET

### **SERVICES**

#### **1. BIBLIOTHEQUE**

Mme Mariam DIOUF  
(Vacataire)

Ingénieur

Documentaliste

#### **2. SERVICE AUDIO-VISUEL**

Bouré SARR

Technicien

#### **3. OBSERVATOIRE DES METIERS DE L'ÉLEVAGE (O.M.E.)**

### **D. SCOLARITE**

M. Théophraste LAFIA

Chef de la scolarité

Mlle Aminata DIAGNE

Assistante

# PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV

## 1. MATHEMATIQUES

Abdoulaye MBAYE

Assistant  
Faculté des Sciences et Techniques  
UCAD

## 2. PHYSIQUE

Amadou DIAO

Assistant  
Faculté des Sciences et Techniques  
UCAD

### Travaux Pratiques

Oumar NIASS

Assistant  
Faculté des Sciences et Techniques  
UCAD

## 3. CHIMIE ORGANIQUE

Aboubacary SENE

Maître - Assistant  
Faculté des Sciences et Techniques  
UCAD

## 4. CHIMIE PHYSIQUE

Abdoulaye DIOP

Maître de Conférences

Mame Diatou GAYE SEYE

Maître de Conférences  
Faculté des Sciences et Techniques  
UCAD

### Travaux Pratiques de CHIMIE

Assiongbon TECKO AGBO

Assistant  
EISMV – DAKAR

### Travaux Dirigés de CHIMIE

Momar NDIAYE

Maître - Assistant  
Faculté des Sciences et Techniques  
UCAD

## 5. BIOLOGIE VEGETALE

Dr Aboubacry KANE

Maître - Assistant (Cours)

Dr Ngansomana BA

Assistant Vacataire (TP)  
Faculté des Sciences et Techniques  
UCAD



## **6. BIOLOGIE CELLULAIRE**

Serge Niangoran BAKOU

Maître de conférences agrégé

EISMV – DAKAR

## **7. EMBRYOLOGIE ET ZOOLOGIE**

Malick FALL

Maître de Conférences

Faculté des Sciences et Techniques

UCAD

## **8. PHYSIOLOGIE ANIMALE**

Moussa ASSANE

Professeur

EISMV – DAKAR

## **9. ANATOMIE COMPAREE DES VERTEBRES**

Cheikh Tidiane BA

Professeur

Faculté des Sciences et Techniques

UCAD

## **10. BIOLOGIE ANIMALE (Travaux Pratiques)**

Serge Niangoran BAKOU

Maître de conférences agrégé

EISMV – DAKAR

Oubri Bassa GBATI

Maître - Assistant

EISMV – DAKAR

Gualbert Simon NTEME ELLA

Assistant

EISMV – DAKAR

## **11. GEOLOGIE :**

FORMATIONS SEDIMENTAIRES

Raphaël SARR

Maître de Conférences

Faculté des Sciences et Techniques

UCAD

## **12. HYDROGEOLOGIE**

Abdoulaye FAYE

Maître de Conférences

Faculté des Sciences et Techniques

## DEDICACES

Je **remercie** le Seigneur DIEU TOUT PUISSANT qui ne cesse de me combler de ses grâces depuis que j'ai vu le jour, et qui me permet d'arriver jusqu'ici, devant vous, aujourd'hui. C'est grâce à lui que j'ai pu réaliser ce travail.

**A mes Ancêtres** qui ont donné naissance à une famille au grand cœur et d'y avoir su instaurer un climat de paix et de solidarité. Sachez que vos descendants vous seront à jamais reconnaissants.

**A mon Père** Maurice TSOUMBOU qui a œuvré pour l'harmonie de cette si grande famille, tes conseils demeurent des directives incontournables pour ma vie et celle de notre famille.

**A mes Mères** POPO Yvonne, KOMBO Julienne qui ont toujours été là, dans les joies et les peines, les réussites et les échecs. Vous avez toujours cru en moi malgré mes multiples erreurs. Pilier central de ma vie, je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. Vous avez toujours su me ramener à la raison car vous saviez ce qui est bon pour moi.

**A mes grands frères et sœurs** OKI Michael, PISSA TSANGO, GASPARD, TSOUNGUI Aude Mauricette, KEYI TSOUMBOU POSNIC, MOUPELA TSOUMBOU pour l'encadrement et le soutien incessant qu'ils manifestent à mon égard, vous êtes mes aînés et vous avez toute ma reconnaissance

**A mes petits frères et sœurs**, BOUTOUNDOU Stéphane, KOMBO TSOUMBOU Amour, NGODERE Tresor, OBONE OBIANG Milly guenaëlle, EKOUAGHE Cyril, NZIENGUI Fred Olsen, DIKAPI stevy, Berhlyna POSNIC, vous avez toujours été là quand j'ai eu besoin de vous. Sachez qu'un diplôme n'a de valeurs que sur le terrain et connaître un métier du bout des doigts est le moyen le plus sûr pour gagner sa vie. Puisse mon travail vous stimuler dans vos choix pour que demain soit meilleur qu'aujourd'hui.

**A la famille POSNIC**, vous n'avez cessé de m'encadrer, de me soutenir et de me conseiller durant tout mon cursus, je vous serai à jamais reconnaissant pour tout ce que vous avez fait pour moi. Un grand merci, je m'efforcerais pour être à la hauteur de vos exigences, afin qu'un jour je puisse vous rendre les fruits de vos semences et qu'à mon tour, je prenne en charge les plus jeunes.

**A ma bien aimée Mlle MBOU Claude Dalicia**, tu as cru en moi dès le premier jour, et aujourd'hui tu me fais le plus beau cadeau qu'un homme puisse attendre de ce monde. T'es comme la pluie qui a redonné des feuilles à mes branches desséchées. Saches que je te serai à jamais reconnaissant car tu m'as convaincu de tes sentiments à mon égard, et les yeux bandés, je te choisirai pour cheminer avec moi dans les sentiers de vie.

**A mon bb** ; t'es un don de DIEU, qu'il te garde et te protège. Tu as toute mon attention, je promets de faire de mon mieux pour que tu ne manques jamais de rien.

**Mes neveux et nièces, MOMBO Ken Daryl, POSNIC Junior, KEVIN, GERO, Mado, Grace, LEVY.** J'espère être à la hauteur de vos attentes, et avec la grâce de DIEU je prendrai soin de vous tous.

**A tous ceux qui m'on soutenu**, je dis grand merci pour toutes les choses que vous avez faites pour moi, les mots ne sont pas assez face aux bienfaits et bénédictions que vous m'offrez. Vous faire honneur est ma priorité, pour être demain, un homme meilleur.

**A mes ennemis**, malgré nos différents, je tiens à vous dédier ce travail car vos remarques et vos points de vue sur ma personne me permettent de m'améliorer chaque jour. Que ce document vous motive à travailler vu que ma sécurité dépend de votre bien-être.

**Merci ma patrie** qui à travers son système éducatif, m'a permis de me retrouver en ce jour Docteur en médecine vétérinaire,

**A la 40<sup>ème</sup> promotion** : je tiens à vous dédicacer ce travail, qu'il vous serve d'exemple et qu'il soit source de motivation, nous étions bien plus nombreux en année prépa et au fil des années le SEIGNEUR nous a peu à peu sélectionné. Tout ce temps passé à vos côtés m'a permis aujourd'hui de savoir qui je suis.

**A Mes proches, amis et compagnons** dans ce perpétuel combat qu'est la vie. Sachez qu'il n'ya ni heure ni endroit en se monde où l'apprentissage ne tarit complètement. Il faut savoir se faire petit pour être élevé car l'humilité précède la gloire, un simple « merci » vaut bien plus que de l'argent car un bien fait n'est jamais perdu. Dans la vie il faut savoir mourir pour renaître. Ne vous attristez pas des malheurs qui vous arrive car seul DIEU sait ce qui est bon pour vous et après la pluie vient le beau temps. Ces conseils sauveront la vie de qui veut l'entendre s'il est capable d'en porter le fardeau.

## REMERCIEMENTS

### Nos très sincères remerciements

**A DIEU TOUT PUISSANT** pour m'avoir donné la force et le courage d'achever ce travail et pour tous ses bienfaits, son amour, sa miséricorde ; pour m'avoir gardé en bonne santé tout au long de ma formation.

**AU CIRMF** à travers son Directeur, Le Professeur Eric LEROY, pour l'apport technique et financier dans la réalisation de ce travail.

Au professeur Rianatou BADA ALAMBEDJI, qui malgré ses multiples occupations a accepté avec spontanéité d'encadrer ce travail. Merci professeur que le Dieu tout puissant vous accorde santé et longue vie.

A tout le personnel du CIRMF en particulier ceux du CDP

Le Dr NGOUBANGOYE, Directeur du CDP, merci pour votre disponibilité. Les moments passés à vos côtés ont permis de découvrir vos qualités humaines, scientifiques et votre sens de la communication ;

les Docteurs Barthélémy NGOUBANGOYE, Larson BOUDENGA, Gaël MAGANGA, BORIS, Anaïs HERBERT, Franck PRUNIOL , Virginie ROUGERON, Fabrice KASSA , Ilich MANFRED. Merci pour vos conseils et les corrections apportées à ce document ;

Berthony, Kabrel, Karl, Morgane, Loïc, Ibrahim SERRY, Anderson, Legain, Gautier, Aminata, Axelle, Bertrand, Ilich, Linsay, Ismaël (R.I.P), Michaëlle, BITOME, Nadine, Floriane, Hugette LOUVEZO, BITHEGUE, Oriane, Claude, Joa, Sydney, Aurore, Leila, Noe, Peggy, Judicaël . Merci pour la compagnie, l'amitié, les conseils et les inoubliables moments passés à vos côtés.

A ma très chère patrie, le Gabon pour m'avoir donné l'opportunité de poursuivre mes études à l'EISMV de Dakar.

A Mr BASSIROU BONFFO et Mr serge Niangoran BAKOU, respectivement Parrain et Professeur accompagnateur de la 40 ème promotion qui est la mienne. Merci pour le service rendu.

Aux chauffeurs du CIRMF, Brice, Christophe, Alain et le chef du Garage, Mr Adjo. Merci de m'avoir conduit à travers le Gabon sans incident, que Dieu vous bénisse.

A mes amis de Franceville, Dr Gaël, Dr Barthélemy, Ilich, Hugette, Ibrah, Berthony, Michelle, Loïc je me suis senti en famille et en sécurité à vos cotés.

A ma grande famille, EKOUAGHE Cyril, NZIEGUI Fred, Lobezo, Gabana, IKAPI Stevy, GNOUNDOU Davy, MOUKOUMOU Marcy, Manuella, ASSOUM Levy, OKOUA BEKALE Parfait, Roland KONAN Valère, BACHIR BOUKO, Arnaud TALNAN, Joss BATCHI, ACKA TANO Ladji, Mahamat MAZRA, KARABOUALI Ali ANLIOU, Mouamed DOUMBIA, Olivier MITSA MI ONDO, BI, Frank EZOUA, Mouamed DALLY, Bernadette YOUNGBARE, ANUARITE DEKI, NDEYE Fatou Niang, Emanuel, Amy MALEKOU, Olivia, BEBEDI, pour tous ces moments inoubliables qui m'ont permis de toujours prendre la vie du bon côté.

A tous mes amis de l'EISMV : Béninois, Burkinabé, Camerounais, Centrafricains, Congolais, Djiboutien, Français, Gabonais, Ivoiriens, Malgache, Nigériens, Rwandais, Sénégalais, Togolais.

Au Sénégal, pays de la Téranga pour l'accueil chaleureux ; Dieuredieuf.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, ainsi que tous ceux m'ont accompagné et soutenu tout au long de ma formation. Je vous adresse mes sincères remerciements.

## **A NOS MAITRES ET JUGES**

**A notre Maître et Président du Jury, Monsieur Bernard Marcel DIOP,** Professeur à la faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie de Dakar, la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de présider notre jury de thèse, et cela malgré vos multiples occupations, nous a profondément marqué. Nous vous prions de bien vouloir croire en l'assurance de notre profonde gratitude.

**A notre Maître, Directeur et Rapporteur de Thèse, Madame Rianatou BADA ALAMBEDJI,** Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar. Nous sommes très heureux et satisfaits d'avoir effectué sous votre encadrement ce travail. Vos qualités intellectuelles et humaines ont guidé notre choix sur votre service pour la soutenance de notre thèse. Votre amour du travail bien fait et votre rigueur scientifique ont forcé notre admiration. Telle une mère vous avez su nous rassurer et nous conseiller tout au long de notre cursus jusqu'à notre soutenance. Aucun mot ne saura décrire la reconnaissance que j'ai pour vous. Que Dieu vous accorde santé et longévité.

**A notre Co-Directeur de thèse Monsieur Barthélémy NGOUBANGOYE,** Docteur vétérinaire, et chef du centre de primatologie du CIRMF au Gabon. Vous nous avez accueilli avec bienveillance, enseigné les bases du terrain, initié à ce travail de recherche et vous nous avez guidé tout au long de sa réalisation. Vos qualités humaines, vos connaissances scientifiques et votre disponibilité nous ont profondément fascinés. Veuillez croire à l'assurance de notre profonde reconnaissance.

**A notre Maître et juge, Monsieur Yalacé Yamba KABORET,** Professeur à l'EISMV de Dakar, Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail de thèse malgré vos multiples



occupations. Vos qualités intellectuelles et humaines forcent respect et admiration. Profonde gratitude, respectueuse considération et vive admiration.

**A notre Maître et juge, Monsieur Moussa ASSANE** Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar, Nous vous remercions d'avoir spontanément accepté de corriger ce travail. Votre disponibilité et vos enseignements nous ont profondément marqué. Vive admiration et sincère remerciement.

**« Par délibération, la faculté et l'école ont décidé que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner aucune approbation, ni improbation »**

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**ANPN** : Agence Nationale des Parc Nationaux

**AR** : *Avulavirus/Rubulavirus*

**ARN** : Acide ribonucléique

**AVU** : *Avulavirus*

**BET** : Bromure d'éthidium

**BKB** : Bakoumba

**BSA** : Bovine serum albumin

**CDC** : Center for Disease Control and Prevention

**CDP**: Centre De Primatologie

**CICS** : Chlorure de césium

**CIRMF** : Centre International de Recherches Médicales de Franceville

**DNTP** : désoxy Nucléosides Triphosphates

**FVR** : Fièvre de la Vallée du Rift

**HEN** : *Henipavirus*

**HeV** : Virus Hendra

**HO** : Haut Ogooué

**HPIV** : Parainfluenza humain de type 1

**IgM** : Immunoglobuline M

**IRD** : Institut de Recherche pour le Développement

**Kb** : kilobase

**Km** : kilomètre

**MenV** : Menangle virus

**MgCl<sub>2</sub>** : Chlorure de Magnésium

**Mg** : milligramme

**MgSO<sub>4</sub>** : Sulfate de magnésium

**ml** : millilitre

**mn** : minutes

**MOR** : *Morbillivirus*

**NiV** : Nipah virus

**OIE** : Office International des Epizooties

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**Pb** : Paires de base

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PNE** : Pneumovirus

**PNH** : Primates non humains

**PNPB** : Parc national des plateaux Batéké

**PPG** : Programme protection gorille

**RES** : Respirovirus

**RhCMV** : Virus de la rougeole cercopithèque à cytomégalovirus

**RMH** : Respirovirus-Morbillivirus-Henipavirus

**RNP** : Complexe Ribonucléoprotéique

**RSV** : Virus Respiratoire Syncytial

**Rpm** : Rotation par minute

**RT-PCR** : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

**SeV** : Sendai virus

**SIDA** : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise

**SIV** : Virus Simien d'Immunodéficience

**SRV** : Rétrovirus Simien de type D

**STLV** : Virus Simien T-lymphotropic

**TBE** : Tris borate EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétone)

**UMVE** : Unité des Maladies Virales Emergentes

**VHA** : Virus de l'Hépatite A

**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification des Paramyxoviridae .....	8
Tableau II : Propriétés physico-chimiques du virus respiratoire syncytial. ....	15
Tableau III : Séquences des amorces de paramyxovirus utilisées .....	37
Tableau IV : Effectif total d'individus prélevés .....	51
Tableau V : Bilan des résultats de RT-PCR Paramyxoviridae .....	53
Tableau VI: Bilan des résultats de RT-PCR Paramyxoviridae effectué dans les différentes populations du programme protection gorille (PPG).....	54
Tableau VII: Bilan des résultats de RT-PCR Paramyxoviridae effectuée dans les différentes populations du centre de primatologie du CIRMF .....	55

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Vue d'un Paramyxovirus au microscope électronique .....	6
Figure 2 : Arbre phylogénique des Paramyxoviridae en fonction des espèces affectées .....	10
Figure 3: Schéma d'une particule virale de Paramyxovirus .....	11
Figure 4 : Organisation génomique de quelques Paramyxoviridae .....	13
Figure 5 : Étapes du cycle viral des Paramyxoviridae.....	19
Figure 6: Localisation du Centre International de Recherches Médicales de Franceville (à gauche), centre de primatologie, projet protection gorille, et parc de Bakoumba (à droite) .....	25
Figure 7 : plan de masse du centre de primatologie du CIRMF(CDP) .....	26
Figure 8: Primates non humains du CDP .....	29
Figure 9: Espèces de rongeurs capturés .....	30
Figure 10: Matériel de capture et de géo localisation:.....	31
Figure 11: Matériel de prélèvement sur le terrain .....	33
Figure12 : Hotte à flux laminaire.....	34
Figure 13: Automate Geno Grinder 2000 .....	34
Figure 14: L'automate EZI Advanced XL .....	35
Figure 15: Kit d'extraction individuel sur fèces (a et b) et centrifugeuse (c).....	36
Figure 16: Cuve à électrophorèse .....	38
Figure 17: Géo localisation de la zone de capture (a ; b), et les points de piégeage (c).....	41
Figure 18: Contention et prélèvement de primate sous anesthésie générale .....	43
Figure 19 : Photo d'un gel d'agarose des produits de PCR sur pool d'ARN d'échantillons de primates, système AR. ....	53

Figure 20: Photo d'un gel d'agarose des produits de PCR sur pool d'ARN d'échantillons humains, système AR.....	54
Figure 21: Photo d'un gel d'agarose des produits de PCR sur échantillons individuels humains, système AR.....	55
Figure 22: Photo d'un gel d'agarose des produits de PCR sur échantillons individuels de primates non humains, système AR.....	56



## TABLE DE MATIERES

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES PARAMYXOVIRIDAE.....</b>	<b>6</b>
<b>I- DÉFINITION .....</b>	<b>6</b>
<b>II- CLASSIFICATION .....</b>	<b>7</b>
II- 1 SOUS-FAMILLE DES PNEUMOVIRINAE .....	9
II-2 SOUS-FAMILLE DES PARAMYXOVIRINAE .....	9
<b>III- STRUCTURE ET ORGANISATION GENOMIQUE .....</b>	<b>11</b>
III- 1 STRUCTURE VIRALE.....	11
III-2 ORGANISATION GENOMIQUE.....	12
<b>IV- PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET ANTIGÉNIQUES.....</b>	<b>13</b>
IV-1 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES.....	14
IV-2 PROPRIETES ANTIGENIQUES.....	16
<b>CHAPITRE II : EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS DUES AUX PARAMYXVIRIDAE .....</b>	<b>17</b>
II-1 SOURCES VIRALES .....	17
II-2 MODE DE TRANSMISSION DES PARAMYXOVIRIDAE .....	18
II-4 INTERACTIONS ENTRE LES PARAMYXOVIRIDAE ET LES POPULATION D'HÔTES CIBLEES .....	21
II-4-1 PARAMYXOVIRIDAE CHEZ LES RONGEURS.....	21
II-4-2 PARAMYXOVIRIDAE CHEZ LES HUMAINS .....	21
II-4-3 PARAMYXOVIRIDAE CHEZ LES PRIMATES NON HUMAINS .....	22
<b>DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>23</b>

<b>CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>24</b>
<b>I. PRESENTATION DU CADRE D’ETUDE .....</b>	<b>24</b>
I-1 LE CIRMF ET SON CENTRE DE PRIMATOLOGIE.....	24
I-2 LE PROGRAMME DE PROTECTION DES GORILLES (PPG) .....	27
I-3 LE PARC DE LA LEKIEDI.....	27
<b>II- MATERIEL .....</b>	<b>28</b>
<b>II-1 COMMUNAUTE D’HOTES .....</b>	<b>28</b>
II-1-1 les primates non humains (PNH).....	28
II-1-2 les rongeurs .....	30
II-1-3 le personnel travaillant .....	31
<b>II-2 MATERIEL DE CAPTURE ET DE LOCALISATION.....</b>	<b>31</b>
<b>II-3 MATERIEL DE LABORATOIRE.....</b>	<b>32</b>
II-3-1 matériels de prélèvement.....	32
II-3-2 matériel d’extraction d’ARN.....	33
II-3-3 matériel de transcription inverse suivie d’une polymérisation en chaîne (RT- PCR) .....	36
II-3-4 matériel d’électrophorèse .....	38
II-3-5 matériel de conservation des amplicons .....	38
<b>III- METHODES.....</b>	<b>39</b>
<b>III-1 SUR LE TERRAIN .....</b>	<b>39</b>
III-1-1 Détermination des coordonnées des points de capture.....	39
III-1-2 capture des rongeurs .....	42
III-1-3 capture des primates non humains .....	42
<b>III-2 AU LABORATOIRE.....</b>	<b>43</b>
III-2-1 méthodes de prélèvement.....	43

<b>III-2-1-1 technique de prélèvement sur le personnel</b> .....	43
<b>III-2-1-2 technique de prélèvement sur les rongeurs</b> .....	44
<b>III-2-1-3 technique de prélèvement sur les primates non humains</b> ...	44
<b>III-2-2 méthodes d'obtention d'ARN</b> .....	45
<b>III-2-2-1 méthodes d'extraction d'acide ribonucléique (ARN)</b> .....	45
<b>III-2-2-1-1 Découpe et broyage des organes sur l'automate</b> .....	45
<b>III-2-2-1-2 extraction d'ARN sur crottes</b> .....	46
<b>III-2-3 méthodes d'analyse d'ARN</b> .....	47
<b>III-2-3-1 Principe de la PCR</b> .....	47
<b>III-2-3-2 RT-PCR one step (pan paramyxoviridae)</b> .....	48
<b>III-2-3-3 PCR semi-nichée (pan <i>paramyxovirus</i>)</b> .....	49
<b>III-2-3-4 électrophorèse des fragments amplifiés</b> .....	49
<b>III-2-4 analyses statistiques et interprétation des résultats</b> .....	50
<b>CHAPITRE II : RESULTATS</b> .....	<b>51</b>
<b>RESULTATS DE CAPTURE</b> .....	<b>51</b>
<b>RECHERCHE DES PARAMYXOVIRIDAE</b> .....	<b>52</b>
<b>II-1 POPULATION GENERALE</b> .....	52
<b>II-2 PAR SITE D'ETUDE</b> .....	54
<b>II-2-1 programme de protection des gorilles (PPG)</b> .....	54
<b>II-2-2 centre de primatologie (CDP)</b> .....	55
<b>II-2-3 parc de la LEKIEDI (Bakoumba)</b> .....	56
<b>CHAPITRE III : DISCUSSION ET RECOMMANDATIONS</b> .....	<b>57</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>57</b>
<b>I-1 CONTEXTE, CHOIX DES SITES ET DES ESPECES ANIMALES</b> .....	57
<b>I-2 ECHANTILLONNAGE ET PRELEVEMENTS</b> .....	58
<b>I-3 ANALYSES AU LABORATOIRE</b> .....	59
<b>I-4 RESULTATS GENERAUX</b> .....	60

I-5 RESULTATS PAR SITE.....	62
<b>RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>68</b>
<b>WEBOGRAPHIE.....</b>	<b>73</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>74</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>77</b>

# **INTRODUCTION**

Les maladies infectieuses émergentes (MIE) de la faune sont les principales menaces à la fois pour la santé humaine et à la conservation de la biodiversité. Un grand nombre d'études ont montré que l'émergence des nouvelles maladies chez l'homme durant les dernières décennies est principalement due à des changements d'hôtes des agents infectieux, du fait de modifications environnementales d'origine anthropique (Lloyd-Smith et al., 2009). La plupart de ces études se sont intéressées à la compréhension de la dynamique des agents infectieux de manière individuelle et généralement au niveau d'une seule espèce hôte présentant des symptômes cliniques. Cette vision néglige trois aspects importants qui constituent des axes majeurs émergents dans les interactions hôte-« parasites », à savoir : (i) les interactions entre plusieurs agents infectieux chez un même individu ; (ii) les modifications sélectives spécifiques que subissent les différentes souches de pathogènes au cours de leurs passages d'une espèce d'hôte réservoir ou vectorielle à une espèce d'hôte définitif ; et (iii) le caractère asymptomatique de certaines infections dans les populations. Il est donc important de centrer le questionnement non plus sur les cas symptomatiques qui ne représentent qu'une partie émergée de l'interaction et des processus, mais sur la détection des cas d'infections asymptomatiques.

L'identification des agents infectieux est aujourd'hui possible par la méthode de criblages moléculaires à l'aide des systèmes « *pan* » détection. Ces méthodes peuvent permettre de caractériser des souches de plusieurs types d'agents pathogènes au sein des populations d'hôtes de la même espèce ou d'espèces différentes.

Bien comprendre la circulation des agents infectieux est fondamental pour la gestion des maladies d'une part (isoler des individus/populations/espèces clés dans la transmission), et permet d'appréhender au mieux le rôle de la structuration des communautés d'espèces hôtes et d'agents sur l'évolution des interactions et le risque pour la santé animale et humaine d'autre part.

Avec un climat chaud et humide, une flore couvrant près de 90% du territoire et une faune intensément variée, le GABON regroupe les conditions propices au développement de pathogènes. A ce contexte environnemental, s'ajoutent la déforestation grandissante, les activités artisanales, le braconnage et les conditions de promiscuité offertes par les parcs et aires protégés qui favorisent des conditions de contact entre les différentes populations humaines, animales et végétales entraînant la circulation et l'émergence de pathogène mais aussi la transmission de maladie (Patz et al., 2000). En concédant 10,66 % de son territoire, répartis en 13 parcs nationaux (ANPN, 2007), et la création de sanctuaire et d'aires de conservation, le Gabon vise via la conservation, le développement de l'écotourisme basé sur une gestion durable de ses écosystèmes. Afin de garantir la sécurité sanitaire dans les parcs, il est important que les questions liées au risque infectieux, à la circulation des pathogènes et à l'adaptation évolutive des parasites soient prises en compte dans les programmes de conservation et développement des aires protégées.

Situé à l'interface forêt-savane au sud-est du Gabon, le Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) dispose d'un Centre De Primatologie (CDP) abritant près de 400 primates non humains d'une dizaine d'espèces, une vingtaine d'employés et de nombreux rongeurs qui se nourrissent des débris et déchets alimentaires laissés par les primates non humains. La promiscuité, et les interactions quotidiennes hommes, primates non humains et rongeurs qui s'y effectuent chaque jour font du centre de primatologie (CDP) un excellent modèle représentatif des parcs et aires de conservation ouverts à la population à des fins touristiques. De ce fait, il constitue un bon modèle d'étude de contamination, de circulation et d'adaptation inter-espèces de certains pathogènes ; et plus spécifiquement des maladies zoonotiques. Parmi les maladies graves menaçant le bien-être du règne animal depuis des décennies, les maladies zoonotiques sont les plus incriminées. En raison de l'importante diversité d'espèces affectées et des pertes enregistrées, ces maladies font l'objet d'une attention particulière pour la communauté

scientifique. (Cleaveland et al., 2006). Près de 60% de maladies sont des zoonoses et environ 70% d'entre elles proviennent de la faune sauvage (Jones et al., 2008).

C'est dans ce contexte qu'un projet portant sur la caractérisation et l'évolution adaptative de quatre (4) types de pathogène (*Trypanosomes*, *Entérovirus*, *Paramyxovirus* et *Plasmodium*) a été initié par le CIRMF. Dans l'approche préliminaire du projet, notre travail a pour objectif principal de rechercher une circulation des souches de *Paramyxoviridae* entre différentes espèces rencontrées dans les sites de conservation de primate. Il s'agira de manière spécifique de :

- Détecter par RT-PCR les virus de la famille des *Paramyxoviridae* dans les échantillons de fèces et d'organes de rongeurs, de primates non humains et humains ;
- Déterminer leurs prévalences dans ces échantillons ;
- Formuler des recommandations visant à réduire les contaminations.

Ce travail comporte deux parties. Une première partie bibliographique consacrée aux généralités sur les virus de la famille des *Paramyxoviridae* et à l'épidémiologie des infections qu'ils provoquent. Une seconde partie expérimentale, traite du matériel et des méthodes que nous avons utilisées pour conduire ce travail, des résultats obtenus suivis de leur discussion et quelques recommandations.

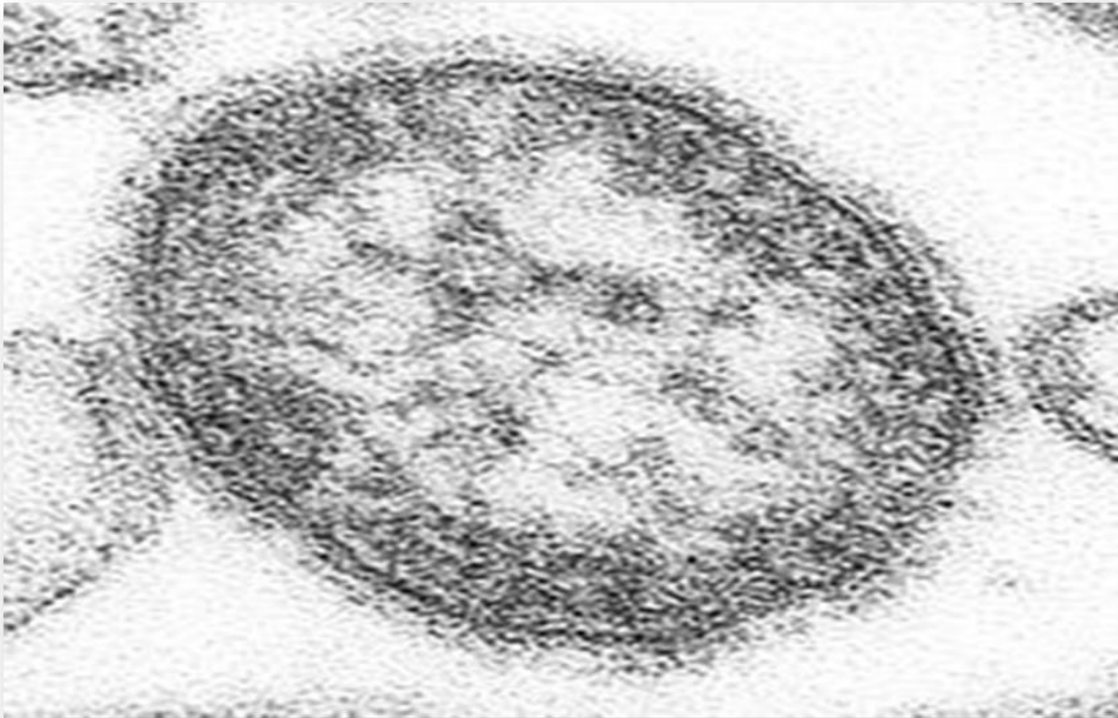


## **PREMIÈRE PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES *PARAMYXOVIRIDAE*

### I- DÉFINITION

Du grec para: «à côté de» et de myxa: "mucus", les Paramyxovirus sont des virus à ARN et font partie de l'ordre des Mononegavirales. Le groupe des *Paramyxoviridae* contient de nombreuses espèces de virus, même si la plupart d'entre eux semblent avoir une gamme d'hôtes étroite. Les génomes de cette famille contiennent un simple brin d'ARN de polarité négatif. Leurs nucléocapsides sont enveloppées sous forme d'hélices. Le virion a un aspect un peu pléomorphe ou sphérique (Figure1)(Boiko, 2007-08)



**Figure 1** : Vue d'un *Paramyxovirus* au microscope électronique  
(*Paramyxoviridae*; 2013)

## II- CLASSIFICATION

La famille des *Paramyxoviridae* est divisée en deux sous-familles : les *Pneumovirinae* et les *Paramyxovirinae* (Tableau I). Les *Pneumovirinae*, subdivisés en *Pneumovirus* et *Métapneumovirus*, se distinguent des *Paramyxovirinae* par leurs nucléocapsides plus étroites. La sous-famille des *Paramyxovirinae*, quant à elle, comprend cinq genres : *Avulavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus* et *Rubulavirus*.

**Tableau I** : Classification des *Paramyxoviridae* (ROMETTE, 2011)

Sous-famille	Genre	Quelques exemples	
		Virus humains	Virus animaux
<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	Virus respiratoire syncytial humains	Virus respiratoire Syncytial bovin Virus respiratoire Syncytial caprin Virus respiratoire Syncytial ovin
	<i>Metapneumovirus</i>	Métapneumovirus humain	Virus de la rhino-trachéite de la dinde Virus de la pneumonie de la souris
<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	Parainfluenza virus Humain 1 et 3	Virus de Sendai Parainfluenza virus bovins
	<i>Rubulavirus</i>	Virus des oreillons Para influenza virus Humain 2, 4a et 4b Menangle	Virus simien 5 Virus de la maladie de Newcastle Menangle
	<i>Henipavirus</i>	Virus Hendra Virus Nipah	
	<i>Morbillivirus</i>	Virus de la rougeole	Morbillivirus des cétacées Virus de la maladie de Carré Virus de la peste des petits ruminants Virus de la peste bovine
	<i>Avulavirus</i>	rare	virus de la maladie de Newcastle

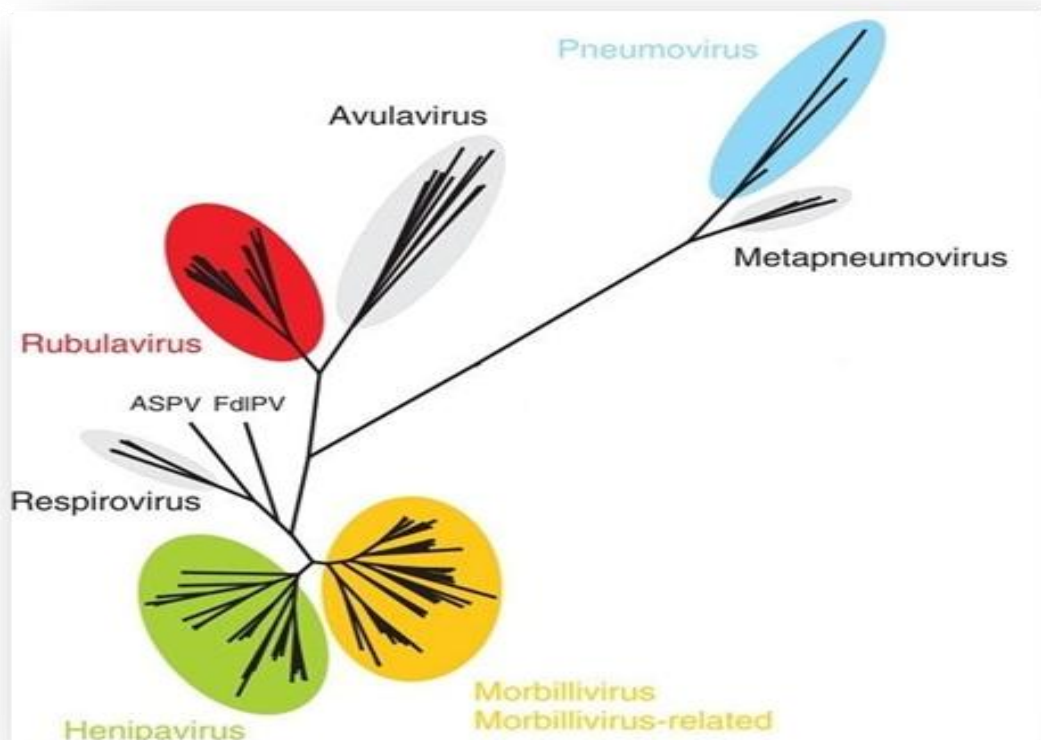
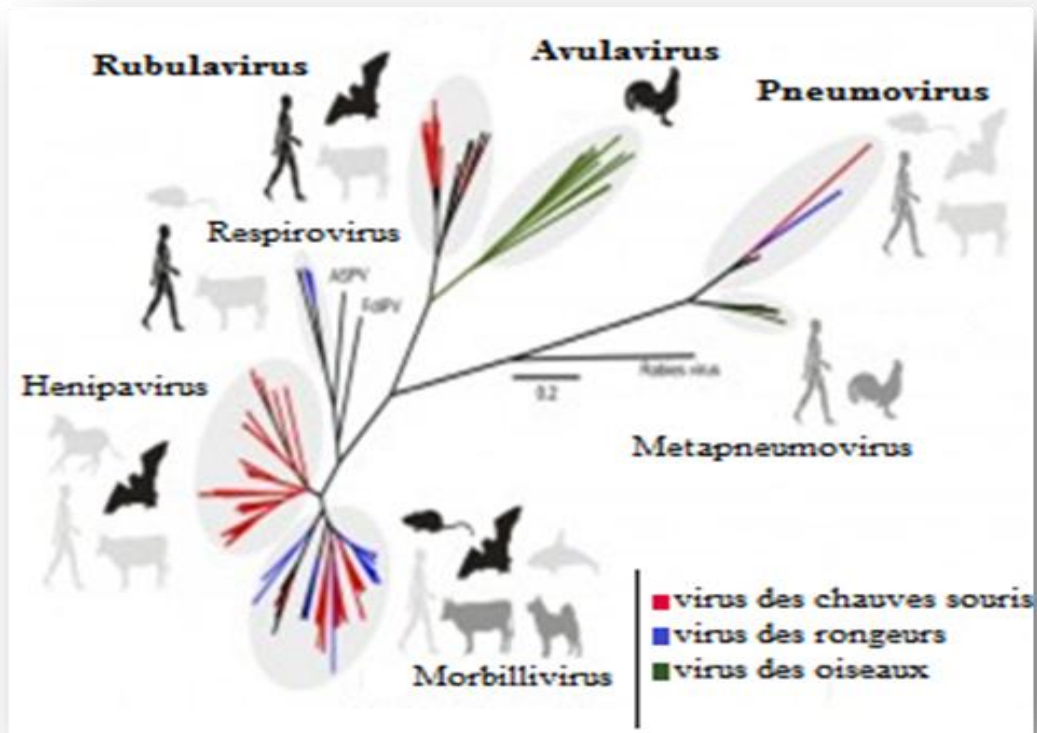
## **II- 1 SOUS-FAMILLE DES PNEUMOVIRINAE**

Les virus appartenant à cette sous famille, transmis par voie aérienne, sont responsables de maladies dans les populations humaines et animales. Ils ont une durée d'incubation de moins de 10 jours. Pour les *Pneumovirus*, la première souche de RSV a d'abord été isolée chez le chimpanzé (Chanock et al., 1958). Il provoque chez l'homme, une atteinte du tractus respiratoire. Une primo-infection est constatée chez 90 % des enfants de moins de 5 ans. Des réinfections sont possibles chez l'adulte. Des virus proches existent chez la souris, les bovins et les caprins.

## **II-2 SOUS-FAMILLE DES PARAMYXOVIRINAE**

Les virus de cette sous-famille ont été associés au cours de ces dernières années à l'émergence de nouvelles maladies dans les populations humaines et animales (Mackenzie et al., 2001). Quatre de ces nouveaux virus ont été décrits dans la région Pacifique Ouest et ont la particularité de partager les mêmes réservoirs qui sont les chauves-souris frugivores du genre *Pteropus*. Il s'agit des virus Menangle (MenV) et Tioman appartenant au genre *Rubulavirus*, des virus Hendra (HeV) et Nipah (NiV) appartenant au nouveau genre *Henipavirus*. Toutefois, aucun cas humain de virus Tioman n'a été décrit à ce jour (Mackenzie et al., 2001).

Les virus Hendra et Nipah ont été responsables chez l'homme et chez l'animal de syndrome pulmonaire et de méningo-encéphalites mortels. Le virus Menangle a causé des troubles de la reproduction en élevage porcin et de nombreux cas humains ont été signalés (Goldsmith et al., 2003).



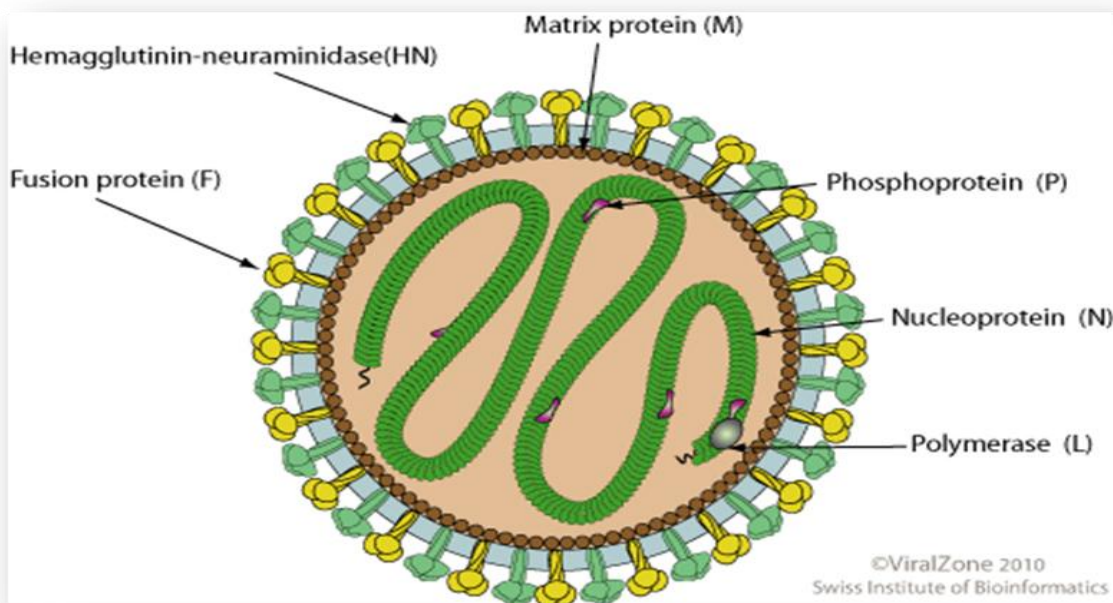
**Figure 2** : Arbre phylogénique des *Paramyxoviridae* en fonction des espèces affectées (Twiv, 2012 ; Nature, 2008)

### III- STRUCTURE ET ORGANISATION GENOMIQUE

#### III- 1 STRUCTURE VIRALE

La famille des *Paramyxoviridae* comprend des virus à ARN d'assez grande taille et enveloppés. Les particules virales sont polymorphes, globuleuses ou filamenteuses et mesurent 150 à 350 nm. Le génome à ARN monocaténaire est associé à une nucléocapside hélicoïdale de 18 nm de diamètre. Le génome code 7 protéines dont la polymérase associée au virion (Chastel, 2007).

Leur enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique qui provient de la membrane plasmique de la cellule hôte et dans laquelle sont insérées des glycoprotéines d'origine virale : la protéine d'attachement (H) et la protéine de fusion (F). La protéine « H » doit son nom au fait qu'elle peut provoquer l'agglutination d'érythrocytes de primates. L'enveloppe repose sur un squelette protéique constitué par la protéine de matrice (M)(figure 3)(Lund et al., 1984).



**Figure 3:** Schéma d'une particule virale de *Paramyxovirus* (Viralzone, 2010).

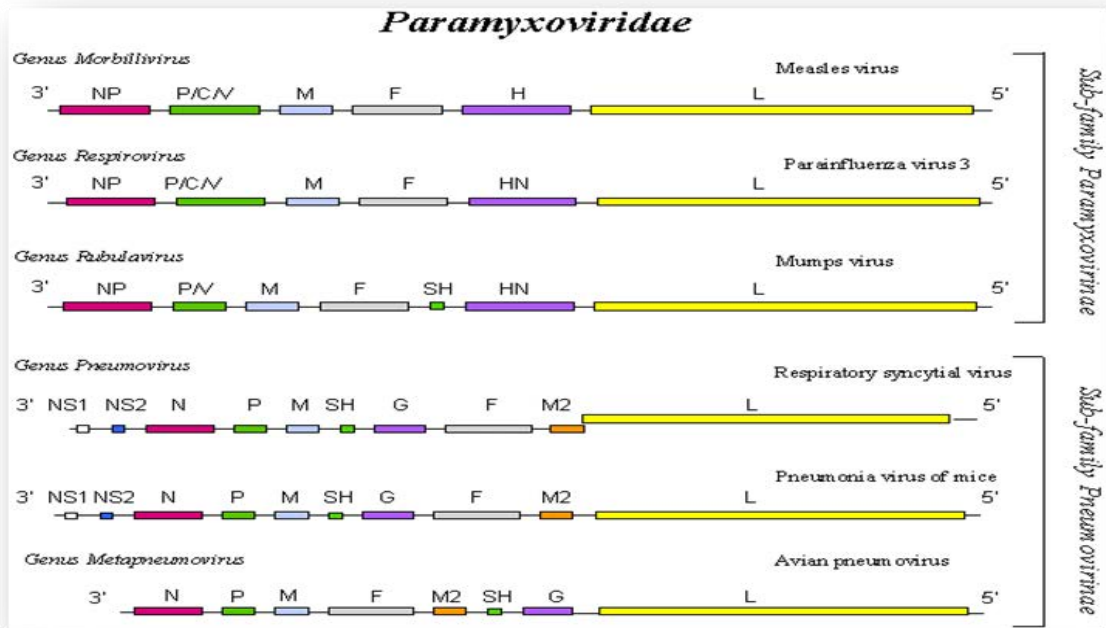
### III-2 ORGANISATION GENOMIQUE

Les composants du RNP sont présentés en couleur dans la figure 4 : le segment rouge représente la portion du gène codant pour les nucléoprotéines (N); le segment vert, les phosphoprotéines (P); le segment bleu, la matrice ; le segment gris, les protéines de fusion (F) ; le segment violet, les protéines d'attachement (H) ; le segment jaune, la polymérase (L). L'ARN génomique est encapsulé par N dans une nucléocapside hélicoïdale, représentée symboliquement sur la figure 3.

Des études sur SeV et hPIV-1, des Respiravirus, ont montré qu'il existe des multimères de Phosphoprotéine (P) libres, non complexés avec la polymérase (L). Ainsi, dans des RNP engagés dans la transcription, les phosphoprotéines sont regroupées en amas autour des polymérases, mais on trouve aussi des multimères de P distants des molécules de L (ROMETTE, 2011).

A titre d'exemple, chaque virion de la rougeole contient plusieurs complexes ribonucléoprotéiques (RNP), formés chacun par une molécule d'ARN viral génomique ou antigénomique associée aux protéines N, P, et L (Lund et al., 1984)





**Figure 4 :** Organisation génomique de quelques *Paramyxoviridae* (Vadscorner, 2011).

Les analyses virologiques de RT-PCR réalisées dans notre étude, consistent à amplifier un gène conservé dans l'ARN des *Paramyxoviridae*, dont le gène L le plus conservé dans cette famille (Figure 4).

#### IV- PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ET ANTIGÉNIQUES

Dans la suite ce document, les informations présentées sont celles du virus respiratoire syncytium (RSV) considéré comme modèle viral de la famille des *Paramyxoviridae*.

#### IV-1 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Le virus respiratoire syncytial (RSV) a une densité de flottaison moyenne de 1,21 g/cm<sup>3</sup>. En effet, lors de la purification de ce virus en gradient de saccharose, il migre à des densités variant entre 1,16 et 1,26 g/cm<sup>3</sup> (Chanock et al., 1958). En gradient de chlorure de césium, la densité du RSV est entre 1,19 et 1,32 g/cm<sup>3</sup>. En gradient de métrizamide elle est de 1,16 à 1,20 g/cm<sup>3</sup> (Wunner and Pringle, 1976).

Outre les études sur les conditions d'équilibre du RSV, en gradient de densité, d'autres propriétés physico-chimiques ont été étudiées, et sont résumées dans le tableau II.

**Tableau II** : propriétés physico-chimiques du virus respiratoire syncytial.  
(Mbiguino, 1991)

<b>Stabilité</b>	<b>Sensibilité</b>	<b>Références</b>
	Champs gravitationnels élevés	(CHANOCK and FINBERG, 1957)
	Obtention d'un culot par ultracentrifugation de sumageants de culture	Wunner et Pringle, 1976
	Chloroforme Déoxycholate de sodium Ether Trypsine 0,25%	(Bennett and Hamre, 1962) Bloth et Norrby, 1966 Chanock <i>et al.</i> , 1957 Inaba <i>et al.</i> , 1963
<b>pH 7,5</b>	pH3	(Hambling, 1964) Hamparian <i>et al.</i> , 1963
<b>-500 C à -800 C</b>	550 C, 5 min 370 C, 24 heures 250 C, 48 heures 40 C, 7 jours	<i>Beemetal.</i> , 1960 Hambling, 1964 Wulff <i>et al.</i> , 1964 b.
<b>Congélation rapide</b>	Congélation lente Gel-dégel	(Beem et al., 1960) Hambling, 1964 Jordan, 1962
<b>Lait écrémé à 20%</b> <b>Glycérine à 50%</b> <b>Sérum de poulet</b> <b>Saccharose 44,5%</b>		Bennett et Hamre, 1962 Law et Hull, 1968 Wulff <i>et al.</i> , 1964 b.
<b>NaO,MgS04</b> <b>Na2S04</b> <b>Phosphate de sodium,</b> <b>glucose, sorbitol, glace</b> <b>sèche</b>		Fernie et Gerin, 1980 Reschteiner, 1969 Yamamoto, 1969
	Mg02	Tai <i>et al.</i> , 1974
<b>Milieu de transport avec bentonite</b>	Lyophilisation	Klein <i>et al.</i> , 1975 Wulff <i>et al.</i> , 1964 b

## **IV-2 PROPRIETES ANTIGENIQUES**

Dès le début des travaux sur le RSV, la présence d'un antigène fixant le complément est rapportée (Chanock et al., 1958). Plus tard, deux (2) antigènes A et B, ayant des densités différentes en gradient de chlorure de césium (CICs) sont signalés, et permettant de classer ces virus en deux sous groupes (Coates et al., 1966). L'antigène A provoque en plus, l'apparition d'anticorps neutralisants. L'antigène A est associé à l'enveloppe virale et l'antigène B à la nucléocapside. La présence d'un troisième antigène est aussi suggérée. Cependant, les travaux de biologie moléculaire ont permis de démontrer que le RSV possède plusieurs antigènes de structure.

L'utilisation d'antisérums humains a démontré que le RSV possédait un seul sérotype. Cependant, des différences parmi les isolats ont été observées par neutralisation à l'aide de sérums immuns, par le profil électrophorétique des protéines virales par la réactivité avec les anticorps monoclonaux et par la carte peptidique, ainsi que la présence de souches n'appartenant à aucun groupe et dites "intermédiaires" (Hendry and Thames, 1986).

Lors d'une épidémie, les souches des 2 sous-groupes se retrouvent couramment, avec une prédominance des souches du sous-groupe A. Les infections causées par les souches du sous-groupe A sont plus sévères que celles dues aux souches du sous-groupe B. Ces 2 sous groupes sont rencontrés à travers le monde (Anderson, 1988).

## CHAPITRE II : EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS DUES AUX PARAMYXVIRIDAE

### II-1 SOURCES VIRALES

Les enquêtes sérologiques menées en Australie, en Malaisie, au Cambodge, en Indonésie, au Bangladesh, en Inde et à Madagascar, ainsi que l'isolement du virus Hendra et du virus Nipah chez les chauves-souris, permettent de penser que ces animaux pourraient être les principaux réservoirs des *Paramyxoviridae* (Halpin et al., 2000; Wacharapluesadee et al., 2005). D'ailleurs, une étude sérologique récente au Ghana sur des chauves-souris frugivores du genre *Eidolon helvum* a révélé la présence d'anticorps dirigés contre des virus apparentés antigéniquement au genre *Henipavirus* (Hayman et al., 2008).

La plupart des mammifères terrestres et marins sont sensibles aux *Paramyxoviridae* et peuvent le transmettre en cas d'infection. Des anticorps fixant le complément ont été détectés chez le chien, et chez le mouton. Kalter et Heberling, en 1971 ont démontré que les primates tels que l'orang-outang, le rhésus, le patas, le lagotrix, possèdent des anticorps anti-RSV.

Le besoin d'un modèle animal, dont la pathologie du RSV ressemble à celle de l'homme, a donné lieu à plusieurs essais d'infections expérimentales chez les animaux. Ainsi, l'inoculation intranasale du RSV, à certaines espèces animales a montré que, le cobaye, le furet, le chinchilla, le marmouset, le vison, le lapin, le rat, ne développent pas de maladie, mais produisent des anticorps fixant le complément et des anticorps neutralisants. La souris est sensible aux *Paramyxoviridae*, mais ne développe de signes pathologiques que lorsque l'inoculum utilisé contient un titre élevé de virus (Graham et al., 2000). Le singe écureuil adulte, le singe rhésus nouveau-né, le singe cébus nourrisson, infectés, sécrètent du virus, mais ne font pas de maladie. Enfin, le hamster et l'agneau sont sensibles aux *Paramyxoviridae*. Parmi tous les animaux testés, le nourrisson furet, la souris et le rat du coton sont de bons modèles pour la compréhension de la pathologie du RSV, car leur affection ressemble à celle de

l'homme, à savoir, la présence de lésions, de bronchiolites et pneumonies (Anderson, 1988)

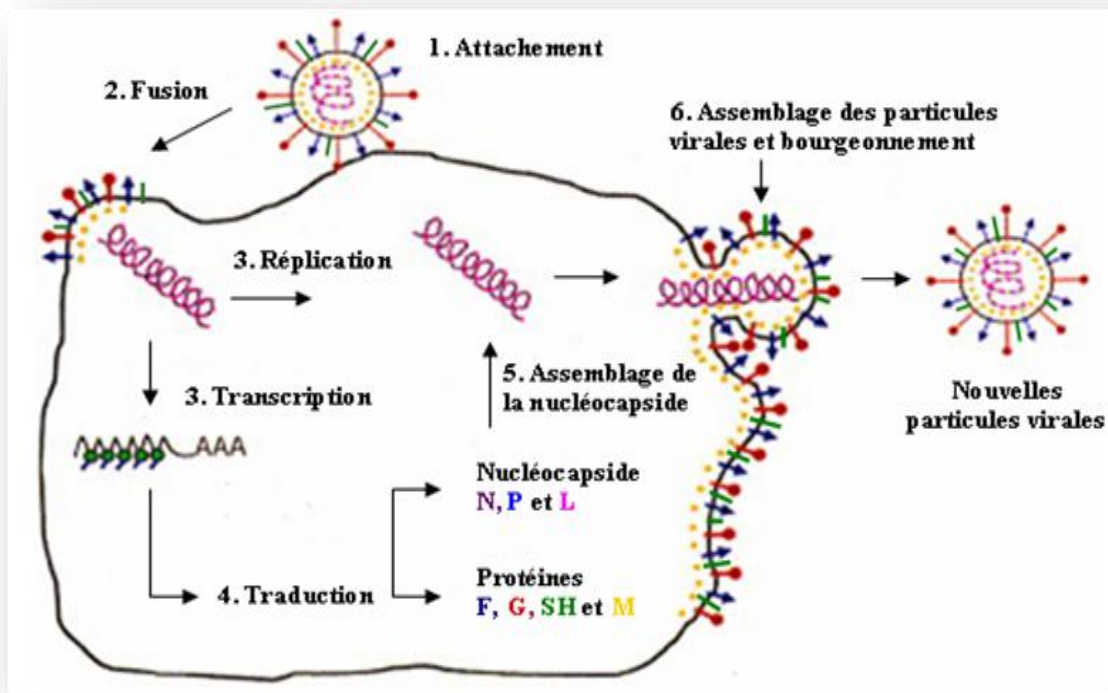
## **II-2 MODE DE TRANSMISSION DES PARAMYXOVIRIDAE**

Deux modes de transmission ont été recensés chez les *Paramyxoviridae*, à savoir un mode de transmission direct et un mode indirect. Le virus, véhiculé par les sécrétions rhinopharyngées pénètre dans les voies respiratoires supérieures où il se multiplie. Survient ensuite une phase de virémie suivie d'une localisation dans les organes cibles tel que le poumon, le foie la rate et les reins. Le virus est excrété par les urines et la salive et les fientes.

Dans le mode de transmission direct, les animaux contractent l'infection par voie respiratoire en inhalant les sécrétions rhinopharyngées émises par un sujet infecté au cours d'un éternuement. Les urines, la salive et les fientes constituent les sources biologiques à l'origine des contaminations indirectes aux travers des aliments souillés. Cette transmission par intermédiaire de produits souillés est la plus incriminée dans les infections humaines à *Paramyxoviridae* (Kwiatek et al., 2010).

Les études faites sur le cycle de multiplication ont montré que le virus respiratoire syncytial s'adsorbe très lentement à la surface des cellules. En effet, 50 à 60% des particules virales sont adsorbées entre 30 minutes et 2 heures, mais il faut plus de 10 heures pour que 96% des particules soient adsorbées (Bennett and Hamre, 1962). La latence dure 12 à 16 heures. Pendant une partie de cette période, il y a la synthèse des antigènes viraux. La production de virions matures (figure 5), commence vers la 14<sup>e</sup> heure et continue dépendamment de l'indice de multiplicité. Au cours de cette période, le virus est produit, mais plus de 90% des particules virales reste associées aux cellules. En principe, pour un indice de multiplicité de 1, la production virale est à son maximum au bout de

24 heures post-infection, alors qu'avec un indice de multiplicité inférieure à 1, le titre infectieux est maximal 72 heures après l'infection (Bächi, 1988).



**Figure 5** : Étapes du cycle viral des *Paramyxoviridae* (Ulaval, 2005)

### II-3 FACTEURS FAVORISANTS LA TRANSMISSION

Plusieurs facteurs peuvent influencer la transmission de ces virus. Les plus recensés sont l'âge et le climat.

Parmi les cinq (5) familles de virus qui causent des maladies respiratoires chez l'homme, les *Paramyxoviridae* causent les plus importantes épidémies de bronchiolites et de pneumonies, surtout chez les nourrissons et les jeunes enfants. De plus, les enfants qui guérissent de ces bronchiolites ont tendance à faire de l'asthme récurrente plus tard dans leur vie.

Les épidémies surviennent régulièrement chaque année. Dans les zones tempérées, elles s'étendent de novembre à avril dans l'hémisphère nord, avec un

pic au mois de février. Dans l'hémisphère sud, les épidémies ont lieu entre le mois d'avril et septembre. Dans les régions tropicales et subtropicales, les épidémies ont lieu pendant la saison chaude et pluvieuse.

Les infections sont très graves chez les enfants de moins de 5 ans, notamment ceux entre 6 semaines à 6 mois, avec un pic de fréquence à l'âge de 2 mois. Le taux d'hospitalisation est en moyenne de 90% et la mortalité de 0,5 à 2,5%. La proportion d'enfants possédant des anticorps neutralisants augmente avec l'âge, ainsi 80% des enfants de moins de 4 ans ont déjà été en contact avec le virus.

Bien que le risque d'infection soit excessivement élevé chez les nourrissons et les jeunes enfants, les adolescents, les adultes et les personnes âgées en sont aussi victimes. Des données récentes ont fait mention du rôle croissant de l'infection à RSV chez les adultes et principalement les personnes âgées (Taylor and Oppenheim, 1998). L'infection chez les adultes est caractérisée par une affection des voies respiratoires supérieures, une bronchite et de l'asthme dans certains cas (Gardner, 1973).

Les *Paramyxoviridae* ont déjà été mis en évidence au sein des espèces d'hôtes de notre étude. Plusieurs études ont été recensées à travers le monde montrant la circulation de ces virus chez les rongeurs, les primates non humains, et les humains. Le chapitre suivant en résume quelques exemples.



## **II-4 INTERACTIONS ENTRE LES PARAMYXOVIRIDAE ET LES POPULATION D'HÔTES CIBLEES**

### **II-4-1 PARAMYXOVIRIDAE CHEZ LES RONGEURS**

Les rongeurs et musaraignes sont connus pour abriter divers virus. Les Paramyxovirus ont été isolés de rongeurs asiatiques et australiens, mais peu de données sont disponibles pour les rongeurs africains. Récemment, des séquences de paramyxovirus jusqu'alors inconnues ont été trouvées chez les rongeurs en Afrique du Sud. Il a été constaté une forte prévalence de paramyxovirus chez les rongeurs sauvages. Les analyses RT-PCR semi-nichée ont permis de détecter l'ARN du paramyxovirus dans 21% soit 96 échantillons sur 462 échantillons analysés. L'analyse phylogénétique a révélé que ces virus étaient de nouveaux paramyxovirus et pourraient en être classés comme liés aux Morbillivirus ou Henipavirus. Ces résultats suggèrent qu'il existe une circulation des Paramyxovirus jusqu'alors inconnus chez les rongeurs africains, et fournissent de nouvelles informations sur la répartition géographique et la diversité génétique des paramyxovirus (Sasaki et al., 2013)

### **II-4-2 PARAMYXOVIRIDAE CHEZ LES HUMAINS**

Chez des enfants hospitalisés pour infections respiratoires dans les services de pédiatrie du centre hospitalier universitaire de Caen et de l'hôpital de Flers, la recherche d'un nouveau métapneumovirus humain a été effectuée par *PCR* sur les prélèvements négatifs pour les virus respiratoire syncytial, virus influenza A et B, virus para-influenza (1, 2 et 3), adénovirus, entérovirus, coronavirus et rhinovirus. La comparaison de la morbidité des infections à métapneumovirus et virus respiratoire syncytial a été effectuée après appariement des sexes, âge et mois d'infection. Comme résultats, Vingt-six (26) cas d'infection à métapneumovirus humain ont été identifiés. L'étude comparative avec une cohorte appariée de nourrissons infectés par le virus respiratoire syncytial n'a

retrouvé aucune différence significative en ce qui concerne les motifs d'hospitalisation, les signes cliniques et la prise en charge thérapeutique. Ce qui démontre que le métapneumovirus humain est responsable d'un tableau typique de bronchiolite aiguë du nourrisson (Bach et al., 2004).

### **II-4-3 PARAMYXOVIRIDAE CHEZ LES PRIMATES NON HUMAINS**

Créé à partir d'un stock fondateur de 100 animaux, la colonie de reproduction macaque rhésus de la Fondation Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) est restée fermée à l'introduction de nouveaux animaux pour près de 70 ans. Une enquête sérologique a été réalisée pour déterminer la prévalence des anticorps anti-virus choisis comme première approche pour identifier les agents pathogènes viraux endémiques dans cette population. Les échantillons de sérum prélevés ont été testés pour les anticorps au virus de la rougeole cercopithèque à cytomégalovirus (RhCMV) (MV). La prévalence globale des anticorps était de 95% pour RhCMV. La prévalence variait selon le groupe d'âge (Andrade et al., 2003).

En somme, les *Paramyxoviridae* sont des virus à ARN, responsables de maladies respiratoires chez l'homme et les animaux. Ils affectent les jeunes, les personnes âgées et les immunodéprimés et sont transmis à travers les sécrétions rhinopharyngées, la salive, les fientes et les urines. Dans les régions tropicales et subtropicales, les épidémies surviennent pendant les périodes chaudes et humides, et provoquent des infections graves chez les enfants de moins de 5 ans.

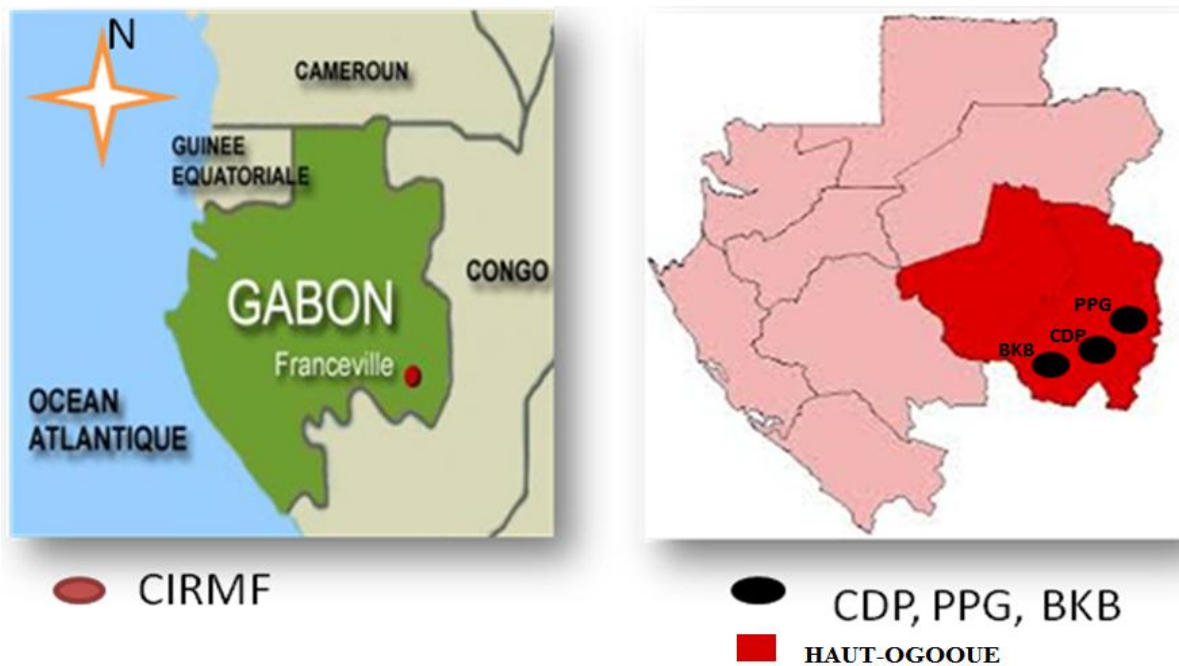
## **DEUXIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE**

## **CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES**

### **I. PRESENTATION DU CADRE D'ETUDE**

#### **I-1 LE CIRMF ET SON CENTRE DE PRIMATOLOGIE**

Situé au sud ouest du Gabon (figure 6), le Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) est un Institut Gabonais de référence pour la recherche, la formation et de soutien au système de santé. Si la recherche initiale au CIRMF était orientée sur les pathologies parasitaires et la fécondité humaine, les thématiques de recherche se sont rapidement élargies aux autres questions de santé majeures pour l'Afrique Centrale. Aujourd'hui, les activités du Centre se diversifient et intéressent des recherches en virologie fondamentale et épidémiologie, en parasitologie, en primatologie, en génétique, en hématologie et en écologie de la santé. La formation à l'excellence est faite d'une action participative à ces recherches et se fait par l'accueil de jeunes chercheurs, étudiants, doctorants et post doctorants Gabonais et du Monde entier. Les chercheurs du CIRMF participent aussi aux enseignements académiques universitaires. Le CIRMF remplit enfin une mission fondamentale d'appui à la santé publique au niveau national et international en mettant à disposition ses expertises : du diagnostic de laboratoire, à l'aide aux interventions de riposte aux épidémies. Le CIRMF a célébré ses 30 ans le 5 février 2009.



**Figure 6:** Localisation du Centre International de Recherches Médicales de Franceville (à gauche), centre de primatologie, projet protection gorille, et parc de Bakoumba (à droite) (Wikipedia, 2013)

Le CIRMF comprend plusieurs départements dont l'Unité de Maladie Virale Emergente (UMVE), le Laboratoire d'Analyses Médicales (LAM), l'Unité de Parasitologie et d'Analyse Bactériologique, et un centre de primatologie. Le Centre De Primatologie (CDP) a été installé au sein des 40 ha du Campus du C.I.R.M.F dès sa création dans les années 1980. Au fil des années, ce centre est devenu l'un des centres de primatologie les plus importants d'Afrique. Près de 400 primates, pour la plupart originaires du Gabon (chimpanzés, gorilles, mandrills, cercopithèques à queue de soleil, mangabeys à collier blanc, hocheurs) d'Afrique (vervets) ou d'Asie (Macaques rhésus et macaques cynomolgus) sont élevés dans ce centre dédié à la recherche. Selon les besoins et les possibilités, les animaux sont maintenus captifs soit en cage individuelle dans des bâtiments de haute sécurité type A2 et A3 pour des protocoles expérimentaux de maladie grave, soit dans de grandes « volières » pouvant héberger une dizaine d'individus selon la taille et la composition des groupes ou

encore dans des enclos de semi-liberté de plusieurs hectares. Une équipe d'animaliers, d'éthologues et de vétérinaires assure son bon fonctionnement.

Les équipements médicaux de ce Centre sont comparables à ceux d'un hôpital de la sous-région (salle de soins, salle de chirurgie, salle d'imagerie médicale) et permettent la réalisation de l'ensemble des soins médicaux ou chirurgicaux nécessaires. Les primates sont soumis annuellement à un contrôle sanitaire et leur population est régulée par un programme de maîtrise de la reproduction. Le CDP fait un effort important depuis quelques années pour améliorer les conditions de captivité des primates qu'il élève.



**Figure 7 :** plan de masse du centre de primatologie du CIRMF(CDP)  
(Wikipedia, 2013)

1= aire de divertissement gorille

2= aire de divertissement et volière chimpanzé

3= volière torquatus

4= volière mandrills

6= volière solatus

B= bureau du CDP

Q= bâtiment de quarantaine

P4= laboratoire de haute  
sécurité

5= volière vervets

7= enclos

## **I-2 LE PROGRAMME DE PROTECTION DES GORILLES (PPG)**

Le Programme de Protection des Gorilles (PPG- Gabon) est un espace sauvage protégé qui a été directement impliqué dans les initiatives de conservation de l'habitat dans et autour du parc national des plateaux Batéké (PNPB) pour la réintroduction des gorilles orphelins qui ont été sauvés du trafic de la faune et le commerce de viande de brousse. Aujourd'hui, il ya deux groupes qui vivent en toute indépendance dans le PNPB, et ils sont régulièrement suivis par le personnel du PPG (actuellement au nombre de 24 personnes) (Berggorilla, 2012).

## **I-3 LE PARC DE LA LEKIEDI**

Le parc de la Lékiédi est situé au Sud-Est du GABON, dans la région du Haut-Ogooué, à 100 km de Franceville et à 50 km de la cité minière de Moanda. La ville la plus proche du parc est Bakoumba, à 7 km, le chef-lieu du département de Lekoko. La frontière avec la République du Congo est à 50 km du parc environ. Le parc occupe 14 000 hectares entièrement clôturé ; il est long de 20 km et large de 7 km. Il est traversé par plusieurs rivières dont les deux plus importantes sont la Missombo et la Lékiédi. Toutes les espèces présentes dans le Parc sont autochtones, excepté les impalas, importés de Namibie. Un suivi particulier est accordé aux grands singes: gorilles et chimpanzés. Mais on y trouve aussi des mandrills, des sitatungas, des guibes, des buffles, de nombreuses espèces de petits singes et d'oiseaux, ainsi que des panthères.

## II- MATERIEL

### II-1 COMMUNAUTE D'HOTES

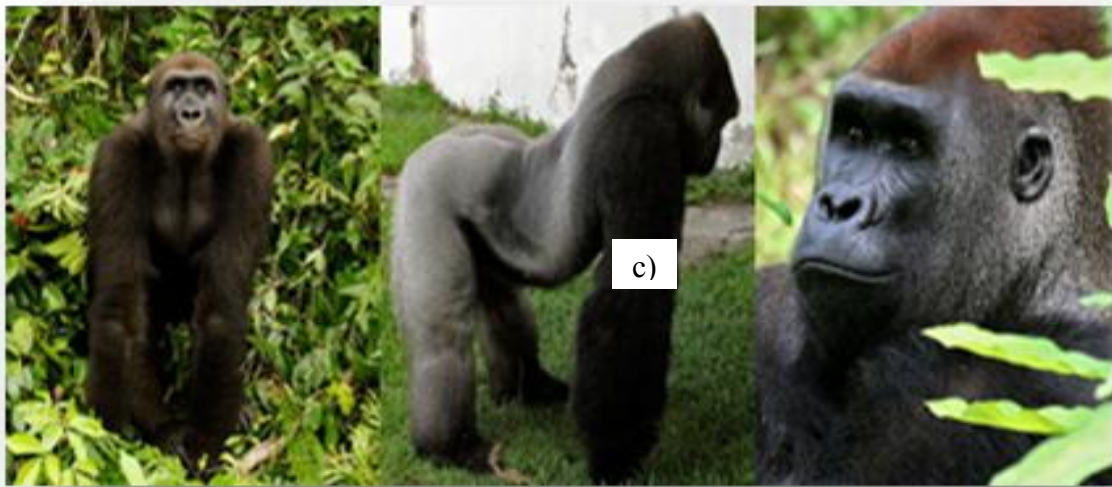
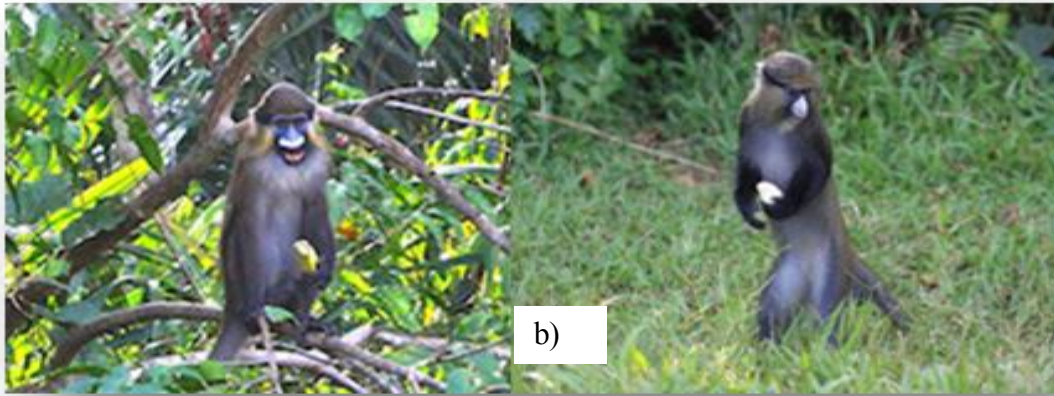
La population d'étude était composée de primates non humains, de rongeurs et d'humains.

#### II-1-1 les primates non humains (PNH)

Les espèces africaines sont essentiellement composées de chimpanzés (*Pan troglodyte*), de gorilles (*Gorilla gorilla*) de Mandrills (*Mandrillus sphinx*) et de vervet ou singes verts. Parmi ces espèces, certaines sont endémiques du Gabon à savoir les cercopithèques hocheurs et les torquatus (*Cercocebus torquatus*). Les espèces asiatiques étaient représentées par les macaques cynomolgus ou macaques crabiers (*Macaca fascicularis*) et les macaques rhésus (*Macaca mulatta*).





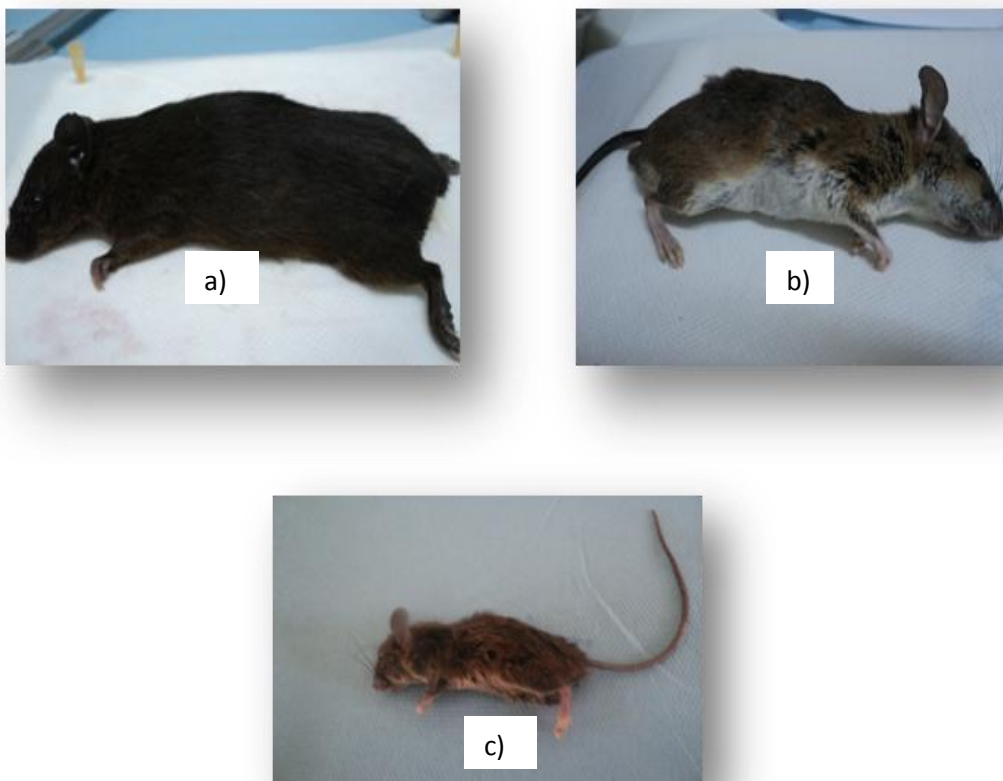


**Figure 8:** Primates non humains du CDP : a) : chimpanzé, b) : Cercopithèques, c): gorille, d) : mandrill (Wikipedia, 2013 )

En plus des PNH du CDP, d'autres PNH recueillis à travers le Gabon durant la période de l'étude ont été intégrés à la population d'étude, ainsi que ceux vivant au parc de la Lekiedi à Bakoumba à environ 100 Km de Franceville et ceux du programme de protection des gorilles (PPG). Les PNH du PPG étaient uniquement des gorilles alors que ceux du parc de LEKIEDI étaient constitués de gorilles et de chimpanzés.

### II-1-2 les rongeurs

Au cours de notre étude, nous avons capturé au total 213 rats appartenant à 5 espèces différentes selon la clef d'identification des petits rongeurs du Gabon (Duplantier, 2011). Les 5 espèces identifiées sont les suivantes : *Lemniscomys striatus* ou rat raillé, *Lophuromys nudicaudus*, *Mastomys natalensis*, *Rattus Rattus* et *Praomys sp*. Tous ces rats ont été capturés au CDP.

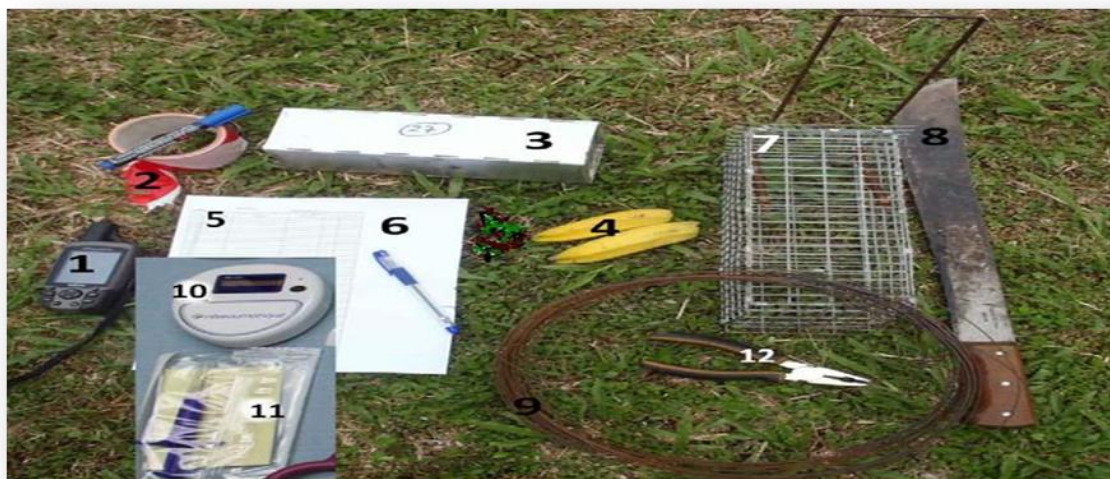


**Figure 9:** Espèces de rongeurs capturés : a) *Lophuromys nudicaudus* b) *Praomys sp* c) *Mastomys natalensis*

### II-1-3 le personnel travaillant

La population humaine était représentée par les agents du CDP, du parc de la LEKIEDI et du Programme de Protection des Gorilles, qui sont en relation avec les PNH dans 3 types de milieux différents, le CDP (zone semi-urbaine), le parc de la LEKIEDI (milieu naturel avec activité touristique), le PPG (milieu sauvage avec une pression humaine réduite). La participation des agents au protocole a été faite sur la base du volontariat, avec la signature d'une fiche de consentement éclairé qui leur a préalablement été expliquée. Cette fiche (voir annexe 2) précise qu'un numéro d'identification est attribué à chaque volontaire, permettant ainsi l'utilisation des échantillons sanguins sous le couvert de l'anonymat. L'équipe de médecins du CIRMF était la seule à disposer des identités réelles des individus. Au total 30 personnes ont participé.

### II-2 MATERIEL DE CAPTURE ET DE LOCALISATION



**Figure 10:** Matériel de capture et de géo localisation.

1. GPS (CSX60, Garmin, Taiwan, Chine) utilisé pour géo-référencier les endroits de pose de chaque piège ;
2. Ruban utilisé pour marquer chaque lieu ;

3. Piège Sherman, qui est un piège à déclenchement automatique. C'est une boîte en aluminium entièrement fermée avec un volume de 1,800dm<sup>3</sup>, utilisé essentiellement pour la capture des souris ;
4. Bananes servant d'appât ;
5. feuille de relevé des pièges qui permet de noter les positions du jour
6. Stylo utilisé pour la prise de notes ;
7. Piège Tomahawk qui est un piège à déclenchement automatique. C'est un piège grillagé avec un volume de 4,065 dm<sup>3</sup>, utilisé essentiellement pour la capture des galagos, mais des souris également ;
8. Machette qui permet de se frayer un chemin dans la forêt ;
9. Fil de fer qui sert à maintenir le piège sur l'arbre ;
10. lecteur de puce permettant de voir si le galago capturé est une recapture ou non ;
11. Seringue pour transpondeur, utilisée uniquement sur les galagos, qui permet d'implanter un transpondeur à l'animal en sous cutanée et de suivre l'animal pour une longue période ;
12. Pince métallique utilisée pour la coupe de fil de fer

### **II-3 MATERIEL DE LABORATOIRE**

Plusieurs matériels ont été utilisés pour prélever les échantillons (sang, fèces), et effectuer les analyses.

#### **II-3-1 matériels de prélèvement**

Au CDP, les prélèvements se font dans un petit laboratoire affilié au bâtiment et équipé pour l'occasion.

En mission dans les différents parcs, seul le minimum de matériel de prélèvement et de désinfection est emporté.





**Figure 11:** Matériel de prélèvement sur le terrain

Une fois les prélèvements réalisés, les analyses supplémentaires conduisant à l'obtention des génomes viraux sont effectuées au sein des locaux de l'Unité des Maladies Virales Emergentes.

### **II-3-2 matériel d'extraction d'ARN**

L'extraction d'ARN à partir des fèces a nécessité un certain nombre de matériel.

Pour le broyage d'organes, et l'extraction de leurs ARN, un certain nombre de matériel et de réactifs ont été utilisés. Il s'agit de :

- La hotte à flux laminaire : appareil offrant un milieu aseptique lors de la découpe des organes en morceaux plus fins avant le broyage. La découpe des organes en morceaux de 25 mg pour la formation de pool, se fait manuellement à l'aide d'un scalpel puis ces derniers sont placés dans un automate Geno Grinder 2000, broyeur d'organe (Figure 12).



**Figure 12** : Hotte à flux laminaire

- un automate Geno Grinder 2000, broyeur d'organe



**Automate Geno Grinder**



**Boîtes et tubes WPV contenant les microbilles**

**Figure 13:** Automate Geno Grinder 2000

- Un extracteur EZ1, un kit d'extraction individuel sur fèces et une centrifugeuse ont été utilisés pour l'extraction d'ARN (figure 14 et figure 15).



**Figure 14:** L'automate EZI Advanced XL

En plus des appareils cités ci-dessus, un ensemble de réactifs contenus dans le kit RNeasy a été utilisé pour l'extraction d'ARN.

Les tampons AW1 et AW2 utilisés lors de l'extraction de l'ARN permettent d'enlever les contaminants par simple lavage ; du PBS 1x, et de l'éthanol pure.

Le tampon RLT et le  $\beta$ -mercapto éthanol permettent la lyse des tissus de l'échantillon avant l'extraction ;



a



b



c

**Figure 15:** Kit d'extraction individuel sur fèces (a et b) et centrifugeuse (c)

### **II-3-3 matériel de transcription inverse suivie d'une polymérisation en chaîne (RT- PCR)**

La hotte est également utilisée pour la préparation du mix (un mélange de réactifs constitués pour l'amplification) ainsi qu'un thermocycleur pour l'amplification du génome viral recherché.

Pour réaliser la RT-PCR, nous avons utilisé des amorces spécifiques aux différents genres de la famille des *Paramyxoviridae*: amorce PNE, AVU-RUB,



RES-MOR-HEN pour Paramyxovirus et les séquences de ces amorces sont présentées dans le tableau III.

Le Sérum Albumine Bovine (BSA), le Chlorure de Magnésium (MgCl<sub>2</sub>) et les 4 désoxynucléotides (dNTP : dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ont été utilisés pour la préparation du mix (mélange des réactifs) ;

Les enzymes SuperScript III RT/Platinum® *Taq* Mix (Qiagen) et Platinum® *Taq* DNA polymérase (Invitrogen) sont respectivement utilisées pour la première et la deuxième série d'amplification de la RT-PCR.

**Tableau III** : Séquences des amorces de *Paramyxovirus* utilisées

Genre viral	Gène ciblé	Nom des amorces	Séquence amorce (5'-3')
<b>Respirovirus</b>	L (496 pb)	RES-MOR-HEN-F1	TCITTTAGAACITTYGGNCAAYCC
<b>Morbidivirus</b>		*RES-MOR-HEN-R	CTCATTGTAIGTCATYTTNGCRAA
<b>Henipavirus</b>		*RES-MOR-HEN-F2	GCCATATTTTGTGGAATAATHATHAAYGG
<b>Avulavirus</b>	L (250 pb)	AVU-RUB-F1	GGTTATCCTCATTITTYGARTGGATHCA
<b>Rubulavirus</b>		*AVU-RUB-R	GCAATTGCTTGATTITCICCYTGNAC
<b>Pneumovirus</b>	L (300 pb)	*AVU-RUB-F2	ACACTCTATGTIGGIGAICCNNTTYAAYCC
		PNE-F1	GTGTAGGTAGIATGTTYGCNATGCARCC
		*PNE-R	GTCCCACAAITTTTGRACCANCCYTC
		*PNE-F2	ACTGATCTIAGYAARTTYAAYCARGC

\*Amorce de PCR semi-nichée

### II-3-4 matériel d'électrophorèse

Une cuve à électrophorèse a été utilisée après la PCR pour la migration des produits de PCR sur gel d'agarose (2%).



**Figure 16:** Cuve à électrophorèse

### II-3-5 matériel de conservation des amplicons

Après extraction et amplification, les ARN et les amplicons sont conservés au congélateur, respectivement à  $-80^{\circ}\text{C}$  et  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **III- METHODES**

Notre étude s'est déroulée durant la période comprise entre le 15 Novembre 2012 et le 15 octobre 2013. Plusieurs méthodes dont l'extraction sur colonne, la RT-PCR et l'électrophorèse ont été utilisées dans notre étude. Ces méthodes sont décrites dans les paragraphes qui suivent.

Au début de notre étude, il nous a fallu connaître notre zone de capture afin de pouvoir dresser une carte géo-référenciée qui nous permettra d'avoir les coordonnées de chaque piège, posé à 50 m d'intervalle. Une inspection des lieux était nécessaire pour identifier les endroits propices au piégeage.

#### **III-1 SUR LE TERRAIN**

##### **III-1-1 Détermination des coordonnées des points de capture**

Le préalable à la capture fut de subdiviser notre zone d'étude en différents points de piégeage géo référenciés. Au total, 63 points ont été retenus pour la pose des pièges. Les points ont été géo référenciés avec un GPS (CSX60, Garmin ®, Taiwan, Chine), les logiciels google earth, MAPSOURCE, EXCEL, DNRGPS et CONVERS 3 ont été utilisés selon la méthode suivante :

Relever avec le GPS les coordonnées de deux points de référence suffisamment éloignés dans la zone de capture, puis dans MAPSOURCE, à partir du premier point tracer des parallèles de 50 m d'intervalle, puis d'autres parallèles également de 50 m d'intervalle, à partir d'un second point et perpendiculaires aux premières. On se retrouve avec un quadrillage dont les points sont à équidistance de 50 m et il suffit à ce stade de faire basculer la grille directement sur GOOGLE EARTH.

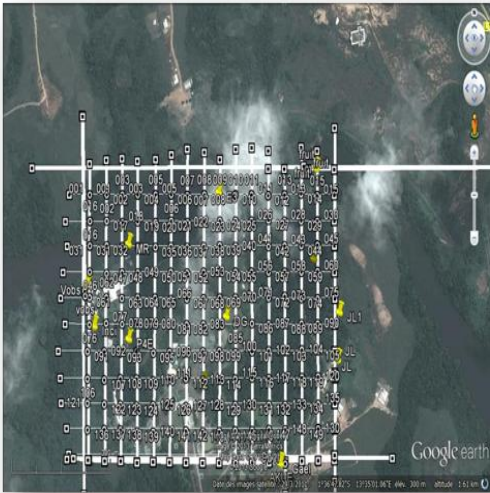
Sur la carte GOOGLE EARTH, identifier la zone de capture et éliminer les points qui n'y font pas partie, puis éliminer les points situés dans des zones non

praticables (enclos, routes, volières, marécages etc.) ; enfin, relever les points restants et leurs coordonnées GPS. La liste des points et leurs coordonnées sont transférées dans le GPS pour le marquage de point sur le terrain et traçage des trajets en forêt. Plus tard, le GPS sera connecté au logiciel DNRGPS pour le traitement des coordonnées.

Une fois le GPS connecté sur DNRGPS, la liste des coordonnées peut être copiée en TXT puis transférée sur le logiciel Excel. DNRGPS permet de trier les informations retenues par le GPS pour ne récupérer que les données dont on a besoin.

Pour le traitement des données, Excel permet de modifier certaines informations parasites pour obtenir une liste définitive des points de capture et leurs coordonnées. Une fois la liste finalisée, il est important de la réintégrer au GPS, d'où la nécessité du logiciel CONVERS 3 car le passage de ces coordonnées sur GOOGLE EARTH a entraîné leur modification, il faut alors les reconvertir.

Sur CONVERS 3, il est primordial d'effectuer certaines modifications sur les coordonnées GPS en fonction du format (changer le N et le E en + et – pour le format world géodésique system 1984) pour qu'elles puissent être converties. Ceci nous a permis d'obtenir la répartition des points ci-après (figure 17) :



a



b



c

**Figure 17:** géo localisation de la zone de capture (a ; b), et les points de piégeage (c)

### **III-1-2 capture des rongeurs**

La phase de géo localisation terminée, nous avons procédé au déploiement des pièges aux endroits identifiés. Deux types de pièges à déclenchements automatiques ont été utilisés: Sherman et Tomahawk. Ces deux types de pièges sont couramment employés pour la capture des petits mammifères terrestres (Pimley et al., 2005).

Chaque piège était appâté avec une noix de palme entre 8h30 et 9h30 durant les périodes de capture et, relevé le matin à la même période puis redéposé dans l'après midi en cas de succès de capture. Après la capture, les animaux étaient conservés dans les pièges et transportés jusqu'au laboratoire du CDP pour procéder à l'identification de l'espèce.

L'identification des espèces de rongeur a été faite sur la base de caractères morphologiques clé pour la détermination des petits rongeurs du Gabon (Duplantier et al., 1997)(annexe 4).

### **III-1-3 capture des primates non humains**

Les primates non humains ont été capturés lors des contrôles sanitaires annuels. Ils ont été identifiés par des numéros tatoués sur les cuisses ou sur la poitrine pour certains, et par des boucles numérotés pour d'autres. Pour l'immobilisation en vue du contrôle sanitaire, les animaux ont été anesthésiés par le biais de fléchettes anesthésiques mises sous pression et propulsées au moyen d'une sarbacane. La molécule utilisée étant la kétamine, à la dose de 1ml pour 10kg, soit 0.1 ml/ Kg.



**Figure 18:** Contention et prélèvement sur un primate sous anesthésie générale

## **III-2 AU LABORATOIRE**

### **III-2-1 méthodes de prélèvement**

#### **III-2-1-1 technique de prélèvement sur le personnel**

Conformément aux conventions, et pour des raisons d'éthique, les prélèvements humains se sont effectués au laboratoire d'analyse médicale (LAM) du CIRMF par des médecins.

Toutes les personnes participant à l'étude sont soumises à un formulaire attestant de leur participation volontaire au projet et leur garantissant un suivi sanitaire en cas de maladie, et un bilan complet de santé. Ils sont chargés de rapporter en plus des prélèvements sanguins ; des fèces et des écouvillons nasaux.



### **III-2-1-2 technique de prélèvement sur les rongeurs**

Le prélèvement d'organes chez les rongeurs se fait au petit laboratoire du CDP ou directement dans une pièce équipée pour l'occasion dans des conditions optimum d'asepsie.

L'animal est d'abord endormi dans un sac plastique contenant du chloroforme pendant quelques minutes, une fois endormi il est sorti du sac et installé sur la paillasse où il est prélevé du sang et une petite quantité de certains organes tels que : cœur, rate, rein, foie, intestin, poumon et crottes. On réalise également des écouvillons nasaux et rectaux. A la fin des prélèvements, les animaux ont été euthanasiés et incinérés.

Les échantillons prélevés sont conservés dans des tubes eppendorf secs au congélateur à -80°C, les écouvillons sont aussitôtensemencés sur des boites de Pétri à milieux sélectifs pour la culture bactérienne destinée à une autre étude.

Il est important de préciser que dans le cadre de notre étude, seuls la rate, le foie, les poumons et les crottes ont été utilisés, les autres organes étaient destinés à d'autres études.

### **III-2-1-3 technique de prélèvement sur les primates non humains**

Les primates non humains sont prélevés en salle de soin pour la plupart, le prélèvement de sang se fait manuellement au niveau des veines iliaques, la récolte des crottes se fait à la main avec des gants, et l'écouvillonnage nasal et anal se fait en utilisant des écouvillons stériles.



## **III-2-2 méthodes d'obtention d'ARN**

### **III-2-2-1 méthodes d'extraction d'acide ribonucléique (ARN)**

En raison de l'importante diversité aussi bien qualitative que quantitative de nos échantillons, nous avons réalisé l'extraction d'ARN par pool de crottes et d'échantillons de poumon.

En effet, le pool est réalisé à partir de crottes et d'échantillon de poumon d'au plus quatre (4) animaux de la même espèce, environ 2,5g de fèces sont prélevés par animal pour la constitution d'un pool. Pour les échantillons de poumon, ils sont soigneusement découpés sous une haute stérile en morceaux de 2,5g en prenant soin de changer de scalpel après chaque pool.

#### **III-2-2-1-1 Découpe et broyage des organes sur l'automate**

La découpe et le broyage des organes ont été effectués de la manière suivante : On commence par identifier les tubes 24-well polycarbonate vials (WPV), qui sont des tubes avec une microbille, puis on y dépose 500µl de tampon PBS (Phosphate Buffer Saline pH 7,2). Les tubes contenant le PBS sont ensuite placés dans la glace une demi-heure avant la manipulation. Puis les organes préalablement conservés dans le congélateur à -80°C sont découpés sous la hotte à flux laminaire en morceau de 100 mg à l'aide d'un scalpel jetable (un scalpel par échantillon). Les morceaux d'organes de 100 mg sont ensuite immergés dans 500µl de PBS contenu dans les tubes WPV. Après le mélange organes + PBS, les tubes sont refermés et classés dans les boîtes WPV puis le tout est placé dans le broyeur.

Le broyage proprement dit est effectué grâce à un automate Geno-Grinder 2000 (figure 14). L'automate permet de traiter deux boîtes contenant chacune 24 tubes Well Polycarbonate Vials (WPV). Les organes sont broyés en 2 minutes à 1500 tours/minute. Le broyat obtenu est ensuite stocké à -80°C jusqu'à son utilisation (extraction de l'ARN)

### III-2-2-1-2 extraction d'ARN sur crottes

L'extraction de l'ARN s'est effectuée à partir des crottes de rongeur et des fèces de primates et d'humains à l'aide du kit EZ1 virus kit2.0 (QUIAGEN®, hilden, Allemagne). Cette extraction s'est effectuée sur l'automate EZI Advanced XL selon le protocole recommandé.

Il faut tout d'abord préparer les réactifs : préparer le tampon RNA carrier en dissolvant 310 µl de tampon AVE dans le tube contenant le RNA carrier lyophilisé, le conserver à - 20°C après utilisation ; et pour chaque échantillon traité, diluer dans un tube de 1,5ml (fourni), 3,6 µl de la solution de RNA carrier dans 56,4µl de tampon AVE.

- Mélanger doucement en pipetant. Ne pas « vortexer », aliquoter les échantillons puis mettre 1200µl de PBS dans des tubes propres identifiés préalablement.
- Ajouter une petite quantité de fèces dans chaque tube environ (300 mg) et centrifuger les tubes à 3000 tr/min pendant 5min ; prélever et transférer ensuite le surnageant dans un nouveau tube; transférer 200µl de la suspension (surnageant) de l'échantillon dans un tube de 2ml (fourni). Laisser reposer quelques minutes à température ambiante.
- Introduire la carte EZ1 advanced virus cardv2.0, allumer l'automate, appuyer sur START, ouvrir la porte de l'automate et prendre les cartouches, les renverser trois (3) fois pour bien homogénéiser les particules magnétiques ; disposer les cartouches dans les supports de tubes, sur chaque ligne, disposer les éléments de la manière suivante :
  - Ligne 1 : tube d'élution de 1,5ml
  - Ligne2 : porte cône et cône
  - Ligne 3 : tube de 1,5 ml contenant 60µl de mélange RNA carrier+ tampon AVE

- Ligne 4 : tube de 2ml contenant l'échantillon (200µl)

Fermer la porte et appuyer sur START ;

A la fin du protocole, récupérer les tubes d'éluion contenant les acides nucléiques purifiés et les conserver à -80°C ; effectuer ensuite la procédure de maintenance comme décrite dans le manuel.

### **III-2-3 méthodes d'analyse d'ARN**

Pour cette étude, une RT-PCR classique suivie d'une PCR semi nichée d'un fragment de gène L et l'électrophorèse des amplicons issus de cette RT-PCR sont les principales analyses effectuées.

#### **III-2-3-1 Principe de la PCR**

La Polymerase Chain Reaction ou PCR est une technique de réplication ciblée *in vitro*. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. C'est généralement suffisant pour une utilisation ultérieure. Le principe et les conditions expérimentales qui en découlent sont très simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' et 5' pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou « primers » définissent alors, la séquence amplifiée. Dans notre étude, nous effectuons une RT-PCR. En effet, l'amplification de l'ARN nécessite une reverse transcription pour la synthèse du brin complémentaire, avant de passer à la PCR.

Lors de la RT-PCR *Pan Paramyxoviridae*, nous avons tenté d'amplifier un fragment du gène L. Cette inverse ou Reverse Transcription (RT) couplée à la réaction de polymérisation en chaîne en une seule étape (RT-PCR one step), est suivie d'une deuxième série d'amplification (PCR semi-nichée). Le recours à une deuxième série d'amplification semi-nichée, permet d'augmenter la

spécificité de la réaction car le second fragment amplifié est contenu dans le premier fragment. Pour pouvoir amplifier le génome viral des virus recherchés, des amorces spécifiques ont été utilisées RMH (R ; F1 ; F2) pour les genres *Respirovirus*, *Morbillivirus* et *Henipavirus*, AR (R ; F1 ; F2) pour les genres *Avulavirus* et *Rubulavirus* PNE (R ; F1 ; F2) pour les genres *Pneumovirus*, et *metapneumovirus*.

### **III-2-3-2 RT-PCR one step (pan *Paramyxoviridae*)**

La transcription inverse consiste à synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN extrait du poumon ou des crottes. Cette étape se réalise comme suit : on prépare une solution mix d'un volume final de 25 µl, contenant 5µl d'ARN, 0,5µl d'eau, 12,5µl de tampon (One step buffer), 1µl de Sérum Albumine Bovin (BSA), 0,4µl de MgCl<sub>2</sub> (50µM), 1 µl d'enzyme SuperScript III RT/Platinum® *Taq* Mix (Qiagen) et deux amorces à 10 µM (RMH, AR, PNE (R) =2,3µl et RMH AR PNE (F1)=2,3µl) spécifiques à un fragment du gène L de 496 pb pour RMH, de 250 pb pour AR et de 350 pb pour PNE des *Paramyxoviridae*.

La transcription inverse et la première série d'amplification se déroulent dans un thermocycleur comme suit : d'abord une étape de purification à 60°C pendant 1mn, une étape de synthèse du brin complémentaire à 48°C pendant 30mn, une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 2 mn, un cycle de 3 réactions répétées 40 fois, puis une élongation finale à 72°C pendant 7 mn. Chacun des 40 cycles est constitué d'une dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, d'une hybridation à 50°C pendant 30 secondes et d'une élongation à 72°C pendant 30 secondes.

### **III-2-3-3 PCR semi-nichée (*pan paramyxovirus*)**

Une PCR nichée est une réaction d'amplification au cours de laquelle le produit de PCR, issu de la RT-PCR One step est de nouveau amplifié à l'aide d'un nouveau couple d'amorce sens et anti-sens RMH, AR, PNE (R) et RMH AR PNE (F2).

La réaction de PCR semi-nichée permet d'augmenter le seuil de détection de la PCR et elle se réalise dans un volume final de 50µl comprenant 29,8µl d'eau, 5µl de la solution tampon (10x PCR buffer), 1µl des 4 désoxynucléotides (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 10µl de la solution des amorces sens et anti-sens (RMH, AR, PNE (R) =5µl et RMH, AR, PNE (F2) =5µl), 2µl de Mgcl<sub>2</sub>, 0.2µl d'enzyme Platinum ® Taq DNA polymérase (Invitrogen), et 2µl de produits de la première PCR (différents ADNc).

L'amplification se déroule dans un thermocycleur en 3 étapes successives : une dénaturation initiale à 94°C pendant 2 mn, un cycle de 3 réactions répétées 40 fois, puis une élongation finale à 72°C pendant 7 mn. Chacun des 45 cycles est constitué d'une dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, d'une hybridation des amorces à 50°C pendant 30 secondes et d'une élongation à 72°C pendant 30 secondes.

### **III-2-3-4 électrophorèse des fragments amplifiés**

Afin de visualiser les produits de PCR, on effectue une électrophorèse selon le protocole suivant :

- Préparation d'un gel d'agarose à 2% (3g pour 200 ml de tampon) en tampon TBE (Tris Borate EDTA, de Sigma France). Le gel est placé dans une cuve à électrophorèse remplie de tampon TBE.
- Dépôt dans chaque puits du gel de 10 µl de produit de PCR mélangés à 4µl d'une solution contenant du bleu de bromophénol (Sigma).

- Migration électrophorétique des produits de la PCR sous l'action d'un champ électrique de 180 volts, puis visualisation des fragments sous rayons ultra violet.

### **III-2-4 analyses statistiques et interprétation des résultats**

La comparaison des effectifs et résultats d'analyse a été faite à l'aide du logiciel statistique R version **R.3.0.2**. Au niveau de confiance de 95%, un résultat est considéré comme significatif lorsque le  $\chi^2$  est inférieur à 0.05%. Lorsque les effectifs sont inférieurs à 5, nous utilisons le test exact de Fisher.

Pour l'interprétation de nos résultats d'analyse d'amplification, lorsqu'un pool est révélé positif, ce résultat est considéré comme suspect ; et les échantillons composant ce pool sont par la suite analysés de manière individuelle.

## CHAPITRE II : RESULTATS

### RESULTATS DE CAPTURE

L'ensemble de nos captures se sont effectuées tout le long de l'année. Pour les rongeurs, 63 pièges ont été posés et la capture n'a été menée qu'au CDP. Au total, nous avons obtenu 143 échantillons de primates non humains répartis en six (6) espèces dont des mandrils, des chimpanzés, des gorilles, des vervets, des solatus et des macaques ; 213 échantillons de rongeurs repartis également en cinq (5) espèces dont *Lemniscomys striatus*, *Praomys* sp, *Lophuromys nudicaudus*, *Rattus norvegicus* et *Mastomys natalensis* ; et 30 échantillons humains. Tous les échantillons ont été mélangés par groupe de quatre individus de même espèce. On se retrouve ainsi avec respectivement : 39 pools de fèces de primates non humains, 30 pools de crottes de rongeur, 61 pools de poumon de rongeur et 8 pools de fèces humains. L'ensemble des résultats est confiné dans le tableau IV.

**Tableau IV** : Effectif total d'individus prélevés

Espèces	CDP	PPG	Parc de la LEKIEDI	TOTAL
Primates non humains	126	3	14	143
Rongeurs	213	0	0	213
Humains	17	6	7	30
<b>TOTAL</b>	<b>356</b>	<b>9</b>	<b>21</b>	<b>386</b>

## RECHERCHE DES *PARAMYXOVIRIDAE*

### II-1 POPULATION GENERALE

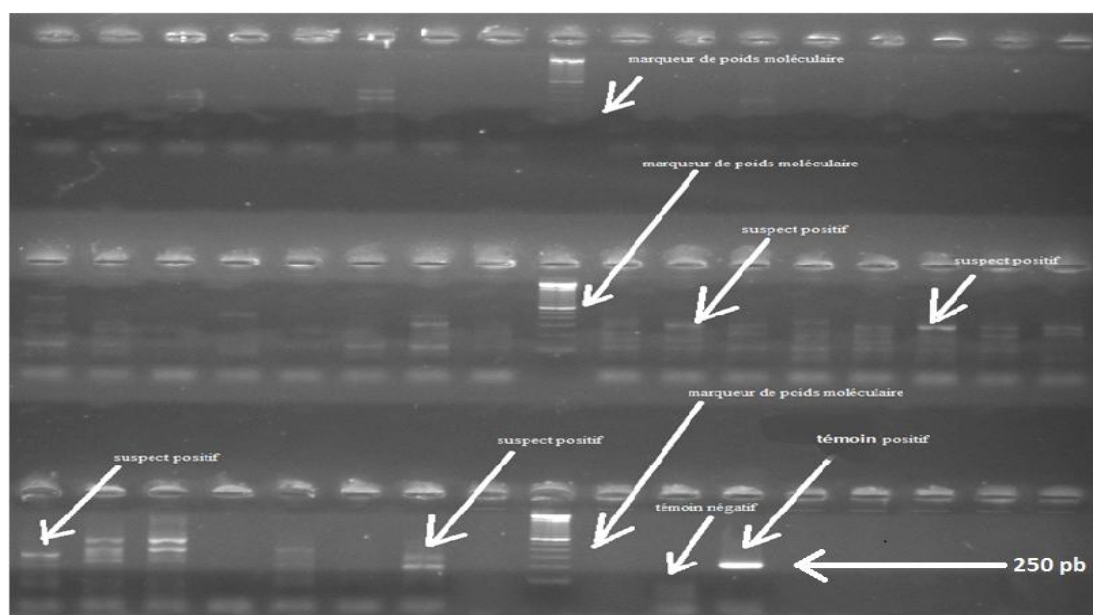
Un échantillon est dit amplifié et considéré comme positif lorsque son gel présente des bandes à hauteur de 496 pb pour le système RMH (*Respirovirus*, *Morbillivirus* et *Henipavirus*), 250 pb pour le système AR (*Avulavirus* et *Rubulavirus*) et 300 pb pour le système PNE (*Pneumovirus*, et *metapneumovirus*). La **figure 19** est une illustration d'un gel de PCR pour le système AR.

La RT-PCR a révélé après électrophorèse des fragments amplifiés, des bandes dont les tailles sur gel correspondent au poids moléculaire attendus. Au total, 3 pools d'ARN de primates non humain et 1 pool d'ARN d'humain ont été amplifiés. Après dépoolage, 3 échantillons de PNH (tableau V) soit 2,09% (IC95=0,4-6%) et 2 échantillons humains soit 6,6% (IC95=[0,8-22%]) ont été amplifiés et considérés comme positifs. Aucun échantillon de rongeur ne s'est révélé positif. On n'enregistre pas de différence significative entre les primates non humains et les humains ( $\chi^2=0,57$  et  $p=0,2076$ ) mais aussi entre les rongeurs et les primates non humains ( $\chi^2=2,34$  et  $p=0.064$ ). A l'opposé, les primates pris dans leur ensemble (Homme + PNH) sont significativement plus porteurs que les rongeurs ( $\chi^2=4,18$  et  $p=0.017$ ), de plus on constate une différence significative entre les primates non humains, les hommes et les rongeurs lorsqu'ils sont comparés dans l'ensemble ( $\chi^2=10,28$  et  $p=0,0068$ ).

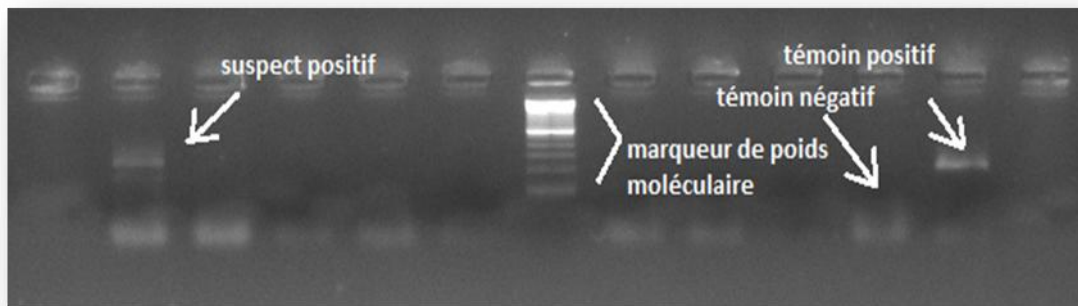


**Tableau V** : Bilan des résultats de RT-PCR *Paramyxoviridae*

	Négatif	Positif	Total
Primates non humains	140	3	143
Humains	28	2	30
Rongeurs	213	0	213
Total	381	5	386



**Figure 19** : Photo d'un gel d'agarose des produits de PCR sur pool d'ARN d'échantillons de primates, système AR.



**Figure 20:** Photo d'un gel d'agarose des produits de PCR sur pool d'ARN d'échantillons humains, système AR.

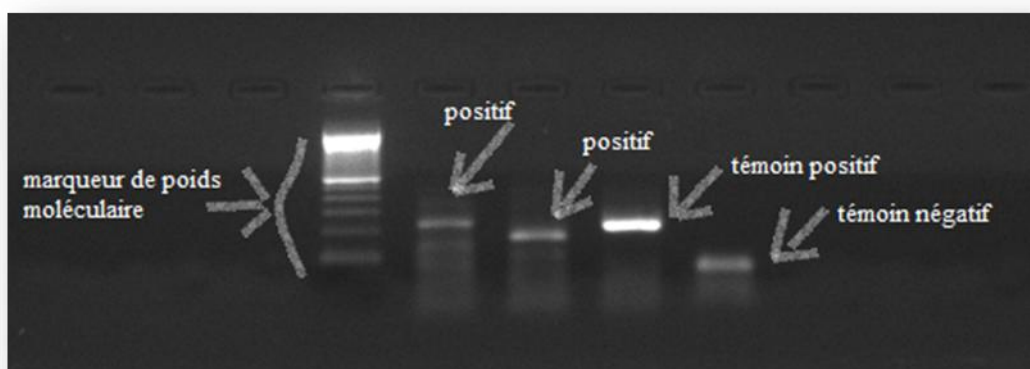
## II-2 PAR SITE D'ETUDE

### II-2-1 programme de protection des gorilles (PPG)

Parmi les populations du PPG participant au protocole (tableau VI), nous avons obtenu 2 positifs chez les humains et aucun parmi la population de primates non humains (figure 21). Il n'y a pas de différence significative entre les infections de ces différentes populations analysées au PPG( $p=0,5$ ).

**Tableau VI:** Bilan des résultats de RT-PCR *Paramyxoviridae* effectué dans les différentes populations du programme protection gorille (PPG)

Espèces	Négatif	Positif	Total
Primates non humains	3	0	3
Humains	4	2	6
Total	7	2	9



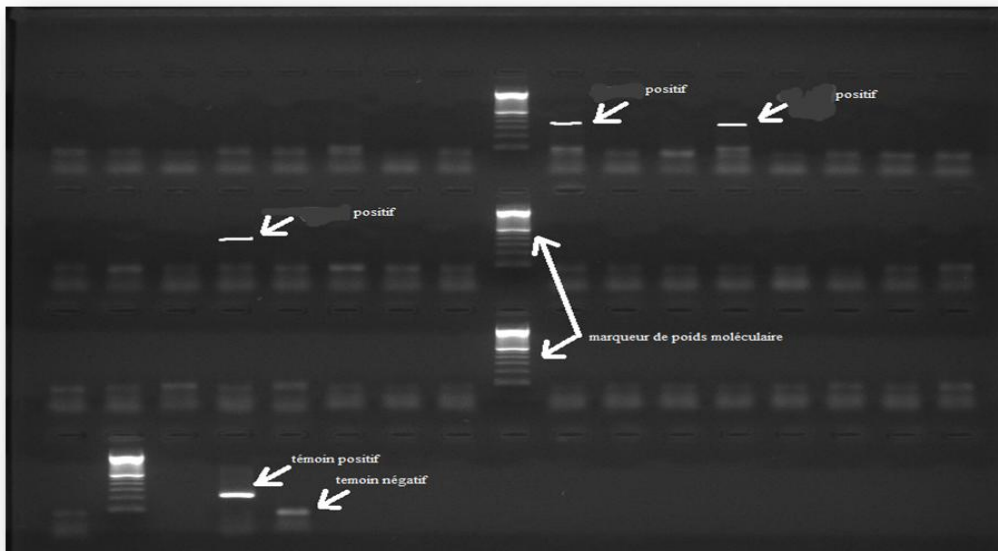
**Figure 21:** Photo d'un gel d'agarose des produits de PCR sur échantillons individuels humains, système AR.

## II-2-2 centre de primatologie (CDP)

Parmi les populations du centre de primatologie participant au protocole (tableau VII), nous avons obtenu 3 suspects positifs chez les primates non humains soit 2,38% (IC95=[0,5-6,80%]) et aucun suspect chez les humains et chez les rongeurs (figure 22). Il n'y a pas de différence significative entre les infections de ces différentes populations ( $p=0,068$ ).

**Tableau VII:** Bilan des résultats de RT-PCR *Paramyxoviridae* effectuée dans les différentes populations du centre de primatologie du CIRMF

Espèces	Négatif	Positif	Total
Primates non humains	123	3	126
Humains	17	0	17
Rongeurs	213	0	213
Total	353	3	356



**Figure 22:** Photo d'un gel d'agarose des produits de PCR sur échantillons individuels de primates non humains, système AR.

### II-2-3 parc de la LEKIEDI (Bakoumba)

Sur la totalité des échantillons prélevés et analysés en provenance du parc de la LEKIEDI à savoir 14 primates et 7 humains, aucun ne s'est révélé positif en *Paramyxoviridae*.

## CHAPITRE III : DISCUSSION ET RECOMMANDATIONS

### DISCUSSION

#### I-1 CONTEXTE, CHOIX DES SITES ET DES ESPECES ANIMALES

La plus grande difficulté de contrôle des maladies émergentes d'origine animale est le fait de la méconnaissance des réservoirs naturels d'agents pathogènes en causes et leurs modes de transmission. L'état sanitaire des animaux sauvages souvent inconnu, peut contribuer à l'infection humaine. L'exemple des épidémies dues au virus Ebola après la consommation des grands singes infectés dans une région du Gabon est démonstratif (Nkoghe Mba et al., 2005). Par ailleurs, plusieurs études ont démontré le rôle des animaux sauvages dans la transmission d'agents pathogènes à l'homme (Larkin, 2003). Afin de réduire les risques de contamination due aux espèces animales sauvages, il serait judicieux de connaître les différentes étapes qui aboutissent à ce phénomène. C'est dans ce contexte que la présente étude a ciblé quelques espèces animales ayant un contact régulier avec les hommes au Gabon à savoir les primates non humains et les rongeurs pour la recherche des virus de la famille des *Paramyxoviridae*. C'est ainsi que des échantillons ont été prélevés en tenant compte du tropisme cellulaire des différents virus de cette famille. Les paramyxovirus étant des virus à tropisme respiratoire mais se retrouvant aussi au niveau du tube digestif, nous avons utilisé le poumon, les écouvillons nasaux et les crottes. Nos sites d'études sont essentiellement des sites de conservation de primates non humains retrouvés dans la province du Haut Ogooué et travaillant en collaboration avec le CIRMF.

## I-2 ECHANTILLONNAGE ET PRELEVEMENTS

Les prélèvements ont été réalisés dans des laboratoires équipés pour la circonstance. Bien que notre étude se soit effectuée sur toute une année, les périodes de captures des différentes espèces, beaucoup plus réduites ne nous ont pas permis de couvrir toutes les saisons rencontrées au GABON.

Après le prélèvement de leurs organes, les rongeurs sont sacrifiés puis incinérés. Les primates non humains quant à eux sont prélevés sous anesthésie générale, nous avons prélevé respectivement les sécrétions nasales et des crottes. Par contre, les humains ont été prélevés par des médecins humains conformément à la réglementation éthique de projet. Le personnel participant doit signer un consentement éclairé (annexe 1) les informant sur le projet et les circonstances de prélèvement ; et les assurant d'un suivi sanitaire complet sur les échantillons fournis. Ils fournissent du sang, des fèces et des écouvillons nasaux ; mais seuls les deux derniers ont été exploités dans notre étude, le sang étant réservé à une étude ultérieure.

Pour la conservation des échantillons, deux aliquots ont été effectués et conservés à température négative (-80°C dans le congélateur au laboratoire). Le premier aliquot est utilisé pour une éventuelle confirmation des résultats positifs ; et le deuxième est utilisé pour l'extraction. Conservés au congélateur -80°C aussitôt après leurs prélèvements, les échantillons sont décongelés pour être triés avant d'être recongelés à -80°C. Ces échantillons ont été décongelés à nouveau lors du broyage et au moment de l'extraction d'ARN. L'ARN extrait a également été conservé à -80°C avant d'être utilisé pour la RT-PCR. Par conséquent, nous pensons que la succession des phases congélation et décongélation pourrait altérer l'ARN des virus recherchés et les réactifs utilisés. L'ARN est très fragile, il convient donc de le doser au spectrophotomètre avant son utilisation pour s'assurer de sa qualité, ce qui n'a malheureusement pas été fait dans notre étude.

### I-3 ANALYSES AU LABORATOIRE

La technique de biologie moléculaire RT-PCR reconnue pour sa grande sensibilité à détecter les fragments du génome viral dans les tissus a été utilisée à cet effet. Ces analyses ont consisté à amplifier le gène L, qui est le plus conservé dans la famille de *Paramyxoviridae*. Les amorces sont spécifiques pour des groupes de genre de cette famille (RMH, AR, PNE), et les analyses s'effectuent en deux séries d'amplifications suivant le protocole recommandé. La seconde amplification est semi-nichée afin d'augmenter la spécificité des résultats. Ce protocole a permis de révéler 5 prélèvements positifs en Avulavirus et Rubulavirus, dont 2 chez les humains et 3 chez les primates non humains. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par MVE ONDO en 2011, qui a également utilisé cette technique pour la recherche des Paramyxovirus sur 454 animaux sauvages (224 ongulés, 83 rongeurs, 71 primates non humains, 34 carnivores, 28 reptiles et 14 oiseaux) destinés à la consommation au Gabon. Bien que la durée pour la reconstitution du second brin d'ARN diffère, les protocoles et les amorces qu'il a utilisés restent identiques aux nôtres. Les organes utilisés dans son étude étaient le foie et la rate pour la recherche des Paramyxovirus ; et les résultats ont été confirmés par séquençage des fragments amplifiés. Au sortir de cette étude, ses résultats ont révélé l'absence de paramyxovirus dans les échantillons analysés. Cependant, une RT-PCR effectuée avec un couple d'amorces spécifiques du virus Hendra un autre *Paramyxovirus*, a permis de révéler 25% de positifs sur des organes de chauves-souris frugivores de l'espèce *Pteropus hypomelanus* en Asie. Dans cette étude, au total 5000 échantillons ont été collectés, répartis en 46 espèces dont 36 espèces sauvages. Les organes utilisés étaient le foie, la rate, le rein et le poumon. Le couple d'amorces utilisés amplifie un fragment de 200 pb du gène M de ce virus (Halpin et al., 2000). Toutes ces conditions différentes des nôtres pourraient expliquer le pourcentage de détection supérieur obtenu dans cette étude. En effet, nous avons ciblé une famille virale (*Paramyxoviridae*) regroupant en son sein plusieurs virus ; les

prélèvements ont été effectués chez trois espèces (humaines, simiennes, et rongeurs) ; nos amorces sont spécifiques de plusieurs genres viraux et visent à amplifier un gène conservé dans ces sous familles (gène L) cela constitue une limite à notre étude contrairement aux études menées en Asie. Nos échantillons sont constitués d'organe de poumon et des fèces. Une durée de reconstitution de second brin d'ARN plus longue, nous a permis de détecter des virus dans nos population d'études, mais ces résultats ne concernent malheureusement qu'une région du territoire gabonais ce qui constitue également une limite pour notre étude. Nos résultats pourraient être améliorés en testant les échantillons avec de nouvelles amorces plus spécifiques et d'autres témoins positifs ; en prenant soin de faire plusieurs aliquots à usage unique de tous les réactifs pour contourner les problèmes liés aux changements de température.

#### **I-4 RESULTATS GENERAUX**

Les résultats obtenus après analyse de laboratoire, suggèrent que les *Paramyxoviridae* circulent très peu et de façon asymptomatique chez les animaux ayant fait l'objet de notre étude. Ce résultat signifierait que le risque de contracter les virus appartenant à ces deux familles virales par contact avec ces animaux dans nos différents sites d'étude (centre de primatologie du CIRMF, parc de la LEKIEDI, projet protection gorille) est potentiellement faible. Toutefois, ce premier essai ne permet pas de tirer des conclusions définitives, il convient de reprendre cette étude avec un échantillonnage plus important et en diversifiant les espèces animales. Plusieurs autres paramètres doivent être pris en compte, notamment la période et la durée de collecte des échantillons chez les primates non humains et les humains. La période des collectes chez ces espèces ne nous a pas permis de couvrir les différentes saisons que l'on rencontre au Gabon (deux saisons sèches et deux saisons de pluies). Les virus recherchés pourraient ne pas circuler dans la zone de collecte à une saison



donnée. En effet, la circulation virale n'est pas continue dans le temps, ni dans l'espace. Pour certains virus, leur circulation peut être favorisée, soit par la saison pluvieuse ou la sécheresse mettant en jeu plusieurs facteurs : tel que le déplacement des animaux réservoirs dans de nouvelles régions en cas de sécheresse. C'est le cas des épidémies dues aux virus appartenant aux *Paramyxoviridae* qui, surviennent en général pendant la saison des pluies, une période caractérisée par un temps froid et humide. Ces caractères épidémiologiques se confirment dans nos résultats avec nos 5 suspects positifs en *Paramyxoviridae* capturés entre avril et juin, période qui correspond à la petite saison de pluie au Gabon, justifiant notre faible pourcentage de détections en raison d'une absence de prélèvement pendant la grande saison de pluie.

Dans notre étude, les primates pris dans leur ensemble (Homme + PNH) sont significativement plus porteurs que les rongeurs ( $\chi^2=4,18$  et  $p=0.017$ ). Cela indiquerait que c'est par les primates que les rongeurs s'infectent. En effet, les rongeurs se nourrissent essentiellement de restes d'aliment laissés par les primates, sachant que chez les primates non humains, ces restes sont très souvent couplés aux excréments. Il serait donc probable que l'infection se transmette à travers ces derniers. Toutefois, ces résultats nécessitent d'être confirmés par séquençage des échantillons détectés positifs. Au regard de notre faible échantillonnage, nos résultats ne peuvent donner lieu à des conclusions mais plutôt des observations qui seront infirmées ou confirmées dans la suite du projet avec des effectifs plus conséquents.

## **I-5 RESULTATS PAR SITE**

Dans une vue d'ensemble, l'absence de capture de rongeur dans les sites du parc de la LEKIEDI et du Programme de protection des gorilles, influence considérablement les résultats qui y sont enregistrés et constitue une limite non négligeable à notre étude. Les captures de rongeur n'ont eu lieu que dans le site du centre de primatologie du CIRMF. Il serait prétentieux pour nous de conclure à une prévalence zéro chez les rongeurs dans les autres sites. En plus, contrairement au CDP ; le parc de la LEKIEDI et le PPG sont des sites naturels où les animaux vivent en toute liberté avec des interactions plus étroites entre les espèces ; il serait donc possible théoriquement d'y obtenir des pourcentages de détection plus importants. De plus, au PPG, la circulation de pathogènes mis en évidence uniquement chez le personnel en contact avec les primates non humains se justifie par un bon respect des règles d'asepsie lors des distributions d'aliment ou de soin aux animaux, et suggère implicitement une non transmission d'homme à homme de ce virus adapté à l'espèce humaine. Au CDP, les résultats positifs exclusivement limités aux primates non humains, s'explique par les moyens logistiques utilisés pour le nettoyage et la désinfection des déchets, et des matériaux souillés par les déjections des animaux.

Au terme de cette étude, nous formulons quelques recommandations à l'attention des autorités étatiques, des scientifiques et des acteurs de la filière.

## RECOMMANDATIONS

Malgré le faible pourcentage de détection des virus ciblés, les connaissances actuelles sur l'origine animale (sauvage) de certaines maladies permettent d'attirer l'attention sur les risques infectieux. En effet, des agents pathogènes appartenant à la famille des *Paramyxoviridae* et d'autres familles virales sont impliqués dans l'émergence de nombreuses maladies chez l'homme. C'est ainsi que certaines recommandations sont faites en direction du personnel des parcs et réserves naturels, des touristes et autorités touristiques et des scientifiques.

### II-1 AUX AUTORITES DES PARCS, RESERVES ET AIRES PROTEGES

En dépit des faibles pourcentages dans cette étude, la présence de virus potentiellement pathogènes pour l'homme dans les populations animales est évidente. Le cas des parcs et des réserves est assez particulier en raison de l'étroite cohabitation entre les hommes et les animaux. Pour réduire les risques de contamination, il serait judicieux de procéder au suivi sanitaire longitudinal des différentes populations concernées vivant en cohabitation, et d'établir des programmes de vaccinations en fonction du risque infectieux. Aussi, il faudrait instaurer des périodes de quarantaine obligatoire pour tout nouvel animal entrant et de faire le vide sanitaire des bâtiments à chaque changement de saison pour casser le cycle viral.

## **II-2 AUX TOURISTES ET AUTORITES TOURISTIQUES**

Parmi les activités touristiques, la visite d'animaux sauvages est très prisée, Pourtant les risques biologiques rencontrés ne sont pas toujours bien évalués. En effet, très peu savent quelles sont les maladies qu'ils peuvent contracter en manipulant des animaux sauvages. Il serait souhaitable pour les autorités touristiques, d'établir les cartes de risque infectieux et prendre des mesures de sécurité avant tout contact ou visite dans un site donné. Avant et après tout contact avec des animaux sauvages, se laver soigneusement les mains avec une solution hydro-alcoolique ou à défaut avec de l'eau savonneuse. Afin de réduire les risques de contracter des pathogènes en suspension dans l'air, il est conseillé de porter un masque.

## **II-3 AUX SCIENTIFIQUES**

Les virus à ARN sont des virus assez complexes, depuis l'émergence de plusieurs d'entre eux, les chercheurs s'y intéressent d'avantage. Toutefois, beaucoup négligent la fragilité de leurs génomes et se retrouvent très souvent avec des résultats négatifs en amplification. Il est donc recommandé à tous ceux qui travaillent avec de l'ARN de quantifier au spectrophotomètre leur aliquot avant chaque utilisation ou de faire plusieurs aliquots à usage unique pour contourner les problèmes dus aux changements de température qui cassent l'ARN, perturbant ainsi les sites de fixation ou les séquences d'amplification des amorces.

## **CONCLUSION**

Dans l'histoire de l'humanité, la lutte contre les maladies infectieuses a toujours été un cheval de bataille pour les différentes populations sans cesse soumises à différentes pressions. Près de 60% de maladies sont des zoonoses et environ 70% d'entre elles proviennent de la faune sauvage (Jones et al., 2008).

Avec le développement de l'écotourisme, les parcs et aires protégées sont davantage ouverts à la population à des fins touristiques, favorisant ainsi les interactions inter espèces essentielles au passage du pathogène d'une espèce à l'autre. Les modifications écologiques et les changements climatiques ont ainsi permis à certains pathogènes d'origine animale de franchir la barrière inter-espèce et s'adapter à l'homme.

Avec pour objectif principal la révélation d'une circulation des virus appartenant à la famille des *Paramyxoviridae* au sein des sites de conservation des primates, notre étude s'inscrit dans un projet portant sur la caractérisation et l'évolution adaptative de quatre (4) types de pathogène (*Trypanosomes*, *Entérovirus*, *Paramyxovirus* et *Plasmodium*). Elle a consisté plus spécifiquement, à détecter par RT-PCR les virus de la famille des *Paramyxoviridae* dans nos échantillons ; puis à déterminer leurs prévalences dans ces échantillons et ensuite Formuler des recommandations visant à réduire les contaminations.

Ainsi, cette étude a été menée à partir de 143 échantillons de primates non humains répartis en six (6) espèces, 213 échantillons de rongeurs répartis en cinq (5) espèces et 30 échantillons d'humains. Les prélèvements ont été effectués sur trois (3) sites ; notamment le centre de primatologie de Franceville (CDP); le programme de protection de gorille (PPG); et le parc de la LEKIEDI.

La RT-PCR a révélé la présence de virus de genre *Avulavirus* et *Rubulavirus* dans 3 échantillons de PNH soit 2,09% et 2 échantillons humains soit 6,6%. Au Programme de protection de Gorille, cette circulation de *Paramyxoviridae* reste limitée aux personnels ; alors que ces virus sont exclusivement retrouvés chez des populations de primates non humains au Centre de primatologie. Cependant, aucun *Paramyxoviridae* n'a été détecté chez les rongeurs.

Cette étude que nous avons initiée, nécessite d'être étendue à l'ensemble du territoire Gabonais pour être plus éclairé sur les prévalences de ces virus à l'échelle nationale. Elle doit être reprise avec des périodes de collecte couvrant l'ensemble des saisons, un échantillonnage plus important et varié ; et une utilisation de réactifs plus adaptée au modèle viral. De plus, pour le développement d'un éco-tourisme plus responsable, cette étude pourra se poursuivre par la recherche d'autres familles virales à partir de la base de données constituée de l'ensemble de notre échantillonnage ; afin d'élargir nos champs d'action sur les pathogènes d'origine animale.

Hormis les recommandations que nous avons formulées à l'attention des autorités des parcs et réserves naturels, des autorités touristiques et des scientifiques ; nous pensons qu'il est indispensable de mettre en place un réseau de surveillance de maladies humaines d'origine animale, regroupant les médecins, les vétérinaires et les scientifiques.

**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**



1. **Anderson, L.J., 1988**, Paramyxoviridae: Respiratory syncytial virus, In: *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice*. Springer, pp. 540-570.
2. **Andrade, M.R., Yee, J., Barry, P., Spinner, A., Roberts, J.A., Cabello, P.H., Leite, J.P., Lerche, N.W., 2003**, Prevalence of antibodies to selected viruses in a long-term closed breeding colony of rhesus macaques (*Macaca mulatta*) in Brazil. *American journal of primatology* 59, 123-128.
3. **Bach, N., Cuvillon, D., Brouard, J., Lafay, F., Freymuth, F., Legrand, L., Guillois, B., Duhamel, J., 2004**, Infections respiratoires aiguës à métagenuevirus humain chez l'enfant: études descriptive et comparative avec le virus respiratoire syncytial. *Archives de pédiatrie* 11, 212-215.
4. Bächli, T., 1988, Direct observation of the budding and fusion of an enveloped virus by video microscopy of viable cells. *The Journal of cell biology* 107, 1689-1695.
5. **Beem, M., Wright, F., Hamre, D., Egerer, R., Oehme, M., 1960**, Association of the chimpanzee coryza agent with acute respiratory disease in children. *New England Journal of Medicine* 263, 523-530.
6. **Bennett, C.R., Hamre, D., 1962**, Growth and serological characteristics of respiratory syncytial virus. *Journal of Infectious Diseases* 110, 8-16.
7. **Chanock, R., Finberg, L., 1957**, recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (cca) epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *American Journal of Epidemiology* 66, 291-300.
8. **Chanock, R.M., Parrott, R.H., Cook, K., Andrews, B., Bell, J., Reichelderfer, T., Kapikian, A.Z., Mastrota, F., Huebner, R.J., 1958**, Newly recognized myxoviruses from children with respiratory disease. *New England Journal of Medicine* 258, 207-213.
9. **Chastel, C., 2007**, Virus et émergences virales dans un contexte de mondialisation: le grand défi. *Med Trop* 67, 213-214.
10. **Cleaveland, S., Kaare, M., Knobel, D., Laurenson, M.K., 2006**, Canine vaccination—providing broader benefits for disease control. *Veterinary Microbiology* 117, 43-50.
11. **Coates, H., Alling, D., Chanock, R., 1966**, An antigenic analysis of respiratory syncytial virus isolates by a plaque reduction neutralization test. *American Journal of Epidemiology* 83, 299-313.

12. **Duplantier, J.M., Granjon, L., Bâ, K., 1997**, Répartition biogéographique des petits rongeurs au Sénégal. *Journal of African Zoology* 111, 17-26.
13. Gardner, P., 1973, Respiratory syncytial virus infections. *Postgraduate medical journal* 49, 788-791.
14. **Goldsmith, C.S., Whistler, T., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Rota, P.A., Bellini, W.J., Daszak, P., Wong, K., Shieh, W.-J., Zaki, S.R., 2003**, Elucidation of Nipah virus morphogenesis and replication using ultrastructural and molecular approaches. *Virus research* 92, 89-98.
15. **Graham, B.S., Johnson, T.R., Peebles, R.S., 2000**, Immune-mediated disease pathogenesis in respiratory syncytial virus infection. *Immunopharmacology* 48, 237-247.
16. **Halpin, K., Young, P., Field, H., Mackenzie, J., 2000**, Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *Journal of General Virology* 81, 1927-1932.
17. **Hambling, M., 1964**, Survival of the respiratory syncytial virus during storage under various conditions. *British journal of experimental pathology* 45, 647.
18. **Hayman, D.T., Suu-Ire, R., Breed, A.C., McEachern, J.A., Wang, L., Wood, J.L., Cunningham, A.A., 2008**, Evidence of henipavirus infection in West African fruit bats. *Plos One* 3, 2739.
19. **Hendry, J., Thames, H., 1986**, The tissue-rescuing unit. *British Journal of Radiology* 59, 628-630.
20. **Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008**, Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-993.
21. **Kwiatek, O., Keita, D., Gil, P., Fernández-Pinero, J., Jimenez Clavero, M.A., Albina, E., Libeau, G., 2010**, Quantitative one-step real-time RT-PCR for the fast detection of the four genotypes of PPRV. *Journal of virological methods* 165, 168-177.
22. **Larkin, J., 2003**, Strategic reputation risk management. Palgrave Macmillan. book, 52, 435.

23. **Lloyd-Smith, J.O., George, D., Pepin, K.M., Pitzer, V.E., Pulliam, J.R., Dobson, A.P., Hudson, P.J., Grenfell, B.T., 2009**, Epidemic dynamics at the human-animal interface. *Science* 326, 1362-1367.
24. **Lund, G., Tyrrell, D., Bradley, R., Scraba, D., 1984**, The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids. *Journal of general virology* 65, 1535-1542.
25. **Mackenzie, J., Chua, K., Daniels, P., Eaton, B., Field, H., Hall, R., Halpin, K., Johansen, C., Kirkland, P., Lam, S., 2001**, Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. *Emerging infectious diseases* 7, 497.
26. **Mbiguino, A., 1991**, immunité du virus respiratoire syncytial humain, université de MONTREAL. scientific book, 64, 502-517.
27. **Mve Ondo, 2011**, contribution a la recherche des virus appartenant aux familles des coronaviridae et des paramyxoviridae dans les organes de gibier abattu pour la consommation humaine au gabon. Ecole Inter-etats des Sciences et Médecine Vétérinaire de dakar. thèse vétérinaire 01. 130.
28. **Nkoghe Mba, D., Formenty, P., Leroy, E., Nnegue, S., Obame Edpu, S., Ba, I., Allarangar, Y., Cabore, J., Bachy, C., Andraghetti, R., 2005**, Plusieurs épidémies de fièvre hémorragique due au virus Ebola au Gabon, d'octobre 2001 à avril 2002. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* 98. 345-356.
29. **Patz, J.A., McGeehin, M.A., Bernard, S.M., Ebi, K.L., Epstein, P.R., Grambsch, A., Gubler, D.J., Reither, P., Romieu, I., Rose, J.B., 2000**, The potential health impacts of climate variability and change for the United States: executive summary of the report of the health sector of the US National Assessment. *Environmental health perspectives* 108, 367.
30. **Pimley, E.R., Bearder, S.K., Dixon, A.F., 2005**, Social organization of the Milne-Edward's potto. *American journal of primatology* 66, 317-330.
31. **Romette, M.P.J.L., 2011**. Etude structurale des protéines du complexe réplicatif du virus de la rougeole. universite de la mediterranee, thèse vétérinaire, 12, 109-115.
32. **Sasaki, M., Muleya, W., Ishii, A., Orba, Y., Hang'ombe, B.M., Mweene, A.S., Moonga, L., Thomas, Y., Kimura, T., Sawa, H., 2013**, Molecular epidemiology of paramyxoviruses in Zambian wild rodents and shrews. *Journal of General Virology*, vir. 0.058404-058400.

33. **Taylor, M., Oppenheim, B., 1998**, Hospital-acquired infection in elderly patients. *Journal of hospital infection* 38, 245-260.
34. **Wacharapluesadee, S., Lumlertdacha, B., Boongird, K., Wanghongsa, S., Chanhome, L., Rollin, P., Stockton, P., Rupprecht, C.E., Ksiazek, T.G., Hemachudha, T., 2005**, Bat Nipah virus, Thailand. *Emerging infectious diseases* 11, 1949.
35. **Wunner, W., Pringle, C., 1976**, Respiratory syncytial virus proteins. *Virology* 73, 228-243.

## WEBOGRAPHIE

1. **Nature, 2008.** Taxonomie espèces-hôtes Paramyxoviridae,  
Accès internet: <http://www.nature.com/ncomms/journal/v3/n4/full/ncomms1796.html> consulté le 26/04/2013 à 23h20
2. **Paramyxoviridae; 2013.** Généralités sur les Paramyxoviridae.  
Accès internet: <http://fr.wikipedia.org/wiki/Paramyxoviridae.html>  
consulté le 12/01/2013 à 11h35
3. **Twiv, 2012.** Taxonomie Paramyxoviridae,  
Accès internet: <http://www.twiv.tv/2012/05/13/twiv-183-bats-out-of-hell.html> consulté le 14/02/2013 à 15h12
4. **Ulaval, 2005.** cycle viral de Paramyxoviridae. Accès internet:  
<http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/24378/ch02.html> consulté le  
12/01/2014 à 21h20
5. **viralzone, 2010.** génome viral Paramyxoviridae.  
Accès internet: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/556.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/556.html) consulté  
le 21.06.2013 à 18h00
6. **Vadscorner, 2011.** structure d'une particule virale de Paramyxovirus Accès  
internet: <http://www.vadscorner.com/paramyxo.html> consulté le 27/01/2013  
à 3h45
- 7.
8. **Wikipedia, 2013.** franceville GABON  
Accès internet: [http://fr.wikipedia.org/wiki/franceville\\_GABON.html](http://fr.wikipedia.org/wiki/franceville_GABON.html)  
consulté le 10/01/2014 à 9h10
9. **Wikipedia, 2013.** centre de primatologie. Accès internet: [http://  
fr.wikipedia.org/wiki/www.centre\\_de\\_primatologie\\_du\\_CIRMF.html](http://fr.wikipedia.org/wiki/www.centre_de_primatologie_du_CIRMF.html)  
consulté le 25/03/2013 à 17h45
- 10.
11. **Wikipedia, 2013.** primates non humains.  
Accès internet: [http://GABON/primates\\_non\\_humains\\_du\\_CDP.html](http://GABON/primates_non_humains_du_CDP.html)  
consulté le 25/03/2013 à 18h13

## **ANNEXES**

## Annexe I

Protocole de recherche risque Zoonotique liée à la conservation

Investigateur Principal : Dr Barthélémy NGOUBANGOYE

Superviseurs : Pr Dominique Pontier (Lyon1), Dr François RENAUD (IRD Montpellier)

Cadre de l'étude : Thèse PhD

### **Formulaire de consentement éclairé**

Je soussigné,

.....

Atteste participer de façon volontaire au protocole portant sur « *Recherche d'agents infectieux circulant dans une communauté d'hôtes, intérêt pour la conservation des espèces et risque d'émergence de maladies zoonotiques, au Centre De Primatologie du CIRMF (Gabon)* ». Je suis informé que les prélèvements réalisés feront l'objet de recherche de pathogènes ou agents infectieux potentiellement zoonotiques. Je suis conscient de ce que ces analyses, effectuées de façon anonyme dans ce protocole, peuvent conduire à la découverte d'un parasite dont la prise en charge médicale se fera par les médecins du CIRMF.

En foi de quoi, le présent formulaire est rempli et signé pour valoir ce que de droit.

PS : En cas de syndrome fébrile, je m'engage à contacter le CIRMF au numéro qui vous sera communiqué par les médecins.

Lu et approuvé

## Annexe II

### FICHE CAPTURE RONGEURS :

- Nom :
- Date :
- Site :
- Climat :
- Espèce :
- Sexe :
- Age :
- Poids :
- Etat général :

### Mesures :

- L. corps (total) :
- L. queue :
- L. pattes ante :
- L. pattes post :

### Prélèvements :

- Sang :  frotti  tube EDTA  tube sec
- Fèces :
- Ecouvillons :
- Organes :  intestin  foie  poumon   
rein  cœur  rate
- Autres :



