

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

Année 1998



N°21

**PERIODE D'EXCRETION DU VIRUS DE LA PESTE DES
PETITS RUMINANTS CHEZ LES CAPRINS INFECTES
ET INFLUENCE DE LA PRESENCE DES ANTICORPS
ANTI-PPR SUR LA VACCINATION
ANTI-BOVIPESTIQUE CHEZ LES BOVINS.**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le 27 juillet 1998 devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et
d'Odonto-Stomatologie de Dakar

pour obtenir le grade de DOCTEUR VETERINAIRE

(DIPLOME D'ETAT)

par

TRAORE AWA

Née le 20 décembre 1967 à Grand- Bassam (Côte d'Ivoire)

Jury

- Président** : **Monsieur Souleymane MBOUP**
Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Dakar
- Directeur** : **Monsieur Ayayi Justin AKAKPO**
Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar
- Rapporteur** : **Monsieur Yalacé Yamba KABORET**
Maître-assistant à l'E.I.S.M.V. de Dakar.
- Membres** : **Monsieur Moussa ASSANE**
Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar
- : **Monsieur Louis Joseph PANGUI**
Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

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

B.P 5077- DAKAR (Sénégal)
Tel. (221) 825 66 92- Télécopie (221) 825 42 83- Telex 51 403 INTERVET SG

ANNEE UNIVERSITAIRE 1997-1998

COMITE DE DIRECTION

1. Le DIRECTEUR

-Professeur François Adébayo ABIOLA

2. Le DIRECTEUR ADMINISTRATIF ET FINANCIER

- Monsieur Jean Paul LAPORTE

3. LES COORDONNATEURS

**-Professeur Malang SEYDI
Coordonnateur des Etudes**

**- Professeur Justin Ayayi AKAKPO
Cordonnateur des Stages et Formation
Post-Universitaires**

**- Professeur Germain Jérôme SAWADOGO
Coordonnateur Recherches et Développement**

PERSONNEL ENSEIGNANT EISMV

A- DEPARTEMENT DE SCIENCES BIOLOGIQUES ET PRODUCTIONS ANIMALES

CHEF DU DEPARTEMENT

Professeur ASSANE MOUSSA

SERVICES

1. ANATOMIE -HISTOLOGIE -EMBRYOLOGIE

**Charles Kondji AGBA
Serge BAKOU**

**Professeur
Assistant**

Kossi ALOEYI

Docteur Vétérinaire Vacataire

2. CHIRURGIE -REPRODUCTION

**Papa El Hassan DIOP
Ahmadou Thiam DIA
Ségoto ALLADOUM**

**Professeur
Moniteur
Moniteur**

3. ECONOMIE RURALE ET GESTION

**Cheikh LY
Oswald MPOUK**

**Maître-Assistant
Moniteur**

4. PHYSIOLOGIE-THERAPEUTIQUE-PHARMACODYNAMIE

**ASSANE MOUSSA
Assiongbon TEKO-AGBO**

**Professeur
Moniteur**

5. PHISIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

**Germain Jérôme SAWADOGO
Kouassi Messan AGUE
Malachie MBAIOGAOU**

**Professeur
Moniteur
Moniteur**

6. ZOOTECHNIE-ALIMENTATION

**Ayao MISSOHOU
Paul GIRARD
Wake Kissao TCHEDRE**

**Maître-Assistant
Agronome
Moniteur**

B. DEPARTEMENT DE SANTE PUBLIQUE ET ENVIRONNEMENT

CHEF DE DEPARTEMENT

Professeur *Louis Joseph PANGUI*

SERVICES

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

**Malang SEYDI
Etchri AKOLLOR
Abdoulaye NDIAYE**

**Professeur
Moniteur
Docteur Vétérinaire Vacataire**

2. MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-PATHOLOGIE INFECTIEUSE

**Justin Ayayi AKAKPO
Rianatou ALAMBEDI (Mme)
Mamadou Lamine GASSAMA
N'Koudodoba SIMTOKENA**

**Professeur
Maître-Assistante
Docteur Vétérinaire Vacataire
Moniteur**

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

Louis Joseph PANGUI
Rose (Mlle) NGUE MEYIFI KOMBE
Wellars HABYARIMANA

Professeur
Docteur Vétérinaire Vacataire
Moniteur

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

Yalacé Yamba KABORET
BOURDANNE
Awa (Mlle) TRAORE

Maître de Conférences Agrégé
Moniteur
Monitrice

5. PHARMACIE-TOXICOLOGIE

François Adébayo ABIOLA
Patrick FAURE

Professeur
Assistant

PERSONNEL VACATAIRE (Prévü)

1 - Biophysique

Sylvie (Mme) GASSAMA SECK

Maître de Conférences Agrégé
Faculté de Médecine et de Pharmacie
UCAD

2 - Botanique

Antoine NONGONIERMA

Professeur
IFAN- UCAD

3 - Agro-Pédologie

Alioune DIAGNE

Docteur Ingénieur
Département "Sciences des Sols"
Ecole Nationale Supérieure
d'Agronomie (ENSA) THIES

**4 - Normalisation et Assurance
Qualité**

Mme NDIAYE Mame Sine MBODJ

Chef de la division
Agro-alimentaire de l'Institut Sénégalais
de Normalisation

5 - Pathologie du Bétail

Mallé FALL

Docteur Vétérinaire

PERSONNEL EN MISSION (Prévu)

1 - Parasitologie

Ph. DORCHIES

Professeur
ENV-TOULOUSE

M KILANI

Professeur
ENMV-SIDI THABET (tunisie)

2 - Anatomie Pathologie Générale

G. VANHAVERBEKE

Professeur
ENV- TOULOUSE (France)

CABANIE

Professeur
ENV-TOULOUSE (France)

3 - Pharmacodynamie- thérapeutique

M. GOGNY

Professeur
ENV-NANTES (France)

4 - Pathologie du Bétail

Th. ALOGNINOUBA

Professeur
ENV-LYON (France)

5 - Pathologie des Equidés et Carnivores

A CHABCHOUB

Professeur
ENMY-SIDI THABET (Tunisie)

6 - Zootechnic-Allimentaire

A BEN YOUNES

Professeur
ENMV-SIDI THABET(Tunisie)

7 - Denréologie

J ROSIER

Professeur
ENV-TOULOUSE (France)

8 - Physique et Chimie Biologiques et Médicales

P. BERNARD

Professeur
ENV- TOULOUSE (France)

9 - Pathologie Infectieuse

J. CHANTAL

**Professeur
ENV-TOULOUSE (France)**

10 - Pharmacie-Toxicologie

J.D PUYT

**Professeur
ENV-NANTES (France)**

L. EL BAHRI

**Professeur
ENMV- SIDI THABET (Tunisie)**

SAGAZE BURGAT

**Professeur
ENV-TOULOUSE (France)**

11 - Chirurgie

A. CAZIEUX

**Professeur
ENV-TOULOUSE (France)**

12 - Anatomie

A. MATOUSSI

**Professeur
ENMV- SIDI THABET (Tunisie)**

SAUTET

**Professeur
ENV-TOULOUSE (France)**

13 - Economie

Henri SEEGERS

**Professeur
ENV-NANTES (France)**

Christian MOUCHET

**Professeur
ENV-NANTES (France)**

PERSONNEL ENSEIGNANT CPEV

1. MATHEMATIQUES

Sada Sory THIAM

**Maitre-Assistant
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**

Statistiques

Ayao MISSOUHOU

**Maître-Assistant
EISMV- DAKAR**

2. PHYSIQUE

I. YOUM

**Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**

Chimie Organique

Abdoulaye SAMB

**Professeur
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**

Chimie Physique

Alphonse TINE

**Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**

T.P Chimie

Abdoulaye DIOP

**Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**

3 - BIOLOGIE VEGETALE

Physiologie Végétale

K. NOBA

**Maître-Assistant
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**

4 .BIOLOGIE CELLULAIRE

5. EMBRYOLOGIE ET ZOOLOGIE

Bhen Sikina TOGUEBAYE

**Professeur
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**

**6. PHYSIOLOGIE ET ANATOMIE
COMPAREES DES VERTEBRES**

Assane MOUSSA

Professeur

EISMV DAKAR

Cheikh T.BA

**Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**

7. BIOLOGIE ANIMALE (TP)

DPANDARE

**Maître-Assistant
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**

Jacques. N. DIOUF

**Maître-Assistant
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**

9. GEOLOGIE

A.FAYE

**Chargé d'Enseignement
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**

R.SARR

**Maître de Conférences
Faculté des Sciences et Techniques
UCAD**

10.T.P

Ngaraïta AL-OGOUMRABE

Moniteur

DEDICACES

Je dédie ce travail

- **Au Tout Puissant Allah, le Clément et le Miséricordieux et à son Prophète Mohamed (P.S.L.)**
- **A ma maman Maïmouna Niénebouin SOULAMA TRAORE**
Tu n'es plus physiquement avec nous, mais à tout moment, nous te sentons auprès de nous. Puisses-tu reposer en paix. Tout mon amour.
- **A la mémoire de mes grands-parents disparus**
- **A mon père El -Hadj Souleymane SOULAMA TRAORE**
Ton amour pour tes enfants, ton acharnement au travail, ton immense bonté, ta piété me serviront toujours d'exemple. Personne mieux que toi ne mérite cet hommage en ce jour qui est pour toi la récompense de tant d'années d'espoir, mais également d'angoisse. Les mots me manquent pour te dire mon amour.
Que le ciel te préserve encore très longtemps à nos côtés.
- **A ma mère Hadja Djeneba Mahouyami FAYAMA**
Pour toutes ces années de sacrifices durant lesquelles tu as su nous élever et nous éduquer mes frères, sœurs, et moi dans l'amour et la dignité. Sans toi nous ne serions pas ce que nous sommes aujourd'hui. Et cette harmonie où nage notre famille nous la devons à ta grande compréhension et à ta générosité.
Sois en remerciée du fond du cœur.
- **A ma tante Corotoumou Gnanman HEMA**
Tu resteras pour moi une deuxième mère.
Sincères remerciements pour la pierre que tu apportes à la stabilité de notre famille.

- **A mon grand frère Abdoulaye TRAORE**

Ton aide, tes conseils et ton soutien moral ont toujours été pour moi d'un grand reconfort dans les moments les plus difficiles. Tu resteras toujours pour moi le symbole de la volonté et de la compréhension. Ce travail est aussi le tien.

- **A mes frères et soeurs; Salimata, Bintou, Mariame, Moussa, Issouf, Fati, Roki, Hamed, Habiba, Ramatou, Ismael, Yacouba, Safiatou, Kadi, Issa, Maïmouna, Ibrahim.**

J'ai toujours apprécié l'estime et le respect que vous portez à mon égard. Sachez qu'elle est réciproque, ce travail est aussi le vôtre. Puisse nous rester toujours amis dans la tendresse, solidaires dans la vie et fidèles à l'éducation que nos chers parents ont su nous inculquer.

- **A mon oncle KONE Drissa et son épouse Oumou.**

Toute ma reconnaissance

- **A mes oncles, tantes, cousins, cousines, nièces, neveux.**

L'union fait la force. Ce travail est aussi le vôtre. Faites mieux que moi.

- **A M'man TRAORE**

En témoignage de l'amitié qui a fait de nous des sœurs et de nos deux familles une famille. Affection profonde.

- **A Serigne GASSAMA**

Tu as toujours été disponible, ta simplicité et ton amour pour ton prochain font de toi un homme de vertu. Puisse notre entente continuer. Ce travail est aussi le tien. Pensées affectueuses à Laurence et à toute ta famille.

- **A M^{me} COULIBALY Sirantou**

Toute mon affection et ma reconnaissance.

- A Kadi, Alimatou, Nana, Mata, Nakani, Roki, Madjara, Bata, Rose

Profonde gratitude et amitiés sincères.

Pensées affectueuses à toute votre famille.

- A M^r et M^{me} FAYE

Vous avez fait de votre famille ma deuxième famille . J'en suis profondément touchée et les mots me manquent pour vous exprimer toute mon affection et ma reconnaissance. Ce travail est aussi le vôtre. Puisse Allah vous préserver longtemps auprès de nous.

- A Fatou ,Lissa, Mariem, Marie, Woré, Soda, Charlotte

En témoignage de la fraternité qui nous unit. Qu'il en soit toujours ainsi

Profonde gratitude et affection profonde

- A DIAKITE Ahmadou

Toute mon estime.

A l'AEEMCI (Association des élèves et étudiants de Côte d'Ivoire).

- A tous mes amis du Maroc

Toute ma reconnaissance et mes meilleurs souvenirs.

- A Guillaume, Danielle, Katherine, Jeanne et à la CEVIS

Sincères remerciements et mes meilleurs souvenirs

- A la 25^{eme} promotion

- A la Côte d'Ivoire, mon pays

- Au Sénégal, pays hôte

SINCERES REMERCIEMENTS

- A tous ceux qui m'ont aidé pour l'accomplissement de ce travail
- A tous mes enseignants, éducateurs et formateurs
- Au professeur AKAKPO
Pour tous les efforts déployés pour l'accomplissement de ce travail.
Hommage de ma grande admiration.
- A KONE Domia, son épouse Massita et leurs amis.
- Au Dr COUACY Hyman Emmanuel,
que je remercie très sincèrement pour son implication personnelle à
l'élaboration de ce travail. Toute ma reconnaissance. Hommage très
respectueux.
- Au Dr BODJO Charles,
pour ses sacrifices et son esprit de collaboration.
- Au Laboratoire de Pathologie Animale (LANADA) de Bingerville
Pour son soutien logistique
- A tout le personnel de la Section de Virologie du LANADA de Bingerville
- A Madame DIOUF, documentaliste à l'E.I.S.M.V.

A NOS MAITRES ET JUGES

A Monsieur Souleymane MBOUP

Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie

C'est un grand honneur et une fierté pour nous de vous voir présider notre jury. Nous avons pu apprécier la simplicité de votre abord empreint de paternité et de bienveillante sollicitude.

Sincères reconnaissances et indéfectible attachement.

A Monsieur Moussa ASSANE

Professeur à l'E.I.S.M.V de Dakar

Nous nous faisons un grand plaisir en acceptant de siéger à notre jury de thèse. Vos qualités humaines, scientifiques et votre disponibilité sans restriction méritent admiration.

Profonde gratitude.

A Monsieur Yalacé Yamba KABORET

Maître de Conférences Agrégé à l'E.I.S.M.V de Dakar

Vous avez spontanément su guider ce travail avec compétence. Votre simplicité et vos qualités intellectuelles nous ont beaucoup marqué.

Sincères reconnaissance et indéfectible attachement.

A Monsieur Louis Joseph PANGUI

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

Vous nous faites un grand plaisir en acceptant de siéger à notre jury de thèse. Vous nous avez permis de découvrir toute l'importance de la parasitologie. Votre contact empreint de sympathie nous ont beaucoup marqué.

Hommage respectueux.

A Monsieur Ayayi Justin AKAKPO

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

Vous vous êtes personnellement impliqué et vous avez su guider ce travail avec compétence. Votre disponibilité à écouter et à aider ne nous laisse pas indifférent. Je ne saurais ici mesurer la grandeur de votre soutien.

Profonde gratitude et hommage de ma grande admiration.

" Par délibération, la Faculté et L'Ecole 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 ."

SOMMAIRE

PREMIERE PARTIE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES MORBILLIVIRUS AGENTS DE LA PESTE BOVINE ET DE LA PESTE DES PETITS RUMINANTS

Chapitre I : les virus de la peste bovine (pb) et de la peste des petits ruminants (ppr)

I - Généralités sur les morbillivirus	4
II - Morphologie et taille du virus peste bovine et du virus PPR	5
1) Cas du virus peste bovine	5
2) Cas du virus PPR	6
III - Caractères physicochimiques et cultureux du virus BP et du virus PPR	8
1) Propriétés physicochimiques du virus de la peste bovine et du virus de la PPR	8
1.1 - Résistance du virus	8
1.1.1 - Les agents physiques	8
1.1.2 - Les agents chimiques	10
2) Caractères cultureux du virus de la peste bovine et du virus de la PPR	11
2.1 - Culture in vivo	11
2.2 - Culture sur oeuf embryonné	11
2.3 - Culture in vitro	12
IV - Propriété biologique du virus de la peste bovine et du virus de la PPR	13
1) Pouvoir pathogène	13
1.1 - Virus de la PPR	13
1.2 - Virus de la peste bovine	13
2) Pouvoir antigénique et immunologie	15
Chapitre II : Diagnostic de la peste bovine et de la PPR	17
I - Diagnostic sur le terrain	17
1) les éléments épidémiologiques	17
2) Les éléments cliniques	20
3) Les éléments nécropsiques	20
II - Diagnostic de laboratoire	22
1) Méthodes virologiques directes	22
1.1 - Précipitation en milieu gélosé	22
1.2 - L'isolement et identification du virus	22
1.3 - La technique de la RT PCR	23
1.4 - La neutralisation de l'inhibition de l'héماغlutination morbilleuse (N.I.H.M.)	26
2) Les méthodes indirectes	26
2.1 - La séroneutralisation	26
2.2 - L'inhibition de l'héماغlutination	27
2.3 - L'ELISA	27
Chapitre III : Prophylaxie contre la Peste bovine et la PPR	29
I - Prophylaxie sanitaire	29
1) Les mesures défensives	29
2) Les mesures offensives	29
II - Prophylaxie médicale	30
1) La vaccination dans la peste bovine	30
2) La vaccination dans la PPR	31
2.1 - Le vaccin hétérologue	31
2.2 - Le vaccin homologue	32

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériel et méthodes -----	35
I) Sur le terrain -----	35
1) Le matériel animal -----	35
2) Matériel d'immunisation, d'inoculation et de prélèvement -----	36
3) Méthodes de vaccination, d'inoculation et de prélèvement-----	36
II - Au laboratoire-----	38
1) Le matériel -----	38
1.1 - Pour le diagnostic virologique direct (RT PCR)-----	38
1.1.1 - Appareillage -----	38
1.1.2 - Le petit matériel -----	38
1.1.3 - Amorces et autres réactifs-----	39
1.2 - Pour le diagnostic virologique indirect (ELISA) -----	40
2) Techniques d'investigation -----	40
2.1 - La RT PCR-----	40
2.1.1 - L'extraction de l'ARN viral -----	40
2.1.2 - La reverse transcription -----	40
2.1.3 - L'amplification génétique -----	44
2.1.4 - La révélation des produits de PCR par la méthode d'électrophorèse sur gel d'agarose-----	44
2.2 - L'ELISA-----	45
2.2.1 - Exécution du test : ELISA compétition peste bovine virus (PB) -----	45
2.2.2 - Calcul et interprétation des résultats : calcul du pourcentage-----	49
2.2.3 - Interprétation des résultats -----	50
Chapitre II : Résultats et discussion -----	51
I - Résultats -----	51
1) L'inoculation des caprins avec le virus sauvage PPR -----	51
2) La RT PCR -----	52
3) L'ELISA-----	59
II - Discussion-----	63
1 - Matériel et méthode -----	63
1.1 - Matériel animal -----	63
1.2 - Méthode -----	64
1.2.1 - Inoculation et RT-PCR -----	64
1.2.2 - ELISA -----	65
2 - Résultats-----	65
2.1 - Liés à l'inoculation-----	65
2.1.1 - Expression clinique-----	65
2.1.2 - Excrétion du virus PPR (détectée par la RT-PCR) -----	65
2.2 - Liés à la vaccination (test ELISA)-----	66
Chapitre III : Conséquences et applications -----	68
I - Du point de vue épidémiologique -----	68
II - Sur le plan prophylactique-----	68
1 - Prophylaxie médicale -----	68
2 - Prophylaxie sanitaire-----	69
III - Sur le plan économique et commercial -----	69

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES ABREVIATIONS

A = Adénine

ADN = Acide désoxynucléique

ADNc = cDNA = ADN complémentaire

ARN = Acide désoxyribonucléique

ARNm = ARN messenger

C = Cytosine

BET = Bromure d'Ethidium

C+ = Sérum de référence positif moyen

C++ = Sérum de référence positif hyperimmum

C- = Sérum de référence négatif

Cc = Contrôle du conjugué

Cm = Contrôle du monoclonal

dATP = Désoxyadénosine 5' triphosphate

DEPC = Diéthyl pyrocarbonate

dGTP = Désoxyguanosine 5' trophosphate

D.O. = Densité optique

dTTP = Désoxythymidine 5' triphosphate

ELISA = Enzyme Linked Immunosorbent Assay

G = Guanidine

H₂O₂ = Eau oxygénée

Mab = Anticorps monoclonal bovine

PB = Peste bovine

PCR = Polymerase chain reaction

PPR = Peste des petits ruminants

OIE : Office International des Epizooties

OPD = Orthophénylène diamine (solution chromogène)

RT-PCR = Reverse transcriptase-polymerase chain réaction

T = Thymidine

TBE = Tampon tris-acide borique EDTA

UV = Ultra-violet

LISTE DES TABLEAUX

I : Vaccination des veaux contre la peste bovine et la PPR

II : Vaccination des vaches contre la peste bovine et la PPR

III : Les pools d'échantillons

IV : Schéma de distribution des sérums

V : Résultats sur le terrain de l'inoculation des caprins avec le virus PPR sauvage par la voie nasale

VI : Résultats sur le terrain de l'inoculation des caprins avec le virus PPR sauvage par la voie sous-cutanée

VII : Présence du virus dans les prélèvements oculaires, nasales, gingivaux après inoculation par les voies souscutanée et nasale

VIII : Statut immunitaire des veaux après la vaccination

IX : Statut immunitaire des veaux après la vaccination

LISTE DES FIGURES

1 : Structure schématique d'un paramyxovirus

2 : Carte de l'extension de la PPR en Afrique

3 : Structure de l'ADN

4 : Schéma du principe de la PCR

5 : Gel d'agarose des produits de l'amplification, par PCR réalisée avec les échantillons de la voie sous-cutanée obtenus avec la première technique

6 : Gel d'agarose des produits de l'amplification, par PCR réalisée avec les échantillons de la voie sous-cutanée obtenus avec la deuxième technique

7 : Gel d'agarose des produits de l'amplification, par PCR réalisée avec les échantillons de la voie nasale obtenus avec la première technique

8 : Gel d'agarose des produits de l'amplification, par PCR réalisée avec les échantillons de la voie nasale obtenus avec la deuxième technique

9 : La technique d'amplification (PCR)

10 : Nombre de cycle à réaliser en fonction du nombre de copies de la cible à amplifier dans l'incubation

INTRODUCTION

La peste bovine et la peste des petits ruminants (PPR) sont deux maladies infectieuses, inoculables, contagieuses qui affectent le bétail africain. La PPR décrite pour la première en Côte d'Ivoire par GARGADENNEC et LALANNE (en 1940) s'est étendue aujourd'hui sur toute l'Afrique noire. La peste bovine est quant à elle l'une des maladies infectieuses les plus anciennement connues.

Ces deux maladies représentent une menace pour l'élevage des pays africains. Conscient de ce problème les pays africains se sont organisés pour mettre en place le PARC (Campagne Panafricaine de lutte contre la peste bovine ou Panafrican Rinderpest Campaign) qui est une organisation chargée de lutter contre la peste bovine et la PPR.

Aujourd'hui le succès du PARC est à l'origine de la déclaration de certains pays africains provisoirement indemnes de peste bovine.

La Côte d'Ivoire qui fait partie de ces pays, doit ce succès à l'organisation des structures d'encadrement tel que la SODEPRA (Société des Productions Animales), l'ANADER (Agence Nationale de Développement Rurale), LANADA (Laboratoire National de Développement agricole).

En effet malgré une évolution relativement rapide au cours des deux dernières décennies, le niveau du cheptel ivoirien reste modeste comparativement aux pays voisins du Sahel (TRAORE et YO, 1997). De plus la région forestière du pays rapporte chaque année des foyers de PPR (COUACY, 1994).

La Côte d'Ivoire est d'une part provisoirement indemne de peste bovine et d'autre part menacée par des foyers constants de PPR. Connaissant la contamination naturelle, réciproque de ces deux maladies entre les espèces ovine/caprine et bovine ; il est important de savoir si l'une des deux maladies n'influence pas l'autre d'une façon ou d'une autre. C'est pour tenter de répondre à cette question que le LANADA de Bingerville (Côte d'Ivoire) a mis à notre disposition les moyens logistiques pour mener une étude sur ces deux maladies.

Cette étude part du fait que des bovins vivants au contact des petits ruminants atteints de PPR peuvent être infectés par le virus PPR et par conséquent produire des anticorps anti-PPR. Nous avons dans un premier temps recherché la période d'excrétion du virus PPR chez des caprins infectés afin de savoir à quel moment ils deviennent contaminant pour des animaux sensibles.

Enfin nous avons recherché l'influence des anticorps anti-PPR sur la vaccination antibovipestique chez des veaux et des vaches du ranch d'Irhu Lamé (Côte d'Ivoire).

Notre étude doit nous aider à mieux comprendre l'épidémiologie et la prophylaxie de ces deux maladies et d'en déduire les répercussions sur la production animale d'un pays.

Cette étude est conçue en deux parties :

- La première partie est consacrée aux données bibliographiques sur les morbillivirus agents de la PPR et de la peste bovine.

Dans cette partie nous exposerons la morphologie, les caractères physico-chimiques, culturels et biologiques de ces virus, de même que le diagnostic de la maladie. Nous exposerons également les principes généraux de la prophylaxie contre ces deux maladies.

- La deuxième partie présente l'étude expérimentale que nous avons réalisée.

Dans cette partie nous exposerons le matériel et les méthodes utilisés. Les résultats seront présentés, discutés puis nous en tirerons les conséquences et applications.

PREMIERE PARTIE :
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES
MORBILLIVIRUS AGENTS DE LA PESTE BOVINE
ET DE LA PESTE DES PETITS RUMINANTS

CHAPITRE I - LES VIRUS DE LA PESTE BOVINE (P.B) ET DE LA PESTE DES PETITS RUMINANTS (PPR)

I - GENERALITES SUR LES MORBILLIVIRUS

Les *Morbillivirus* représentent le nom du genre donné au groupe de virus de la rougeole, de la peste bovine, de la maladie de carré et de la peste des petits ruminants.

La place du virus de la peste bovine et de la peste des petits ruminants dans la systématique d'après FRANCKI et coll. (1994) est la suivante :

ORDRE : Mononégavirales

FAMILLE : Paramyxoviridés

SOUS FAMILLE : Paramyxoviriné

GENRE : *Morbillivirus* - Virus morbilleux

- Virus de la maladie de carré

- Virus de la peste bovine (virus PB)

- Virus de la peste des petits ruminants (virus PPR)

Selon (FRANCKI et coll. 1994), l'ordre des Mononégavirales englobe les trois familles d'eucaryote qui possèdent des génomes à ARN de brin négatif, linéaire non segmenté, à savoir les Filoridae, les Paramyxoviridae et les Rhabdoviridae.

Les Paramyxoviridae sont polymorphes habituellement et grossièrement sphériques de 150 nm de diamètre ou davantage mais des formes filamenteuses sont fréquentes. La nucléocapside est de symétrie hélicoïdale avec un diamètre de 13 à 18 nm et un pas de 5,5 à 7 nm suivant le genre. La longueur peut aller jusqu'à 1 µm dans certains genres.

Tous les membres du genre *Morbillivirus* sont dépourvus de la neuraminidase que possède le genre *Paramyxovirus* et diffère du genre *Pneumovirus* par la taille de la nucléocapside et par d'autres caractères. Tous les membres produisent des inclusions

cytoplasmiques et des inclusions nucléaires qui contiennent la ribonucléoprotéine virale. Les membres de ce genre sont antigéniquement apparentés.

II - MORPHOLOGIE ET TAILLE DU VIRUS PESTE BOVINE ET DU VIRUS PPR

La détermination de la morphologie et de la taille de ces deux virus a fait l'objet de nombreuses recherches par plusieurs auteurs jusqu'à l'avènement du microscope électronique qui a éclairé les chercheurs sur cette question.

1 - Cas du virus peste bovine

Concernant le virus de la Peste bovine, GAMELLELA, cité par CURASSON (1942) aurait le premier reconnu la filtrabilité du comptage avec du sang passé sur une bougie de porcelaine. Mais ce sont les travaux de NICOLLE et ADIL BEY, confirmés par YERSINE cité par JACOTOT ET MORNET (1967), qui vont montrer que la filtration sur bougie Berkefeld ou Chamberland de liquide céphalorachidien, d'émulsion de cerveau, de fèces et de liquide de lavage péritonéale, donne un produit virulent (CURASSON, 1942). Ce n'est qu'en 1941 que SIMONS dans RÖHRER (1971) par filtration sur membrane "gradocol" de suspension de pulpe splénique de bovins infectés a estimé les dimensions du virus entre 860 à 1260 Å.

PLOWRIGHT et coll. (1962), après culture de tissus et examen des particules infectieuses au microscope électronique trouve que la plupart de ces particules sont circulaires ou ovalaires et leur dimension varie de 1300 à 3000 Å de diamètre maximum avec un composant interne hélicoïdale de 175 Å de diamètre. La périodicité de l'hélice est de 50 à 60Å (BREESE et BOER cités par JACOTOT et MORNET, 1967). Ces particules sont plus polymorphes que celles du virus de la rougeole et leurs structures sont proches de ceux de la maladie de Newcastle et de la rougeole. Il existe aussi des particules de

forme irrégulière de 7500Å. Des formes allongées de 300 à 500Å de large et atteignant 10.000 Å de long sont observés.

PROVOST (1966), a montré grâce à des techniques d'inhibition des acides nucléiques par les pyrimidines halogènes que le virus de la peste bovine est un virus à acide ribonucléique et que la spécificité antigénique est portée par les inclusions intracytoplasmiques qui sont de nature ribonucléoprotéinique.

2 - Cas du virus PPR

D'après BOURDIN et coll. (1967) le virus PPR appartient au paramyxovirus et se présente au microscope électronique sous la forme d'une particule arrondie. Sa taille plus grande que celle du virus de la peste bovine varie entre 1500Å et 7000Å. Il est entouré d'une enveloppe hérissée de projections. A l'intérieur de cette membrane se trouve un filament hélicoïdale qui constitue la nucléocapside.

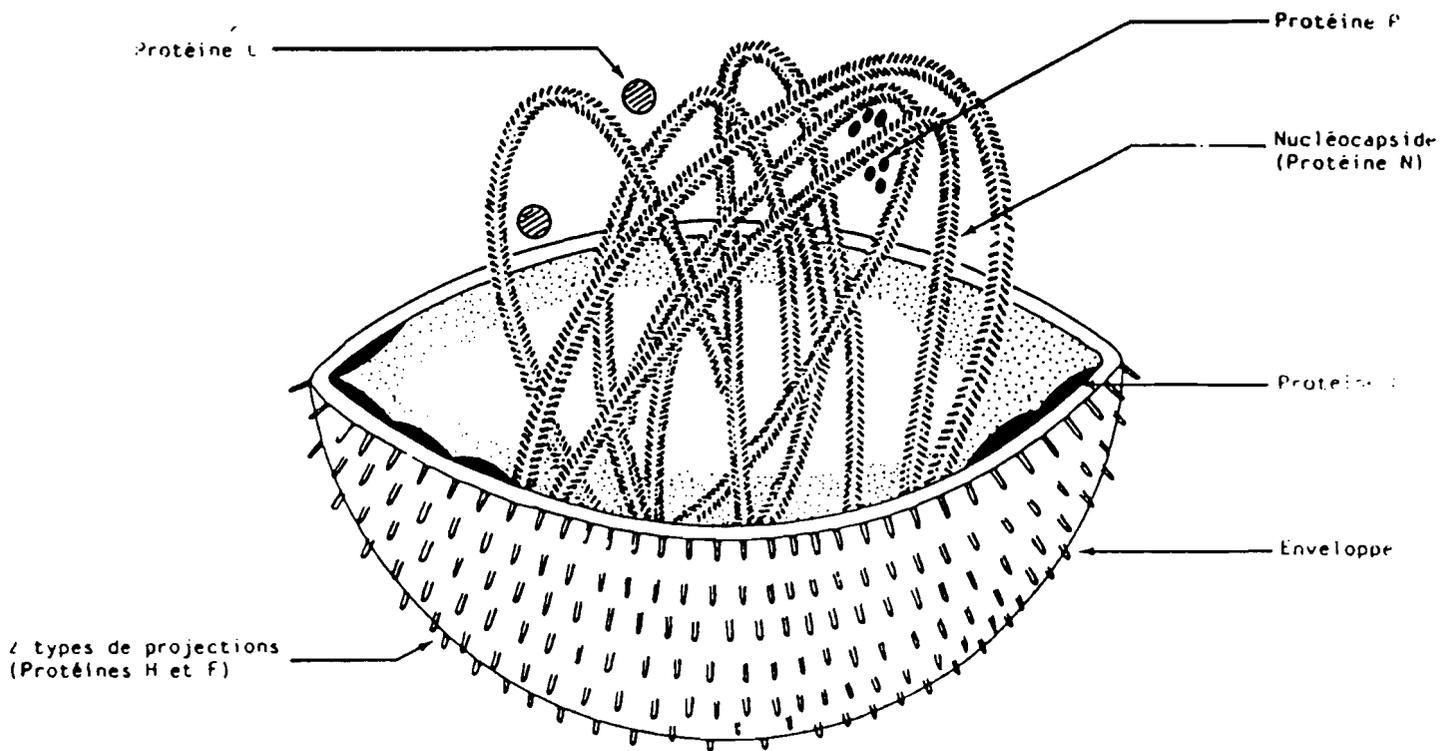


Figure 1 : STRUCTURE SCHEMATIQUE D'UN PARAMYXOVIRUS,
 LA MOITIE SUPÉRIEURE DE LA MEMBRANE A ÉTÉ SUPPRIMÉE POUR PERMETTRE DE VOIR L'ENROULEMENT DU FILAMENT.

Source : LEFEVRE

III - CARACTERES PHYSICOCHIMIQUES ET CULTURAUX DU VIRUS PESTE BOVINE ET DU VIRUS PPR

Nous exposerons les caractères physico-chimiques puis les caractères cultureux de ces deux virus.

1 - Propriétés physico-chimiques du virus de la peste bovine et du virus de la peste des petits ruminants

1.1 - Résistance du virus

Le virus bovipestique et le virus de la peste des petits ruminants peuvent être considérés de façon générale comme peu résistant à l'action des agents physiques et chimiques.

1.1.1 - Les agents physiques

- **Cas du virus de la peste bovine**

Le sang citraté exposé à la lumière et à la chaleur en région tropicale est stérilisé en quelques minutes. Le pouvoir de résistance est accru dans les organes (ganglion, rate) dont le titre en unités virulentes est beaucoup plus élevé et qui sont mieux protégés contre les facteurs d'agression. Mais on estime qu'à 55°C cette résistance disparaît en quelques heures.

KOCH et THEILER cités par JACOTOT et MORNET(1967), avaient déjà noté le peu de résistance du virus dans le milieu extérieur. L'anaérobiose facilite sa conservation. La dessiccation du virus conservé à la température ordinaire, entraîne sa disparition en quelques jours.

Selon JACOTOT et MORNET (1967), sa virulence est maintenue pendant plusieurs mois à 0°C et la lyophilisation constitue, comme pour les autres virus, le meilleur procédé de sa conservation. La mise en ampoules scellées sous vide du matériel lyophilisé assure si le produit est stocké à -20°C, un délai de conservation de plusieurs années.

Il faut cependant noter qu'au cours des diverses opérations de lyophilisation le produit subit une perte en unités virulentes pouvant parfois atteindre 90 %.

Le pH du milieu dans lequel se trouve le virus intervient. Ainsi dans la viande, la fermentation avec production d'acide lactique contribue à la destruction du virus (EDWARDS, dans RÖHRER, 1971).

D'après PLOWRIGHT (1962), le virus de culture cellulaire est plus stable à +4°C, dans une gamme de pH allant de 7,2 à 8,6. A un pH de 3 à 11 l'inactivation totale intervient en quelques secondes. Les rayons U.V inactivent rapidement le virus de façon exponentielle.

Dans les carcasses d'animaux morts de peste bovine la disparition du virus varie suivant les températures auxquelles elles sont soumises. NICOLAS et RINJARD dans RÖHRER (1971) observent la perte de la virulence dans une viande maintenue à 8°C après 33 jours d'entreposage. Par contre, CILI et STICCO cités par JACOTOT et MORNET (1967), démontrent en Erythrée que le virus est encore infectant dans la viande après 57 jours de conservation entre 8°C et 10°C.

Le séchage même à l'ombre stérilise en moins de 48 heures les cuirs infectés (JACOTOT et MORNET, 1967).

Les laboratoires de Dakar-Hann au Sénégal (1958-1975) et de Fort-Lamy/Farcha au Tchad (1965-1975) ont montré la persistance du virus dans les viandes pestiques soumises à une réfrigération immédiate ou à une maturation préalable avant la réfrigération.

- **Cas du virus de la PPR**

D'après les travaux du laboratoire de Dakar Hann au (1958-1975), le virus de la PPR est fragile dans le milieu extérieur. La demi-vie à 37 °C d'une suspension virale est de deux heures environ. A 50°C, le virus est détruit en une demi heure. A l'instar du virus bovipestique, une solution de sulfate de magnésium a un fort pouvoir thermoprotecteur à l'égard du virus PPR. Le froid joue un rôle protecteur.

D'après les travaux de BOURDIN et coll. cités par LEFEVRE (1982), le virus PPR est retrouvé dans les ganglions de carcasse de chèvres infectées expérimentalement après une conservation de 8 jours à +4°C.

1.1.2 - Les agents chimiques

Selon JACOTOT et MORNET (1967), le virus bovipestique est aisément et très rapidement détruit par les antiseptiques usuels : glycérine, toluène, formol acide pnénique, chloroforme en particulier dans le sang. Cependant les suspensions tissulaires d'organes pestiques conservent leur virulence plus longtemps, le virus étant davantage protégé dans ces milieux.

En culture cellulaire, le virus bovipestique est complètement inactivé par 20 % d'éther éthylique en 12-24 h, à 4°C et par 5 % de chloroforme en 10 minutes à 22°C. L'hydroxylamine 1 M n'a pas d'effet marqué sur le virus après 15 minutes à 22° (FRANKLIN et WECKER, cités par JACOTOT et MORNET, 1967).

Les caractères chimiques du virus PPR décrit par LAURENT (1968) sont assimilables à ceux du virus bovipestique.

2 - Caractères cultureux du virus de la PPR et du virus de la peste bovine

La production du virus de la PPR et du virus de la peste bovine peut s'effectuer soit in vitro soit in vivo. La culture in ovo du virus de la PPR n'est pas développée.

2.1 - Culture in vivo

Le produit virulent contenant le virus PPR inoculé à des petits ruminants et le virus bovinepestique inoculé à des bovins provoquent en fonction du degré de sensibilité des sujets, des formes cliniques variables de la peste bovine et de la PPR; l'inoculation se faisant par voie sous-cutanée, intraveineuse ou nasale.

D'après MORNET et coll. (1956), les bovins éprouvés par le virus PPR font une simple poussée thermique. Ils se révèlent par la suite résistants à une injection de virus bovinepestique.

2.2 - Culture sur œuf embryonné

KUNERT dans RÖHRER (1971), entreprend les premiers essais de culture du virus bovinepestique sur œuf embryonné en inoculant du sang virulent citraté dans la membrane chorioallantoïdienne. Cinq à sept jours après, de l'œdème, des hémorragies et des foyers nécrotiques sont observés. La multiplication du virus est cependant douteuse.

Par contre les résultats de SHOPE, GRIFFITHS et JENKIN (1946) utilisant une technique analogue avec le virus kabete 0 (entretenu au Kenya), montrent que le virus pestique ne provoque pas de lésions visibles marquées. Il ne provoque pas non plus une action létale évidente parce qu'une partie des œufs infectés donnent naissance à des poussins normaux.

2.3 - Culture in vitro

Les premiers essais de culture du virus PPR sur tapis cellulaire sont réalisés par GILBERT et MONNIER (1962). Ils ont été repris par LAURENT (1968) sur le thème "aspect biologiques de la multiplication du virus PPR sur culture cellulaire". Les cultures peuvent s'effectuer sur cellules :

- MDKBC (cellules de rein de bovin adulte de Madin et Darby) ;
- MS (lignée continue de cellules rénales de singe adulte) ;
- BHK21 (cellules rénales de jeunes hamsters).

Le virus PPR provoque un effet cytopathogène (ECP) caractérisé par la formation de cellules multinucléées (syncytiums) et des inclusions cellulaires. L'ECP apparaît entre le 6e et 15e jours selon le mode d'inoculation et la nature de l'inoculum.

D'après NAKAMURA, MOTOHASHI et KISHI (1958), le virus bovipestique lapinisé,-avianisé, prolifère en culture de tissu normal d'embryon de poulet mis en suspension dans une solution de tyrode. Le tissu infecté n'offre pas d'altérations pathologiques visibles

Des effets cytopathogènes (ECP) sont observés pour la première fois par PLOWRIGHT et FERRIS (1957), dans des couches mononucléaires de cellules rénales bovines et de fibroblastes provenant soit de la peau, soit du muscle après infection par la souche kabeté 0 et plusieurs passages "aveugles".

PLOWRIGHT et coll. (1957) ont ultérieurement montré que les souches naturelles de virus peuvent être facilement isolées en cultures de cellules rénales de premières explantations à partir du sang ou des tissus de bétail infecté ou d'animaux sauvages.

Selon JACOTOT et MORNET (1967), seul le virus bovipestique virulent peut être cultivé en culture cellulaire. Les virus atténués par passages sur organismes animaux naturellement peu ou pas sensibles (chèvre, lapin, bœuf embryonné) ne se multiplient pas.

La culture du virus bovipestique en leucocyte de bœuf provoque l'apparition de cellules géantes.

IV - PROPRIETES BIOLOGIQUES DU VIRUS DE LA PESTE BOVINE ET DU VIRUS DE LA PPR

1 - Pouvoir pathogène

1 - Virus de la PPR

Le spectre d'infection naturelle du virus PPR est très restreint. Il s'étend seulement aux ovins et aux caprins. Il en est de même dans les reproductions expérimentales.

Ce virus possède un tropisme marqué pour les tissus épithéliaux. Sa virulence est surtout fonction de la réceptivité des animaux.

En effet, dans les zones infectées, on constate que le virus est très pathogène pour les caprins. Il provoque chez la chèvre une infection aiguë, le plus souvent mortelle. Il est moins pathogène pour les ovins. Il se révèle spontanément atténué pour les bovins. Il détermine chez ces derniers une infection bénigne.

1.2 - Virus de la peste bovine

Tous les animaux susceptibles de contracter la peste bovine dans les conditions naturelles sont des "artiodactyles" appartenant au sous-ordre des Ruminants ou à celui des Suiformes (CURASSON, 1932).

Les animaux domestiques naturellement réceptifs sont les bovins, ovins, caprins et les suidés.

Généralement très sensibles, les bovidés et les buffles sont les victimes habituelles de la peste bovine. La souche sauvage de ce virus est lymphotrope puis épithéliotrope (SCOTT et coll., 1986).

Chez les petits ruminants, les ovins et les caprins sont sensibles au virus bovipestique et peuvent présenter des formes mortelles ; mais dans les conditions africaines, ils font une forme subclinique de l'infection (ROSSITER et coll., 1982) ; (LEFEVRE, 1987).

En Inde par contre ces deux espèces sont souvent infectées et font une peste bovine typique (SHAILA et coll., 1989). Ce même phénomène a été observé au Sri-Lanka (ANDERSON et coll., 1990).

En Afrique, des foyers de peste bovine chez les petits ruminants ont été aussi signalés (JOHNSON, 1958) ; (LIBEAU et coll., 1960). Malgré ces observations, il est admis maintenant que les petits ruminants ne constituent pas un réservoir du virus de la peste bovine (PLOWRIGHT, 1968) ; (PROVOST, 1982) ; (PLANTON, 1990).

Chez le porc, la réceptivité semble dépendre de la race. En effet, les porcs domestiques asiatiques sont sensibles à la maladie (STODDART, 1964) tandis que les porcs européens et africains ne manifestent aucun signe apparent d'infection (SCOTT et coll., 1986).

Chez les camélidés : les observations de peste bovine naturellement contractée sont rares. La maladie n'a jamais été observée chez ces animaux en Afrique.

SCOTT et DONALD (1962), ont montré lors de l'épizootie sévère de peste bovine en Ethiopie, que les dromadaires épargnés de cette région n'avaient aucun anticorps antibovipestiques dans leur sérum. Ainsi ces dromadaires apparemment épargnés, n'avaient pas contracté une infection bénigne ou inapparente.

Par contre en Inde HAJI, cité par COUACY (1994) a décrit au cours d'un foyer de peste bovine, que le taux de mortalité varie chez les chameaux de 20 à 40 %.

Nombreux sont les animaux sauvages qui peuvent être naturellement atteints par le virus bovipestique. Cependant, cette faune sauvage ne joue aucun rôle dans le maintien du virus bovipestique (PROVOST, 1982) ; (PLANTON, 1990).

2 - Pouvoir antigénique et immunogène

L'infection naturelle ou expérimentale, par le virus PPR et le virus bovipestique, fait apparaître dans l'organisme, des anticorps précipitants, neutralisants, fixants le complément, inhibants l'hémagglutination. L'immunité qui s'en suit est durable.

Selon JOHNSON (1968) ces deux virus n'agglutinent pas les hématies de bovins, ovin, caprin, cheval, porc, chien, chat, lapin, cobaye, poulet, suivant les techniques d'hémagglutination directe et indirecte.

A l'heure actuelle, tous les auteurs s'accordent pour reconnaître que le virus bovipestique fait preuve d'unicité antigénique, mais présente une étroite communauté antigénique avec le virus de la PPR, et une parenté antigénique avec le virus de la maladie de Carré et surtout celui de la rougeole, relation exploitable au laboratoire dans le cadre du diagnostic mais aussi de la prophylaxie. Ainsi:

- les bovins vaccinés avec le virus PPR deviennent résistants à la peste bovine.
- le virus bovipestique atténué protège les moutons et les chèvres contre la PPR.

D'après MORNET et coll. (1956), la virulence du virus de la peste des petits ruminants peut s'exacerber pour le bœuf sous l'influence de certains facteurs comme souche spécialement pathogène, réceptivité particulière de certains sujets... Aussi la permanence d'un virus "pestique" chez les petits ruminants vivant au contact de bovins particulièrement sensibles à la peste bovine constitue un risque "potentiel" qu'on ne doit pas sous-estimer.

Les veaux sont quant à eux immunisés avec le lait d'une mère immunisée. Selon COUACY (1994), à 4 mois d'âge 70 % des veaux perdent l'immunité d'origine maternelle. La réponse des veaux à 1 mois et 2 mois (100 % d'immunisation) indique qu'ils ont reçu les anticorps bovipestiques à travers le colostrum..

PROVOST et coll. (1972) ont montré que c'est quelques semaines après la disparition des anticorps colostraux que les veaux contractaient la maladie.

Les virus P.B et le virus PPR quoique très proches entraînent deux maladies distinctes (la peste bovine et la PPR) dont la transmission entre espèce est possible.

Pour confirmer ou infirmer une suspicion de PPR ou de peste bovine, le diagnostic sur le terrain et au laboratoire doit être établi.

CHAPITRE II : DIAGNOSTIC DE LA PESTE BOVINE ET DE LA PPR

Le diagnostic de la Peste bovine et de la PPR comprend :

- le diagnostic sur le terrain
- le diagnostic au laboratoire

I - LE DIAGNOSTIC SUR LE TERRAIN

Le diagnostic sur le terrain fait appel à des :

- éléments épidémiologiques
- éléments cliniques
- éléments nécropsiques

1 - Les éléments épidémiologiques

- **Le cas de la Peste bovine**

- **En milieu neuf**

Du point de vue épizootiologique, on note que la peste bovine frappe surtout les bovins. Les petits ruminants ne le sont qu'irrégulièrement et les porcs ne présentent que des signes cliniques discrets en Afrique. C'est une affection caractérisée par une grande contagiosité avec une expansion rapide. En milieux nouvellement infectés les bovins de tous âges sont frappés avec une morbidité de 100 % de l'effectif et une mortalité de 95 %.

- **En milieu infecté**

Les jeunes bovins de 6 à 24 mois sont les plus souvent atteints, les animaux plus jeunes (possédant une immunité d'origine maternelle) ou plus âgés (ayant une immunité acquise) sont habituellement épargnés. Les foyers sont sporadiques et la morbidité relativement faible aussi bien que la mortalité.

- **Le cas de la PPR**

La PPR apparaît surtout à la saison des pluies sur les chèvres et à un moindre degré, sur les moutons. Les bovins et grands artiodactyles sauvages en contact avec les petits ruminants ne sont pas cliniquement atteints.

La maladie est très contagieuse. Son expansion est rapide dans un troupeau. La morbidité et la mortalité sont très élevées.

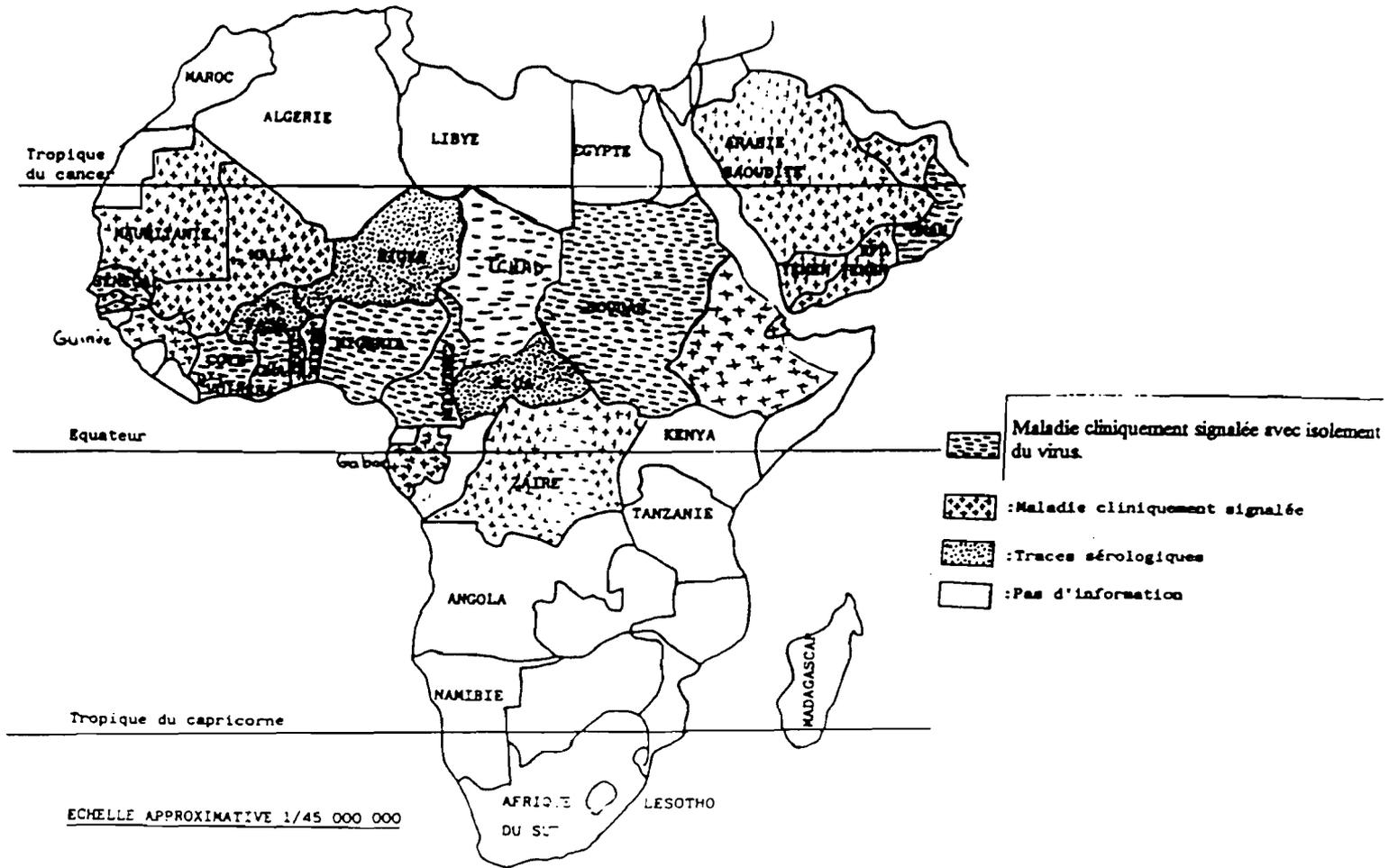


Figure 2 : Carte : extension de la PPR en Afrique
 Source : M'BABEKOUNG

2 - Les éléments cliniques

Les éléments cliniques de la Peste bovine ont été décrits par plusieurs auteurs dont CURASSON en 1932 et en 1942. Cette description a été complétée par PLOWRIGHT (1968) et par SCOTT et coll. (1986). Nous en reprendrons ici les points essentiels concernant la forme aiguë la plus courante.

Après une incubation de 5 à 11 jours, l'animal présente une forte fièvre (40°-42°C) qui dure en moyenne trois jours précédant l'apparition des ulcérations buccales. Les ulcérations atteignent les muqueuses nasales et congénitales. Les sécrétions oculonasales, séro-muqueuses, deviennent mucopurulentes. Puis, arrive la diarrhée qui devient incoercible et souille l'arrière train. La mortalité survient dans le marasme.

Pour les animaux qui n'ont pas succombé à l'infection la phase de convalescence est très rapide. En effet il y a cessation des symptômes et régénération épithéliale en 24 à 48 h.

LEFEVRE (1982), résume les éléments de suspicion de la PPR à de l'hyperthermie, au typhus, au jetage et au larmolement. Les érosions buccales et linguales sont les symptômes confirmatifs.

3 - Les éléments nécropsiques

- **Sur le plan macroscopique.**

Selon la description des lésions de la PPR et de la peste bovine par différents auteurs JACOTOT et MORNET (1967); GNAGNA (1976) ; LEFEVRE (1982), nous constatons que les lésions macroscopiques et microscopiques des deux maladies sont proches. Ainsi nous retenons sur le plan macroscopique que le cadavre est amaigri ou émacié et les modifications organiques portent essentiellement sur le tractus digestif, les organes du système réticulo-endothélial et l'appareil pulmonaire.

La cavité buccale est le siège de lésions ulcéro-congestives qui peuvent intéresser toute la longueur du tube digestif.

Dans la peste bovine la caillette est l'organe le plus atteint des réservoirs gastriques. Elle est violemment inflammée voire hémorragique.

Dans les deux maladies les poumons sont le siège d'une pneumonie ou d'une bronchopneumonie. Selon MANN et coll. (1974), l'atteinte pulmonaire est constante chez les chèvres et plus rare chez les moutons.

Les ganglions lymphatiques sont tous œdémateux, congestionnés. La rate est d'aspect normal dans la peste bovine alors que dans la PPR, on observe une légère splénomégalie.

- **Sur le plan microscopique**

- Dans les tissus épithéliaux stratifiés pavimenteux (muqueuses externes, œsophage, réservoir gastrique), il se forme des plasmodies particulièrement abondantes dans la région pharyngienne; dans d'autres, il apparaît des formations acidophiles. Puis les polynucléaires

neutrophiles affluent entraînant la dégénérescence des cellules épithéliales et la disparition des plasmodies.

- Dans les épithéliums cylindriques simples (muqueuse digestive) il apparaît une congestion plus ou moins intense avec de fines hémorragies sous épithéliales au pourtour de la valvule iléocœcale. Des inclusions acidophiles sont décelables en plusieurs points.

Dans les organes lymphoïdes, la lésion lymphoïde élémentaire est représentée par l'infiltration du follicule par les polynucléaires neutrophiles.

II - LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

1 - Méthodes virologiques directes

1.1 - Précipitation en milieu gélosé

Un broyat de ganglion ou de rate prélevé sur un animal mort depuis peu de temps ou mieux, sacrifié au cours de la phase agonique, est mis à diffuser dans un gel à la rencontre d'un sérum hyperimmun précipitant obtenu sur lapin. Une zone de précipitation apparaît si le broyat contient de l'antigène PPR ou peste bovine (JACOTOT et MORNET 1967).

1.2 - Isolement et identification du virus

L'isolement du virus se fait à partir du sang hépariné ou du mucus nasal (sur écouvillons) maintenu dans la glace fondante. Des ganglions prélevés sur animal sacrifié sont également utilisés.

D'après BOURDIN et LAURENT (1972), l'isolement à partir du mucus nasal est inconstant et doit pour réussir, comprendre plusieurs prélèvements.

Les ganglions sont broyés après addition d'antibiotique suivit d'un cycle de congélation, décongélation et centrifugation. Le sang est quant à lui centrifugé, la fraction leucocytaire récoltée, est lavée. Le broyat de ganglion centrifugé et la fraction leucocytaire sont utilisés pour infecter des cellules de reins d'embryon de veau (dans le cas de la peste bovine) ou les cellules de rein d'embryon de mouton (dans le cas de la PPR).

Sur ces cellules spécifiques on ajoute dans un cas du sérum de veaux (réceptif à la peste bovine) ou de mouton (réceptif à la PPR) et dans l'autre cas du sérum de veau ou de mouton immun. La détection du virus se traduit par un effet cytopathogène (ECP) dont la

lecture se fait à partir du quatrième jour après l'inoculation puis tous les jours pendant dix jours (JACOTOT et MORNET, 1967).

L'isolement et l'identification du virus permet la mise en évidence des pouvoirs cytopathogène, antigène et pathogène du virus.

1.3 - La technique de la RT PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de diagnostic en biologie moléculaire. Elle est basée sur la répétition de réplifications *in vitro* des séquences de DNA à partir d'amorces spécifiques.

Cette technique, mise au point par MULLIS est certainement celle qui a connu le développement le plus spectaculaire et le plus grand dans l'histoire de la biologie moléculaire (KAPLAN et coll., 1993).

Elle est utilisée pour déterminer une séquence spécifique d'un acide nucléique appartenant à un agent infectieux ou une partie d'un gène chromosomique .

La RT-PCR est quant à elle réalisée à partir d'ARN messager (ARNm) qui est d'abord transformé en ADN complémentaire (ADNc) grâce à la reverse transcriptase. L'ADN est ensuite amplifié par la technique classique de PCR. Cette méthode est en général utilisée pour identifier les virus à ARN par la PCR. C'est ce que nous avons fait avec le virus PPR qui est un virus à ARN. En effet dans la RT PCR on distingue les étapes suivantes :

- extraction de l'ARN
- la reverse transcription
- la PCR
- détection et analyse des produits PCR.

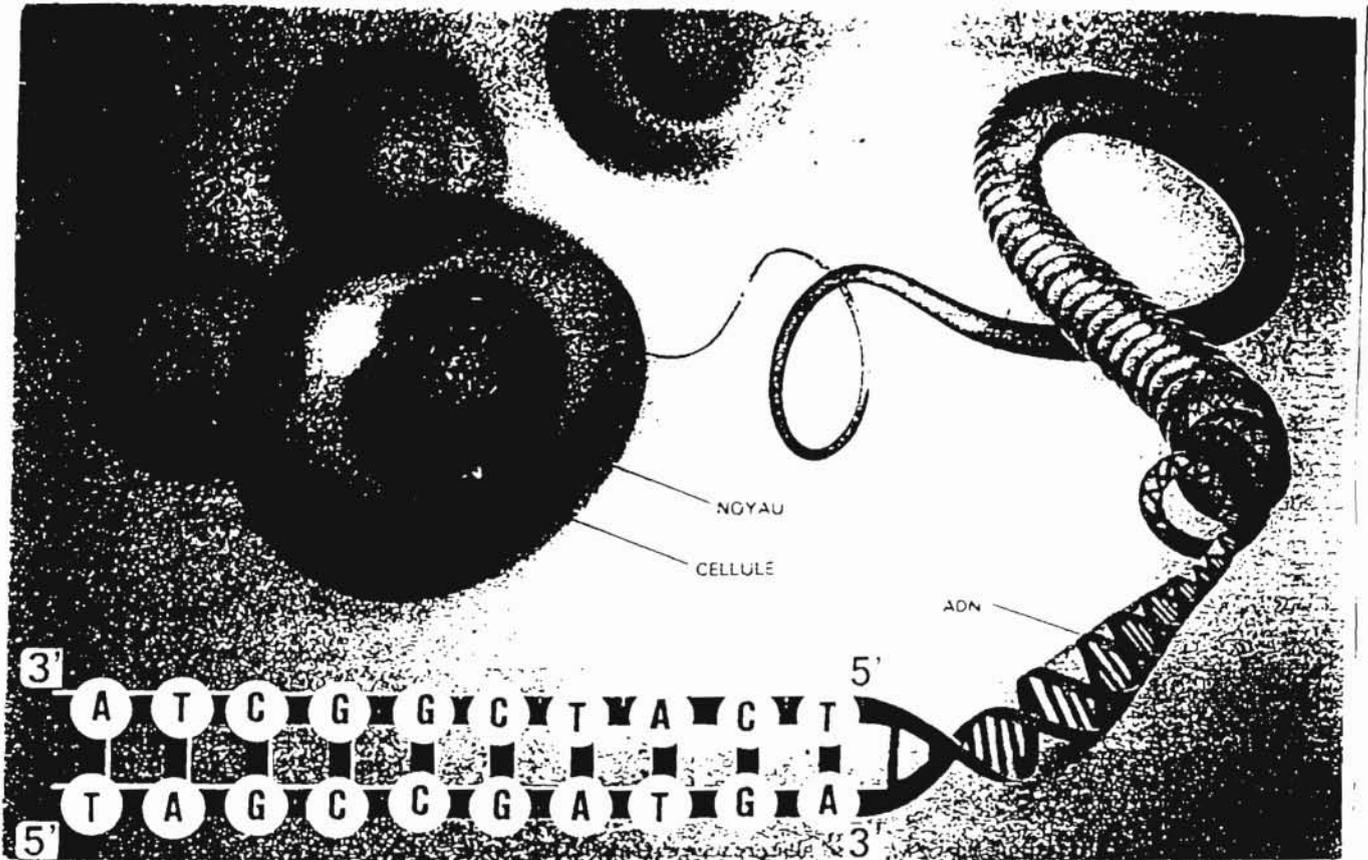


Figure 3 : Structure de l'ADN

Source : MULLIS

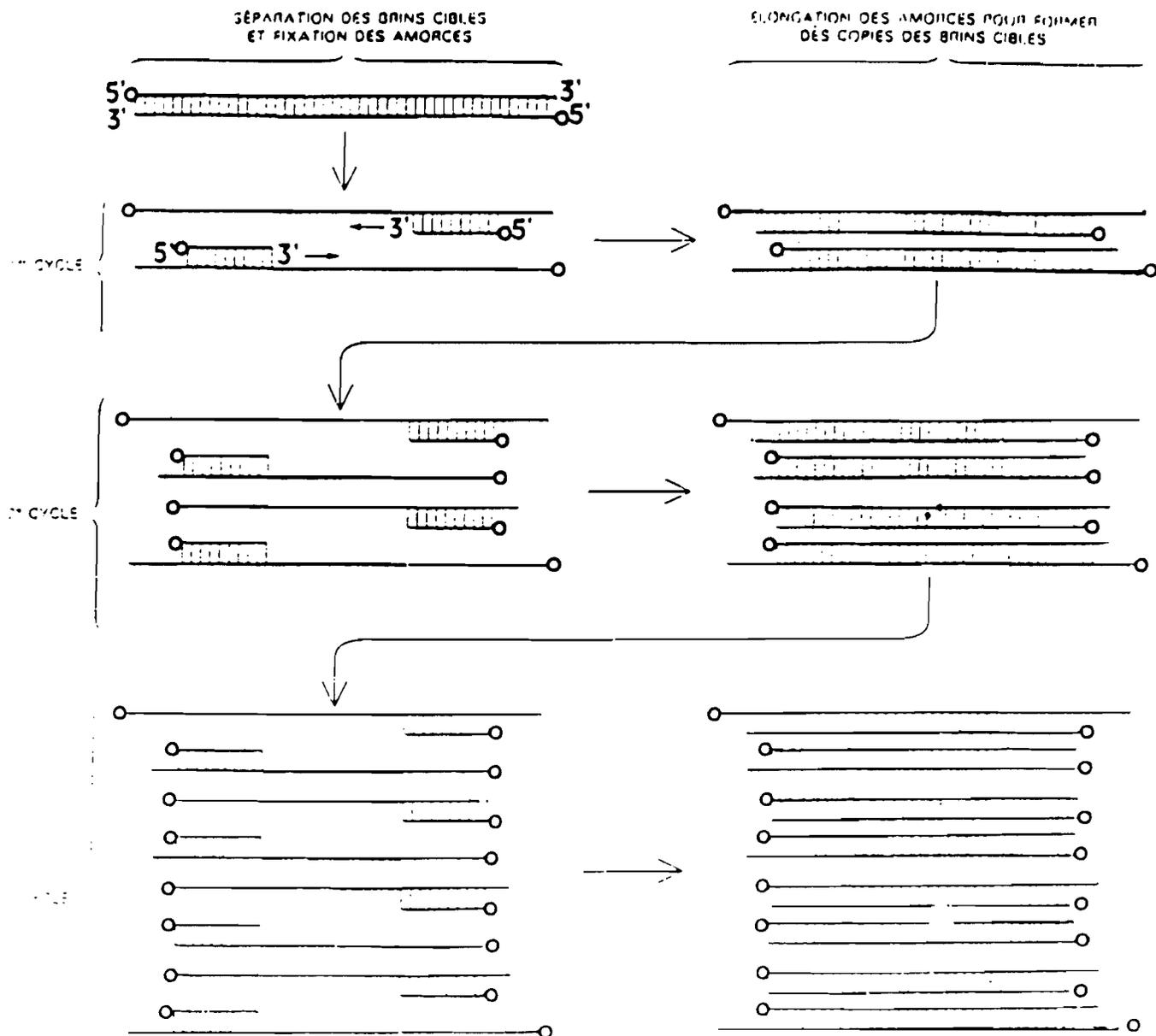


Figure 4 : Schéma du principe de la PCR

Source : MULLIS

1.4 - La neutralisation de l'inhibition de l'hémagglutination morbilleuse (N.I.H.M)

Il consiste à traiter le sérum antipestique avec le matériel suspect de contenir le virus, et ensuite de tester ce sérum en inhibition de l'agglutination d'érythrocytes de singes par l'hémagglutine morbilleuse.

L'avantage de ce procédé est l'utilisation, dans les pays indemnes de peste bovine, de l'antigène morbilleux, au lieu d'un antigène peste bovine.

2 - Les méthodes virologiques indirectes

Ce sont des méthodes permettant de mettre en évidence les anticorps témoins de l'infection à partir d'un sérum suspect. Elles comprennent :

- la séroneutralisation
- l'inhibition de l'hémagglutination morbilleuse
- l'ELISA

Ces trois méthodes sont applicables à la PPR et à la peste bovine.

2.1 - La séroneutralisation

C'est une méthode à posteriori. Elle permet de détecter les anticorps témoins d'une infection. Elle s'adresse aux animaux convalescents et aux animaux vaccinés. Elle s'applique également aux sujets chez qui l'infection évolue sous une forme fruste ou inapparente. Ce diagnostic n'est intéressant que pour les enquêtes épidémiologiques. Selon TAYLOR (1979), la distinction est possible par séroneutralisation entre une authentique infection à virus PPR et une éventuelle contamination par le virus bovine pestique (titre différent dans le système homologue et le système hétérologue).

2.2 - L'inhibition de l'hémagglutination morbilleuse (I.H.M.)

L'hémagglutination virale est une agglutination des globules rouges (érythrocytes de singe) par intervention d'hémagglutinines virales (hémagglutinines morbilleuses). Cette réaction est spécifiquement inhibée par des anti-hémagglutinines produites par l'organisme en réponse à l'infection virale correspondante.

L'inhibition de l'hémagglutination morbilleuse est donc l'inhibition de la réaction d'hémagglutination en présence d'anticorps spécifiques.

Le virus de la rougeole (virus morbilleux) est utilisé dans le diagnostic de la peste bovine et de la PPR en raison de la communauté antigénique entre le virus morbilleux, le virus bovipestique et le virus de la PPR.

Cette méthode a l'avantage d'être utilisée dans les territoires indemnes où l'on redoute l'introduction de la PPR et de la peste bovine.

PROVOST et coll. (1972) utilisent cette réaction pour rechercher des anticorps anti-bovipestiques chez les chèvres. Elle s'est révélée très spécifique. Mais elle est surtout applicable en début d'infection où les anticorps I.H.M. se situent à un taux maximum. En effet ces anticorps ont une durée éphémère par rapport aux anticorps neutralisants. Ils disparaissent en moins d'un mois.

2.3 - L'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

L'ELISA est très utilisée en virologie médicale car elle est très sensible et automatisable. L'antigène viral est absorbé sur un support solide. Les anticorps éventuellement présents dans le sérum se fixent spécifiquement sur les antigènes. L'addition d'immunoglobulines d'espèces conjuguées à une enzyme permet la transformation d'un substrat chromogène en un produit coloré dont l'intensité mesurée en

densité optique est proportionnelle à la quantité d'anticorps. On s'assure, grâce aux cupules témoins sans antigène absorbé, de la spécificité de la réaction.

La méthode ELISA peut manquer de spécificité du fait de la fixation non spécifique des réactifs sur la plaque. Ce problème est résolu par :

- la réalisation de lavage entre chaque étape de la réaction ;
- la purification des réactifs ;
- l'utilisation d'anticorps monoclonaux, soit pour fixer l'antigène sur le support, soit sur le conjugué ;
- la détermination de seuils qui optimisent la fiabilité de la réaction.

Sur le terrain et au laboratoire les éléments de diagnostic permettent de bien distinguer la PPR de la peste bovine. Cependant leur éradication passe forcément par une bonne prophylaxie sanitaire et médicale.

CHAPITRE III : PROPHYLAXIE CONTRE LA PESTE BOVINE ET LA PPR

Pour lutter contre la peste bovine et la PPR , on peut soit les guérir soit les prévenir. On ne dispose d'aucun traitement spécifique. Mais on peut lutter contre les complications à l'aide de sulfamides, d'anti-diarrhéiques et d'antibiotiques. Ce traitement symptomatique permet de limiter les pertes. Cependant il demeure un moyen très limité en raison de son coût élevé. Seul le recours aux moyens prophylactiques constituent des moyens de lutte efficaces. Cette prophylaxie repose sur les mesures sanitaires et médicales.

I - PROPHYLAXIE SANITAIRE

On distingue deux types de moyens selon qu'on se trouve en milieu sain ou infecté.

Il s'agit:

- des mesures défensives (milieu sain)
- des mesures offensives (milieu infecté).

Ces mesures sont applicables à la peste bovine et à la PPR.

1 - Les mesures défensives

Ce sont des mesures destinées à protéger un pays ou un troupeau. Elles cherchent à éviter l'introduction du virus dans ce milieu.

2 - Les mesures offensives

Elles visent à neutraliser le virus partout où il se trouve. Elle consiste à dépister les animaux malades et les contaminés et à les neutraliser.

Dans un élevage familial, tout animal malade ou suspect doit être isolé. Les malades seront éliminés. Les cadavres sont détruits par enfouissement. Les bergeries, les étables et les enclos seront désinfectés. L'exposition des enclos à l'ensoleillement pendant quelques jours suffit pour l'assainissement. Pour les bergeries et les étables la désinfection se fera à l'aide d'une solution de formol. Les foyers seront circonscrits le plus vite possible. Les circuits commerciaux du bétail seront interdits.

De telles mesures ne sont applicables que dans les pays où l'armature sanitaire est suffisamment développée. Elles demeurent difficiles dans le contexte africain. La prophylaxie médicale devient alors prépondérante.

II - LA PROPHYLAXIE MEDICALE

Elle permet de rendre l'organisme résistant vis-à-vis du virus. Selon les premiers travaux effectués, la PPR semble justifiable des mêmes méthodes d'immunisation que la peste bovine . Nous retiendrons comme modalités de mesures médicales, la vaccination avec le vaccin homologue et le vaccin hétérologue.

On entend par vaccin hétérologue, un vaccin qui utilise un germe différent de celui contre lequel on veut protéger l'organisme mais possédant des antigènes communs.

Un vaccin est dit homologue, lorsqu'il emploie le virus responsable de l'affection contre lequel on veut protéger l'organisme.

1 - La vaccination dans la peste bovine

Le vaccin homologue

Pour ce qui est de la vaccination contre la peste bovine, diverses tentatives d'immunisation ont été menées par plusieurs auteurs. Retenons que c'est seulement en 1962 qu'un vaccin de culture cellulaire a pathogène et efficace fut obtenu (PLOWRIGHT

et coll., 1962). Cette souche vaccinale est uniquement lymphatique et n'est pas excrétée dans le milieu extérieur par l'animal vacciné, contrairement à la souche sauvage qui est lymphoépithéliotrope. L'immunité conférée est solide et durable.

Cependant l'inconvénient majeur de ce vaccin de culture cellulaire est sa thermolabilité. L'eau est délétère pour le virus bovine pestique. Par contre les ions sulfate (SO_4) lui apportent une protection que ne confèrent pas les ions chlorure (Cl^-), (ROBIN et coll., cités par COUACY, 1994). Aussi la solution molaire de sulfate de magnésium est recommandée comme diluant de vaccination (PROVOST et coll., 1974).

Des recherches sont menées depuis quelques années pour obtenir un vaccin thermostable :

- par le développement d'une technique de lyophilisation (MARINER et coll., 1990a ; MARINER et coll., 1990b ; MARINER et coll., 1993) ;

- par recombinaison génétique, en insérant les gènes des protéines vaccinales H et/ou F dans le virus de la vaccine qui est thermorésistant (BARRET et coll., 1989 ; GIABVEDON et coll., 1991) ; ou le gène F dans le capripoxivirus (ROMEO et coll., 1993).

2 - La vaccination dans la PPR

2.1 - Le vaccin hétérologue

Les vaccins hétérologues qui avaient été utilisés chez les petits ruminants sont :

- le vaccin antibovine pestique lapinisé (souche Nakamura)
- le vaccin antibovine pestique tissulaire.

Le premier n'avait pas donné de résultats satisfaisants sur le terrain en Côte d'Ivoire (GNAGNA, 1976).

Le second est disponible à l'heure actuelle. C'est celui préconisé par BOURDIN et coll. (1969), dans la lutte contre la peste bovine. Il est fabriqué à partir de la souche kabeté 0 de PLOWRIGHT et FERRIS qui a subi 60 passages sur cellules rénales

d'embryon de veau. Mais la déclaration de la plupart des pays de l'Afrique de l'Ouest indemne de peste bovine a fait arrêter la production de ce vaccin depuis 1996 au profit d'un vaccin homologue atténué.

2.2 - Le vaccin homologue

Les vaccins homologues comprennent :

- le vaccin à base de pulpe de rate broyée inactivée avec du formol par GARGADENNEC et LALANNE ;
- le vaccin à virus modifiés sur culture cellulaire par GILBERT et collaborateurs.

Ces deux vaccins s'étaient avérés peu performants et certains auteurs avaient donc proposé de lutter contre la PPR avec le vaccin antibovipestique notamment la souche kabeté 0 dont la production est actuellement arrêté en Afrique de l'Ouest. Le vaccin homologue a été repris et mieux atténué. Il est donc depuis 1996 d'usage pour lutter contre les PPR chez les petits ruminants. Il s'agit du vaccin obtenu avec la souche PPR 75/1 isolée au Nigéria en 1975 et atténuée par passage (70e passage) sur des cellules vero (PPRV 75/1 I. K6 B K2 vero 70). (O.I.E, 1996).

Ce vaccin est actuellement produit à Dakar, à Bamako, au Botswana et au Cameroun.

CONCLUSION

L'étude des virus de la PPR et de la Peste bovine nous montre que ces deux virus sont très proches tant dans leur structure que dans leur manifestations. La contamination naturelle et réciproque de ces deux maladies entre les espèces ovine, caprine et bovine est possible. La ressemblance entre ces deux virus est exploitable au laboratoire.

La deuxième partie de notre travail est consacrée à l'étude expérimentale que nous avons menée sur le terrain et au laboratoire sur ces deux virus.

**DEUXIEME PARTIE :
ETUDE EXPERIMENTALE**

En Afrique en général, l'élevage des bovins et des petits ruminants est souvent mené en association.

En Côte d'Ivoire et dans d'autres pays africains, l'existence du virus de la PPR peut, compte tenu du mode d'élevage, passer des petits ruminants aux bovins. Il était utile de rechercher le moment où un caprin infecté devenait contaminant et quelle influence exerce le virus de la PPR sur la vaccination anti- peste bovine chez les bovins.

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODE

La recherche de la période d'excrétion du virus PPR a été réalisée chez des caprins et l'influence de ce virus sur la vaccination anti-bovipestique s'est faite sur des bovins. Le virus PPR a été étudié au laboratoire par la technique RT-PCR et l'influence de la présence des anticorps anti-virus PPR sur la vaccination anti-bovipestique chez les bovins a été appréciées par la technique ELISA.

I - SUR LE TERRAIN

1 - Le matériel animal

Deux espèces animales ont été utilisées. Les caprins pour l'étude de la PPR et les bovins pour l'étude de la peste bovine.

- Les caprins

Il a été constitué deux lots de six caprins de race Djallonké.

- Les bovins

Ils sont représentés par les vaches et les veaux de race N'dama d'un élevage fermé (Ranch d'Irhu-Lamé).

Au départ nous avons travaillé avec 99 vaches de plus de deux ans d'âge et 99 veaux de 6 à 12 mois d'âge. Malheureusement le nombre de veaux sur lequel nous avons travaillé a diminué par la suite à cause de la vente de certains veaux par le propriétaire.

2 - Matériel d'immunisation d'inoculation et de prélèvement

Les bovins ont été immunisés avec une seringue contenant :

- le vaccin antibovipestique fabriqué à Bamako
- le vaccin homologue PPR fabriqué au CIRAD-EMVT à Montpellier.

Les caprins ont été inoculés avec une seringue contenant :

- une souche de virus sauvage PPR de Côte d'Ivoire (PPRVCI).

Le prélèvement de sang des bovins s'est effectué avec un tube véroject hépariné.

Le prélèvement du mucus nasal, oculaire et gingival s'est fait à l'aide d'écouvillons.

De la glace a été utilisée pour la conservation des écouvillons dans leur acheminement au laboratoire.

3 - Méthodes de vaccination, d'inoculation et de prélèvement

- **Cas des caprins**

Deux box ont été aménagés et contenant chacun six chèvres. Avec la souche de virus sauvage PPR de Côte d'Ivoire (PPRV-CI), l'un des lots de chèvre a été inoculé par la voie sous-cutanée (Box A) et l'autre par la voie nasale (Box B).

Les écouvillons (nasaux, gingivaux, oculaires) ont été réalisés chaque jour à partir de J0 jusqu'à développement de la maladie et mort des animaux.

Les écouvillons sont, sur place (dans les box) conservés dans de la glace fondante puis définitivement au congélateur à moins 80°C.

- **Cas des bovins.**

Les veaux ont avant l'expérience été testés à l'ELISA pour voir s'ils avaient des anticorps antibovipestiques ou non. En effet 99 veaux sélectionnés ont été tous négatifs en anticorps à l'ELISA compétition peste bovine.

Les vaches et les veaux ont subi une vaccination contre la PPR suivie d'une vaccination contre la peste bovine. Les tableaux II et III montrent les moments où les vaccinations ont été effectuées.

Tableau I : Vaccination des veaux

Date	Nombre d'animaux immunisés contre	
	La peste bovine	La PPR
J0		99
J1 + 28 jours	93	
J2 = J1+48 jours		31 (les négatifs à l'ELISA)
J3=J2+48 jours	88	
J4 = J3+21 jours		
J5=J4+34 jours	73	
J6=J5+29 jours		

Tableau II : Vaccination des vaches contre la peste bovine et la PPR.

Date après J0	Nombre d'animaux Sélectionnés l'immunisation contre		nombre d'animaux soumis à l'ELISA
	La peste bovine	La PPR	
J0		99	
J0 + 4 semaines	99		
J0 + 5 semaines			99 animaux soumis à l'ELISA pour rechercher les AC anti-PB et les AC anti-PPR

J0 = jour de l'inoculation du virus PPR.

II- AU LABORATOIRE

1 - Le matériel

1.1 - Pour le diagnostic virologique direct (RT-PCR)

1.1.1 - Appareillage

- Une centrifugeuse
- Un thermocycleur
- Un appareil photo
- Une hotte
- Un appareil à électrophorèse

1.1.2 - Le petit matériel

- un vortex
- des tubes eppendorf
- les colonnes
- les pipettes jetables
- les pipettes non jetables
- des micropipettes de 1000, 200, 20, 10 μ l
- de la glace
- des gants
- un bain-marie
- les cônes
- des supports de tube

Le matériel gros (appareillage) et petit ne doit pas circuler entre les pièces. L'utilisation du matériel à usage unique est formellement recommandé pour la préparation de réactifs et leur stockage et pour le traitement des échantillons.

Pour les pipettes réglables il faut éviter le contact entre l'air de la pipette et le liquide. Les cônes sont changés à chaque pipettage.

Pour les volumes plus importants on privilégie les pipettes jetables.

1.1.3 - Les amorces et autres réactifs

- **Choix des amorces**

L'alignement des gènes N du virus P.B (KAMATA et coll., cité par COUACY, 1994.) et du virus PPR (DIALLO et coll., cité par COUACY, 1994) nous a permis de choisir nos amorces dans la partie de faible homologie se situant dans la région 3' terminale. Ainsi il a été déterminé pour le virus PPR le couple d'amorces P1/P2 :

- P1 : 5' - TCT CCT TCC TCC AGC ATA AAA CAG AT-3' (sens)

- P2 : 5' -ACT GTT GTC TTC TCC CTC CTC CT-3' (inverse).

Des oligonucléotides ont été choisis à l'intérieur du fragment amplifié par chaque couple d'amorces spécifiques. Ce sont :

- pour le virus PPR : l'oligonucléotide SP1 :

CCC GGC CAA CTG CTT CCG

- **Les réactifs**

Ils varient selon les protocoles de manipulation utilisés à chaque étape de la RT-PCR. Nous les exposerons dans le paragraphe des techniques d'investigation.

1.2 - Le diagnostic virologique indirect (E.L.I.S.A)

Le matériel et réactifs utilisés figurent en annexe 5.

2 - Techniques d'investigation

2.1 - La RT-PCR

2.1.1 - L'extraction de l'ARN viral

- **Préparation des échantillons**

Il s'agit d'extraire les cellules des écouvillons. On détache alors le coton de la tige avec une lame puis on le triture dans un tube contenant 400 µl d'une solution de DEPC. Le coton est ensuite remis dans une seringue et à l'aide du piston, il est comprimé pour en extraire le liquide dans le tube Eppendorf.

Cette opération est réalisée pour chaque écouvillon. On obtient ainsi autant d'échantillons que d'écouvillons.

- **Préparation des pools d'échantillons**

Ce sont des pools que nous avons utilisés comme échantillon tout au long du diagnostic par la méthode RT-PCR. Pour chaque box (inoculation par la voie sous cutanée ou par la voie nasale), nous avons six animaux. Pour chaque animale, nous avons obtenu un écouvillon nasal, gingivale, oculaire. Pour chaque date de réalisation des écouvillons,

on a :

- 6 écouvillons nasaux qui constituent le pool d'échantillon nasal.
- 6 écouvillons gingivaux qui constituent le pool d'échantillon gingivale.
- 6 écouvillons oculaires qui constituent le pool d'échantillon oculaire.

Nous avons utilisé deux méthodes différentes pour obtenir deux types de pool d'échantillon à partir des mêmes écouvillons des deux box .

Dans un premier temps nous avons mené toute l'expérience jusqu'à l'obtention des résultats (positifs et négatifs). Les écouvillons des résultats positifs et douteux ont été resélectionnés pour subir une nouvelle méthode de diagnostic en vue d'obtenir des résultats définitifs de confirmation. Cette nouvelle méthode est représentée par la deuxième technique d'extraction de l'ARN suivie de la deuxième technique de la reverse transcription.

Dans la première technique d'extraction de l'ARN (méthode du phénol- chloroforme)

Les pools ont été réalisés après extraction de l'ARN c'est-à-dire avec des suspensions de l'ARN extrait de la suspension cellulaire provenant de chaque écouvillon. En effet ce sont les écouvillons des résultats positifs de la première expérience qui ont été sélectionnés pour subir une 2^{ème} méthode d'extraction d'ARN et de reverse transcription.

Etant donné que les écouvillons ont été réalisés à des dates précises, nous avons pour chaque date fait un pool d'échantillon de ARN oculaire, nasale et gingivale après extraction. Le pool oculaire est obtenu avec 5 µl de chaque échantillon d'ARN oculaire de la date indiquée. La même opération est réalisée avec les échantillons d'ARN nasaux et gingivaux.

Dans notre deuxième technique d'extraction de l'ARN les pools d'échantillon ont été réalisés avec les suspensions cellulaires extraites des écouvillons reconnus positifs ou douteux après la première technique. Les pools oculaires, nasaux et gingivaux ont été réalisés de la même manière que précédemment mais avec 50 µl de chaque échantillon de suspension cellulaire. C'est par la suite que l'extraction de l'ARN a été faite avec les suspensions des pools et par la méthode du Kit QUIAGEN.

Les détails techniques de ces deux types d'extraction figurent dans l'annexe 2.

Le nombre de pool est représenté dans le tableau III.

Ce sont ces pools d'échantillons qui ont subi la reverse transcription et l'amplification génétique du cDNA dont les détails techniques figurent en annexe 3 et 4.

Les pools d'échantillons de la voie sous cutanée et de la voie nasale ont la même numérotation.

Tableau III : Les pools d'échantillons

INOCULATION PAR LA VOIE SOUS CUTANEE OU NASALE		
Jour de réalisation des écouvillons après J0	N° de pool d'échantillon	Muqueuse de pool d'échantillon correspondant
2	1	O
	2	N
	3	G
3	4	O
	5	N
	6	G
4	7	O
	8	N
	9	G
5	10	O
	11	N
	12	G
6	13	O
	14	N
	15	G
7	16	O
	17	N
	18	G
8	19	O
	20	N
	21	G
9	22	O
	23	N
	24	G
10	25	O
	26	N
	27	G
11	28	O
	29	N
	30	G
12	31	O
	32	N
	33	G
13	34	O
	35	N
	36	G
14	37	O
	38	N
	39	G

O : oculaire

N: nasale

G : gingivale

2.1.2 La reverse transcription.

Elle permet de transformer l'ARN en cDNA. Nous avons utilisé deux méthodes:
(Annexe 3)

- La méthode traditionnelle utilisée au laboratoire de Bingerville.
- La méthode du kit QUIAGEN.

2.1.3 L'amplification génétique.

Elle permet d'amplifier le cDNA à l'aide du thermocycleur. Les produits de la PCR obtenus sont révélés par l'électrophorèse en gel d'agarose.

Les détails de la technique d'amplification figurent dans l'annexe 4.

2.1.4 - La reconnaissance des produits de PCR

Elle est faite par la méthode de l'électrophorèse en gel d'agarose.

- Préparation du gel d'agarose

Un gel d'agarose à 2 % final (1,5 g d'agarose pure dans 75 ml de tampon TBE à 10%) est dissout à chaud dans un four micro-ondes, puis refroidi à 50°C. 3 µl de BET (Bromure d'éthidium à 10 mg/ml) sont ajoutés.

Le bromure d'éthidium permet la visualisation des fragments d'ADN à la lumière UV (ultra violet) en s'intercalant entre les deux brins d'ADN.

Ce gel est coulé de façon horizontale dans une cuve contenant deux rangées de peigne. Laisser refroidir et retirer les peignes pour obtenir des puits . La cuve est déposée dans le bac d'électrophorèse contenant le tampon TBE (Tris acide borique EDTA).

Dans le premier puits de la première rangée mettre 10 µl de marqueur (M6 ou de Boerlinger). Dans les autres puits mettre le mélange de 3 µl de tampon et 8 µl de solution de produits PCR. Dans les derniers puits mettre un témoin positif et un témoin négatif. Les électrodes du générateur sont branchées aux bacs et la migration se fait à 70 V en 1 h.

- La révélation

Elle se fait sous une lumière UV (ultraviolet) légèrement déviée pour être vue à l'oeil nu. Enfin on fait la prise de photo de bandes de migration observées.

2-2 - L'E.L.I S.A.

2.2.1- Exécution du test: E.L.I.S.A compétition peste bovine (virus P.B).

2.2.1.1 - Sensibilisation des plaques (ou coating)

Les détails des réactifs figurent en annexe 5.

Exemple : pour une dilution au 1/100 prendre 10 µl d'antigène reconstitué (solution stock) pour 1 ml de tampon de sensibilisation.

- Distribuer 50 µl d'antigène dilué

- Tapoter les plaques et incuber à 37°C pendant 60 min (sous agitation faible et continue si possible sinon agiter manuellement toutes les 10-15 min) ou une nuit (14-16 heures) à 4°C.

2.2.1.2 - Lavage des plaques

Commencer d'abord par préparer le tampon de blocage. Préparer une quantité nécessaire pour 3 usages différents. Exemple : pour 1 plaque, préparer 15 ml de tampon (5 ml pour la dilution des sérums ; 5 ml pour la dilution du Mab et 5 ml pour la dilution du conjugué).

- Laver 3 fois la plaque avec le tampon de lavage (étape très importante en ELISA). Ne jamais sécher les plaques quand on n'est pas prêt à distribuer un réactif.

2.2.1.3 - Distribution de sérums de contrôle et échantillons

- Marquer la plaque en utilisant les deux premières colonnes pour les contrôles CC, C+++ , C+ , Cm , C-.
- Distribuer 40 μ l de tampon de blocage dans toutes les cupules.
- Distribuer 60 μ l de tampon de blocage en plus dans les cupules A1 et A2 (cupules du contrôle conjugué, CC).
- Distribuer 10 μ l de tampon de blocage en plus dans les cupules F1, F2, G1 et G2 (cupules du contrôle Mab, Cm).
- Distribuer 10 μ l de chaque échantillon de sérum en commençant par la colonne 3 : 2 cupules par échantillon de sérum comme indiqué dans le tableau IV. La dilution du sérum est de 1/5.
- Distribuer les sérums de contrôle C++, C+ , C- dans leurs cupules respectives.

2.2.1.5 - Distribution du conjugué

Exemple : Pour une dilution de 1/1000 soit 1 µl de solution stock de conjugué (= flacon lyophilisé reconstitué avec 2 ml d'eau distillée de Vienne) pour 1 ml de tampon de blocage. Pour une plaque, il faut 5 µl de conjugué pour 5 ml de tampon de blocage.

- distribuer 50 µl de la solution de conjugué diluée au 1/1000 dans toutes les cupules;
- incuber sous agitation lente pendant 60 min à 37°C

Remarque : Conserver une partie (50-100 µl) de la solution de conjugué pour un contrôle ultérieur.

Laver 3 fois

2.2.1.6. - Distribution du substrat (orthophénilène diamine)/ Chromogène (eau oxygénée) (OPD/H₂O₂)

Préparer le mélange OPD/H₂O₂ à raison de 4 µl de H₂O₂ pour 1 ml d'OPD. Pour une plaque : 20 µl de H₂O₂ pour 5 ml d'OPD.

- distribuer 50 µl de ce mélange dans toutes les cupules ;
- incuber à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière pendant 10 à 15 minutes.

Garder 50-100 µl de ce mélange pour un contrôle ultérieur.

Remarque : sur une plaque neuve, distribuer 50 µl du mélange OPD/H₂O₂ dans les cupules de la colonne 1 uniquement. Incuber la plaque comme la plaque-test à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière pendant 10-15 minutes. Elle servira à faire le blanc.

2.2.1.7 - Distribution de la solution d'arrêt (acide sulfurique)

- Distribuer 50 µl d'acide sulfurique dilué dans toutes les cupules y compris celles de la plaque du blanc.

2.2.1.8 - Lecture

Lire la plaque à 492 nm.

Contrôle ultérieur : Ajouter à 100 µl du mélange OPD/H₂O₂ 50 µl de la solution de conjugué 1/1000. Si une coloration apparaît rapidement cela signifie que ces conjugués sont bons. Ce contrôle doit être effectué avant la distribution du mélange OPD/H₂O₂.

2.2.2. - Calcul et interprétation des résultats : calcul du pourcentage d'inhibition (PI)

2.2.2.1 - Calcul du PI des contrôles

$$PI = 100 - \frac{DO \text{ de chaque cupule de contrôle}}{\text{Médiane DO de } C_m} \times 100$$

Remarque : La valeur médiane de C_m est obtenue en faisant la moyenne des 2 valeurs intermédiaires de DO. Les valeurs extrêmes de DO du C_m sont rejetées. Seules ces 2 valeurs intermédiaires de DO sont utilisées pour le calcul de la médiane du C et qui est prise pour les calculs ultérieurs de PI. Cependant ces 2 valeurs de DO du C_m doivent être dans l'intervalle de DO indiquées sur la fiche d'accompagnement.

2.2.2.2 - Calcul du PI des sérums à tester

2.2.3- Interprétation des résultats

Après le calcul des PI des sérums à tester et on en déduit que :

- un sérum à tester est dit positif quand son PI est supérieur ou égal à 50 % ou quand sa moyenne de DO est inférieure ou égale à la moyenne de DO du Cm divisée par 2 ;
- un sérum à tester est dit négatif quand son PI est inférieur à 50 % ou quand sa moyenne de DO est supérieure à la moyenne de DO du Cm divisée par 2 ;
- un sérum à tester est dit douteux ou à retester quand l'une des 2 cupules du même sérum est positive et l'autre négative.

$$PI = 100 - \frac{\text{DO de chaque cupule de contrôle}}{\text{Médiane DO de Cm}} \times 100$$

CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats et discussions vont intéresser les deux types de travaux que nous avons menés. Il s'agit de :

- la période d'excrétion du virus PPR chez les caprins
- l'influence des anticorps anti-PPR sur la vaccination anti-bovine chez les bovins.

I - RESULTATS

1 - L'inoculation des caprins

Après une incubation de deux à trois jours, on note une hyperthermie (39,°C à 40°C), une congestion des muqueuses buccales et un léger larmolement. Le jetage et l'érosion buccale commencent environ cinq à six jours après l'inoculation. La diarrhée apparaît deux à trois jours avant la mort. Le résumé des signes cliniques figure dans les tableaux 5 et 6.

Les animaux (n° 8374, n° 8380, n° 8352) sont morts au bout de six jours. Ils ont donc fait la forme suraiguë de la PPR.

Les animaux (n° 8377, n° 8353) sont morts au bout de quinze jours d'évolution. Il s'agit là de la forme subaiguë de la maladie.

Les autres animaux sont morts au bout de dix à onze jours. Ils ont fait la forme aiguë de la PPR.

L'inoculation du virus sauvage nous a permis de voir l'évolution des trois formes de PPR (suraiguë, aiguë et subaiguë).

L'inoculation par la voie nasale a provoqué un cas de forme suraiguë et chez les cinq autres animaux, la forme aiguë.

L'inoculation par la voie sous-cutanée a provoqué un cas de forme suraiguë, deux cas de forme aiguë et deux cas de forme subaiguë.

Le virus entraîne la mort beaucoup plus rapidement par la voie nasale que par la voie sous-cutanée.

2 - Résultats de la RT-PCR

Les échantillons provenant de l'inoculation par les virus sous-cutanées et nasales ont été d'abord soumis à la première technique. Les échantillons positifs et douteux ont alors été confirmés par la seconde technique (Kit QUIAGEN). En définitif sont retenus comme positifs les échantillons reconnus par la deuxième technique.

Les résultats de la RT PCR sont représentés par les illustrations des plaques de migration des produits PCR (figures 5, 6, 7, 8). Ils sont repris dans le tableau VII.

Selon les illustrations, des plaques de migration :

- ont été reconnues par la première technique :
 - par la voie sous-cutanée :
 - positif les échantillons n° 16, 17, 18, 19, 22, 23, 25, 27, 28
 - douteux les échantillons n° 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14
 - par la voie nasale :
 - positifs les échantillons n° 19, 22, 25, 29, 30, 31, 34
 - douteux les échantillons n° 4, 5, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 23
- ont été confirmées par la deuxième technique :
 - par la voie sous-cutanée :
 - positifs les échantillons n° 14, 16, 18, 19, 22, 23, 25, 27,
 - par la voie nasale :
 - positifs les échantillons n° 19, 21, 22, 23, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 34

Les résultats montrent que l'excrétion du virus est plus précoce après inoculation par la voie sous-cutanée que par la voie nasale.

Le virus apparaît dès le 6^e jour après inoculation par la voie sous-cutanée dans la muqueuse nasale et le 7^e jour dans l'oeil et sur les gencives alors qu'il n'apparaît que dans l'oeil le 8^e jour suite à l'inoculation intranasale.

Cependant l'excrétion du virus est plus durable lors d'inoculation par la voie nasale (persistance jusqu'au 13^e jour) par rapport à l'inoculation en sous-cutanée (10^e jour).

Tableau V : Résultats sur le terrain de l'inoculation des caprins avec le virus sauvage PPR par la voie nasale

N° des Animaux	Température corporelle et symptômes observés à partir de J0 (date d'incubation du virus)										
	J0+2	J0+3	J0+4	J0+5	J0 + 6	J0+ 7	J0+8	J0+9	J0+10	J0+11	J0+12
8357	39,4°C	39°C	39,3°C H.T.	42°C H.T. C.M.	40,°C H.T.; lar. jetage.	40,1°C H.T.; larmoie- ment ; Jetage	40°C H.T. lar-moie- ment jetage;E.B.	39,5°C H.T.; E.B diarrhée	39°C H.T. jetage E.B diarrhée	39°C jetage et diarrhée	mort
8367	39,4°C	39°C	39,3°C	42°C larmoie- ment ;H.T.	40°C H.T. C.M	40,8°C jetage C.M	40,2°C jetage H.T; E.B.	39,8°C jetage E.B.	40,8°C diarrhée	40°C diarrhée	mort
8371	40,5°C H.T.	40,3°C H.T.	39,2°C larmoie-ment	39,7°C CM; H.T.	41,2°C.M jetage; H.T.	41,2°;C.M jetage H.T.	40,2°C E.B;H.T jetage	40,3°C jetage diarrhée	mort		
8374	39,4°C	39,6°C larmoie- ment	40°C larmoie-ment ;C.M	42°C H.T.;C.M	42°C diarrhée	mort					
8378	39,3; larmoie- ment	40,3°C larmoie- ment;C.M	40,6°C H.T.;C.M	40,5°C H.T.;C.M	41,1°C jetage H.T	41,2°C jetage	40,2°C jetage;E.B.	40,8°C E.B. jetage	41°C H.T. diarrhée.	38°C diarrhée	mort
8379	38,4°C	39,1°C H.T.;C.M	38,8°C H.T.;C.M	40°C H.T.;C.M	41°C Larmoie- ment.;H.T.	40,6°C H.T. Jetage	40,5°C jetage;E.B diarrhée	40,3°C E.B diarrhée	mort		

H.T. = hyperthermie

CM = Congestion des muqueuses ;

E.B. = Erosion buccale

Tableau VI : Résultats sur le terrain de l'inoculation des caprins avec le virus sauvage PPR par la voie sous-cutanée

Animaux	Température corporelle et symptômes observés à partir de J0 (jour d'inoculation du virus)															
	J0+2	J0+3	J0+4	J0+5	J0+6	J0+7	J0+8	J0+9	J0+10	J0+11	J0+12	J0+13	J0+14	J0+15	J0+16	J0+17
8352	40°C	40°C C.M	39,2°C C.M	41°C jetage diarrhée	41°C jetage diarrhée	mort										
8353	39,2°C faible larmoie- ment	39,3°C C.M Larmoie- ment	40,3°C C.M	41°C jetage; H.T	41°C jetage; H.T	40,8°C jetage; H.T	41,1°C jetage; H.T C.M.	41°C jetage; H.T C.M.	41°C jetage; H.T C.M.	40,5°C jetage H.T C.M.	38,5°C jetage E.B	39°C jetage E.B	39,4°C jetage E.B.	39,5°C jetage diarrhée	38,5°C jetage diarrhée	mort
8361	39,°C	38,2°C larmoie- ment	39,2°C larmoie- ment	40,2°C H.T.; C.M	41°C; C.M. jetage	39,5°C C.M jetage	39°C jetage	39°C jetage diarrhée	39°C jetage diarrhée	39°C jetage diarrhée	mort					
8366	39°C larmoie ment	39,4°C faible larmoie- ment	41°C animal faible	40,2°C C.M. jetage	36,5°C animal faible	mort										
8377	38,7°C	38,5°C larmoie- ment	38,8°C larmoie- ment jetage	38,8°C jetage C.M	39°C jetage C.M.	38,5°C jetage	39,1°C jetage	39°C jetage	39°C jetage	38,4°C E.B jetage	38°C animal faible	38°C animal faible E.B	37,9°C diarrhée	37,8°C diarrhée	38,5°C diarrhée	mort
8380	39°C larmoie- ment	39°C larmoie- ment	40°C animal faible	40,4°C jetage C.M	39,8°C jetage faiblesse	mort										

H.T.= Hypertermie

E.B. = Erosion buccale

C.M.=Congestion des muqueuses

52

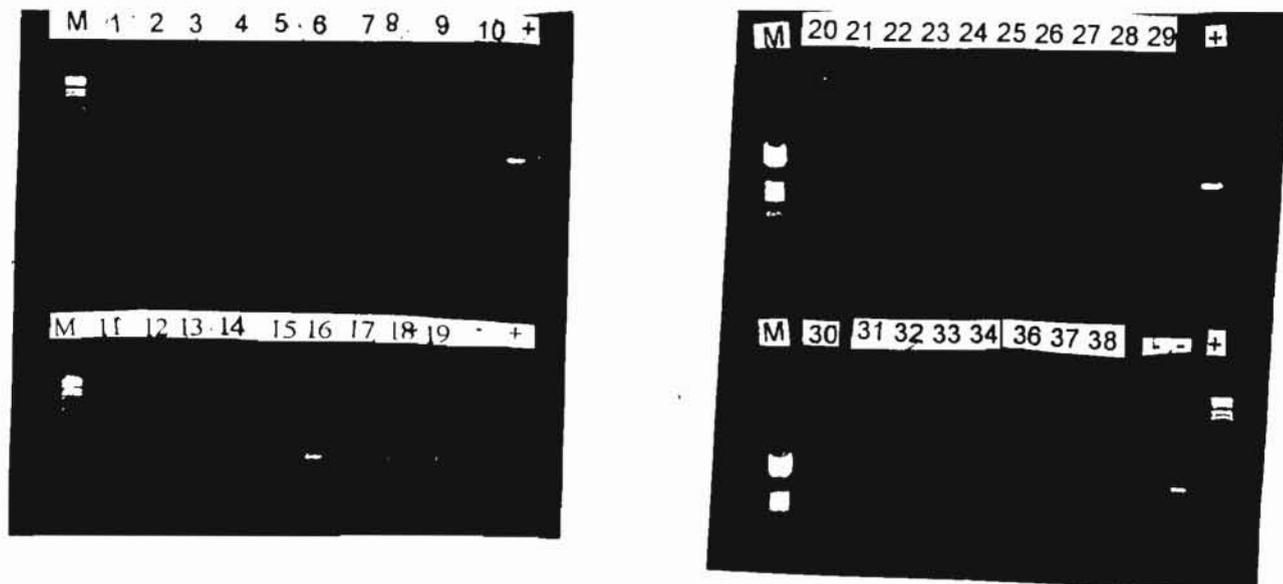


Figure 5 : Gel d'agarose des produits de l'amplification, par PCR réalisée avec les échantillons de la voie sous-cutanée obtenus avec la première technique.

+ : Témoin positif ; - : Témoin négatif ; M : marqueur de poids moléculaire
 Echantillons positifs : n° : 13, 14, 16, 18,19, 22, 23, 25, 27, 28

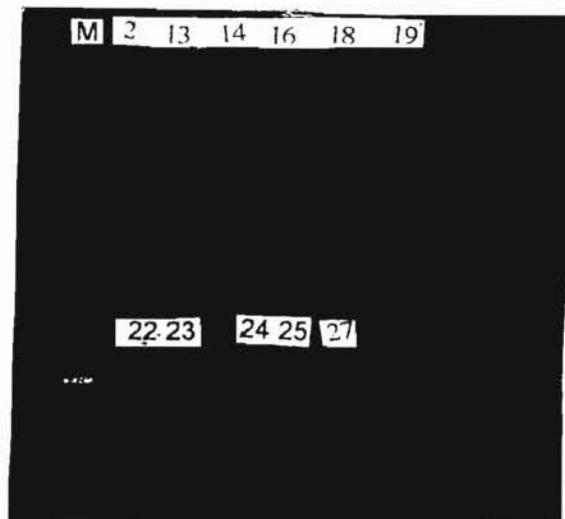


Figure 6 : Gel d'agarose des produits de l'amplification, par PCR réalisée avec les échantillons de la sous-cutanée obtenus avec la deuxième technique.

+ : Témoin positif ; - : Témoin négatif ; M : marqueur de poids moléculaire
 Echantillons positifs : n° : 14, 16, 18, 19, 22, 23, 25, 27

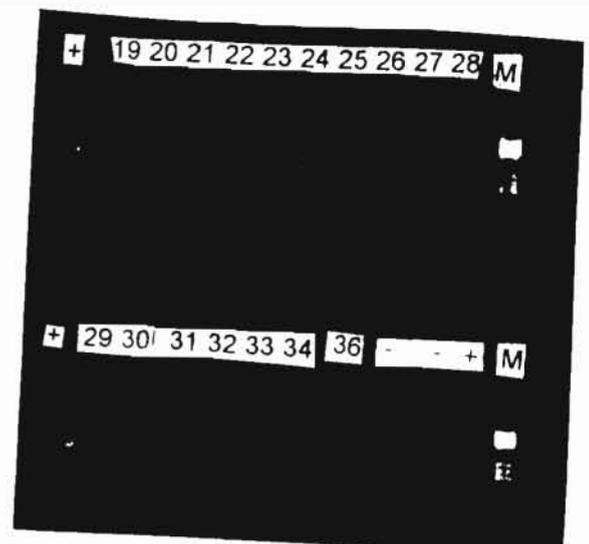
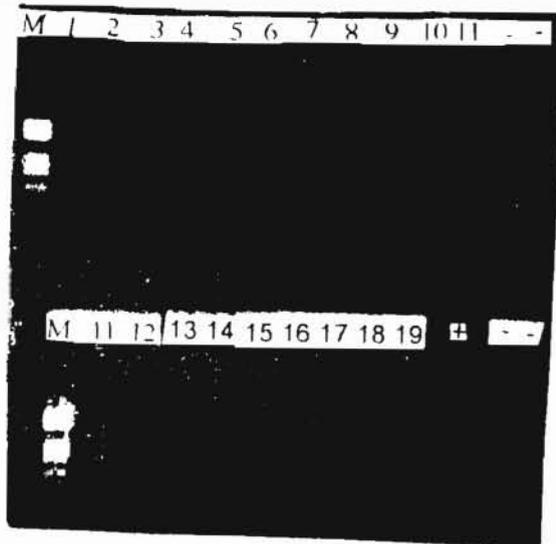


Figure 7 : Gel d'agarose des produits de l'amplification, par PCR réalisée avec les échantillons de la voie nasale obtenus avec la première technique.

+ : Témoin positif ; - : Témoin négatif ; M : marqueur de poids moléculaire
 Echantillons positifs : n° : 4, 5, 10, 12, 19, 21, 22, 25, 29, 30, 31, 32, 34

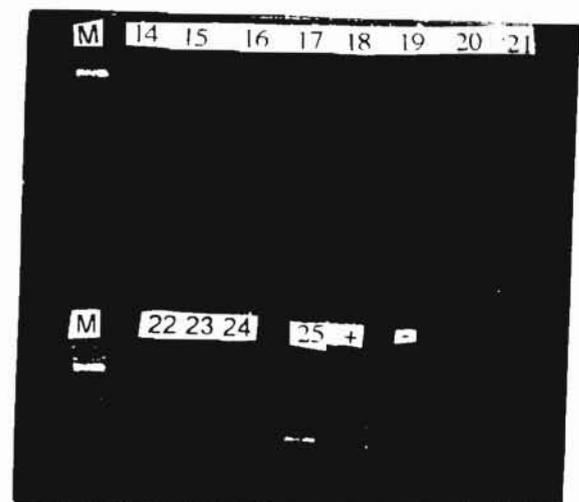
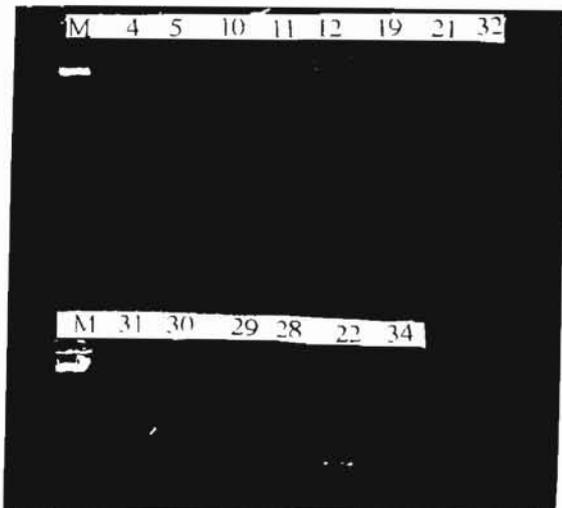


Figure 8 : Gel d'agarose des produits de l'amplification, par PCR réalisée avec les échantillons de la voie nasale obtenus avec la deuxième technique.

+ : Témoin positif ; - : Témoin négatif ; M : marqueur de poids moléculaire
 Echantillons positifs : n° : 19, 21, 22, 25, 28, 29, 30, 31, 32, 34

Tableau VII : Présence du virus PPR dans les prélèvements oculaires nasales, gingivaux après inoculation par les voies sous-cutanée et nasale.

N° de Pool	Muqueuse correspondante	Présence du virus au jour	Inoculation par la voie	
			sous-cutanée	nasale
1	O	J0 + 2	-	-
2	N		-	-
3	G		-	-
4	O	J0 + 3	-	-
5	N		-	-
6	G		-	-
7	O	J0 + 4	-	-
8	N		-	-
9	G		-	-
10	O	J0 + 5	-	-
11	N		-	-
12	G		-	-
13	O	J0 + 6	-	-
14	N		+	-
15	G		-	-
16	O	J0 + 7	+	-
17	N		-	-
18	G		+	-
19	O	J0 + 8	+	+
20	N		-	-
21	G		-	+
22	O	J0 + 9	+	+
23	N		+	-
24	G		-	-
25	O	J0 + 10	+	+
26	N		-	-
27	G		+	-
28	O	J0 + 11	-	+
29	N		-	+
30	G		-	+
31	O	J0 + 12	-	+
32	N		-	+
33	G		-	-
34	O	J0 + 13	-	+
35	N		-	-
36	G		-	-

O = oculaire; N = Nasale; G = gingivale; + = résultats positifs; - = résultats négatifs

J0 = jour d'inoculation du virus PPR

D'après le tableau VII, à la même date, la présence du virus est positive dans une muqueuse et négative dans l'autre. La date suivante les résultats négatifs deviennent positifs. C'est comme si le virus apparaissait et disparaissait le lendemain dans une muqueuse quelconque.

3 - L'ELISA

Les résultats de l'ELISA concernent l'analyse des sérums de veaux et des vaches après une vaccination contre la PPR suivie d'une vaccination contre la peste bovine.

Avant l'expérience, le statut immunitaire des vaches par rapport à la peste bovine n'a pas été déterminé. Toutefois ces vaches ont été régulièrement vaccinées contre la peste bovine lors des campagnes annuelles de vaccination. Nous avons estimé qu'elles sont immunisées contre la peste bovine et possèdent des anticorps antibovipestiques.

Le statut immunitaire des veaux par rapport à la peste bovine a permis de sélectionner 99 veaux négatifs à l'ELISA.

Après vaccination contre la PPR suivie de la vaccination contre la peste bovine on note :

- Chez les veaux (Tableau VIII)

Première vaccination contre la peste bovine : 17/88 positifs à l'ELISA peste bovine
soit une prévalence de 19,32 %.

Deuxième vaccination contre la peste bovine : 28/73 positifs à l'ELISA peste bovine
soit une prévalence de 38,35 %.

Troisième vaccination contre la peste bovine : 42/62 positifs à l'ELISA Peste bovine
soit une prévalence de 67,74 %

Il apparaît à travers ces résultats que la prévalence augmente avec les immunisations successives.

- Chez les vaches (Tableau IX)

Après la vaccination contre la peste bovine : - 80/99 positifs à l'ELISA Peste bovine

soit une prévalence de 80,80 %

- 78/99 positifs à l'ELISA PPR

soit une prévalence de 78,78 %

Chez les veaux les anticorps anti-PPR semblent inhiber la réponse à la vaccination contre la peste bovine quarante huit jours après la vaccination et même vingt et un jours après revaccination, la réponse anamnesticque à la vaccination anti-PPR n'est pas significative.

Chez les vaches les anticorps anti-PPR n'ont aucune influence sur la vaccination contre la peste bovine.

Tableau VIII Statut immunitaire des veaux après la vaccination

Date	Nombre d'animaux positifs à l'ELISA	
	Les anticorps anti-bovipestiques	Les anticorps Anti-PPR
J0		
J1=J0+28 jours		62/93 soit 66,66 %
J2=J1+48 jours	17/88 soit 19,32 %	66/88 soit 75,18 %
J3=J2+48 jours		
J4= J3+21 jours	28/73 soit 38,35 %	
J5=J4+34 jours		
J6=J5+29 jours	42/62 soit 67,74 %	

J0 = Jour de la vaccination contre la PPR

J1 = Jour de la première vaccination contre la peste bovine

J3 = Jour de la deuxième vaccination contre la peste bovine

J5 = Jour de la troisième vaccination contre la peste bovine

Tableau IX : Statut immunitaire des vaches après vaccination

Date	Nombre d'animaux positif à l'ELISA pour déterminer :	
	Les anticorps antibovipestiques	Les anticorps anti PPR
J0		
J0 + 4 semaines		
J0 + 5 semaines		
	80/99 soit 80,80 %	78/99 soit 78,78 %

J0 = Jour de la vaccination contre la PPR

J0 + 4 semaines = Jour de la vaccination contre la peste bovine

II - DISCUSSION

La discussion porte sur le matériel, les méthodes et les résultats.

1 - Matériel et méthode

1.1.- Matériel animal

- Cas des chèvres.

Nous avons utilisé les caprins pour l'inoculation du virus sauvage parce qu'ils sont plus sensibles à ce virus. Les signes cliniques de la PPR ont commencé à se manifester dès le deuxième jour après l'inoculation. La maladie a évolué entraînant la mort de certains animaux au bout d'une semaine. Cela a évidemment diminué le nombre d'échantillons prélevés.

Nous avons réalisé des pools d'échantillon pour chaque jour d'écouvillonnage. C'est le jour d'apparition du virus dans les sécrétions des muqueuses (nasales, oculaires, gingivales) qui nous intéressaient. Voilà pourquoi nous avons jugé plus rapide de rechercher ce virus dans un mélange des sécrétions oculaires ou nasales ou gingivales des six animaux du jour visé. Si le virus apparaît dans le pool du jour choisi, cela veut dire qu'à cette date le virus est apparu dans cette muqueuse chez au moins un animal du lot.

- Cas des bovins (vaches et veaux)

Les bovins sont issus du Ranch d'Irho Lamé. Nous avons travaillé avec 99 veaux et 99 vaches au départ. Les 99 veaux ont été testés et sont au départ tous négatifs en anticorps peste bovine. Ceci n'est pas le cas des vaches que nous n'avons pas pu tester.

Le nombre de veaux a ensuite diminué par suite de la vente de certains veaux par le propriétaire.

Le ranch est situé dans une ville éloignée du laboratoire. Il n'était donc pas facile de s'y rendre à tout moment. Il fallait un véhicule pour le déplacement et être sûre que le propriétaire n'a pas laissé les animaux aller brouter hors du Ranch. Le mieux était de prendre un rendez-vous avec lui pour aller faire les prises de sang ou les vaccinations.

Nous avons voulu connaître l'effet des anticorps anti-PPR sur le statut immunitaire des bovins vaccinés contre la peste bovine. C'est pourquoi nous avons fait une vaccination contre la PPR suivie d'une vaccination contre la peste bovine. L'analyse des serums nous a permis de déterminer le statut immunitaire des bovins en peste bovine.

Nous n'avons pas fait de témoins parce qu'il s'agit d'un travail préliminaire qui va nous permettre de mieux orienter l'expérimentation en tenant compte des facteurs individuels, de l'âge, de la race, des techniques de diagnostic.

1.2 - Méthodes

1.2.1 - Inoculation et RT-PCR

Nous avons choisi la RT-PCR parce que c'est une méthode d'analyse directe très sensible. Elle permet de déterminer la présence du virus par l'amplification de son ADN. Une infime quantité de virus peut être ainsi détecté. Les autres techniques d'analyse du virus sont en général des méthodes sérologiques. Elles ne visent pas directement l'entité virale mais plutôt ces effets tels que les anticorps produits, l'effet cytopathogène ou les réactions de précipitation. Nous avons travaillé avec des sécrétions muqueuses et la RT-PCR nous a permis de mettre en évidence la présence du virus dans ces sécrétions.

La RT PCR est une méthode certes fiable mais obéit à des règles de travail qui lorsqu'elles ne sont pas respectées peuvent conduire à des résultats faussement négatifs. Ce virus PPR est un virus à ARN. L'ARN se conserve à moins 70°C. La manipulation des échantillons d'ARN à une température plus élevée peut conduire à la destruction des ARN. De plus les ARNases que nous portons sur nos mains peuvent également détruire les ARN si on oublie de porter les gants pendant la manipulation.

L'inoculation par la voie nasale et sous-cutanée est bien indiquée pour le passage du virus dans les voies lymphatiques puis dans le sang.

1.2.2 - L'ELISA

C'est une méthode bien indiquée pour rechercher les anticorps antibovipestiques, anti-PPR dans les sérums prélevés. Son exécution s'est bien déroulée. Cependant il semble que les kits actuellement disponibles ne donnent pas entière satisfaction car si les uns sont très sensibles, ils sont peu spécifiques, tandis que les autres sont très spécifiques mais peu sensibles.

2 - Résultats

2.1 - Liés à l'inoculation

2.1.1 - Expression clinique

Les signes cliniques observés après inoculation des caprins sont bien ceux de la PPR décrits par plusieurs auteurs (LEFEVRE, 1982 ; GNAGNA, 1976). Les animaux inoculés ont fait les trois formes de la PPR. Il s'agit des formes aiguë, suraiguë et subaiguë.

2.1.2 - Excrétion du virus PPR (Déteectée par la RT-PCR)

Dans nos résultats, le virus de la PPR apparaît dans les sécrétions 6 à 8 jours (en moyenne une semaine) après inoculation. Ce délai est plus précis et plus précoce que celui trouvé par JOHNSON et coll. cités par LEFEVRE (1982). En effet ces auteurs estiment cette période entre 5 à 10 jours après culture cellulaire de prélèvement de mucus nasal et oculaire.

Le virus est excrété beaucoup plus précocement après inoculation par la voie sous-cutanée que par la voie nasale. Ceci serait dû au fait que le virus gagne plus rapidement le système lymphatique puis le sang par cette voie.

Le virus une fois apparu doit être constamment présent pendant un certain temps dans les muqueuses et disparaître pour de bon. L'irrégularité des résultats (positifs et négatifs) peut s'expliquer par les contaminations des échantillons par les RNase ou d'une conservation des échantillons à une température inadaptée. Ces résultats négatifs juste après les résultats positifs peuvent être considérés comme faussement négatifs.

2.2 -Liés à la vaccination (Test ELISA)

Les veaux ont d'abord été soumis au test ELISA pour la détection des anticorps anti-bovipestiques. Les résultats ont montré qu'ils ont perdu leurs anticorps d'origine maternelle.

Les deux premiers résultats de 19,32 % et de 38,35 % nous montrent que les taux d'anticorps antibovipestiques des veaux portants des anticorps anti-PPR sont faibles. Cette faible prévalence en anticorps bovipestiques laisse supposer que :

- les anticorps anti-PPR ont complexés les antigènes peste bovine inoculés et ceci jusqu'à leur épuisement. Dans ce cas, nous aurions dû titrer les anticorps anti-PPR en même temps que les anticorps peste bovine ;
- les réponses spécifiques aux antigènes peste bovine ne soient pas encore complètes car après inoculation, les animaux réagissent d'abord contre des antigènes communs (protéine P) aux virus peste bovine et PPR avant de réagir contre les épitopes spécifiques (protéine F) situés plus profondément dans les virus.

Dans ces conditions, nous aurions dû avoir des témoins qui n'aient pas reçu de vaccin anti peste bovine ou seulement qui aient reçu une ou deux inoculations du vaccin anti peste bovine.

On peut déduire que les anticorps anti-PPR des veaux influencent négativement la production des anticorps anti-bovipestiques. D'où l'importance du facteur âge

En ce qui concerne les vaches, nous avons un taux de couverture de 80,80 % en peste bovine après une vaccination contre la PPR suivie de la vaccination contre la peste bovine. Nous ne pouvons malheureusement pas apprécier ce résultat à sa juste valeur en l'absence d'éléments de comparaison car n'ayant pas titré les anticorps anti-peste bovine des vaches dès le départ, ni gardé des témoins.

Les résultats obtenus avec les veaux confirment les travaux de ANDERSON et McKAY (1994) sur la détection des anticorps anti-PPR chez les bovins, les moutons, les chèvres et l'influence de ce virus sur la vaccination anti-bovipestique. Il ressort de ces travaux que les sérums de bovins possédant des anticorps anti-PPR produisaient un faible taux d'anticorps antibovipestiques.

Les résultats que nous avons obtenus à la fin de nos travaux ne manquent pas d'applications sur le plan épidémiologique, prophylactique, économique et commercial.

CHAPITRE III : CONSEQUENCES ET APPLICATIONS

I - DU POINT DE VUE EPIDEMIOLOGIQUE

L'étude de la période d'excrétion du virus nous apprend que dans un milieu infecté de PPR, les animaux malades et contaminés commencent à excréter le virus dans les larmes, le jetage et la salive au bout du sixième jour après l'infection. C'est aussi en ce moment qu'ils deviennent contaminant pour les autres petits ruminants.

Ces virus PPR, lorsqu'ils sont présents chez des veaux dépourvus d'anticorps colostraux anti-bovipestiques, contribuent à baisser la production d'anticorps anti-bovipestiques chez ces veaux. Ces derniers se retrouvent sous la menace d'une éventuelle contamination par le virus pestique.

II - SUR LE PLAN PROPHYLACTIQUE

1 - Prophylaxie médicale

En zone d'endémie de PPR avant la vaccination de jeunes bovins ne possédant pas d'anticorps bovipestiques, il faut s'assurer qu'ils n'ont pas non plus un support immunitaire en anticorps anti-PPR. En effet les anticorps anti-PPR chez ces animaux risquent de baisser le taux de protection contre le virus de la peste bovine. Tout laisse à croire que les anticorps anti-peste bovine n'atteindraient un niveau appréciable que plusieurs mois après la vaccination.

Les petits ruminants vivants au contact des jeunes bovins doivent être vaccinés contre la PPR afin qu'ils ne tombent pas malades. Ainsi des petits ruminants sains ne risquent pas de sécréter des virus PPR susceptibles de contaminer les jeunes bovins et de provoquer chez ces derniers une apparente faible protection contre la peste bovine.

2 - Prophylaxie sanitaire

Lors d'une épidémie de peste des petits ruminants, on peut déjà avoir une idée sur la période à laquelle les petits ruminants contaminés peuvent être infectants. Cela facilite la circonscription du foyer et la mise en place des moyens pour limiter la propagation de l'infection.

Pour des jeunes bovins soumis à une vaccination régulière contre la peste bovine il faut éviter de les mettre en contact avec des petits ruminants non protégés contre la peste des petits ruminants.

III - SUR LE PLAN ECONOMIQUE ET COMMERCIAL

Des jeunes bovins en contact avec des petits ruminants (non protégés contre la PPR) ne doivent pas faire l'objet de campagne de vaccination contre la peste bovine car ils risquent d'être porteurs du virus PPR, ce qui donnerait des résultats pas très satisfaisants.

Aussi connaissant la période d'excrétion du virus PPR chez les petits ruminants on pourrait savoir si tel ou tel autre animal vivant au contact d'un animal malade ou infecté est à son tour déjà infecté ou pas. Par conséquent le propriétaire informé de la question saura que des animaux infectés faisant une infection inapparente ne peuvent pas être vendus. Des jeunes bovins vivant en contact avec des petits ruminants, devraient avant d'être vendus, être soumis à une vérification de leur immunité anti-bovipestique quand bien même, leur vaccination anti-bovipestique serait à jour.

Tout cela contribue à une meilleure prophylaxie sanitaire.

En conclusion nous recommandons que ces travaux puissent être complétés par des travaux plus fins en tenant compte des facteurs individuels, de l'âge, des techniques de diagnostic. Ainsi nous recommandons que les travaux de la RT PCR puissent être repris par la méthode de la Nested PCR (double PCR) et par la sonde. Il s'agit de méthode beaucoup plus précise que la RT PCR tout court. Elles permettent de détecter les quantités

les plus infimes d'ADN dans un échantillon et par conséquent de nous éclairer sur les aspects négatifs de nos résultats. Nous proposons également de rechercher la présence du virus chez chaque animal en lieu et place des pools que nous avons faits. Et aussi de mettre des animaux sains au contact des animaux inoculés ; ainsi on pourrait à la fois déterminer la période d'excrétion du virus PPR et le moment où les animaux sains sont effectivement contaminés.

En ce qui concerne les bovins, nous recommandons d'améliorer le travail en faisant parallèlement des témoins.

CONCLUSION GENERALE

La peste bovine et la peste des petits ruminants (PPR) sont deux maladies infectieuses, inoculables et cliniquement graves. Elles constituent une menace constante pour le cheptel bovin, ovin, et caprin des pays africains. La peste bovine est aujourd'hui en train d'être éradiquée dans certains pays africains grâce aux énormes progrès réalisés par le PARC (Panafrican Rinderpest campaign ou Campagne panafricain de lutte contre la peste bovine). En revanche la PPR est quasi présente sur le continent, s'exprimant par des flambées d'épizootie.

La transmission naturelle du virus PPR aux bovins et du virus peste bovine aux petits ruminants est possible. Cette situation est souvent observée dans le contexte de l'élevage du cheptel africain où les bovins sont en contact étroit avec les petits ruminants.

Si le début de la période d'excrétion du virus peste bovine a fait l'objet de nombreuses études, il n'en est pas de même pour celui de la PPR dont l'analyse par la PCR fait l'originalité de notre travail.

Cette étude a été menée au Laboratoire de Pathologie Animale de Bingerville en Côte d'Ivoire.

La période du début d'excrétion du virus PPR a été déterminée sur deux lots de six caprins de race Djallonké. L'un inoculé par la voie nasale, l'autre par la voie sous-cutanée.

Ces caprins ont été inoculés avec le virus sauvage PPR-CI (PPR Côte d'Ivoire) et des écouvillons nasaux, oculaires et gingivaux ont été réalisés chaque jour jusqu'à la mort des animaux. L'analyse de ces écouvillons par la RT-PCR montre que c'est au 6^e jour après inoculation par la voie sous-cutanée et au 8^e jour après inculcation par la voie nasale que les petits ruminants atteints de PPR deviennent contaminants pour les autres animaux sensibles.

L'influence du virus PPR sur la vaccination anti-bovipestique a été appréciée sur des sérums de veaux de six à douze mois d'âge et des vaches de plus de deux ans d'âge, de

race N'dama, à partir de la technique ELISA. En effet ces bovins ont subi une vaccination contre la PPR suivie d'une vaccination contre la peste bovine avec un intervalle de deux à cinq semaines. L'analyse des sérums après la vaccination contre la peste bovine montre que les anticorps anti-PPR, influencent négativement la prévalence en anticorps anti-bovipestiques chez les veaux soit à cause de la neutralisation des antigènes peste bovine, soit à cause de l'apparition tardive des anticorps spécifiques peste bovine.

Nous avons effectué là un travail préliminaire qui a un intérêt pratique. En effet l'influence des anticorps anti-PPR sur la vaccination antibovipestique peut aider à expliquer certaines insuffisances observées lors des campagnes de vaccination contre la peste bovine. Par conséquent il faut prendre des dispositions pour apprécier plutôt la réponse immunitaire post-vaccinale. Cette étude tout comme la celle de la période du début d'excrétion du virus PPR, a des applications sur le plan épidémiologique, prophylactique, économique et commercial.

Au regard de ce qui précède une étude plus fine doit être menée ultérieurement pour mieux apprécier la diffusion du virus PPR dans les muqueuses externes des petits ruminants et l'influence de ce virus sur la vaccination antibovipestique. Cette étude devra tenir compte des facteurs individuels, de l'âge, de la race, et des techniques de diagnostic.

Enfin nous recommandons que les recherches sur ces deux maladies puissent continuer jusqu'à leur éradication complète.

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSON E. C. ; HASSAN A. ; BARRETT T. ; ANDERSON J. (1990)

Observations on the pathogenicity for sheep and goats and the transmissibility of the strain of virus isolated during the rinderpest outbreak in Sri-Lanka in 1987.

Vet. Microbiol. virus ., **21**: 309-318.

ANDERSON J. ; McKAY J. A. (1994)

The detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats the possible implication to rinderpest control programmes.

Epidiol. Infect. , **112**: 225-235.

BARRETT T; GRAHAM J. ; BELSHAM J. ; SHAILA M. S. ; EVANS S. A. (1989)

Immunization with a vaccinia recombinant expressing the F protein protects rabbits from challenge with a lethal dose of rinderpest virus.

Virology: **170**, 11-18.

BOURDIN P. ; LAURENT A. (1972)

Etat actuel des recherches sur la prophylaxie médicale de la peste des petits ruminants (PPR).

40^e session O.I.E., Paris, (Rapport n° 200).

BOURDIN P. ; LAURENT -VAUTIER A. (1967)

Note sur la structure du virus de la peste des petits ruminants.

Rev. E lev. Méd. Vét. Pays Trop., **20** : 383-386.

BOURDIN P. ; RIOCHE M. ; LAURENT A. (1969)

Emploi d'un vaccin anti-bovine produit sur cultures cellulaires dans la prophylaxie de la peste des petits ruminants au Dahomey-Note préliminaire.

Rev. Elev. Méd. Pays Trop. , **23**: 295-300.

COUACY-HYMAN. E. (1994)

La Lutte contre la peste bovine en Côte d'Ivoire. Coûts et bénéfices des campagnes de prophylaxie. Problèmes posés pour son éradication.

Th:Doct. Sciences: Université Paris 12.

CURASSON G. (1932)

La peste bovine

Paris:Vigot

CURASSON G. (1942)

Traité de pathologie exotique vétérinaire et comparée,

Tome I: Maladies à ultra- virus: 2^{ème} éd.- Paris: Vigot frères.365 p.

FANCKI R. I. B. ; FAUQUET C. M. (1994)

Classification et Nomenclature des virus.

Berlin: Springer-Verlag. 420 p.

FAROUGOU S.(1998)

Contribution à la connaissance de la cowdriose des ruminants.

Th: Doc. 3e cycles Sciences: Université Dakar.

GIAVEDONI L.; JONES L. ; MEBUS C. ; YILMA T. (1991)

A vaccinia virus double recombinant expressing the F and H genes of rinderpest virus

protects cattle against rinderpest and causes no pock lesion.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**: 8011-8015.

GILBERT Y. ; MONNIER J. (1962)

Adaptation du virus de la peste des petits ruminants aux cultures cellulaires.

Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop., **15**: 321-335.

GNAGNA K.P. (1976)

Contribution à l'étude de la peste des petits ruminants au Togo.

Th. Méd. Vét: Dakar; 10.

JACOTOT H. ; MORNET P. (1967)

La peste bovine

Paris:L'expansion, Paris- 174p.

JONSHON A. D. (1958)

An outbreak of rinderpest involving cattle and sheep.

Vet. Rec.,**70**: 457-461.

JOHNSON R. H. (1968)

A virus associated with pseudo-rinderpest in Nigerian dwarf goats.

Bull. Epizoot. Dis. Afr. ,**16**: 411-417.

KAPLAN J. C. ; DELPECH M. (1993)

Biologie moléculaire et médecine, 2^{ème} éd

Paris: Flammarion Médecine-sciences.- 789 p.

**LABORATOIRE DE L'ELEVAGE ET DE RECHERCHES VERINAIRES
(1958-1975)**

Sénégal; Dakar:Rapports

LABORATOIRE DE FARCHA(1965-1975)

Tchad ; N'djamena : Rapports

LAURENT A.(1968)

Aspects biologiques de la multiplication du virus de la Peste des Petits Ruminants sur cultures cellulaires.

Rev. Elev. Méd. Pays Trop., **21**: 297-306.

LEFEVRE P.C. (1982)

Peste des petits ruminants et infection bovinepestique des ovins et caprins.

Maison-Alfort: I.E.M.V.T. -95 p.

LEFEVRE P.C.(1987)

Peste des petits ruminants et infection bovinepestique des ovins et caprins .

Maison - Alfort:I.E.M.V.T. 99 p.(Etude et synthèses)

LIBEAU G. ; SCOTT G. R.(1960)

Rinderpest in Eastern-Africa today.

Bull. epiz. Dis. Afr., **8**: 23-26.

MANN E. ; ISOUN T.T. ; FABIYI A. et coll. (1974)

Experimental transmission of the stomatitis pneumo-enteritis complex to sheep and goats.

Bull. Epizoot. Dis. Afr., **22** : 99-103.

MBA BEKOUNG P. 1997

Contribution à l'étude de la P.P.R. au Gabon.

Etude clinique et sérologique.

Th. Méd. Vét. : Dakar ; 20

**MARINER J. C. ; HOUSE J. A. ; SOLLOD A ; STEM C.; van DEN ENDEE M. ;
MEBUS C. A. (1990a)**

Comparison of the effect of various chemical stabilizers and lyophilization cycles on the thermostability of a Vero cell-adapted rinderpest vaccine.

Vet. Microbiol.21: 195-209.

**MARINER J. C. ; VAN DEN ENDEE M. ; HOUSE J. A. ; MEBUS C. A. ;
SALIFOU S. ; STEM C. (1990b)**

The serological response to a thermostable Vero cell-adapted rinderpest vaccine under field conditions in Niger.

Vet.Microbiol., 22: 119-127.

MARINER J. C.; HOUSE J. A. ; MEBUS C. A. ; van DEN ENDE M.C.(1993)

The use of thermostable Vero cell-adapted rinderpest vaccine as a heterologous vaccine against peste des petits ruminants.

Res. vet. Sci.,54:212-216.

MORNET P. ; ORUE J. ; GILBERT Y. ; THIERY G. ; MAMADOU S. (1956)

La peste des petits ruminants en Afrique Occidentale française , ses rapports avec la peste bovine.

Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop., 9: 313-342.

MULLIS K. (1990)

L'invention insolite de l'amplification des gènes.

Pour la science, **152** : 45-53

NAKAMURA J. ; MOTOHASHI T. ; KISHI S.(1958)

Propagation of the lapinised avianized of rinderpest virus in the culture of dricken embryo tissue

Am. J. vet. Res. , **19** : 174

O.I.E (1996)

Manual of standards for diagnostic Tests and vaccines. 723p.

PLANTON H.(1990)

Role of wilde life and small ruminant in the epidemiology of rinderpest.

Final report. Panafrican Rinderpest Campaign/EEC. DG V III, 30p.

PLOWRIGHT W. ; FERRIS R.D. (1957)

Cytopathogenicity of rinderpest virus in tissue culture.

Nature. **179** : 316.

PLOWRIGHT W. ; CRUICKSHANK J. G. ; WATERSON P.(1962)

The morphology of rinderpest virus.

Virology. **17** : 118

PLOWRIGHT W. (1968)

Rinderpest Virus. Spring- Verlag,

Wien, New-York, Virology Monographs, **3** : 52-110

PROVOST A .(1966)

Connaissances acquises récemment sur la peste bovine et son virus.

Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Tropic. , 19: 365

PROVOST A. (1972)

Transmission de la peste bovine par des veaux possédant une immunité maternelle résiduelle.

Rev. Elev. Méd. Pays trop. , 25: 155-159.

PROVOST A. ;BORREDON C. (1974)

Un vaccin mixte antibovipestque-antipéripneumonique lyophilisé utilisable sur le terrain sans réfrigération.

Rev. Elev.Méd.Vét. Pays Trop. ,27:251-263.

PROVOST A.(1982)

Bases scientifiques et techbiques de l'éradication de la peste bovine en Afrique intertropicale.

Revue Sci. tech. Off. int. Epiz., 3: 589- 618.

RÖHRER H. (1971)

Traité des maladies à virus des animaux :

Tome III/I,Paris: Vigot frères.- 543 p.

**ROMEO C. H. ;BARRETT T. ; EVANS S. A. ; KITCHING R.P. ; GERHON P.D. ;
BOSTOCK C.; BLACK D. N. (1993)**

Single capripoxvirus recombinant vaccine for the protection of cattle against rinderpest and lumpy skin disease.

Vaccine, 11: 737-742.

ROSSITER P. B. ; JESSETT D. M. (1982)

Microtitre technique for the assay of rinderpest virus neutralizing antibody.

Res.Vet. Sci. **32**: 253-256.

ROSSITER P. B. ; JESSETT D. M. ; TAYLOR W. P.(1982)

Neutralising antibodies to rinderpest virus in sheeps and goats in Western Kenya.

Vet ;Rec., **111**: 504-505.

SCOTT G. R. ; TAYLOR W. P. ; ROSSITER P. B.(1986)

Manuel de diagnostic de la peste bovine.

FAO, Production et santé animale .- Rome. 215p.

**SHAILA M. S. ; PURUSHOTHAMAN V.; BHAVASAR D. ; VENUGOPAL K;
VENKATESAN R. A.(1989)**

Peste des petits ruminants of sheep in India.

Vet. Rec; ,**125**: 602.

SCOTT G.R. ; Mac DONALD J. (1962)

Kenyas cameln and rinderpest.

Bull. Epiz. Diss. Afr., **10** : 495.

SHOPE E. ; GRIFFITHS H.J. ; JENKINS D.L. (1946)

The cultivation of rinderpest virus in the developing hen's egg.

Am. J. vet. Res., **7** : 135.

STODDART H. L. (1964)

Rapport au Gouvernement du Cambodge sur la Campagne de lutte contre la peste bovine.

Rome : F.A.O., rapport ETAP. n°1749

TRAORE K. ; YO T.(1997)

Développement des productions d'élevage en Côte d'Ivoire: situation actuelles et principales contraintes: séminaire sur l'étude des contraintes au développement des productions animales en Afrique Sub-Saharienne, E.I.S.M.V. Dakar

Abidjan 18-21 Fevrier 1997.

TAYLOR W.P. (1979)

Serological studies with the virus of "peste des petits ruminants" in Nigeria.

Res. vet. Sci., 27 : 321-324.

ANNEXES

ANNEXE 1 : LES TECHNIQUES D'AMPLIFICATION ELECTIVE IN VITRO (PCR, ETC.)

**EXTRAIT DE : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET MEDECINE 2EME EDITION ECRIT PAR
KAPLAN ET COLL. (1993)**

I - PRINCIPE DE LA TECHNIQUE PCR

L'une des propriétés de toutes les DNA polymérase est de ne pouvoir synthétiser le brin complémentaire qu'à partir d'une amorce. Cette propriété, qui complique considérablement pour la cellule le processus de la réplication, est indispensable à la stabilité de l'information cellulaire. En effet, s'il suffisait que le DNA soit sous forme simple brin pour qu'il soit répliqué, de nouvelles séquences, plus ou moins longues et initiées de manière aléatoire, ne cesseraient d'être synthétisées (par exemple au cours de la transcription) et de s'accumuler au cours de la vie de la cellule. Cette propriété des DNA polymérase est mise à profit dans la technique PCR pour amplifier, par réplifications successives, la séquence désirée. Il suffit pour cela de choisir des amorces oligonucléotidiques synthétiques capables de s'hybrider à ses bornes et de réaliser les réplifications qui assureront la multiplication de la séquence encadrée par les amorces. Pour pouvoir réaliser cette opération il est donc indispensable d'avoir une connaissance préalable de la séquence que l'on souhaite amplifier. Le nombre de copies de la séquence choisie est doublé à chaque réplification. Son augmentation est donc exponentielle. Après 30 cycles on obtient en moyenne une amplification de 106. Si l'on est parti de 1 picogramme de cible contenu dans 1 microgramme de DNA génomique total, on récupère 1 microgramme de cible amplifiée. Ce qui est plus de 100 fois supérieur au seuil de détection par simple coloration au bromure d'éthidium. De plus, la taille du segment amplifié est toujours considérablement plus faible que celle du DNA de départ. Il est donc très facile de les séparer, même par des techniques grossières. Il s'agit donc pratiquement d'un clonage acellulaire.

II - REALISATION PRATIQUE (Figure 9)

Le DNA contenant le segment à amplifier est chauffé à une température supérieure à sa T_m (dans la pratique une température de 94-95°C) en présence des composants nécessaires à la réplication (voir plus loin leur description). Cette température est maintenue entre trente secondes et une minute. Elle est ensuite abaissée à une valeur inférieure à la T_m de l'amorce possédant la plus faible T_m , afin que les amorces puissent s'hybrider avec le DNA dénaturé. Dans la pratique, cette température est comprise entre 40 et 70°C ; elle est maintenue entre trente secondes et une minute. On augmente ensuite la température à 72°C afin de permettre à la DNA polymérase (thermostable) de répliquer le DNA dans les conditions optimales. Bien que cette température soit habituellement supérieure à la T_m des amorces, celles-ci ne se déshybrident pas. En effet, même s'ils sont rapides, les changements de température ne sont pas immédiats, ce qui permet à la polymérase de commencer l'élongation des amorces avant que les 72°C ne soient atteints. Le fragment synthétisé est alors suffisamment long pour que sa T_m soit supérieure à 72°C. La durée de cette étape est fonction de la longueur de la séquence à amplifier ; elle est en général comprise entre trente secondes et une minute (fragments de 0,2 à 1 kb). Des durées de plusieurs minutes peuvent cependant être nécessaires pour les fragments plus longs (2 à 3kb).

Ces trois étapes (dénaturation, hybridation, élongation) constituent un cycle au cours duquel la quantité de DNA cible a été doublée. Ces cycles sont renouvelés entre 20 et 50 fois suivant la quantité de cible de départ et le but poursuivi. Il est inutile de trop augmenter le nombre de cycles, car l'amplification cesse d'être exponentielle après 15 à 20 cycles, et atteint ensuite rapidement un plateau. En fait celui-ci est atteint d'autant plus tôt que la quantité de DNA cible de départ est plus importante. Les raisons de l'infléchissement de la courbe sont multiples. Entre autres on peut citer la dimérisation des amorces, l'apparition de sous-produits de réaction ayant un pouvoir inhibiteur (pyrophosphate), l'épuisement et la dénaturation des composants de la réaction et la compétition entre les amorces et les fragments de DNA amplifié qui peuvent s'hybrider entre eux ou avec la cible plutôt qu'avec les amorces, et ce d'autant plus que leurs concentration varient en sens inverse au cours de la réaction. Quelques

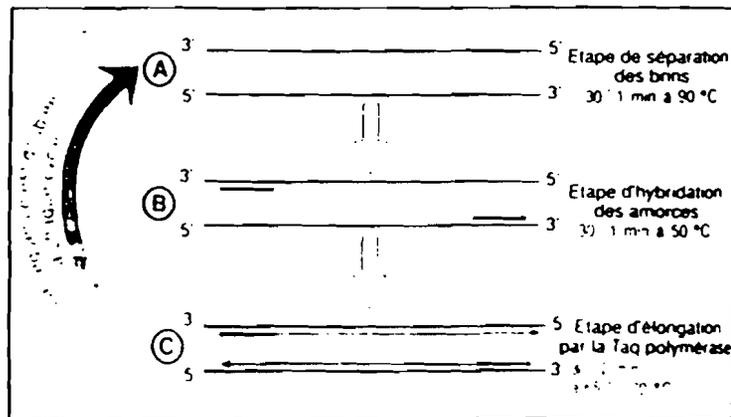
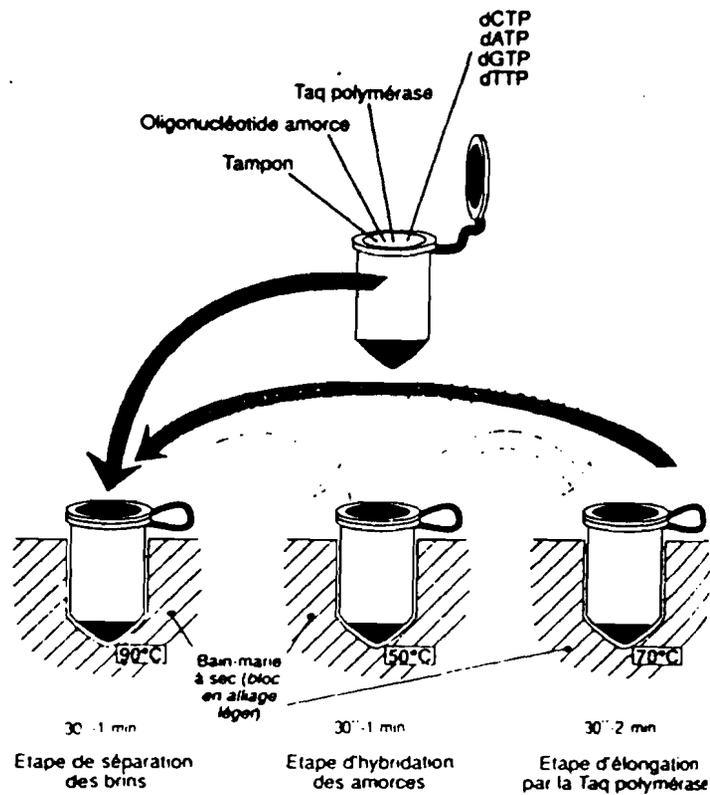


Figure 9 La technique d'amplification (PCR)
 Le DNA contenant la séquence à amplifier (A) est chauffé à 90 °C afin de séparer les deux brins. Puis, après refroidissement à 50 °C (cette température est en fait fonction de la séquence des amorces utilisées) s'hybrident avec les amorces (B), constituées d'oligonucléotides de 20 à 25 bases s'hybridant parfaitement avec les extrémités 3' de la portion de séquence à amplifier. La Taq polymérase (DNA polymérase thermostable) synthétise le brin complémentaire à partir de ces amorces (C). Le nombre de copies de la séquence a été doublé en 6 min. Le même cycle est répété autant de fois que nécessaire. Dans la pratique le nombre de cycles est d'environ 30.

valeurs du nombre optimal de cycles en fonction du nombre de copies de départ sont données dans le tableau

Tableau X : Nombre de cycle à réaliser en fonction du nombre de copies de la cible à amplifier présent dans l'incubation

Nombre de copies de la cible	Nombre de cycles
10^5	25 à 30
10^4	30 à 35
10^2 à 10^3	35 à 40
1 à 10^2	40 à 45

De manière théorique, le nombre de copies obtenues devrait être de 2^n , n étant le nombre de cycles. Dans la pratique, le rendement est beaucoup plus faible, d'une part pour les raisons qui viennent d'être évoquées, d'autre part parce que le rendement à chaque étape est loin d'être de 100 p.100 : il est d'environ 85 p.100. Le nombre de copies, si le rendement reste constant tout au long de l'amplification, est de $(1+R)^n$, R étant le rendement et n le nombre de cycles.

III - LES COMPOSANTS DE LA REACTION ET LEUR INFLUENCE SUR L'AMPLIFICATION

Les résultats d'une amplification PCR sont largement fonction du milieu réactionnel et de la concentration de chacun des composants. Les conditions optimales ne peuvent pas être prévues à l'avance, elles doivent être déterminées par tâtonnement. L'écueil le plus fréquent est l'amplification parasite de séquences autres que celle désirée.

1 - Le DNA

Les meilleurs résultats sont obtenus avec du DNA parfaitement purifié, exempt de protéines et de RNA. Une trop grande quantité de RNA contaminant entraîne une diminution du rendement (hybridation RNA amorces, hybridation RNA-DNA) et une augmentation des amplifications parasites. Il est cependant souvent possible d'obtenir des amplifications satisfaisantes à partir de DNA non purifié. Pour le diagnostic, une technique très simple a été proposée. Il consiste à utiliser 200 µl de sang prélevé au bout du doigt avec un capillaire. Ce sang est ensuite scellé et porté à 100°C. Après centrifugation, le surnageant peut être directement utilisé comme source de DNA pour l'amplification.

Au début de l'utilisation de la PCR la quantité de DNA utilisée par amplification était de 1 µg. La tendance est de réduire cette quantité. Les PCR sont maintenant souvent réalisés avec 100 ng de DNA. Cette diminution a pour effet d'augmenter le rendement des PCR et de diminuer les amplifications parasites.

Enfin il est possible de réaliser des amplifications à partir d'échantillons de cellules conservées à l'état sec : par exemple à partir des taches de sang sur papier ayant servi au dépistage néonatal de la phénylcétonurie (test de Guthrie) ; à partir de coupes histologiques incluses dans la paraffine ; à partir de cheveux, voire même de momies ou de fossiles. Il est ainsi possible d'effectuer rétrospectivement des études génétiques (recherche de maladies, évolution, etc.).

2 - Enzyme

La première enzyme utilisée a été le fragment de Klenow de la DNA polymérase I. Les inconvénients étaient multiples : nécessité d'ajouter de l'enzyme à chaque cycle (l'enzyme étant détruite à chaque cycle par l'étape de dénaturation) ; température d'hybridation des amorces n'excédant pas 37°C, ce qui favorisait de nombreuses hybridations non spécifiques, génératrices d'amplifications parasites ; constitution de structures secondaires après séparation des brins du DNA qui pouvaient aller jusqu'à empêcher le passage de la polymérase et donc l'amplification.

Tous ces inconvénients ont disparu avec l'utilisation d'une polymérase thermostable, la Taq polymérase, extraite d'une bactérie vivant dans les sources thermales (80-90°C) : *Thermus aquaticus*. Les quantités optimales d'enzyme sont comprises entre 1 et 2,5 U pour une incubation et 50 à 100 μ l.

Une amplification en deux étapes a été aussi proposée. Dans une variante les amorces sont choisies de manière que leur T_m soit supérieure à la température d'élongation. Le cycle est alors composé de deux étapes : dénaturation et hybridation-élongation.. Les rendements ne sont optimum dans cette variante que si la concentration de l'enzyme est augmentée d'un facteur 10.

D'autres polymérase thermostables ont été proposées, par exemple celles extaites de *Bacillus steatothermophilus*, d'autres espèces de *Thermus* ou d'archéobactéries. Bien que décrites depuis quelques années, ces polymérases n'ont pas encore eu d'application importante.

3 - Les nucléotides

Les premières amplifications par PCR utilisaient le fragment de Klenow de la DNA polymérase 1 et une concentration de chaque nucléotide de 1,5 mM. Cette concentration fut conservée lors de l'introduction de la Taq polymérase. Là encore la tendance a été de baisser les concentrations, car plus la concentration en nucléotides est élevée plus on observe d'amplifications parasites, et plus la polymérase commet d'erreurs de réplication. Les concentrations utilisées actuellement sont comprises entre 20 et 200 μ M. Les concentrations de chacun des nucléotides doivent être équilibrées même si le DNA à amplifier possède une composition en base particulière. Le déséquilibre dans la concentration des différents nucléotides augmente le taux des erreurs commises par la polymérase. Théoriquement une concentration de 20 μ M pour chaque nucléotide permet de synthétiser 2,6 μ g de DNA.

4 - Les amorces et leur température d'hybridation

Les amorces doivent avoir une T_m d'au moins 5°C au-dessus de la température utilisée pour l'hybridation. Plus cette valeur sera élevée, plus l'amplification sera spécifique. Ses valeurs comprises entre 55 et 70°C donnent les meilleurs résultats. Les concentrations d'amorces habituellement utilisées sont comprises entre $0,1$ et $0,2 \mu\text{M}$.

Le choix des amorces est une étape importante lors de la mise au point d'une PCR. Plusieurs critères sont impératifs et doivent être pris en compte. La séquence des amorces ne doit pas permettre la formation d'épingles à cheveux, ni d'hybrides entre amorces (amorce 5'/amorce 3', amorce 5'/amorce 5', amorce 3'/amorce 3'). Il est préférable que la composition en bases soit équilibrée (éviter les longues répétitions de CG) et que les T_m de deux amorces ne soient pas trop différentes l'une de l'autre. Enfin les séquences choisies ne doivent pas correspondre à des séquences génomiques répétées. Ce choix des amorces optimales est trop complexe pour être réalisé à la main, il existe maintenant des programmes informatiques qui permettent d'optimiser les choix. L'un des plus utilisés est le programme OLIGOR qui tourne sur IBM PC ou compatibles et depuis peu sur Macintosh. Une fois les meilleurs oligonucléotides choisis il est possible de comparer leurs séquences avec les séquences connues contenues dans les banques de données afin d'éliminer les amplifications parasites dues aux homologies de séquences. Enfin la taille du fragment qui sera amplifié ne doit pas être trop grande, les meilleurs résultats étant obtenus pour des tailles inférieures à 800 paires de bases.

5 - La concentration en ions magnésium

La concentration en ions magnésium est un facteur critique dans l'amplification. Le magnésium est nécessaire à la fois pour stabiliser les nucléotides et pour la réaction. Les concentrations optimales sont en général comprises entre $0,5$ et $2,5 \text{ mM}$ en plus de ce qui est nécessaire pour les nucléotides (concentrations stoechiométriques entre Mg^{++} et nucléotides). Il existe cependant des exceptions, principalement lorsque le fragment amplifié est de très grande taille (1 à 3 kb). Il convient tout

particulièrement de faire attention à équilibrer la concentration du magnésium en fonction de la présence de chélateurs comme l'EDTA qui peut être apporté avec le DNA (en général rajouté pour inhiber la dégradation du DNA par les DNases contaminantes). Les concentrations optimales ne peuvent être déterminées que par tâtonnement.

6 - Les autres composantes de l'incubation

Comme dans toute réaction biochimique, le pH doit rester constant et correspondre au pH optimal de l'enzyme utilisée. Pour la Taq polymérase on utilise généralement des concentrations de 10 à 50 mM de tampon Tris-HCl à un pH compris entre 8,3 et 8,8.

La température d'hybridation des acides nucléiques est fonction de la concentration en sel. Une augmentation de la concentration facilite l'hybridation et stabilise les hybrides. D'un autre côté une haute force ionique inhibe la polymérase. La concentration optimale ne peut donc que résulter d'un compromis. En pratique on utilise du KCl à une concentration de 50 mM.

Lorsque les séquences sont riches en GC, il existe un risque que se forme des structures secondaires lorsque le DNA est refroidi après sa dénaturation. Pour empêcher la formation de ces structures secondaires il est possible d'utiliser du diméthylsulfoxyde (DMSO), en général à une concentration de 10 p.100 (du volume de l'incubation). Cette addition présente cependant l'inconvénient d'inhiber fortement la polymérase (d'environ 50 p.100). Dans le même but il est possible de remplacer le dGTP par du 7-aza dGTP.

Enfin il a été montré que l'addition de formamide à faible concentration (quelques mM) diminuait fortement les amplifications parasites.

7 - L'équipement nécessaire

L'amplification par PCR ne nécessite que des variations rapides de températures (en général trois températures différentes), une précision de 0,5 à 1°C à chaque étape étant suffisante. Les premières PCR étaient réalisées manuellement, en utilisant trois

bains-marie à sec. Depuis, de nombreux appareils ont été mis sur le marché. Le système de chauffage est en général constitué d'une résistance chauffante, un appareil utilise une lampe à halogène. Les systèmes de refroidissement sont plus variés. Le plus simple est constitué d'un simple ventilateur (il ne permet pas de descendre à une température inférieure à la température ambiante), d'autres utilisent le refroidissement par l'eau, par des systèmes à effet Peltier, ou par des groupes à fréons comme ceux utilisés dans les réfrigérateurs. Dans tous les appareils un système à microprocesseur assure le contrôle programmable de la température et de ses variations. Certains peuvent être équipés d'une sonde de température intégrée dans un tube de PCR, est ainsi possible de suivre la température régnant réellement au sein du tube et de tenir compte ainsi de l'inertie thermique de la paroi du tube.

D'une manière générale les paramètres de la PCR peuvent varier d'un type d'appareil à l'autre. De ce fait, il est préférable que tous les appareils d'un même laboratoire soient du même type. Les tubes utilisés doivent impérativement être toujours les mêmes. Les différences de résultats entre appareils proviennent le plus souvent de la différence d'inertie thermique des tubes utilisés et surtout du contact entre le tube et le système de chauffage. Toute mauvaise adaptation entre la forme du tube et la forme du trou dans le bloc chauffant peut entraîner des variations de plusieurs degrés au sein du tube. De nouveaux appareils ont fait leur apparition sur le marché, ils sont équipés de plusieurs blocs chauffant réglables de manière indépendante. Il est ainsi possible de réaliser, en même temps, plusieurs PCR nécessitant des conditions expérimentales différentes. Certains appareils permettent aussi d'utiliser des plaques de microtitration (96 puits).

IV - LES LIMITES DE LA TECHNIQUE PCR

La première limite est celle de la taille de la séquence que l'on souhaite amplifier. L'expérience montre qu'il n'est guère possible, sauf cas très exceptionnel, d'amplifier des séquences dont la longueur est supérieure à 3 kb. Jusqu'à 1 à 1,5 kb, l'amplification ne pose en général pas de problème, et les milieux d'incubation classiques peuvent être utilisés. Au-dessus de 1,5 kb, les amplifications sont plus

difficiles à réaliser, et le plus souvent il est nécessaire de rechercher, par tâtonnement, les conditions expérimentales adaptées à la séquence à amplifier.

La seconde limite est celle du nombre de copies de la cible. Des amplifications à partir d'une seule copie ont pu être réalisées. Dans la pratique ce type de prouesse est difficile compte tenu des problèmes de contamination (voir ci-dessous). On peut l'envisager à titre expérimental, lorsque l'amplification peut être réitérée (pour confirmation, ou en cas d'échec), mais pas en routine diagnostique. Lorsque le nombre de copies de départ est faible, il est préférable d'effectuer deux PCR successives plutôt que de multiplier le nombre de cycles. En effet, comme nous l'avons vu, après 40 à 50 cycles la quantité de DNA ne change plus, le plateau est atteint. Cette inefficacité de l'augmentation du nombre de cycle constitue la troisième limite intrinsèque de la technique PCR.

V - LES PRINCIPAUX PROBLEMES RENCONTRES

Parmi les différents problèmes qu'il est possible de rencontrer en utilisant la technique PCR, il en est un qui revêt une importance particulière, surtout lors d'une utilisation en diagnostic (le résultat étant souvent le facteur décisif dans le choix de l'acte qui peut être par exemple un avortement) : il s'agit du problème de la contamination. Si le produit d'amplification doit être sous-cloné, le problème majeur est celui de la faible fidélité de la Taq polymérase. Enfin il apparaît souvent des amplifications parasites dont il n'est pas toujours possible de se débarrasser.

1 - La contamination

Quelle que soit l'application envisagée, il s'agit là d'un problème majeur, particulièrement difficile à maîtriser. Lors des premières utilisations de la PCR, l'attention a très vite été attirée par l'augmentation considérable des faux positifs (tubes ne contenant pas de DNA cible dans lesquels une amplification est cependant observée), au fur et à mesure de l'utilisation d'un type d'amorces donné. Après moins

d'un mois il pouvait arriver que plus de 10 p.100 des blancs soient amplifiés. Ces amplifications artéfactuelles résultent de contamination par les produits des amplifications précédentes. il est impossible de complètement s'affranchir du problème de la contamination. Cependant certaines précautions permettent de minimiser considérablement le risque. En pratique, la source majeure de contamination est le DNA amplifié au cours des manipulations précédentes. Un tube où a été réalisée une amplification contient des quantités énormes de la cible, à haute concentration. Lors de l'ouverture du tube, les turbulences engendrées projettent dans la pièce la vapeur d'eau (dans laquelle du DNA amplifié est solubilisé) que contenait le tube. Par ce simple geste plusieurs milliers de copies peuvent chaque fois contaminer l'atmosphère de la pièce. Lors des pipetages après amplification, la dépression, engendrée par la pipette automatique, crée des micro-aérosols qui vont tapisser des séquences amplifiées les parois de la pipette. Ainsi dans une pièce où sont ouvertes des tubes contenant un produit amplifié l'air, les murs, le matériel, etc. sont contaminés par la séquence cible.

Pour s'en convaincre il suffit de prendre un petit carré de papier filtre et d'essuyer la poignée de la porte du laboratoire, le clavier de l'appareil d'amplification, etc., le papier est alors une source parfaite de DNA Pour obtenir une PCR positive.

La principale et la plus efficace des mesures à prendre pour lutter contre ce type de contamination consiste à réaliser les incubations dans un laboratoire différent et le plus éloignée possible de celui où sera analysé le produit amplifié (il est par exemple préférable qu'il est situé à un autre étage, voire dans un autre bâtiment). Le matériel utilisé pour réaliser les incubations (pipettes automatiques, etc.) ne doit pas être utilisé pour une autre activité et ne doit jamais quitter le laboratoire correspondant. Bien que le risque de contamination par du DNA non amplifié soit infime, quelques précautions supplémentaires peuvent être prises à titre préventif.

- utilisation de cônes de prélèvement munis de coton protecteur, ou mieux de piston.
Le corps de la pipette ne peut jamais être en contact avec l'échantillon ;

- irradiation des amorces avec des rayonnements ultra-violet ;
- aliquotage en petits volumes de tous les composants des incubations (amorces, nucléotides, ...) et ce dès leur réception ;
- distribution du DNA en dernier, lors de la réalisation des incubations.

La société Perkin-Elmer-Cetus propose maintenant un système destiné à supprimer les contaminations. Le principe en est simple : le dTTP est remplacé par le dUTP dans les incubations. Cette modification est sans effet sur l'amplification. Il en résulte un marquage très spécifique de la cible amplifiée par rapport à la cible non amplifiée. Lors de la réalisation de la PCR, de l'uracylglycosylase (enzyme de la réparation extraite d'E. coli) est ajoutée au milieu réactionnel. Une incubation va permettre à cette enzyme de détruire tout DNA provenant d'une amplification antérieure (contenant U et non T). L'enzyme est automatiquement détruite lors de la première dénaturation du DNA, car elle est thermosensible et ne supporte pas la température utilisée (94 à 98°C). Le DNA qui est ensuite synthétisé ne sera donc pas détruit. Cette amélioration augmente le prix d'une technique qui, par elle-même, coûte déjà très cher.

2 - Le manque de fidélité de la Taq polymérase

La Taq polymérase est une enzyme qui ne possède pas d'activité de correction des épreuves (proof reading). Le taux d'erreurs introduites par cette enzyme est donc particulièrement élevé. Il est comparable à celui de la transcriptase inverse, soit environ 10^{-4} . Pour la plupart des applications ces erreurs ne sont pas gênantes, si les seuls paramètres analysés sont la taille ou la présence du produit amplifié. En revanche, lorsque la séquence du produit amplifié joue un rôle dans l'analyse (analyse de mutations, étude de liaisons DNA-protéines, sous-clonage, ...) la présence d'erreurs de réplication peut fausser complètement les résultats obtenus. Il n'existe pas de moyen pour supprimer ces erreurs ; on peut tout au plus les minimiser. Ces moyens ont déjà été évoqués dans l'analyse des produits constituant l'incubation (concentration des différents nucléotides, faible concentration de DNA, etc.). L'interprétation des résultats devra tenir compte de la possibilité d'erreurs dues à la polymérase, et les contrôles devront être suffisants et appropriés. Enfin il sera toujours préférable de pratiquer des déterminations directes de séquences (ou les erreurs ne sont pas détectables car aléatoires et diluées) plutôt que de séquencer après sous-clonage, même si les résultats sont les plus souvent moins bons et plus difficiles à interpréter.

3 - Les amplifications parasites

Les amorces utilisées sont toujours courtes, et la possibilité qu'elles s'hybrident ailleurs qu'au niveau de leur cible n'est pas négligeable. On estime en fait que seulement 1 p.100 des amorces s'hybrident à leur place normale, les 99 p.100 restants s'hybridant n'importe où de manière non spécifique. Normalement les amplifications parasites qui en résultent ne sont pas détectables car elles sont linéaires et non exponentielles. La quantité obtenue à la fin des cycles est trop faible pour être révélée par simple coloration. Pour que le contaminant soit détectable il faut que deux amorces aient pu s'hybrider en regard et à une distance suffisamment faible pour que l'amplification puisse s'effectuer. Les amplifications parasites ne sont pas prévisibles et dépendent de la séquence des amorces utilisées. Le moyen le plus efficace est d'augmenter la stringence, le plus souvent en augmentant la température. Cette augmentation est effectuée progressivement jusqu'à ce que les bandes contaminantes disparaissent (bien sûr dans la limite de ce que permettent les amorces choisies). Il a aussi été montré que la formamide à faible concentration augmentait la spécificité sans trop inhiber l'amplification.

Certains protocoles incluent une étape de dénaturation prolongée lors du premier cycle (quelques minutes à 98°C) afin de s'assurer que tout le DNA est bien passé sous forme simple-brin. Afin de ne pas altérer la polymérase on ne l'ajoute qu'après. Cette stratégie est fortement déconseillée car elle est la source d'amplification parasites. En effet après avoir ajouté la polymérase il est nécessaire de centrifuger les échantillons de manière à rassembler la totalité du contenu au fond du tube. L'ensemble des opérations prend du temps, le DNA étant sous forme simple-brin et la température relativement basse (température ambiante), les hybridations non spécifiques des amorces sont fortement favorisées. A partir de ces amorces fixées non spécifiquement, la polymérase effectue une élongation qui peut être très importante si le temps est suffisamment long (nombreux échantillons à traiter). Il en résulte toute une série de séquences parasites mais qui possèdent une des deux amorces à l'une des extrémités. Toute amorce opposée s'hybride de manière non spécifique à cette séquence conduit à une amplification parasite exponentielle, donc à une bande parasite

à l'électrophorèse. Ce phénomène explique certaines surprises de sous-clonage de produits PCR (bonnes amorces entourant une séquence inattendue).

VI - LA NESTED PCR (DOUBLE PCR)

Une technique a été proposée pour lutter contre les amplifications parasites et s'assurer que la bande observée correspond bien à la séquence recherchée. Cette technique, appelée PCR, nichée" (*nested PCR*), consiste à réaliser deux PCR successives en utilisant des couples d'amorces différents, le deuxième couple d'amorces encadrant une séquence incluse dans celle qui est amplifiée par le premier couple d'amorces. Ainsi, si la bande correspondant à la première amplification est artéfactuelle, lors de la deuxième PCR les amorces du deuxième couple ne pourront pas s'hybrider et il n'y aura pas d'amplification. Cette technique permet d'augmenter dans le même temps la spécificité et le taux d'amplification. Elle est particulièrement souhaitée lorsque la quantité de cible de départ est faible.

Quelles que soient les précautions prises il n'est pas toujours possible de se débarrasser de amplifications parasites (par exemple en cas de très fortes homologies de séquence).

VII - L'AMPLIFICATION DES RNA ET L'ANALYSE DE LA TRANSCRIPTION ILLEGITIME

La Taq polymérase ne peut pas utiliser le RNA comme matrice, mais une amplification peut être réalisée à partir de RNA si une étape intermédiaire de transcription inverse est réalisée. Il est préférable de partir de RNA total plutôt que de RNA poly A⁺. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées :

- transcription inverse en utilisant l'oligonucléotide qui sera utilisé lors de l'amplification (celui qui s'hybride à l'extrémité 3' du messenger) comme amorce pour la transcriptase ;
- transcription inverse de tous les messagers en utilisant de l'oligo dTP comme amorce. Une variante consiste à utiliser des hexanucléotides synthétisés au hasard

ANNEXE 2 : METHODES D'EXTRACTION DE L'ARN VIRAL

- Extraction de l'ARN viral par la méthode du phénol chloroforme

Les réactifs utilisés sont des solutions de :

- . isothiocyanate de guanidium (Gu SCN)
- . Chisen préparé avec 1 ml d'alcool isoamylique dans 24 ml de chloroforme
- . phénol chloroforme préparé avec une partie de phénol pour une partie de Chisen.
- . un mélange de 18 ml d'éthanol et 2 ml d'acétate de sodium
- . éthanol à 70 %
- . l'échantillon : chaque suspension cellulaire provenant de chaque écouvillon.

- A 150 µl d'échantillon (suspension cellulaire) dans un tube eppendorf, ajouter 450 µl de Gu SCN et 500 µl de phénol chloroforme. Vortex le tube et centrifuger pendant 10 minutes à 1300 tour à 6°C.

Le GuSCN lyse les cellules et le phénol de chloroforme libère les substances organiques. Cette opération est réalisée sous une hotte.

- Après centrifugation le surnageant contient l'ARN et le culot des débris cellulaires.

Dans un nouveau tube, ajouter au surnageant 500 µl de la solution de Chisen. Vortexer, centrifuger 10 minutes à 13 000 rpm à 6°C. Attention à ne pas prélever le culot.

- Après centrifugation l'ARN contenu dans le surnageant et précipité avec 500 µl d'un mélange d'éthanol absolue et d'acétate de sodium.

- Laisser à -20°C toute la nuit ou à -70°C pendant 1 h
- Centrifuger 30 minutes à 13 000 rpm à -4°C
- Eliminer le surnageant en faisant attention au culot
- Laver le culot avec 800 µl d'éthanol à -70°C
- Centrifuger à 13 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C
- Eliminer le surnageant et sécher le culot à l'étuve
- Mélanger le culot avec 15 µl d'une solution de DEPC
- Conserver l'ARN ainsi extrait à -70°C

C'est cette suspension d'ARN qui a été utilisée pour réaliser les pools d'échantillon.

- Extraction de l'ARN par la méthode du KIT QUIAGEN Rneasy Mini Handbook

Les réactifs utilisés sont :

- le tampon de lyse préparé avec 1 ml de RTL et 10 μ l de β mercaptoéthanol
- l'éthanol à 70 %
- le tampon RW1
- le tampon RPE
- le DEPC 0,1 % (diethyl pyrocarbonate)
- échantillon : pools de suspension cellulaire

Dans un tube eppendorf ajouter à 30 μ l de suspension cellulaire, 350 μ l de tampon de lyse

- Vortexer pour homogénéiser et attendre 5 à 10 minutes
- Rajouter 600 μ l d'éthanol à 70 %
- Placer les tubes sur des colonnes (qui sont chargées d'amorces qui retiennent l'ARN)
- Centrifuger 15 minutes à 8 000 tours
- Faire trois lavages pour rejeter les débris cellulaires
 - . un lavage avec 700 μ l de tampon RW1 et centrifuger 15 secondes à 8000 tours
 - . un lavage avec 500 μ l de tampon RPE centrifuger 15 secondes à 8000 tours
 - . un lavage avec 500 μ l de tampon RPE pendant 2 minutes et sécher la colonne.
- L'étape d'éluion consiste à libérer l'ARN qui s'est fixé sur la membrane. Elle se fait avec 30 à 50 μ l d'eau traitée avec du DEPC 0,1 %. Cette eau détruit les RNases et protège les ARN.
- Conserver l'ARN - 80°C.

ANNEXE 3 : LA REVERSE TRANSCRIPTION

Elle permet de transformer l'ARN en cDNA. Nous avons utilisé deux protocoles différents.

- Le premier protocole

- . Les réactifs

- pDN6
- ddH₂O
- 4dNTPs (2 mM ; d'ATP, dTTP, dCTP, dGTP)
- RNase
- l'échantillon d'ARN
- le tampon de l'enzyme

- Manipulation

- Préparer un mix de réactifs c'est à dire qu'il faut dans un seul tube mettre les quantités suivantes multipliées par le nombre de tubes (d'échantillons correspondants à réaliser)

PdN6	2 µl
ddH ₂ O	3 µl
RNA	5 µl
Total	10 µl

- Distribuer dans chaque tube eppendorf 10 µl du mix.

- Incuber les tubes à 65°C pendant 10 minutes puis les plonger immédiatement dans la glace

- Préparer un autre mix avec

. tampon	5 µl
. 4dNTP (2 mM)	2 µl de chaque
. Rnase	1 µl

Total = 8 μ l

- Distribuer 8 μ l de ce mix aux tubes précédant qui contenaient 10 μ l du premier mix.

Centrifuger à 2000 rpm pendant quelques secondes les tubes pour obtenir un mélange homogène et incuber à 37° pendant une heure.

On obtient le cDNA.

- Deuxième protocole (KIT QUIAGEN)

Selon le protocole du kit que nous avons utilisé nous avons procédé comme suite :

. Les réactifs

- Les échantillons d'ARN

- Bulk first strand est constitué de Reverse transcriptase et de DNTP (ATP dTTP etc.) ..

- DTT est un inhibiteur des Rnases

- Pd (N)6

. Manipulation

Dans des tubes à PCR (tube eppendorf de 500 μ l) mettre 8 μ l de solution d'ARN et incuber à 65°C pendant 10 minutes. Puis plonger immédiatement les tubes dans de la glace.

Chaque tube doit contenir les quantités suivantes.

Bulk First Strand	Primer	DTT	ARN	Total
5 ml	1 μ l	1 μ l	8 μ l	15 μ l

On prépare alors un mix des trois réactifs (Bulk first-Strand, primer, DTT) c'est à dire que dans un seul tube on met le volume total des quantités pour un tube multiplié par le nombre de tubes total.

Exemple : pour 36 tubes, on prépare un peu plus soit pour 38 tubes. Ce qui correspond a : $38 \times 5 + 38 \times 1 = 266 \mu\text{l}$

On met $7 \mu\text{l}$ du mix dans chaque tube contenant $8 \mu\text{l}$ de solution d'ARN.

Centrifuger à 2000 rpm pendant quelques secondes les tubes pour obtenir un mélange homogène et incuber à 37° pendant une heure.

On obtient le cDNA.

Les contrôles suivant sont effectués. Pour les deux protocoles

. un tube témoin de contrôle de la réaction de reverse transcriptase, dans lequel l'échantillon est remplacé par $1 \mu\text{l}$ d'une solution de l'ARN purifié connue ;

. un témoin de contrôle de contamination, où l'échantillon est remplacé par de l'eau traitée au DEPC ;

- un témoin de contrôle négatif, où l'échantillon est remplacé par de l'ARN de cellule non infectée ;

. un témoin de contrôle de la spécificité des amorces où l'échantillon est remplacé soit par de l'ARN du virus PPR si l'échantillon est du virus bovine pestique, soit de l'ARN du virus bovine pestique si l'échantillon est du virus PPR.

N.B : Dans ces deux protocoles nous n'avons pas eu besoin d'incuber les tubes à 65°C parce que le virus PPR est un virus de structure peu pelotonné qui n'a pas besoin d'être chauffé pour devenir linéaire.

ANNEXE 4 : L'AMPLIFICATION GENETIQUE

C'est la réaction d'amplification génétique du cDNA.

* Teneur finale des différents constituants dans 50 µl

- solution de cDNA < 50 ng
- solution tampon : 1 fois
- les deux primers : 200 ng ou 20 pmol
- dNTP : 200 µM
- Taq polymerase est : 2,5 U
- H₂O : QSP : de l'eau stérile utilisée pour compléter à 50 µl

. Le tampon PCR contient tous les éléments qui optimise l'action de l'enzyme.

Ce tampon est à 10 fois. On travaille avec un tampon de 1 fois.

$$10 \times V = 1 \times 50 \mu\text{l}$$

$$V = \frac{50}{10} = 5 \mu\text{L}$$

$$10$$

$$V = 5 \mu\text{l}$$

. Les primers (A et B) utilisé est à 20 picomol µl donc en prenant 1 µl on a 20 pmol dans 50 µl

. Le DNTP est à 10 mmol de chaque nucléotide. Donc on prend 1 µl

. La taq polymerase est à 5 U, il faut diluer au demi

* Manipulation

Dans un tube eppendorf mettre

. la solution de cDNA : 5 µl

. le tampon : 5 µl

Agiter et incuber les tubes au bain marie bouillant pendant 10 mn. Les plonger immédiatement dans la glace pendant 5 mn, les centrifuger et ajouter : . le primers 1 : 1 μ L

- . le primer2 : 1 μ L
- . le DNTP : 1 μ L
- . H₂O à compléter à 50 μ l

Placer les tubes dans le thermocycleur pour le programme défini.

- Un tube témoin de contrôle de l'amplification est ajouté à cette étape dans lequel 1 μ l < 1 μ g/ μ l d'une solution de cDNA et introduite ainsi que les autres ingrédients de l'amplification.

- Programme utilisé pour l'amplification génétique

- Hybridation à 60°C 1 min

- Elongation à 72°C 30 sec

RAMPING 3.0

- Dénaturation à 95°C ... 10 secondes puis à 94°C ... 30 sec

5 cycles

- 55°C 1 min

- 72°C 30 sec

- 95°C 10 secondes

- 94°C 30 sec

30 cycles

- 55°C 1 min

- 72° 10 min

- 30°c 1 min

1 cycles

ANNEXE 5 : PRATIQUE DE L'ELISA DE COMPETITION POUR LA PESTE BOVINE

I - PREPARATION DES TAMPONS ET REACTIFS

1 - Antigène

- Reconstituer l'antigène lyophilisé avec 1 ml d'eau distillée de Vienne (diluant 1). Agiter lentement jusqu'à complète dissolution. Le flacon reconstitué peut être aliquote en plusieurs parties de 200 µl par exemple et conservés à -20°C. Une partie est utilisée jusqu'à épuisement.

2 - Anticorps monoclonal (Mab), C++, C+, C: reconstituer comme ci-dessus avec 1 ml d'eau distillée, diluant 1.

3- Conjugué : le flacon reçu indique que la reconstitution nécessite 2 ml d'eau distillée de Vienne, diluant 1.

4 - Solution de Chromogène (OPD) : dissoudre 1 comprimé d'OPD dans 75 ml d'eau distillée locale. Conserver à +4°C dans l'obscurité (envelopper le flacon dans du papier aluminium). La solution stock sera conservée à -20°C.

5 - Solution de substrat (H₂O₂) : dissoudre comprimé d'eau oxygénée dans 10 ml d'eau distillée locale.
Conserver à +4°C.

6 - Tampon de sensibilisation : dissoudre 1 sachet de PBS ou 1 comprimé de PBS selon le cas dans 1 litre d'eau distillée locale (0,01 M) puis vérifier le pH = 7,2-7,4 et conserver à +4°C pour 2 semaines maximum. Des aliquotes peuvent être conservés à -20°C.

7 - Tampon de blocage ou de saturation : dans du PBS 0,1 M (tampon de sensibilisation) ajouter 0,1 % (v/v) Tween 20 et 0,3 % (v/v) de sérum négatif bovin (contrôle négatif C-) Exemple : pour 100 ml de PBS, ajouter 100 µl de Tween 20 et 300 µl de sérum négatif. Cette solution est préparée pour le jour de test (préparation extemporanée).

8 - Tampon de lavage : diluer au 1/5 avec de l'eau distillée locale 1 l de tampon de sensibilisation. Exemple : 1 litre de PBS 0,01 M (tampon de sensibilisation) pour 4 litres d'eau distillée (PBS 0,002 M);

9 - Solution d'arrêt : ajouter 55 ml d'acide sulfurique pur dans 945 ml d'eau distillée locale (acide sulfurique 1 M).

SERMENT DES VETERINAIRES DIPLOMES DE DAKAR



« Fidèlement attaché aux directives de Claude BOURGELAT, fondateur de l'Enseignement vétérinaire dans le monde, je promets et je jure devant mes Maîtres et mes Aînés :

- D'avoir en tous moments et en tous lieux le souci de la dignité et de l'honneur de la profession vétérinaire ;
- D'observer en toutes circonstances les principes de correction et de droiture fixés par le code de déontologie de mon pays ;
- De prouver par ma conduite, ma conviction, que la fortune consiste moins dans le bien que l'on a, que dans celui que l'on peut faire ;
- De ne point mettre à trop haut prix le savoir que je dois à la générosité de ma patrie et à la sollicitude de tous ceux qui m'ont permis de réaliser ma vocation.

**QUE TOUTE CONFIANCE ME SOIT RETIREE
S'IL ADVIENT QUE JE ME PARJURE »**

LE CANDIDAT

**VU
LE DIRECTEUR
DE L'ECOLE INTER-ETATS
DES SCIENCES ET MEDECINE
VETERINAIRES DE DAKAR**

**LE PROFESSEUR RESPONSABLE
DE L'ECOLE INTER-ETATS DES
DES SCIENCES ET MEDECINE
VETERINAIRES DE DAKAR**

**VU
LE DOYEN
DE LA FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE DE
L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP
DE DAKAR**

LE PRESIDENT DUJURY

**VU ET PRIS D'IMPRIMER _____
DAKAR, LE _____**

**LE RECTEUR, PRESIDENT DE L'ASSEMBLEE
DE L'UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR**

Résumé :

Des bovins vivants au contact de petits ruminants atteints de peste des petits ruminants peuvent être infectés par le virus PPR.

La période d'excrétion du virus PPR a été déterminée sur deux lots de 6 caprins. L'un inoculé par la voie nasale, l'autre par la voie sous-cutanée.

Ces caprins ont été inoculés avec le virus sauvage PPR. Et des écouvillons nasaux, oculaires et gingivaux ont été réalisés chaque jour jusqu'à la mort des animaux. L'analyse de ces écouvillons par la RT-PCR montre que c'est entre le 6^e et 8^e jour (en moyenne une semaine) après inoculation que les petits ruminants atteints de PPR deviennent contaminants pour les autres animaux sensibles.

L'influence du virus PPR sur la vaccination anti-bovipestique a été appréciée sur des sérums de veaux et de bovins à partir de la technique ELISA. En effet ces bovins ont subi une vaccination contre la PPR suivie quelques semaines plus tard d'une vaccination contre la peste bovine. L'analyse des sérums après la vaccination contre la peste bovine montre que les anticorps anti-PPR, inhibent la réponse immunitaire antibovipestique chez les veaux et pas chez les animaux adultes.

Mots clés

Virus PPR, - Peste des petits ruminants, - Moment d'excrétion chez chèvres, - Influence anticorps anti-PPR sur vaccination anti-bovipestique, - Bovins, - Côte d'Ivoire.

B.P : 170 GRAND-BASSAM, CÔTE D'IVOIRE

TEL : 00225 30 13 47