

REMERCIEMENTS

Le présent travail est le résultat d'un soutien permanent et de nombreux encouragements d'un collectif de personnes que nous tenons à remercier amplement.

A notre promoteur Docteur **AKLOUL K.**, pour avoir accepté de diriger ce travail, son orientation judicieuse, son encadrement et ses conseils qui nous ont guidé dans l'élaboration de ce mémoire de Master.

Nos sincères remerciements vont à :

A Mme **BOUMAHDI Z.** pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury.

A Mme **DECHICHA A.** d'avoir fait l'honneur d'examiner ce mémoire.

A tous les enseignants qui ont contribué à notre formation et aux fonctionnaires de l'Institut des Sciences Vétérinaires de Blida, et à toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation et à la réussite de ce travail.

DEDICACES

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail

A ma chère mère,

A mon cher père,

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir de m'encourager et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

***A mes deux frères Ferhat, Hassou et leurs belles femmes Lynda, Rima et mes
11sœurs***

Pour leurs soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

A mon petit ange Sales

Que Dieu le protège pour nous.

Mes neveux et mes nièces.

Je leurs souhaite que de la réussite et un bon parcours.

A mes chers amis (es)

Zaina, Nadjat, Nassima, Sarah, Amina, Daya.

Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.

A mon cher Mohamed

Qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles.

A mon cher binôme Lynda

Pour son entente et sa sympathie.

Tabti Melissa.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :
A celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoir, la mère des sentiments qui m'a
béni par ces prières,

A mon adorable maman Saliha.

A mon précieux offre du dieu, à mon support dans ma vie, qui m'a soutenu,
m'a encouragé, m'a supporté quoi que je dise ; je ne saurai point te remercier,
ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force, à mon trésor

Mon Papa Mestapha.

A ma chère sœur Massilia,

Pour son encouragement et ses conseils.

A mon cher petit frère Saïd.

A mes grands-parents, mes oncles, mes tantes mes cousins,

Que dieu leur donne une longue et joyeuse vie.

A mes meilleurs amis

Lamia, Safia, Hayet, Lina, ma chère Sabrina, ma belle Zaina et tous les amis que
j'ai connu jusqu'à maintenant.

A mon binôme Melissa

Pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce
projet.

Djelil Lynda.

RESUME

La Peste des petits ruminants est une infection virale hautement contagieuse affectant les petits ruminants domestiques et sauvages. Dans les zones d'élevage où la maladie est enzootique, elle occasionne des pertes économiques importantes du fait des taux de morbidité et de mortalité parfois élevés.

La PPR affecte près d'un milliard de petits ruminants dans le monde. L'agent étiologique est le PPRV appartenant au genre Morbillivirus, dans la famille des Paramyxoviridae.

Le diagnostic sérologique est réalisé de façon classique par ELISA de compétition (cELISA). L'isolement du virus étant difficilement envisageable en moins de trois semaines, l'identification rapide du virus directement à partir d'échantillons de terrain est possible par d'autres méthodes, incluant l'amplification génique, très sensibles et spécifiques. Il s'agit de la transcription reverse-PCR (RT-PCR), méthode dite conventionnelle et de la RT-PCR en temps réel (rRT-PCR) pour la quantification des charges virales. La RT-PCR conventionnelle produit des matrices suffisamment longues pour permettre le séquençage et l'analyse phylogénétique subséquente.

Eu égard, à l'importance économique et médicale de cette pathologie, il nous a semblé opportun d'étudier les différentes méthodes de son diagnostic afin de pouvoir diminuer et lutter contre cette maladie, aussi améliorer le développement de l'élevage des petits ruminants et de leurs produits.

Mots clés : Morbillivirus, Paramyxoviridae, ELISA, Amplification génique.

ABSTRACT

Ovine RinderPest is a highly contagious viral infection affecting small domestic and wild ruminants. In breeding areas where the disease is enzootic, it causes significant economic losses due to sometimes high morbidity and mortality rates.

PPR affects nearly a billion small ruminants worldwide. The etiological agent is PPRV belonging to the genus *Morbillivirus*, in the family of *Paramyxoviridae*.

Serological diagnosis is carried out in a conventional manner by competition ELISA (cELISA). Virus isolation is difficult to envisage in less than three weeks, rapid identification of the virus directly from field samples is possible by other methods, including gene amplification, which are very sensitive and specific. These are reverse-PCR transcription (RT-PCR), a so-called conventional method, and real-time RT-PCR (rRT-PCR) for the quantification of viral loads. Conventional RT-PCR produces matrices long enough to allow sequencing and subsequent phylogenetic analysis.

Considering the economic and medical importance of this pathology, it seemed appropriate to us to study the different methods of its diagnosis in order to be able to reduce and fight against this disease, also to improve the development of the breeding of small ruminants and of their products.

Keywords: *Morbillivirus*, *Paramyxoviridae*, ELISA, Gene amplification.

الملخص

طاعون المجترات الصغيرة مرض فيروسي معدي يصيب المجترات الصغيرة المنزلية والبرية. في مناطق التكاثر اين يكون المرض متوطنًا ، يتسبب في خسائر اقتصادية كبيرة بسبب ارتفاع معدلات المراضة والوفيات.

يؤثر طاعون المجترات الصغيرة على ما يقرب من مليار حيوان مجتر صغير في جميع أنحاء العالم. العامل المسبب للمرض هو PPRV الذي ينتمي إلى جنس Morbillivirus ، في عائلة Paramyxoviridae. يتم إجراء التشخيص المصلي بطريقة تقليدية عن طريق منافسة (Elisa). نظرًا من صعوبة عزل الفيروس في أقل من ثلاثة أسابيع ، فإن التعرف السريع على الفيروس مباشرة من العينات الميدانية ممكن من خلال طرق أخرى ، بما في ذلك تضخيم الجينات بطريقة RT-PCR التقليدية تستعمل لتقدير الأحمال الفيروسية. تنتج RT-PCR التقليدية مصفوفات طويلة بما يكفي للسماح بالتسلسل وتحليل النشوء والتطور اللاحق.

بالنظر إلى الأهمية الاقتصادية والطبية لهذه الحالة المرضية ، بدأ من المناسب لنا دراسة الطرق المختلفة لتشخيصه حتى نتمكن من الحد من هذا المرض ومكافحته ، وكذلك لتحسين التنمية ومنتجات تربية الحيوانات المجترة الصغيرة

الكلمات المفتاحية: موربيليفيروس، الفيروسات المخاطية، إيزا، تضخيم الجينات

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribonucléique.

ARNm : Acide ribonucléique messenger.

CCD : Charge coupled device (Caméra qui assure la conversion d'un signal lumineux en un signal électrique).

CIRAD : centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique en Développement.

DAS-ELISA : Double Antibody Sandwich (Double Anticorps Elisa Sandwich).

ELISA : Enzym-linked Immuno Sorbent Assay (Dosage immuno-enzymatique sur support solide).

FAO: Food and Agriculture Organization (Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'agriculture).

OIE : Office Internationale des Epizooties.

PPR: Peste des Petits Ruminants.

PPRV: Peste des Petits Ruminants Virus.

RdRp: RNA – dependant RNA polymerase (ARN polymérase ARN dépendante).

RNP: Ribonucléoprotéine.

RPV: Rinderpest Virus (Virus de la peste bovine).

R-T PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction.

SLAM: Signalling lymphocyte activation molécule.

LISTE DES FIGURES

Figure1.1:Sécrétionsnasales.....	4
Figure1.2 : Secrétions oculaires	4
Figure1.3 :Diarrhéesévère.....	4
Figure 1.4 :Lésions de nécrose.....	4
Figure 1.5 :Lésions de la langue.. ..	4
Figure 1.6 : Structure d'un morbillivirus	6
Figure 2.1:Lésions typiques de pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) chez la chèvre	10
Figure2.2 : Fièvre catharale du mouton (blueTongue).....	11
Figure2.3: Technique d'amplification d'ADN par ARN.....	13
Figure 2.4 : Les types de test Elisa	17
Figure2.5:Das-Elisa avec révélation directe et indirecte par le système biotine-streptavidine.....	18
Figure2.6 : Etapes du test Elisa indirect.....	20
Figure2.7: Elisa direct.....	22
Figure 2.8: Schémas qui représente les stratégies d'identification virale.....	24
Figure 2.9 : Amplification de l'ARN ribosomique 16 S	25
Figure2.10 : Principales étapes de l'étude protéomique.....	26
Figure 2.11 : Déroulement d'une analyse protéomique basée sur la spectrométrie de masse.....	27

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Technique de séquençage.	26
---	----

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

DEDICACES

RESUME

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION11

CHAPITRE 1:La peste des petits ruminants.2

1.1. La maladie3

1.2. Le virus5

1.3. L'impact économique :.....6

CHAPITRE 2 : Principales techniques de diagnostic de la PPR7

2.1. Diagnostic Epidémioclinique :.....7

2.2. Diagnostic lésionnel8

2.3. Diagnostic différentiel8

2.4. Diagnostic de laboratoire11

2.4.1. Diagnostic virologique :.....12

2.4.1.1 Méthodes d'identification virologiques directes13

2.4.1.1.1. Polymérase Chain Réaction (PCR) (Amplification par Polymérisation en Chaîne) ..13

2.4.1.1.2. RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR).....14

2.4.1.1.3. PCR en temps réel15

2.4.1.1.4. Puces à ADN et analyse du transcriptome16

2.4.1.1.5. Le microscope électronique :	16
2.5. Méthodes d'identification virale indirectes :	16
2.5.1. Sérologie infectieuse par la technique ELISA :	16
2.5.2. ELISA « en sandwich »	17
2.5.3. ELISA indirect	18
2.5.4. ELISA par compétition	20
2.5.5. ELISA Direct.....	21
2.6.1. Méthodes génotypiques basées sur des modèles et du séquençage.....	23
2.6.2. Méthodes basées sur les techniques protéomiques :	25
2.6.3. Techniques d'hybridations moléculaires :	26
2.6.4. Western blot (immune-empainte) :	28
CHAPITRE 3: Contrôle de la maladie.....	33
3.1. Vaccination.....	30
3.2. L'éradication est elle possible	30
Conclusion	32
BIBLIOGRAPHIE.....	34

INTRODUCTION

La peste des petits ruminants est une maladie contagieuse d'origine virale et souvent mortelle qui touche les petits ruminants, domestiques ou sauvages. Décrite pour la première fois en 1942 en Côte d'Ivoire, son aire de répartition géographique s'est considérablement étendue en quelques décennies : initialement cantonnée en Afrique occidentale, la maladie est désormais présente dans de nombreux territoires d'Afrique, du Moyen-Orient et d'Asie (**Banyard et al., 2010; Baron et al., 2016**).

La lutte contre les maladies animales transfrontalières est un énorme défi pour le développement des productions animales. La PPR fait partie des maladies virales les plus meurtrières des petits ruminants. La surveillance et le contrôle de cette maladie reposent avant tout sur un diagnostic clinique et une confirmation au laboratoire

Dans les pays endémiques de PPR la surveillance épidémiologique est de type événementielle. Le processus de déclaration suivi de diagnostic est pourtant essentiel pour caractériser les souches virales présentes dans ces régions car il donne la possibilité de comprendre l'écologie des virus responsables.

Des nouvelles techniques de diagnostic de la PPR mise en place pour l'identification de ce virus ainsi que la prise en compte de ces informations constituent un outil de surveillance et du contrôle de la peste des petits ruminants. Ses techniques peuvent également mener à une stratégie efficace d'une lutte mondiale voire une éradication finale de cette maladie.

L'objet de cette étude porte essentiellement sur l'enseignement des différentes méthodes classiques mises en œuvre pour le diagnostic sérologique et le diagnostic moléculaire du virus de la peste des petits ruminants. Elle présente également des protocoles et des procédures standardisés ainsi que le mode d'emploi des équipements nécessaires.

Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- Formation au diagnostic sérologique de PPRV.
- Connaissance des méthodes sérologiques de référence de l'OIE (séroneutralisation et cELISA).
- Formation au diagnostic moléculaire de PPRV.

- Connaissance des méthodes RT-PCR conventionnelles et en temps réel et le séquençage et l'analyse phylogénétique de PPRV.

Afin d'en limiter les impacts socio-économiques, l'OIE et la FAO ont inscrit l'élaboration d'une stratégie mondiale et la projection une éradication totale d'ici 2030 comme l'une des propriétés du GF-TAD's (Global Framework for The progressive Control of transboundary Animal Diseases - cadre mondial pour la maîtrise progressive des maladies animales transfrontalières) (OIE 2016).

CHAPITRE 1

La peste des petits ruminants

1.1. La maladie

La PPR est une maladie infectieuse virale affectant de nombreuses espèces de petits ruminants (domestiques et sauvages) dont les ovins et les caprins.

Elle peut aussi affecter les camélidés, que ce soit le dromadaire ou le chameau (**Abraham et al., 2005; Woma et al., 2015**). Ils peuvent être réceptifs et sensibles, et présenter des signes cliniques (**Khalafalla et al., 2010; Balamurugan et al., 2014**).

Les espèces bovines et porcines peuvent aussi contracter l'infection mais de façon asymptomatique (**Wohlsein et Singh, 2015**).

Selon les conditions d'infection et les caractéristiques de l'hôte et du virus, la forme clinique de la maladie peut atteindre différents degrés de sévérité : suraiguë, aiguë (forme la plus répandue), subaiguë ou sub-clinique voire asymptomatique (**Couacy-Hymann et al., 2007; Parida et al., 2015**).

La maladie affecte les systèmes digestif et respiratoire des animaux infectés et provoque des avortements fréquents (28 à 45%) chez les femelles gestantes (**Abubakar et al., 2008**). Les formes symptomatiques se caractérisent par l'apparition d'une pneumonie, de fortes fièvres, une perte d'appétit, des sécrétions nasales (**Figure 1.1**) et oculaires (**Figure1.2**) importantes et une diarrhée sévère (**Figure 1.3**). Ces symptômes peuvent être accompagnés d'un œdème des tissus de la bouche et d'ulcération et nécroses au niveau de la gencive inférieure (**Figure 1.4**), du bourrelet gingival, du palais, des joues et de la langue (**Figure1.5**) (**Roeder et al., 1999**). Selon les cas, un animal infecté peut guérir ou mourir. Dans le cas d'une guérison, l'animal acquiert une immunité à vie contre le virus.

PPR affecte différenciellement les ovins et les caprins. Le pic d'incidence chez les caprins se situerait effectivement pendant la saison sèche, mais chez les ovins il aurait lieu pendant la saison humide (**Molla et Delil, 2015**).

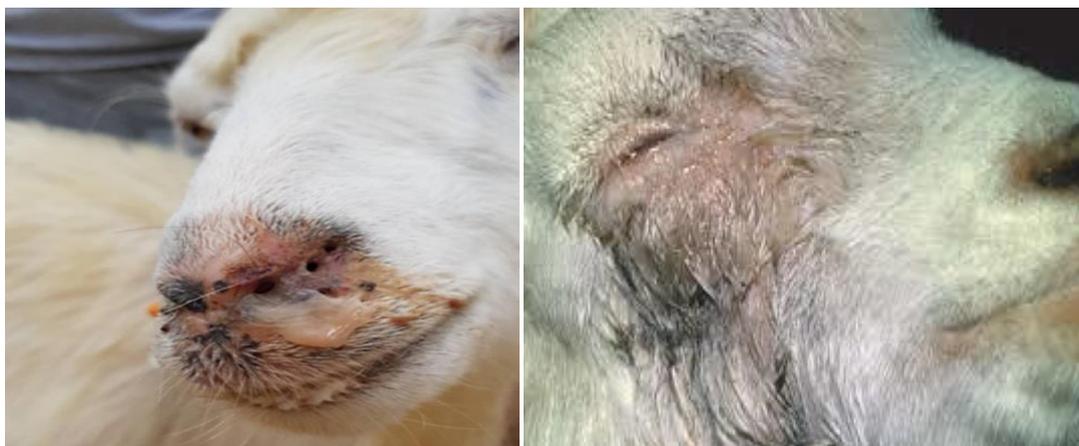


Figure 1.1 : Sécrétions nasales (Roeder et *al.*, 1999)

Figure1.2 : sécrétions oculaires (Roeder et *al.*, 1999)



Figure1.3 : Diarrhée sévère (Abubakar et *al.*, 2008)

Figure 1.4 : Lésions de nécrose (Abubakar et *al.*, 2008)



Figure1.5 : Lésions de la langue (OIE, 2009)

1.2. Le virus

L'agent pathogène responsable de l'infection, le virus de la peste des petits ruminants (PPRV), appartient au genre Morbillivirus (**Figure1.6**) de la famille des Paramyxoviridae (**Gibbs et al., 1979**) auquel appartiennent les virus de la peste bovine, de la rougeole, de la maladie de Carré et de la peste des phoques. Il s'agit d'un virus à ARN négatif monocaténaire non segmenté (**Baron et al., 2011 ; Albina et al., 2013 ; Parida et al., 2015**).

Les études sérologiques n'ont mis en évidence qu'un seul sérotype. Par contre, les classifications génétiques de différentes souches virales ont permis de les regrouper en quatre lignées qui se seraient différenciées au fur et à mesure que le virus se déplaçait vers l'est de l'Afrique et de l'Asie (**Kwiatek et al., 2010**).

Dès le début de la phase d'incubation, avant l'apparition des premiers signes cliniques, les animaux infectés excrètent des particules virales et transmettent la maladie via les aérosols émis par les sécrétions nasales et oculaires, la toux et les fèces (**Lefevre et Diallo, 1990; Chauhan et al., 2009**).

Très sensible à la chaleur, ce virus ne survit pas longtemps en milieu extérieur, sa demi-vie est estimée à environ 4 jours à 4°C, 2 heures à 37°C et il est considéré comme complètement inactif après une heure à 50°C (**Diallo et al., 2010; Kumar et al., 2014**).

Sa transmission nécessite donc des contacts étroits entre animal infecté et animal sain. Du fait de sa transmission précoce et des nombreuses infections sub-cliniques ou asymptomatiques contractées par les ovins, le virus circule silencieusement et peut rapidement se répandre sur de grandes distances en échappant à la surveillance des éleveurs et des services vétérinaires (**Ezeibe et al., 2008**).

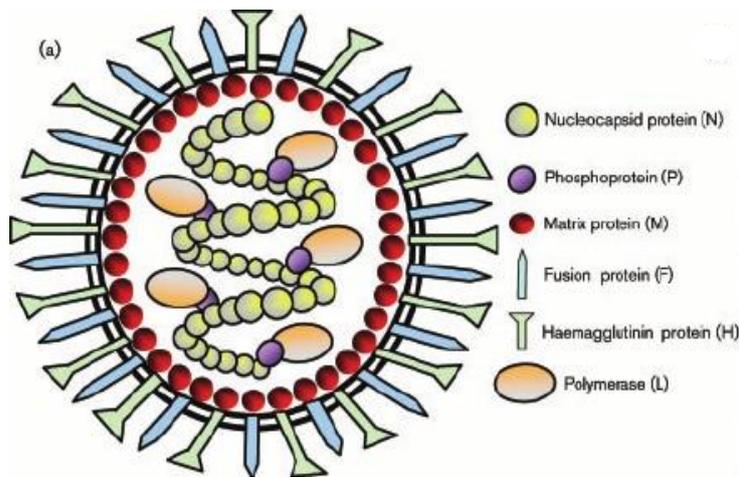


Figure1.6 : Structure d'un morbillivirus (**Diallo et al., 2010**)

1.3. Impact économique :

L'importance économique de la PPR tient d'une part à son extension géographique et, d'autre part aux lourdes pertes qu'elle occasionne. Un animal infecté par le PPRV peut soit mourir, soit guérir et acquérir une immunité à vie contre toutes les souches virales du PPRV (**Taylor, 2016**). La prévalence et la virulence de la maladie varient en fonction de nombreuses variables comme l'espèce, la race, l'âge, la région géographique, les pratiques d'élevage, la topographie ou encore le contexte socio-économique (**Singh et al., 2004**).

le virus peut entraîner des taux de morbidité s'élevant jusqu'à près de 100% et des taux de mortalité de 70 - 90% (**Sen et al., 2010; Saravanan et al., 2010; OIE, 2013**). Il affecte plus sévèrement les animaux de moins de six mois. L'impact est d'autant plus important lorsque les épidémies ont lieu dans des pays non endémiques où les populations ne sont pas porteuses d'anticorps Par ailleurs, les animaux guéris n'ont aucune valeur économique car chez les chèvres et les brebis en lactation, il y a chute de la production de lait, chez les jeunes animaux, un retard de croissance et chez les femelles gestantes, des avortements (**Hamdy et al., 1976**).

CHAPITRE 2

Principales techniques de diagnostic de la PPR

2.1. Diagnostic épidémio-clinique

Une suspicion de PPR repose sur l'association de plusieurs signes cliniques qui doivent alerter l'éleveur, en particulier un état de fièvre, associé à du jetage nasal et du larmolement survenant brusquement sur plusieurs petits ruminants du troupeau. Mais ces trois éléments restent insuffisants pour établir le diagnostic car ils ne sont pas spécifiques de la PPR (**Diallo, 2010**).

Ils s'expriment dans d'autres pathologies des petits ruminants, présentes dans les zones endémiques de PPR, comme l'ecthyma contagieux et la pleuropneumonie contagieuse caprine. Une comparaison différentielle rigoureuse des symptômes et une inspection soignée de tous les animaux d'un troupeau sont donc indispensables pour rassembler l'ensemble des indices cliniques et lésionnels qui ne sont pas toujours tous visibles chez un seul individu. En effet, en fonction de la race, de l'espèce, de l'âge des animaux et de leur statut immunitaire, la maladie se révèle cliniquement sous des formes différentes au sein d'un même troupeau. C'est une difficulté d'identification supplémentaire pour l'éleveur non informé, surtout si la PPR s'accompagne d'infections secondaires trompeuses telles que des « pasteurelloses » respiratoires. La survenue à l'échelle du troupeau d'évènements extérieurs considérés comme des facteurs de risque, doit être pris en compte et pourra renforcer les soupçons de PPR. Cette analyse globale de la situation épidémiologique est très importante dans les zones encore indemnes où le risque d'émergence de la maladie est élevé (**Couacy-Hymann, 2013**).

2.2. Diagnostic lésionnel

La fièvre, un état typhique marqué, le larmolement, le jetage oculo-nasal, la dyspnée et la diarrhée sont des signes de suspicion de la PPR. Quant aux signes pathognomoniques, ce sont les ulcérations de la muqueuse linguale et buccale. Ces indices cliniques et lésionnels ne sont pas forcément tous présents sur un même animal et ne sont par ailleurs pas spécifiques, de ceci découle l'intérêt d'inspecter l'ensemble des animaux du troupeau atteint et d'effectuer un diagnostic différentiel rigoureux (**Albina et al., 2013**).

2.3. Diagnostic différentiel

La PPR est souvent confondue avec d'autres maladies causant de la fièvre et ayant des signes cliniques comparables. Cette confusion est d'autant plus facile à faire que la maladie apparaît pour la première fois dans une région. Pour les enquêtes, la façon dont la maladie évolue au sein du troupeau est aussi importante que les signes cliniques observés sur un seul animal (chèvre ou mouton). Les principales sources de confusion dans le diagnostic de la PPR sont:

Lésions buccales Peste bovine, fièvre aphteuse, fièvre catarrhale du mouton (blue tongue) et ecthyma contagieux. Difficultés respiratoires Pasteurellose, pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC). Diarrhée Coccidiose, infestations par des vers gastro-intestinaux (**Diallo, 2010**).

La pasteurellose est une maladie purement respiratoire des ovins et des caprins causée par la bactérie *Pasteurella haemolytica*. Des zones rouge pourpre, rouge foncé, fermes au toucher, sont observées au niveau des lobes antérieurs et cardiaques des poumons. Il n'y a ni lésions buccales ni diarrhée. Le nombre d'animaux atteints par la maladie et qui meurent est généralement plus faible que dans le cas de la PPR, exception faite de certains cas observés dans des conditions spéciales de stress telles que lors d'une forte concentration d'animaux, par exemple le rassemblement d'animaux pour le commerce. Le problème de diagnostic différentiel se pose particulièrement avec les formes de PPR où les lésions buccales et la diarrhée sont absente ou légèrement présentes. En utilisant des milieux de culture appropriés, les bactéries *Pasteurella haemolytica* sont facilement isolées à partir de prélèvements pulmonaires. Toutefois, l'isolement de la bactérie *Pasteurella haemolytica* des poumons des animaux malades ne confirme ni l'existence d'une infection primaire de pasteurellose, ni l'exclusion de la présence de la PPR (très souvent, la pasteurellose est une complication de la PPR). Les tests de diagnostic pour la détection du virus de la PPR doivent aussi être effectués dans tous les cas de suspicion de pasteurellose (**Diallo et Campo, 2008**).

La pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) est une maladie des chèvres (elle ne touche pas les moutons) causée par *Mycoplasma capricolum* subspecies *capri pneumoniae*. Comme la PPR, elle est caractérisée par de la fièvre, des difficultés respiratoires et de la toux, mais elle n'est accompagnée ni de lésions buccales ni de diarrhée. À l'examen *post-mortem*, les lésions pulmonaires sont plus diffuses et un liquide fibrineux est trouvé dans la cavité thoracique. Des dépôts de fibrine couvrent les poumons et sont souvent attachés à la plèvre (**figure 2.1**). En cas de suspicion de PPCC dans les zones considérées à haut risque d'apparition de la PPR, il faut écarter la présence de cette dernière maladie par l'analyse de sérums des animaux présents dans les troupeaux convalescents (**FAO, 2009**).

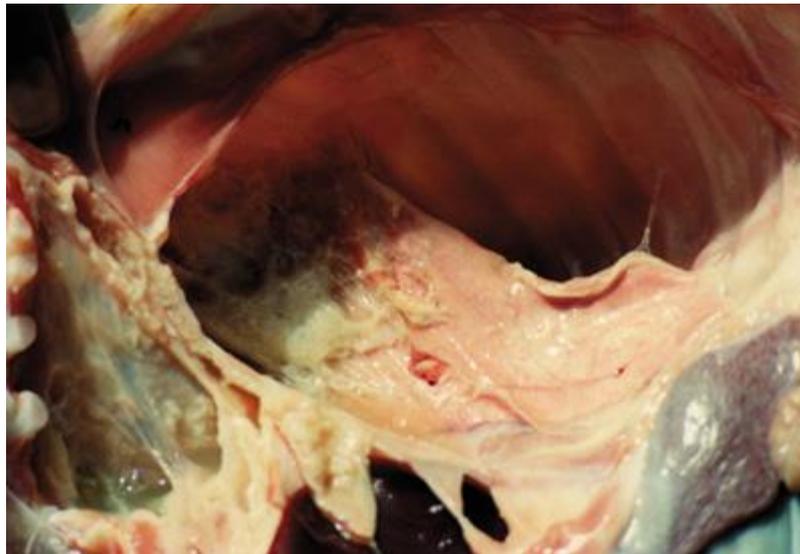


Figure 2.1: Lésions typiques de pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) chez la chèvre (Diallo, 2010)

La peste bovine a été décrite pour la première fois sur les petits ruminants en Asie. Elle apparaît en général chez les petits ruminants, uniquement quand ces derniers sont en contact avec des bovins ou des buffles atteints de cette maladie. En cas de suspicion de peste bovine chez les petits ruminants, il est nécessaire de réaliser des enquêtes sur toutes les espèces animales, présentes dans la région, qui sont sensibles au virus bovipestique. Dans le cadre du programme mondial d'éradication de la peste bovine (GREP), il est essentiel de faire la distinction entre la PPR et la peste bovine. tout foyer de peste bovine, indépendamment de sa localisation, représente une situation d'urgence internationale. En cas de maladie, il faut alors avoir recours à un laboratoire spécialisé. Les échantillons à envoyer au laboratoire pour le diagnostic de la PPR et de la peste bovine sont identiques dans les deux cas (Knopf, 2009).

La fièvre aphteuse est plus fréquemment observée chez les ovins que chez les caprins. Les caractéristiques principales la distinguant de la PPR sont l'absence de problèmes respiratoires et de diarrhée, et la présence de boiteries très marquées. La mort subite des jeunes agneaux en l'absence d'autres signes cliniques est souvent observée dans la fièvre aphteuse. Les lésions buccales, lorsqu'elles sont présentes, sont généralement de très petite taille et difficiles à voir. La bouche ne dégage pas une odeur nauséabonde comme dans le cas de la PPR.

La fièvre catarrhale du mouton ou blue tongue, comme la PPR, est caractérisée par de la fièvre, du jetage, de la salivation et des lésions érosives dans la cavité buccale (figure 2.2). Elle diffère cependant de la PPR par la formation d'œdèmes au niveau de la tête, une coloration

bleuâtre de la cavité buccale ainsi qu'à la jonction des sabots, par des parties déclives du corps, et par de la boiterie. La blue tongue est enzootique dans pratiquement toutes les régions où l'on rencontre la PPR. La maladie clinique n'est cependant pas observée dans les races locales de ces pays et ne se manifeste que sur les animaux exotiques. La présence d'anticorps blue tongue dans un seul prélèvement de sérum ne permet pas de confirmer le diagnostic de cette maladie et il est alors nécessaire de réaliser le diagnostic sur deux sérums prélevés à quelques semaines d'intervalle (**Lefevre, 1991**).



Figure 2.2 : Fièvre catarrhale du mouton (blue tongue) (**Diallo, 2010**)

L'ecthyma contagieux ou dermatite pustulaire contagieuse peut être confondu avec certains cas de PPR (forme subaiguë) quand on observe la présence de nodules et de croûtes autour de la bouche. Il est notamment facile de se tromper dans les cas graves d'ecthyma contagieux accompagnés de lésions buccales et nasales. En l'absence de complication bactérienne, il n'y a ni nécrose de la muqueuse buccale, ni diarrhée, ni pneumonie dans l'ecthyma contagieux (**Diallo A, 2010 ; Kumar et al., 2016**).

2.4. Diagnostic de laboratoire :

- Prélèvement

La détection du virus nécessite de prélever des animaux au stade précoce de la maladie lors de l'hyperthermie et avant que la diarrhée ne se soit manifestée. Le virus peut être identifié à partir (**FAO, 1999**):

- d'écouvillons de larme, de jetage, de débris gingivaux conservés secs ou dans du tampon phosphate stérile (PBS pH 7,2 à 7,6) si celui-ci est disponible
- de papier buvard imprégné de sang, de larme ou de jetage
- de sang prélevé sur anticoagulant - d'organes, préférentiellement des échantillons de nœuds lymphatiques médiastinaux, de rate, de poumons et de muqueuse intestinale.

2.4.1. Diagnostic virologique :

La preuve de la présence du PPRV dans les prélèvements est apportée par les méthodes de diagnostic direct. Elles sont basées soit sur l'identification des protéines antigènes, soit sur celle du matériel génétique viral, soit sur l'isolement du virus lui-même.

La détection des protéines antigènes dans les prélèvements tissulaires et les sécrétions des animaux infectés utilise des variantes de la technologie ELISA, l'ELISA en sandwich et l'ELISA par immunocapture (**Libeau et al., 1994**). Un kit de diagnostic ELISA sandwich (ID Screen®PPRAntigen Capture) basé sur des anticorps monoclonaux anti-nucléoprotéine développé par le CIRAD est maintenant commercialisé par la société ID.vet (Montpellier, France).

Le CIRAD a également mis au point, en partenariat industriel, un prototype de test de diagnostic rapide (Penside test) par immuno-chromatographie (Lateral Flow Device) pour la détection des antigènes viraux. Actuellement en cours de validation, il offrira aux pays du Sud un outil de diagnostic simple d'utilisation sur le terrain, pour une lecture immédiate (quelques minutes) du résultat. D'autres tests similaires ont été mis au point par d'autres laboratoires (Pirbright Institute, par exemple) (**Brüning-Richardson et al., 2011**). Pour le moment, ces tests ne sont pas encore largement utilisés sur le terrain. La détection du matériel génétique viral fait appel aux techniques de la biologie moléculaire. Celle utilisée en routine dans de nombreux laboratoires est la technique RT-PCR (Reverse transcription - Polymerase Chain Reaction) conventionnelle (**Balamurugan et al., 2007**)

Elle est spécifique, rapide et très sensible mais demande un équipement spécialisé et une exigence dans la mise en œuvre pour l'obtention de résultats fiables. Après l'extraction de l'ARN viral, elle se déroule en deux étapes. D'abord une transcription inverse de celui-ci en un ADN complémentaire puis, avec l'ADN polymérase, la reproduction de façon exponentielle d'une séquence de nucléotides, encadrée par des amorces spécifiques, et située sur le gène de la protéine N, le plus transcrit, ou sur celui de la protéine F (**Singh et al., 2004**).

2.4.1.1 Méthodes d'identification virologiques directes

2.4.1.1.1 Polymérase Chain Réaction (PCR) (Amplification par Polymérisation en Chaîne)

Cette technique permet d'amplifier *in vitro* une séquence nucléotidique présente initialement en une seule ou en quelques copies. Quelques heures suffisent pour amplifier au moins un million de fois l'acide nucléique viral d'un tout petit nombre de virions de telle sorte qu'il soit identifié ensuite facilement par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde marquée (Saiki et al., ; 1985).

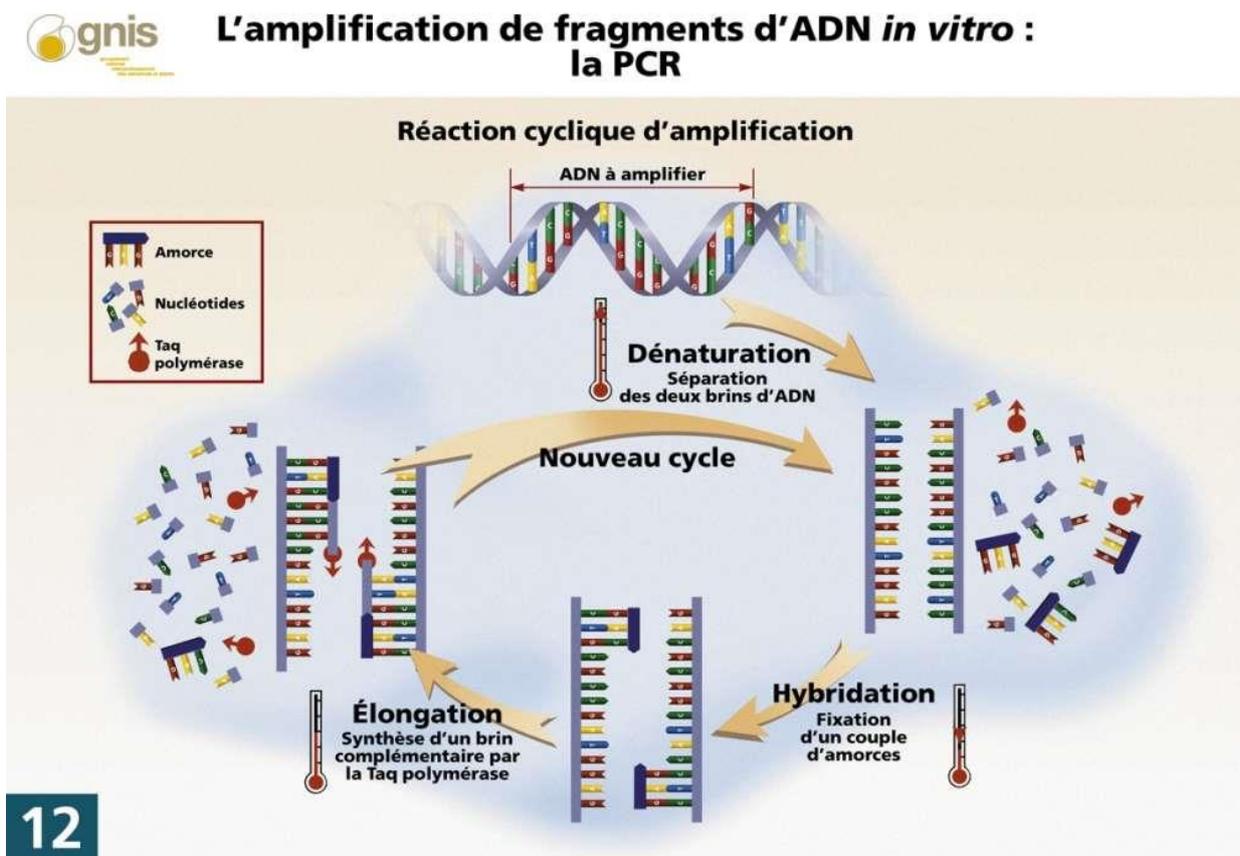


Figure 2.3 : La technique d'amplification de l'ADN par PCR (AnsesioGil , 2007)

Un cycle de PCR comprend 3 étapes (**Figure 2.3**) :

- Dénaturation (94-96°C) : Les brins d'ADN complémentaires cibles contenant la séquence à amplifier se séparent.
- Hybridation (50-60°C) : Les amorces s'hybrident spécifiquement sur chacun des 2 brins d'ADN au niveau de courtes séquences qui flanquent la zone à amplifier.
- Élongation (60-72°C) : L'ADN polymérase thermostable synthétise à partir de chaque amorce une copie complémentaire de chaque brin de la séquence.

Ce cycle (dénaturation-hybridation-élongation) peut être répété de 30 à 40 fois ce qui conduit à une augmentation exponentielle du nombre de copies de la séquence cible.

Ainsi en partant d'une seule copie, 30 cycles aboutissent à plus de 1 million de copies. Cette partie cyclique de la PCR a été automatisée et est réalisée dans un thermocycleur qui permet d'effectuer les 30 à 40 cycles en une à quelques heures.

Pour cette technique, il est nécessaire d'employer une polymérase capable de fonctionner aux températures élevées (60-72°C lors de l'étape d'élongation) et de résister à des températures de 94-96°C (dénaturation) c'est le cas de l'ADN polymérase provenant du microorganisme *Thermophilus aquaticus* (Taq), présent à l'état naturel dans les sources chaudes (**Saiki et al., 1988, Keohavong et al., 1989**).

2.4.1.1.2. RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR)

Technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN. Il s'agit de synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN à l'aide d'une transcriptase inverse ou "reverse transcriptase" (RT) Cette étape qui nécessite la présence d'une amorce pour initier la réaction s'effectue à 37-42°C pendant 30 à 60 min. Elle aboutit à des hybrides ARN-ADN dont le brin d'ADN peut être amplifié par PCR (**Lecomte, 2004**).

Les produits amplifiés sont visualisés par :

- électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide en présence de bromure d'éthyldium et observation sous ultra-violet. Les fragments sont séparés en fonction de leur poids moléculaire.

La révélation des fragments amplifiés après une simple électrophorèse reste la technique la moins sensible et est donc principalement utilisée après RT -PCR

- hybridation moléculaire (dot-blot ou slot blot). Les fragments amplifiés sont déposés sur des membranes (nylon ou nitrocellulose) et révélés par des sondes spécifiques marquées. Cette technique ne fournit aucune information sur la taille des fragments amplifiés mais est plus sensible et plus spécifique qu'une révélation après électrophorèse.

- couplage d'une électrophorèse et d'une hybridation moléculaire (Southern blot) Les fragments amplifiés sont séparés en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse puis transférés sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose pour finalement être révélés par des sondes spécifiques marquées.

C'est la technique la plus couramment utilisée car plus sensible et plus spécifique que la révélation après simple électrophorèse, elle permet de contrôler la taille des fragments amplifiés (**Schwartzbrod ,2000**).

Les gènes N et F sont tous les deux utilisés comme cible pour la RT-PCR conventionnelle (**Forsyth and Barrette, 1995 ; Couacy-Hymannetal., 2002**). La RT-PCR peut également être utilisée directement sur les échantillons collectés sur du papier filtre et stockés en absence de chaîne de froid. Des protocoles pour la RT-PCR quantitative sont disponibles pour le diagnostic de la PPR (**Bao et al., 2008;; Kwiatek et al., 2010 ; Battenetal., 2011**). Une nouvelle technique de PCR, la PCR LAMP pour Loop-mediated isothermal amplification a été mise au point pour l'amplification des acides nucléiques (**Li et al., 2010**). Cette technique pourrait être utilisée sur le terrain avec une extraction de l'ARN simplifiée.

2.4.1.1.3. PCR en temps réel

La PCR en temps réel est utilisée pour de nombreuses applications telles que l'analyse d'expression de gènes, de mutations, de génotypage, de détection et quantification rapide d'agents pathogènes, de quantification d'ADN et d'ARN, d'essais d'expression et de Distribution pour la thérapie génique. La technique de PCR en temps réel est directement inspirée de la PCR classique. Les cycles de PCR successifs induisent une augmentation exponentielle du produit d'amplification, et par conséquent de la fluorescence émise. Pour la détection des amplicons, cette PCR utilise soit l'agent intercalant, soit elle fait appel à des amorces spécifiques du gène à amplifier associées à un système de sondes fluorescentes qui se fixent spécifiquement sur le brin amplifié (**Tellaa ,2013**).

- L'intérêt de la PCR en temps réel :

1. Pour la PCR classique, 2 heures sont nécessaires pour réaliser 30 à 40 cycles alors que 20 à 30 minutes sont nécessaires pour le même nombre de cycles pour la plupart des appareils de PCR en temps réel.
2. Pour les techniques classiques, la détection du produit amplifié se fait, selon différentes méthodes évoquées plus haut qui sont fastidieuses et nécessitent l'utilisation éventuelle de produit cancérigène (BET). De plus, elles favorisent l'électrophorèse et imposent des locaux séparés pour les étapes d'amplification et de post-amplification. A l'inverse, les techniques de PCR en temps réel, permettent une détection spécifique et immédiate de l'amplicon au cours de la réaction de PCR.

3. la PCR en temps réel présente l'avantage de pouvoir quantifier la cible détectée dans l'échantillon biologique (**Poitras *et al.*, 2002**).

2.4.1.1.4. Puces à ADN et analyse du transcriptome

Il s'agit de greffer sur une surface de quelques centimètres carrés des fragments synthétiques d'ADN (les sondes) espacés de quelques micromètres et représentatifs de chacun des gènes étudiés.

Ce micro dispositif est ensuite mis au contact des acides nucléiques à analyser, au cours de l'étape d'hybridation. Ces acides nucléiques, appelés cibles, correspondent aux ARNm ou aux ADNc qui ont été préalablement couplés à un marqueur fluorescent ou radioactif. Ce contact entre cibles et sondes conduit à la formation d'hybrides qualifiés par leurs coordonnées, et quantifiés grâce à la lecture des signaux radioactifs (**Reymond, 2004**).

2.4.1.1.5. Microscopie électronique

Le microscope électronique est un outil qui permet de visualiser des objets extrêmement petits. Pour cette raison, il a été utilisé abondamment pour caractériser et identifier les virus. Le microscope électronique à transmission « transmission electron microscope » (TEM) génère un faisceau d'électrons au départ d'une cathode soumise à un voltage très élevé. Ce faisceau d'électrons est dirigé sur un échantillon qu'il traverse pour en révéler l'image sur un écran fluorescent, une plaque photographique ou plus récemment sur une camera CCD (Caméras qui assure la conversion d'un signal lumineux en un signal électrique) qui peut alors révéler l'image en temps réel sur un moniteur. D'autres microscopes comme le microscope à balayage « Scanning Electron Microscope » (SEM) ou le microscope de force atomique « Atomic Force Microscope » (AFM) permettent aussi de visualiser la structure ou des détails de particules virales (Tony et Pauls, 1999).

2.5. Méthodes d'identification virale indirectes :

2.5.1. Sérologie infectieuse par méthode Elisa :

La technique de dosage d'immuno-absorption par enzyme liée – en anglais Enzyme-Linked Immuno Assay – ou test ELISA est un test immunologique qui permet la détection ou le dosage de molécules dans un échantillon biologique. Elle fut conceptualisée et développée par deux scientifiques suédois, Peter Perlmann et Eva Engvall à l'Université de Stockholm en 1971 (**O'Beirne et Cooper, 1979**).

Le test ELISA est principalement utilisé en immunologie afin de détecter et/ou doser la présence de protéines, d'anticorps ou d'antigènes dans un échantillon. Ce test sérologique détecte notamment les anticorps produits par l'organisme en réponse à la contamination virale, il existe quatre types principaux de test ELISA (**figure 2.4**) : ELISA Directe ,ELISA Indirect, ELISA Sandwich, ELISA Compétitive.

L'utilisation d'anticorps pour le diagnostic des maladies infectieuses représente une méthode spécifique et rapide. La technique ELISA est une technique immuno-enzymatique qui permet de visualiser, à partir d'un échantillon biologique, les réactions entre un antigène – Corps considéré comme étranger par l'organisme vivant – et un anticorps à l'aide d'une réaction colorée produite par un marqueur enzymatique – généralement la phosphatase alcaline et la peroxydase – préalablement fixé à l'anticorps. La réaction colorée permet de confirmer l'identification de la bactérie isolée ou la présence du virus recherché et l'intensité de la couleur donne une indication de la quantité d'antigènes ou d'anticorps dans l'échantillon donné.(**Calamel et Lambert, 1988**)

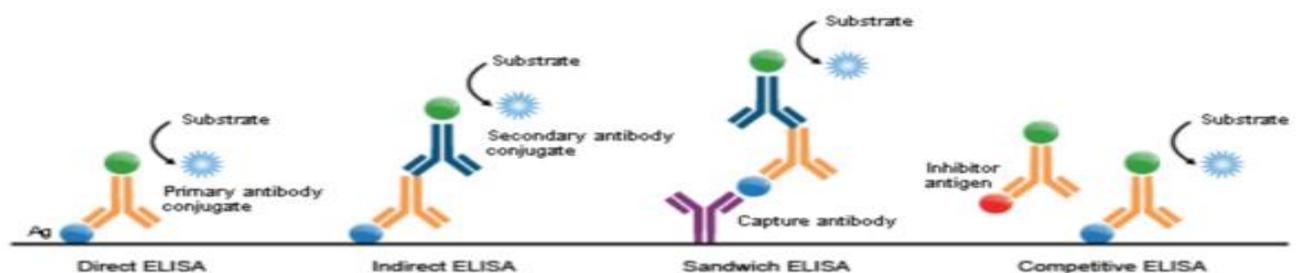


Figure 2.4 : Types de test Elisa (**Calamel et al., 1988**).

2.5.2. ELISA « en sandwich »

La technique « sandwich » a été décrite pour la première fois en 1971 par WIDE avec des anticorps marqués par radio-isotopes, elle permet le dosage des antigènes. Cette technique est utilisée couramment en recherche. Dans ce cas (**figure 2.5**), l'antigène se trouve entre 2 anticorps spécifiques. L'utilisation de la DAS-ELISA ou Double Antibody Sandwich Elisa direct, nécessite de posséder 2 anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène (**London, 1977**).

- La première étape consiste à fixer sur le support, l'anticorps de capture. On incube la solution à 37°C pendant 2 heures puis lavage ou une nuit à 4°C puis lavage.

- Lors de la deuxième étape, on dépose l'échantillon possédant l'antigène à identifier qu'on laisse incuber à 37°C pendant 2 heures puis lavage ou une nuit à 4°C puis lavage.
- Dans une troisième étape, on fixe l'anticorps de détection marqué avec une enzyme sur l'antigène recherché. Pour cela, on dépose la solution d'anticorps dans les puits puis on incube l'ensemble à 37°C pendant 2 heures.
- La dernière étape, on dépose une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme et on laisse incuber pendant 30 à 120 minutes. Le produit de réaction obtenu est soluble et coloré. L'intensité de cette coloration peut être mesurée à l'aide d'un photomètre.



Figure 2.5 : Das-Elisa avec révélation directe et indirecte par le système biotine-streptavidine (Landon, 1977).

NB: la différence entre le DAS ELISA direct et le DAS ELISA indirect par le système biotine-streptavidine réside au niveau de l'anticorps de détection.

Pour le DAS ELISA indirect par le système biotine-streptavidine, l'anticorps de détection porte une molécule de biotine qui interagit avec la streptavidine couplé à une enzyme. La sensibilité du test DAS-ELISA direct se situe entre 1 et 10 ng/ml. Cette sensibilité peut être augmentée par l'utilisation du système indirect du fait de la forte affinité entre la streptavidine et la biotine (Nakano et Nagata, 2004).

2.5.3. ELISA indirect

La plus utilisée, permet aussi de détecter ou doser des anticorps. Elle utilise un anticorps secondaire qui lui permet une meilleure sensibilité que l'ELISA direct (Voller *et al.*, 1978).

Il se réalise en 4 étapes (Figure 2.6)

- La première étape est appelé coating de l'antigène. Elle consiste à incuber dans des puits, la solution d'antigène spécifique de l'anticorps recherché. La fixation de l'antigène sur le fond des puits se fait électro-statiquement. Les plaques sont incubées à 4°C pendant une nuit. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les antigènes en excès avec du tampon de lavage.
- La deuxième étape consiste à fixer l'anticorps à doser. On incube à 37°C dans les puits, la solution d'anticorps à doser pendant environ 30 minutes à 2 heures. Les anticorps se fixent spécifiquement sur l'antigène. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps à doser en excès avec du tampon de lavage.
- La troisième étape consiste à fixer l'anticorps de détection. On incube à 37°C dans les puits, la solution d'anticorps de détection pendant environ 30 minutes à 2 heures. Les anticorps de détection se fixent spécifiquement sur les anticorps à doser. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps de détection en excès avec du tampon de lavage. Notons que les anticorps de détection sont couplés à une enzyme qui en présence de son substrat le transforme en produit de réaction détectable et mesurable grâce à l'apparition d'une coloration.
- La quatrième étape consiste à révéler les anticorps fixés. On incube à température ambiante et à l'obscurité pendant 10 minutes, une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme. L'apparition d'une coloration dans le substrat indique la présence de l'anticorps à doser. L'intensité de celle-ci est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent et donc à la concentration d'anticorps recherché

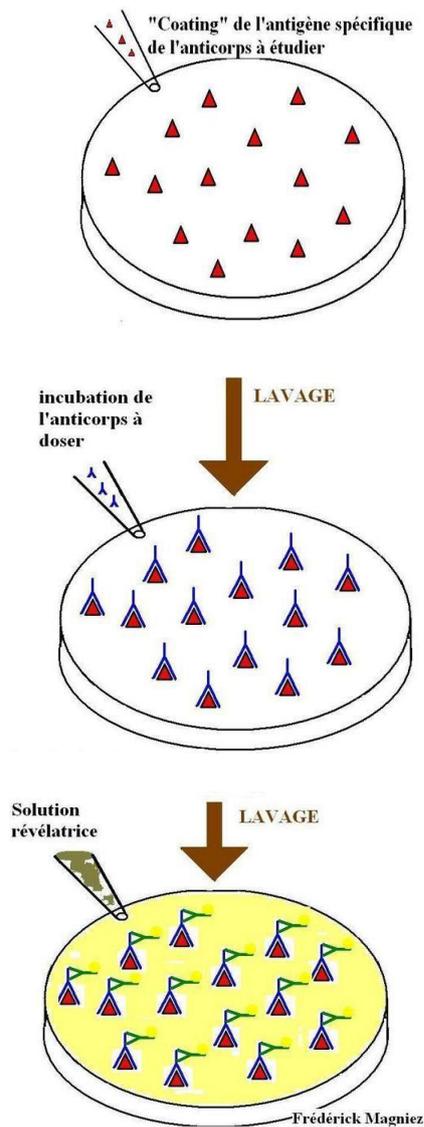


Figure 2.6 : Etapes du test Elisa indirect (**Voller *et al.*, 1978**).

2.5.4. ELISA par compétition

Permet le dosage des antigènes. Réalisée par compétition de liaisons, elle n'utilise pas d'enzyme (**Herman *et al.*, 2008**).

- La technique utilise une protéine à rechercher immobilisée sur un support plastique et un anticorps spécifique conjugué à une enzyme qui est révélé par l'addition d'un substrat qui se colore.
- Ce système de révélation est mis en compétition par une mise en présence préalable d'un échantillon à doser avec l'anticorps conjugué. L'anticorps conjugué est alors bloqué par la protéine recherchée et n'est donc pas révélé sur le support plastique.
- Ce système fonctionne à l'envers dans le sens où plus il y a de protéine présente moins il y a de coloration.

- Dans un ELISA compétitif, un antigène de référence est lié au fond des puits de la microplaque. L'échantillon plus l'anticorps ajouté aux puits, et si un antigène est présent dans l'échantillon, il est en compétition avec l'antigène de référence pour se lier à l'anticorps. La substance non liée est éliminée.
- Plus la quantité d'antigène est importante dans l'échantillon, plus la quantité d'anticorps liée par l'antigène de référence au fond des puits est faible, et plus le signal est faible.

2.5.5. ELISA Direct

Permet de détecter ou doser des anticorps. Utilise uniquement un anticorps conjugué qui est soumis à incubation avec l'antigène contenu dans l'échantillon/la référence et lié à la surface, dans un dosage ELISA direct, l'antigène est lié au fond du puits de la microplaque, puis il est lié par un anticorps qui lui est spécifique et également conjugué à une enzyme ou à une autre molécule (**figure 2.7**) qui permet la détection (**Janeway et Murphy, 2018**).

1. Préparer une surface sur laquelle est lié l'antigène de l'échantillon.
2. Bloquer tous les sites de liaison non spécifiques sur la surface.
3. Appliquer les anticorps liés à des enzymes qui se lient spécifiquement à l'antigène.
4. Rincer la plaque de façon à éliminer les anticorps en excès (non liés à l'antigène).
5. Ajouter une substance chimique qui sera convertie par l'enzyme en couleur, fluorescence ou en signal électrochimique
6. Mesurer l'absorbance, la fluorescence ou le signal électrochimique (le courant) des puits de la plaque, afin de déterminer la présence et la quantité d'antigène Avant l'analyse, les préparations d'anticorps doivent être purifiées et conjuguées.

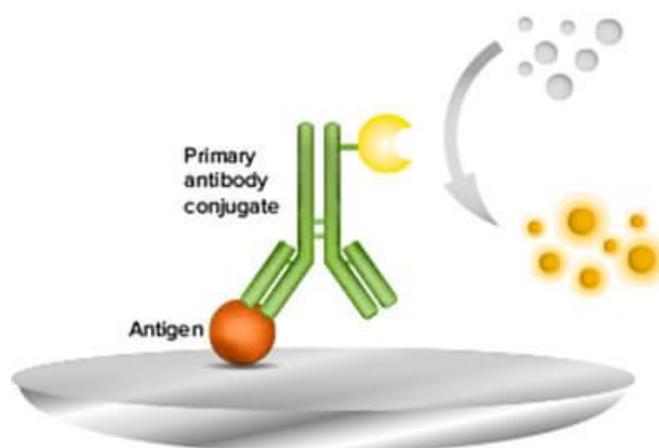


Figure 2.7 : Elisa direct (**Janeway et Murphy, 2018**)

2.6. Nouvelles techniques moléculaires d'identification virales

La biologie moléculaire apporte un ensemble de nouveaux outils puissants. Ces méthodes ont grandement amélioré la rapidité de détecter, d'identifier et de classer rapidement les micro-organismes en plus d'établir la relation taxonomique parmi les genres et les espèces apparentés. L'identification, par les méthodes moléculaires, repose sur la comparaison de séquences d'acides nucléiques (ADN, ARN) ou de profils protéiques d'un micro-organisme avec les données documentées d'organismes connus (**Figure 2.8**). Les méthodes moléculaires sont considérées comme suffisamment sensibles pour permettre une détection à des concentrations faibles de micro-organismes viables ou non viables autant dans les échantillons de cultures pures et que ceux de cultures complexes (**Janeway et al., 2018**).

Comparée aux techniques de microbiologie classique, la biologie moléculaire présente de nombreux avantages. Le résultat est rapide, sensible et spécifique, permet la confirmation du diagnostic, un traitement adapté (**Lamoril et al., 2007**). Les méthodes utilisées sont :

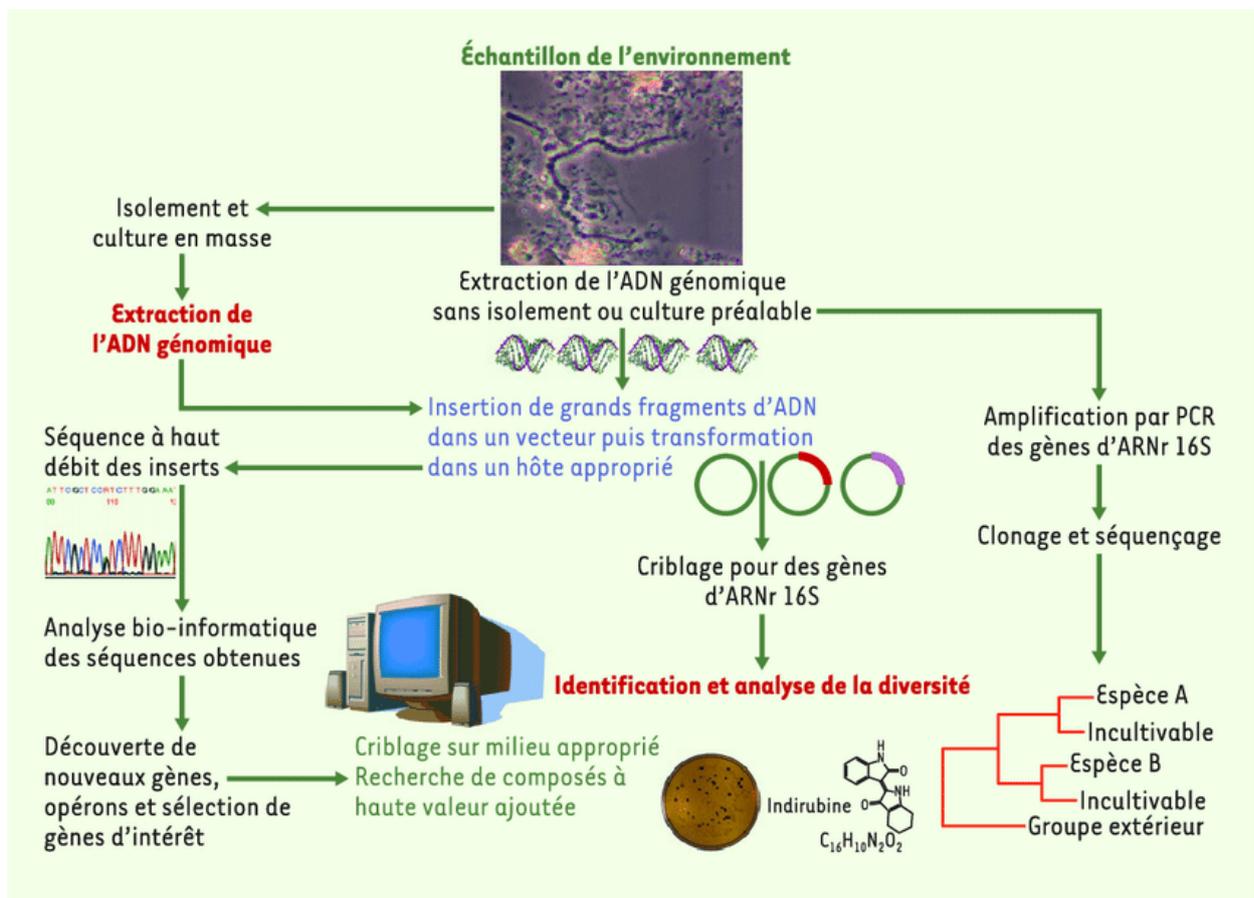


Figure 2.8 : Schéma qui représente les stratégies d'identification du virus (**Janeway et al., 2018**)

2.6.1. Méthodes génotypiques basées sur des modèles et du séquençage

Dans les techniques faisant appel au modèle, une série de fragments provenant de l'ADN chromosomique d'un organisme sont générés. Les fragments générés sont alors séparés en fonction de leur taille pour créer un profil, ou une empreinte génétique unique à cet organisme et aux organismes très apparentés. Ces renseignements sont compilés pour créer une base de données d'empreintes génétiques des organismes connus, à laquelle le profil du micro-organisme testé peut être comparé. Selon la similarité entre les profils des deux organismes, ils seront considérés comme très apparentés ou pas du tout apparentés (**Grosjean et al., 2017**).

Voici quelques exemples de techniques faisant appel au modèle:

- PCR à éléments répétitifs (réaction en chaîne de la polymérase) : Les amorces ciblent des éléments répétitifs spécifiques distribués dans les chromosomes de façon aléatoire.
- Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP) : L'ADN chromosomique est digéré par des enzymes de restriction, suivi d'une PCR à l'aide d'adaptateurs couplés aux sites de restriction.
- Profilage ribosomique : L'ADN chromosomique est digéré par des enzymes de restriction, suivi d'une recherche pour les gènes ribosomiques.
- Amplification aléatoire de l'ADN polymorphe : De courts segments de l'ADN chromosomique sont amplifiés de façon aléatoire par un ensemble d'amorces courtes arbitraires.
- Électrophorèse sur gel en champ pulsé : Des enzymes rares de restriction de coupe sont utilisées pour couper l'ADN chromosomique en gros fragments, et les fragments sont déterminés.
- PCR multiplex : Des gènes de diagnostic sont ciblés par les amorces de la PCR (**Huraux , 2008**).

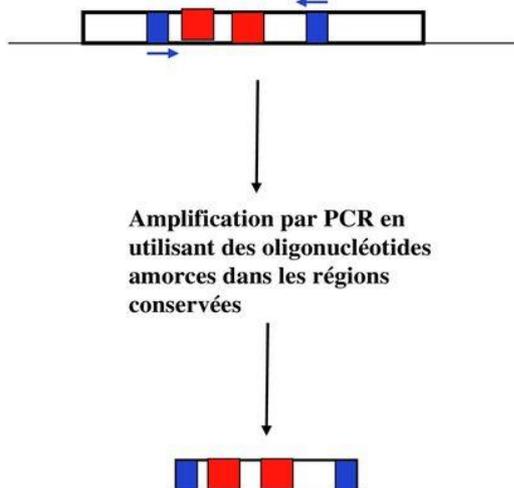
Dans les techniques faisant appel au séquençage, la séquence d'un segment particulier d'ADN est déterminée. Le degré de similarité, ou la concordance, entre une séquence d'ADN provenant d'une base de données et une séquence testée indique dans quelle mesure les deux organismes sont apparentés (**tableau 2.1**). Des algorithmes informatisés sont ensuite utilisés pour comparer plusieurs séquences les unes aux autres et établir un arbre phylogénétique à partir des résultats. Voici quelques exemples de techniques faisant appel au séquençage (**Grosjean et al., 2017**).

Tableau 2.1 : Techniques de séquençage (Grosjean et *al.*, 2017)

Méthodes	Techniques
Séquençage du gène ribosomique en petites sous-unités (ARNr 16s).	Les amorces conservées sont utilisées pour amplifier puis séquencer le gène ARNr en petites sous-unités. Les séquences sont ensuite comparées à une base de données.
Typage génomique multi-locus (MLST) et analyse génomique multi-locus (MLSA)	Séquençage de l'ADN d'un sous-ensemble particulier de gènes conservés et semi-conservés pour une espèce donnée, suivi d'une comparaison des séquences concaténées.

Amplification de l'ARN ribosomique 16S

Dans les ARN 16S et dans les gènes correspondants il y a des régions **conservées** et des régions **variables**.



Structure de l'ARN ribosomique 16S (40 bases)

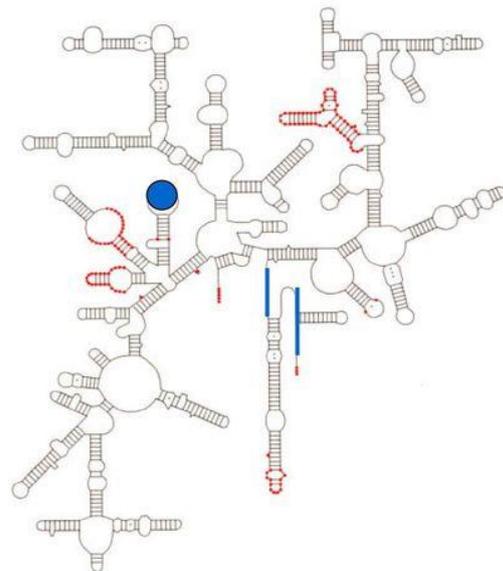


Figure 2.9 : Amplification de l'ARN ribosomique 16S (Moss, 2004)

2.6.2. Méthodes basées sur les techniques protéomiques :

Les méthodes qui déterminent l'activité d'enzymes particuliers, comme la catalase ou l'oxydase, ou les fonctions métaboliques, telles que la capacité de dégrader le lactose, ont longtemps été utilisées comme méthodes de base pour l'identification bactérienne. Les outils protéomiques offrent un excellent complément aux techniques classiques fondées sur la génomique ou la microbiologie en ce qui concerne la classification, l'identification, et la caractérisation phénotypique des bactéries. Les techniques protéomiques prédominantes qui ont été utilisées pour l'identification et la caractérisation bactérienne comprennent les suivantes (**Flandrois et al., 1997**) (**Figure2.10**):

1. la désorption-ionisation par impact laser assistée par matrice spectrométrie à temps de vol (technologie MALDI-TOF-MS);
2. la spectrométrie de masse à ionisation par électronébulisation
3. la désorption-ionisation laser assistée par surface
4. la spectrométrie de masse (**figure 2.11**)
5. l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécyl-sulfate de sodium à une ou deux dimensions
6. une combinaison de spectrométrie de masse, d'électrophorèse sur gel, et de bio-informatiques, etc..... (**Figure2.10**).

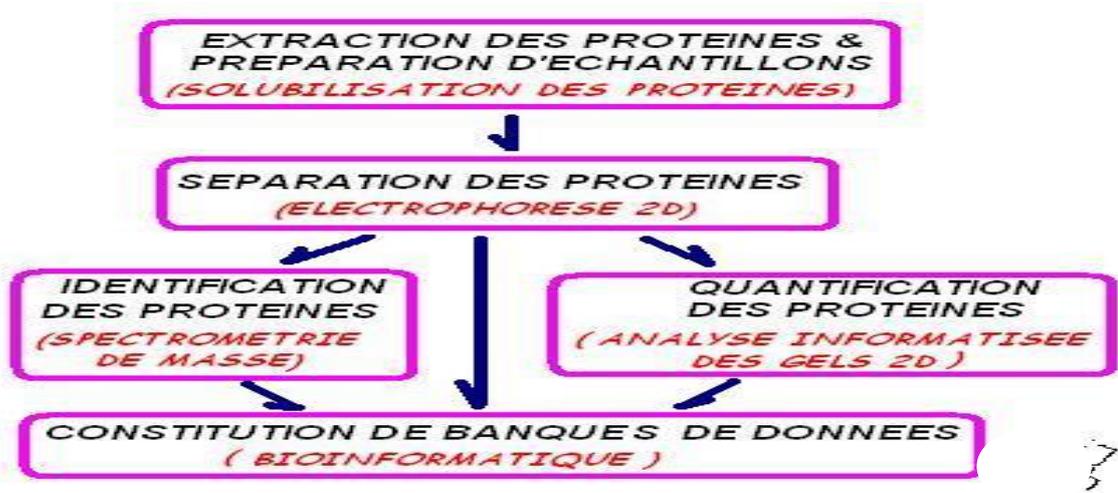


Figure 2.10 : Principales étapes de l'étude protéomique(**Flandrois et al.,1997**)

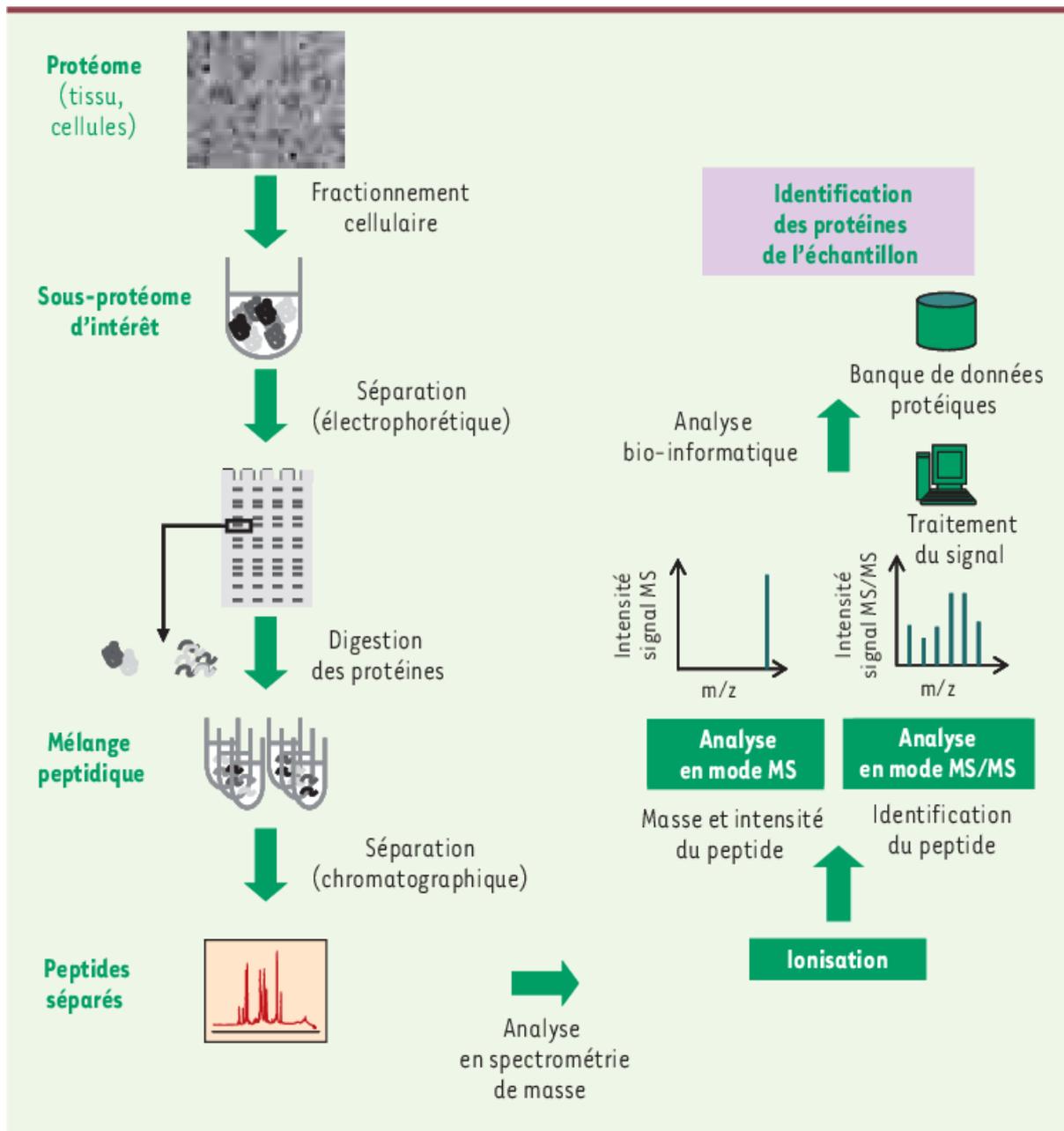


Figure 2.11 : Déroulement d'une analyse protéomique basée sur la spectrométrie de masse (Merchant et *al.*, 2000)

2.6.3. Techniques d'hybridation moléculaire :

L'hybridation moléculaire permet de repérer ou de rechercher une molécule d'ADN ou d'ARN spécifique dans une population hétérogène. Le principe est de marquer par un traceur radioactif ou chimique la séquence d'ADN connue et purifiée que l'on veut repérer dans une population. Ce fragment monocaténaire marqué constitue la sonde (Tague et Mussard, 2003).

Les molécules cibles rendues simple brin (population hétérogène d'acides nucléiques dénaturé) sont au préalable fixées sur une membrane d'hybridation en nylon ou en nitrocellulose.

La sonde simple brin et la cible dénaturée sont mises au contact (la membrane est incubé dans des surface contenant la sonde) dans des conditions permettent une renaturation lorsque la molécule sonde reconnaît son homologue dans la population de molécules cibles. Elles s'hybrident et l'hybride devient marqué par la présence de la sonde **(Vande pille et al., 1994)**.

Des lavages appropriés des membranes permettent d'éliminer alors toute hybridation non spécifique et de ne garde que les hybrides sonde/cible recherchés. Dans le cas d'un marquage radioactif, les hybrides sont repérés en plaçant la membrane au contact d'un film auto radiographique, qui ensuite développé comme un film photographique. Dans le cas d'un marquage chimique, l'hybride moléculaires est révèle souvent par test colorimétrique sur membrane **(Tague et Mussard, 2003)**.

- **Hybridation ADN/ADN (Southern Blot) :**

Le Southern blot est une technique mise au point pour rechercher des fragments de DNA sur une électrophorèse en les hybridant avec une sonde complémentaire.

Après avoir digéré le DNA par une enzyme de restriction, on obtient un mélange de très nombreux fragments de restriction. On soumet ces fragments à une électrophorèse pour les faire migrer dans un gel de haut en bas en fonction inverse de leur taille.

On fait un montage pour faire passer les fragments grâce à une montée de tampon imprégnant le gel puis une membrane de nylon où le DNA va se fixer par des liaisons stables.

La membrane de nylon avec le DNA fixé est alors mise à incuber dans un sac contenant une solution d'une sonde radioactive complémentaire du fragment de DNA qu'on recherche, à une température assez basse pour que l'hybride se forme mais assez élevée pour que cet hybride soit parfaitement complémentaire **(Moussard C ,2003)**.

On lave la membrane des molécules de la sonde qui ne sont pas fixées à leur DNA complémentaire, puis on la met en présence d'un film radiographique vierge dans une enceinte opaque pour que la sonde radioactive fixée sur les fragments de DNA complémentaires impressionne le film.

On révèle le film où des taches noires (sur le négatif) correspondent aux emplacements où ont migré les fragments d'ADN complémentaires de la sonde, On compare les distances de migration avec des fragments de DNA radioactifs de tailles connues qui servent **(Raisonnier, 2006)**

- **Hybridation ADN/ARN ou northern blotting:**

Une technique qui permet de détecter la présence d'ARN messagers (ARNm) spécifiques mais également des ARN non codants comme les petits ARN et les ARN ribosomiaux à l'aide de sondes marquées. Les ARN messagers d'un échantillon sont séparés par électrophorèse. La mise en présence du résultat d'électrophorèse avec une sonde radioactive d'ADN complémentaire (ADNc) de l'ARNm recherché entraîne la détection ou non d'un ARN. La présence de l'ARN est révélée par autoradiographie. Cette technique permet de mesurer l'expression relative d'au plus 20 gènes à la fois **(Carpentier, 2006)**.

2.6.4. Western blot (immune-empreinte) :

Western blot est une technique immunologique qui permet d'analyser l'expression d'une protéine d'intérêt au sein d'un extrait de protéines totales **(Lecomte, 2004)**.

L'immuno-empreinte est utilisée pour l'identification d'une protéine donnée de lysat cellulaire, mais il évite l'inconvénient du marquage radio-isotopique de grande quantité des cellules, les cellules non marquées sont traitées par un détergent qui solubilise toutes les protéines cellulaire, puis on sépare celles-ci en faisant migrer le lysat de SDS-PAGE.

Les protéines séparées en fonction de leur taille sont alors transférées du gel sur un support table, comme une membrane de nitrocellulose.

Les protéines spécifiques sont détecté par un traitement avec des anticorps capables de réagir avec des protéines solubilisé par SDS (c'est à –dire surtout ceux qui peuvent lier des séquences dénaturées), ces anticorps fixés sont ensuite révélé par des anticorps anti-immunoglobulines marqués par un radio-isotope ou une enzyme **(Janeway et Murphy, 2018)**.

Les immuno-empreintes trouvent de nombreuses applications en recherche et diagnostic clinique, elles sont souvent utilisées dans les tests sérologiques pour la détection d'anticorps contre des protéines spécifiques, par exemple, les différents constituants du virus d'immunodéficience humaine (HIV) **(Janeway et Murphy, 2018)**

CHAPITRE 3

Contrôle de la maladie

3.1. Vaccination

La vaccination est couramment utilisée dans le cadre de la lutte contre les maladies infectieuses (peste bovine, fièvre aphteuse, peste porcine classique ou encore la maladie de Newcastle) **(Roth, 2011)**.

Dans le cas de la PPR, la surveillance épidémiologique efficace rend la vaccination inévitable et essentielle **(Babiuk, 2002; Luka et al., 2011; OIE, 2014)**, elle est considérée comme l'outil de lutte efficace contre la PPR **(Kumar et al., 2014)**.

Les vaccins de la PPR sont disponibles et abordables financièrement **(Singh et al., 2015)**. Les plus largement utilisés sont des vaccins vivants atténués par passages successifs sur cultures cellulaires dérivées des souches Nigeria 75/1 (vaccins africains), Sungri/96 (vaccins indiens), Arasur/87 (vaccins indiens) et Coimbatore/97 (vaccins indiens) **(Rojas et al., 2014)**.

Dans de bonnes conditions, tous ces vaccins induisent avec une seule injection une immunité active à long terme protégeant contre les quatre lignées virales connues.

En Afrique, les vaccins contre la PPR utilisés sont "PPR-VAC", "PESTEVAC", "Peste des Petits Ruminants Virus Vaccine" et "PPR-TC Vaccine Attenuated", sont dérivés de la souche Nigerian 75/1 **(Libeau et Bonnet, 2012)**. Produits par des laboratoires africains, ils sont largement distribués à travers tout le continent (The Center for Food Security & Public Health, 2016). Ils n'ont pas d'effets secondaires, même administrés en sur-dose. Les femelles vaccinées sont capables de transmettre des anticorps colostraux anti-PPRV à leur progéniture **(Colas et al., 1999)**. L'immunité colostrale est maintenue pendant environ trois mois chez la progéniture de femelles vaccinées **(Awa et al., 2002)**.

En raison d'un conflit entre les anticorps colostraux et les anticorps vaccinaux, et de l'immaturation du système immunitaire durant les mois suivant la naissance, le vaccin doit être administré aux animaux de plus de trois mois révolus pour optimiser la production d'une réponse immunitaire effective **(Kumar et al., 2014)**.

Chez un animal sain en âge d'être vacciné, une seule injection induit rapidement une immunité active contre les PPRV des quatre lignées **(Khan et al., 2009; Kumar et al., 2014)**. Cette immunité persiste pendant au moins trois ans en conditions expérimentales **(Sen et al., 2010)**.

3.2. L'éradication est-elle possible

Jusqu'alors les deux seules éradications effectives de maladies infectieuses humaines ou animales sont celles de la variole en 1979 **(World Health Organization et al., 1980)** – maladie humaine – et de la peste bovine en 2011 **(Moutou, 2014)**. Or, les caractéristiques et l'intérêt

porté à ces espèces (humain et bovins) sont bien différents de ceux des petits ruminants. Dans le cas de l'éradication de la PPR, les stratégies préalablement utilisées ne seront pas nécessairement adéquates que ce soit en terme épidémiologique (renouvellement des populations, contacts entre troupeaux, réponse immunitaire, etc.) ou d'investissement humain (intérêt des éleveurs, coût de la vaccination, coût de la surveillance, etc.). Néanmoins, considérant l'existence de méthodes de diagnostic fiables et de vaccins de qualité, de nombreuses études ont mis en exergue des caractéristiques de la PPR qui lui conférerait le statut de maladie "éradicable" (**Mariner et al., 2016**). On compte parmi ces caractéristiques l'inaptitude du virus à survivre à l'extérieur de l'hôte, la courte durée de l'infection, un vaccin efficace, des outils de diagnostic appropriés ou encore le développement d'une réponse immunitaire persistante contre le PPRV chez les petits ruminants.

- Les anticorps colostraux On appelle colostrum, la première sécrétion lactée chez les mammifères. Cette sécrétion se caractérise par un aspect jaunâtre et une consistance pâteuse. Elle est riche en protéines, acides gras, vitamines, minéraux, et surtout en anticorps. Une mère en bonne santé et porteuse d'anticorps contre le PPRV est donc capable de transmettre des anticorps à sa portée via l'ingestion de ce colostrum (**Awa et al., 2002**). Chez les petits ruminants, les anticorps colostraux contre le PPRV persistent dans l'organisme entre 2.5 et 4 mois (**Bodjo et al., 2006**). Ils protègent les juvéniles d'une éventuelle infection par le PPRV mais peuvent également contrecarrer les effets d'une vaccination en bloquant la réplication du virus vaccinal. Les services vétérinaires recommandent donc de ne pas vacciner les individus de moins de 4 mois (**Awa et al., 2002**).
- Immunité à vie suite à une infection A l'issue d'une infection par le PPRV soit l'animal décède, soit il développe une immunité active qui le protégera de la maladie jusqu'à sa mort (**Balamurugan et al., 2014**).
- Immunité à vie suite à une vaccination Si le processus de vaccination a été réalisé dans de bonnes conditions (maintien de la chaîne de froid, matériel stérile, animal en bonne condition physiologique, d'âge requis et non immuno-déficient), on considère que l'immunité développée par l'animal se maintient jusqu'à sa mort.
- La persistance de l'immunité individuelle permet d'envisager la persistance du taux d'immunité suite à la vaccination. La décroissance du taux d'immunité contre la PPR dans les troupeaux de petits ruminants est donc estimable à partir du renouvellement des populations sans avoir à prendre en compte une potentielle perte d'immunité individuelle au cours du temps. La stratégie globale s'adresse aux pays en zone d'endémicité ou considérés comme

ayant un risque important d'introduction du virus (comme par exemple la Grèce, la Russie ou Madagascar). La durée de chaque phase dépendra du contexte épidémiologique de chaque pays.

Conclusion

Les séries de tests disponibles du diagnostic de la PPR pourraient être appliqués dans plusieurs régions géographiques pour le contrôle et l'éradication de la PPR en fonction des niveaux d'expertise existants et des ressources disponibles. Des tests rapides tels que le test immunochromatographique peuvent être utilisés sur le terrain pour le diagnostic de la PPR, tandis que l'immunocapture et l'ELISA sandwich sont utiles pour le diagnostic en laboratoire. Si ces tests ne parviennent pas à détecter le PPRV, des méthodes sensibles telles que la RT-PCR et la RT-PCR-ELISA auraient être disponible pour confirmer la maladie. Les diagnostics rapides sont utiles pour le diagnostic au niveau du troupeau plutôt que sur des animaux individuels, car lorsqu'un ou quelques animaux sont positifs pour l'infection dans un test immunochromatographique, le troupeau est considéré comme positif. De même, l'immunocapture/ELISA en sandwich est un test convivial pour la surveillance clinique de routine et le diagnostic de la PPR. Pour la détection du PPRV pendant les phases précoces de la maladie et pour les échantillons qui ont donné des résultats ambigus nécessitent une nouvelle confirmation, des tests hautement sensibles basés sur les acides nucléiques tels que la RT-PCR et la RT-PCR-ELISA. Les quatre étapes de la stratégie mondiale de contrôle et d'éradication de la PPR de la FAO-OIE, à savoir. L'évaluation, le contrôle, l'éradication et la post-éradication impliquent l'utilisation intensive de diagnostics avec une sensibilité et une spécificité variables. La mise au point d'un vaccin multivalent et de tests diagnostiques discriminatoires pour plusieurs maladies faciliterait également la réduction de la pauvreté grâce à l'amélioration de la production de petits ruminants. Cependant, les étapes finales de l'éradication de la PPR sont des approches plus ciblées peuvent être nécessaires pour finalement éliminer le virus de l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, G., Sintayehu, A., Libeau, G., Albina, E., Roge, F., Laekemariam, Y., Abyaneh, D. et Awoke, K. (2005).** Antibody seroprevalences against peste des petits ruminants (ppr) virus in camels, cattle, goats and sheep in Ethiopia. *Preventive veterinary medicine*, 70(1):51–57
- Abubakar, M., Ali, Q. et Khan, H. A. (2008).** Prevalence and mortality rate of peste des petits ruminant (ppr) : possible association with abortion in goat. *Tropical animal health and production*, 40(5):317–321
- Albina, E., Kwiatek, O., Minet, C., Lancelot, R., Servan de Almeida, R. et Libeau, G. (2013).** Peste des petits ruminants, the next eradicated animal disease? *Veterinary microbiology*, 165(1):38–44.
- Anderson, J., McKay, J.A. (1994).** The detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats and the possible implications to rinderpest control programmes. *Epidemiol. Infect* 112, 225.
- Ansesio Gil. L (2007)** PCR based methods for fish and fishery products authentication. *Trends in food science and technology* 18 (11): 558-566.
- Awa, D. N., Ngagnou, A., Tefiang, E., Yaya, D. et Njoya, A. (2002).** Post vaccination and colostral peste des petits ruminants antibody dynamics in research flocks of kirdi goats and fowlbe sheep of north cameroon. *Preventive veterinary medicine*, 55(4):265–271.
- Babiuk, L. (2002).** Vaccination: a management tool in veterinary medicine. *Vet J*, 164(3):188–201.
- Balamurugan V, Singh RP, Saravanan P, Sen A, Sarkar J, Sahay B, Rasool TJ, RK., S., (2007).** Development of an indirect ELISA for the detection of antibodies against Peste-des-petits-ruminants virus in small ruminants. *Vet. Res. Commun.* 31, 355-364
- Banyard, A. C., Parida, S., Batten, C., Oura, C., Kwiatek, O. et Libeau, G. (2010).** Global distribution of peste des petits ruminants prospects for improved diagnosis and control. *Journal of general virology*, 91(12):2885–2897

Bao, J., Wang Q, Li L, Liu C, Zhang Z, Li J, Wang S, Wu X, Wang, Z., (2017). Evolutionary dynamics of recent peste des petits ruminants virus epidemic in China during 2013-2014. *virology* 510, 156-164.

Baron, M., 2005. Wild-type Rinderpest virus uses SLAM (CD150) as its receptor. *J. Gen. Virol.* 86, 1753.

Baron, M., Parida, S. et Oura, C. (2011). Peste des petits ruminants : a suitable candidate for eradication *Veterinary Record : Journal of the British Veterinary Association*, 169(1):16–21.

Baron, M.D., Diallo, A., Lancelot, R. et Libeau, G. (2016). Peste des petits ruminants virus. *Advances in virus research*, 95:1–42.

Bodjo, S. C., Couacy-Hymann, E., Koffi, M. Y. et Danho, T. (2006). Assessment of the duration of maternal antibodies specific to the homologous peste des petits ruminant vaccine "nigeria 75/1" in djallonké lambs. *Biokemistri*, 18(2).

Brüning-Richardson A, Akerblom L, Klingeborn B, J., A., (2011). Improvement and development of rapid chromatographic strip-tests for the diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants viruses. *J Virol Methods* 174, 42-46.

Calamel M, Lambert M (1988). E.L.I.S.A. standardised technique. English edition : Laboratoire National de Pathologie des Petits Ruminants et des Abeilles, 235p

Carpentier A-S (2006). Le transcriptome : un domaine d'application pour les statistiques, de nouveaux horizons pour la biologie. Thèse pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université d'Evry, Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire, Université d'Evry, France 137p.

Chauhan, H., Chandel, B., Kher, H., Dadawala, A., Agrawal, S. et al. (2009). Peste des petits ruminants virus infection in animals. *Veterinary World*, 2(4):150–155.

Colas, F., Guerre, L., Libeau, G. et Diallo, A. (1999). Innocuité sur chèvre gestante et protection colostrale du vaccin homologue anti peste des petits ruminants. *Vet. Microbiol.*, 23 : 155-163.

<https://www.cirad.fr/nos-activites-notre-impact/enseignement-et-formation/formation-professionnelle/catalogue-des-formations/peste-des-petits-ruminants>. Consulté le 15 octobre 2021. 12:24.

Couacy-Haymann, E. (2013). Update on PPR Epidemiology, Diagnosis and its Control. *RASPA*, 2013 :59-65. Article de synthèse. 11 :59-65.

Coucy-Hymann, E., Roger, F., Hurard, C., Guillou, J.P., Libeau, G., Diallo, A., (2002). Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay. *Journal of Virological Methods* 100, 17-25.

Coucy-Hymann, E., Bodjo, C., Danho, T., Libeau, G. et Diallo, A. (2007). Evaluation of the virulence of some strains of peste-des-petits ruminants virus (pprv) in experimentally infected west african dwarf goats. *Veterinary journal* (London, England : 1997), 173:178–183.

Diallo, A. (2010). Peste des petits ruminants, Guide pratique de diagnostic et de gestion des épizooties. 143-154. Paris, Direction Générale de l'alimentation (DGA1).

Diallo, A., Gourreau, J.-M., Jestin, V., Potier, M.-F. L., Lefevre, P.-C., Boisseleau, D., Mesplède, A., Picault, J.-P., Thiaucourt, F., Toma, B., Zientara, S. et GOFFETTE, R. (2010). Guide pratique de diagnostic et de gestion des épizooties. Direction Générale de l'Alimentation.

Ezeibe, M., Okoroafor, O., Ngene, A., Eze, J., Eze, I. et Uganabo, J. (2008). Persistent detection of peste de petits ruminants antigen in the feces of recovered goats. *Tropical animal health and production*, 40(7): 517–519.

FAO. 2009. Peste des petits ruminants (PPR) : une menace croissante pour l'élevage de petits ruminants en Afrique et en Asie. EMPRES, Bulletin des maladies transfrontalières.

Flandrois J.P., Courcol R., Lemeland J.F., Ramus M., Sirot J., Soussy C.J. (1997). Bacteriologie médicale, collection AZAY, presses universitaire de lyon. p151.

Forsyth, M.A., Barrette, T., (1995). Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterization of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Res.* 39, 151-163.

Gibbs, E., Taylor, W., Lawmn, M. et Brayant, J. (1979). Classification of peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus morbillivirus. *Intervirology*, 11(5):268–274

Hamdy, F. M: Dardiri, A. H. NDUAKAB ; Breese, S.S. ; Ihemelanqu, E.C Etiology of the stomatitis-pneumo enteritis complex in Nigeria dwarf goats. *Cano 1. Camp. Med.* (1976), 40 (3), 276-284

Hart T. et Shears P. (1999). Atlas de poche de microbiologie. Médecine-Sciences Flammarion Paris p18-228.

Janeway C. A et Murphy K (2018).immunobiologie de janeway. Traduction de pierre L.Masson .4ieme édition de book superieur p763.

Khalafalla, A. I., Saeed, I. K., Ali, Y. H., Abdurrahman, M. B., Kwiatek, O., Libeau, G., Obeida, A. A. et ABBAS, Z. (2010).An outbreak of peste des petits ruminants (ppr) in camels in the sudan. Actatropica, 116(2):161–165.

Knopf L. (2009) : Le point sur l'éradication mondiale de la peste bovine, Bull. Off. OIE, 2009-3, 52-53.

Kumar S., Stecher G., K., T., (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular biology and evolution 30, 1870-1874.

Kumar, N., Maherchandani, S., Kashyap, S. K., Singh, S. V., Sharma , S., Chaubey, K. K. et LY, H. (2014). Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants: Acomprehensive review. Viruses, 6(6):2287–2327.

Kwiatek, O., Keita, D., GIL, P., Fernandez perrino, J., JimenzClavero, M. A., Albina, E. etLibeau, G. (2010).Quantitative one-step real-time rt-pcr for the fast detection of the four genotypes of pprv.Journal of virological methods, 165:168–177

Kwiatek, O., Ali, Y.H., Saeed, I.K., Khalafalla, A.I., Mohamed, O.I., Obeida, A.A., Abdelrahman, M.B., Osman, H.M., Taha, K.M., Abbas, Z., El Harrak, M., Lhor, Y., Diallo, A., Lancelot, R., Albina, E., Libeau, G., (2011). Asian lineage of peste des petits ruminants virus, Africa. Emerging infectious diseases 17, 1223-1231.

Lamoril J, Bogard M, Ameziane N, DeybachJ.C ,Bouizegarène P (2007).Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007 : Molecular biology in clinical microbiology in 2007. Revue générale et analyse prospective : 6-17.

Lecomte C (2004).Modélisation génétique de l'oncogenèse mesotheliale induit par les fibres minérales. Thèse doctorat université de paris XII discipline biologie cellulaire et moléculaires.224P

Lefèvre P.C. (1991) : Une maladie en pleine expansion : la peste des petits ruminants ; Rev. mond. zootech., 66, 55-58.

Lefevre, P. et Diallo, A. (1990). Peste des petits ruminants. *Revue scientifique et technique* (International Office of Epizootics), 9(4):935–981.

Li L, Bao J, Wu X, Wang Z, Wang J, Gong M, Liu C, J., L., (2010). Rapid detection of peste des petits ruminants virus by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Virol Methods* 170, 37-41.

Libeau, G., Prehaud, C., Lancelot, R., Colas, F., Guerre, L., Bishop, D.H.L., Diallo, A., (1994). Development of a competitive ELISA for peste des petits ruminants virus antibody detection using a recombinant N protein. *Res. vet.Sci* 58, 50

Luka, P. D., Erume, J., Mwiine , F. N. et Ayebazibwe, C. (2012). Molecular characterization of peste des petits ruminants virus from the karamoja region of uganda (2007-2008). *Archives of virology*, 157:29–35.

Mariner, J. C., Jones, B. A., Rich, K. M., Thevasagayam, S., Anderson, J., Jeggo, M., Cai, Y., Peters, A. R. et Roeder, P. L. (2016). The opportunity to eradicate peste des petits ruminants. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 196(9):3499–3506.

Merchant M, Weinberger S, R (2000). Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* ; 21 : 1164–77.

Molla, B. et Delil, F. (2015). Mapping of major diseases and devising prevention and control regimen to common diseases in cattle and shoats in dassenech district of south omo zone, south-western Ethiopia. *Trop Animal Health Prod*, 47(1):45–51.

Moss, T. (2004). At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 14(2), 210-217.

Moussard C (2003). Principe des techniques de biologie moléculaire. 2^{eme} édition revue augmentée p 34.

Moutou, F. (2014). The second éradication : rinderpest. *Bulletin de la Société de pathologie exotique* (1990), 107:137–8, 135–6.

Nakano T, Nagata A. (2004). ELISAs for free human immunoglobulin light chains in serum: improvement of assay specificity by using two specific antibodies in a sandwich detection method. *Journal of Immunological Methods*, 293, 183-189.

O’Beirne AJ, Cooper HR (1979). Heterogeneous enzyme immunoassay. *The journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 27, 1148-1162.

OIE (2009) :Download OIE Reports, Immediate notifications and follow-up report. Peste des petits ruminants. OIE Terrestrial Manual 2013, chapter 2.7.11, 12p.

OIE (2013).Peste des petits ruminants. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, chapitre 2.7.11. Office International des Epizooties (World Organisation for Animal Health), 7 édition.

OIE (2014).Guidelines for Animal Disease Control. OIE2014.

Parida, S., Couacy-Hymen, E., Pope, R. A., Mahapatra, M., Harrak, M.E., Brownlie, J. et Banyard, A.C. (2015). Pathology of peste des petits ruminants. *Peste des Petits Ruminants Virus. Vet. Microbiol* 88, 153-159.

Parida, S., Muniraju, M., Mahapatra, M., Muthuchelvan, D., Buczkowski, H. et Banyard, A.C. (2015). Peste des petits ruminants. *Veterinary microbiology*, 181:90–106.

Poitras E, Houde A (2002) la PCR en temps réel principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology*. 2 (2) : 2-11.

Raisonnier A (2006). Biologie génique, Université Pierre et Marie Curie Techniques de biologie moléculaires. INRA edition .paris. P 61

Reymond N. (2004). Bioinformatique des puces à ADN et application à l’analyse du transcriptome de *Buchnera aphidicola*. Thèse doctorat l’institut national des sciences appliquées de Lyon. 325p

Roeder, D. P., Obi, P. T., Taylor, D. W. et Diallo, A. (1999). Recognizing peste des petits ruminants - A field Manual. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Preventive veterinary medicine*, 102:98–106.

- Rojas, J. M., Moreno, H., Garcia, A., Ramirez, J. C., Sevilla, N. et Martin, V. (2014).** Two replication-defective adenoviral vaccine vectors for the induction of immune responses to pprv. *Vaccine*, 32(3):393–400.
- Rossiter, P., (1994).** Rinderpest. *Infectious diseases of Livestock with special reference to Southern Africa* 2 735-757.
- Roth, J. A. (2011).** Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. *Procedia in Vaccinology*, 5:127–136.
- Saiki R.K, Gelfand D.H, Stoffel S, Scharf S.J, Higuchi R, Horn G.T, Mullis K.B and Erlich H.A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239,487-49
- Saravanan, P., Sen, A., Balamurugan, V., Rajak, K., Bhanuprakash, V., Palaniswami, K., Nachimuthu, K., Thangavelu, A., Dhinakarraj, G., Hegde, R. et al. (2010).** Comparative efficacy of peste des petits ruminants (ppr) vaccines. *Biologicals*, 38(4):479–485.
- Sen, A., Saravanan, P., Balamurugan, V., Rajak, K. K., Sudhakar, S. B., Bhanuprakash, V., PARIDA, S. et SINGH, R. K. (2010).** Vaccines against peste des petits ruminants virus. *Expert Reviews Vaccines*, 9(7): 785–796.
- Singh RP, Sreenivasa BP, Dhar P, Shah LC, SK., B., (2004).** Development of a monoclonal antibody based competitive-ELISA for detection and titration of antibodies to peste des petits ruminants (PPR) virus. *Vet. microbiol.* 98, 3-15.
- Singh, R., Saravanan, P., Sreevinasa, B., Singh, R. et Bandyopadhyay, S. (2004).** Prevalence and distribution of peste des petits ruminants virus infection in small ruminants in India. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 23(3):807–819.
- Singh, R. K., Rajak, K. K., Muthuchelvan, D., Banyard, A. C. et Parida, S. (2015).** Vaccines against peste des petits ruminants virus. *Peste des Petits Ruminants Virus. Veterinary microbiology*, 98(1):3–15.
- Tagu D, Moussard C (2003).** Principe des techniques de biologie moléculaire. 2eme edition revue augmentée : 39-40.

Taylor, W. (2016). The global eradication of peste des petits ruminants (ppr) within 15 years—is this a pipe dream? *Tropical animal health and production*, 48(3):559–567.

Tellaa R (2013). Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections. Thèse du doctorat en pharmacie, Université Mohammed V -SOUISSI, Faculté de médecine et de pharmacie Rabat : 157p.

Vandepille J, Engbaek , Bourguiba M , Fakhfekh R, Slim L (1994). Bactériologie clinique : Techniques de base pour laboratoire, Organisation mondiale de la santé. Pp. 26 – 30.

Voller A, Bartlett A, Bidwell D.E (1978) .Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology*, 31, 507-520.

Wohlsein, P. et Singh, R. (2015). Peste des petits ruminants in unusual hosts : Epidemiology, disease, and impact on eradication. *Pest des Petits Ruminants Virus. Journal of biotechnology*, 73:195–205.

Woma, T.Y., Kalla, D.J.U., Ekong, P.S., Ularamu, H.G., Chollom, S. C., Lamurde, I. I., Bajehanson, D. B., Tom, N. D., Aaron, G. B., Shamaki, D., Bailey, D., Diallo, A. et Quan, M. (2015). Serological evidence of camel exposure to peste des petits ruminants virus (pprv) in Nigeria. *Tropical Animal Health and Production*, 47(3):603.