

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>14</b>
1.1	Le contexte.....	14
1.2	Problématique .....	15
1.3	Hypothèses et questions de recherche.....	15
1.4	Objectifs.....	16
1.5	Méthodologie.....	16
<b>2</b>	<b>Synthèse bibliographique PPR.....</b>	<b>18</b>
2.1	Généralité sur la Peste des Petits Ruminants .....	18
2.1.1	<i>La peste des petits ruminants.....</i>	<i>18</i>
2.1.2	<i>Etendue géographique de la maladie .....</i>	<i>18</i>
2.1.3	<i>Le virus de la peste des petits ruminants .....</i>	<i>19</i>
2.1.4	<i>Le cycle viral.....</i>	<i>23</i>
2.1.5	<i>Les signes cliniques de la maladie – le Pouvoir pathogène .....</i>	<i>25</i>
2.1.6	<i>Le diagnostic de la PPR.....</i>	<i>27</i>
2.1.7	<i>Epidémiologie, Hôtes et Transmission .....</i>	<i>28</i>
2.1.8	<i>Les moyens de traitement et de prévention .....</i>	<i>29</i>
2.2	La répartition géographique.....	30
2.3	L'élevage et le commerce de petits ruminants au Mali et en Afrique de l'Ouest.....	33
2.3.1	<i>L'élevage des petits ruminants.....</i>	<i>33</i>
2.3.2	<i>Le flux de commerce des petits ruminants .....</i>	<i>33</i>
2.4	Etat des connaissances sur la biologie évolutive de PPRV qui sous-tendent la propagation de la maladie .....	35
<b>3</b>	<b>PCR en temps réel asymétrique basé sur le gène M du PPRV pour le diagnostic et la différenciation des lignées du virus.....</b>	<b>38</b>
3.1	Introduction.....	38
3.2	Matériels et méthodes .....	39
3.2.1	<i>Utilisation du gène M du PPRV pour le diagnostic de la PPR.....</i>	<i>39</i>
3.2.2	<i>Génotypage du PPRV par analyse de séquence .....</i>	<i>44</i>
3.3	Résultats.....	48
3.3.1	<i>Génotypage par analyse de séquences .....</i>	<i>48</i>
3.3.2	<i>Génotypage par PCR en temps réel asymétrique .....</i>	<i>52</i>
3.4	Discussion.....	60
<b>4</b>	<b>Etude de la diversité génétique du PPRV au Niger .....</b>	<b>62</b>
4.1	Introduction.....	62

4.2	First genetic characterization of Peste des Petits Ruminants (PPR) from Niger: On the advancing front of the Asian virus lineage .....	62
4.3	Discussion.....	73
<b>5</b>	<b>Répartition et diversité génétique du PPRV au Mali et d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest</b>	<b>74</b>
5.1	Introduction.....	74
5.2	Matériels et méthodes .....	75
	5.2.1 <i>La collecte du matériel biologique</i> .....	75
	5.2.2 <i>Les analyses de laboratoires</i> .....	76
5.3	Résultats.....	78
	5.3.1 <i>Description de foyers</i> .....	78
	5.3.2 <i>Le profil du test multiplex</i> .....	79
	5.3.3 <i>Isolement du PPRV</i> .....	80
	5.3.4 <i>La RT-PCR et le Profil électrophorétique des produits de PCR</i> .....	81
	5.3.5 <i>Les séquences et l'analyse de l'arbre phylogénétique basé sur 255 nucléotides du gène N82</i>	
	5.3.6 <i>Analyse phylogénétique détaillée des souches du Mali</i> .....	92
5.4	Discussion.....	97
<b>6</b>	<b>Etude génomique de la diversité des souches de PPRV au Mali et dans d'autres pays d'Afrique de l'Ouest.....</b>	<b>101</b>
6.1	Introduction.....	101
6.2	Matériels et méthodes .....	102
	6.2.1 <i>Séquençage par amplification aléatoire (SISPA)</i> .....	102
	6.2.2 <i>Séquençage par amplification spécifique.</i> .....	104
	6.2.3 <i>Les analyses phylogénétiques et de datations moléculaires à partir des génomes complets et incomplets</i> .....	108
6.3	Les résultats .....	111
	6.3.1 <i>Le séquençage du génome complet par amplification aléatoire (SISPA)</i> .....	111
	6.3.2 <i>Le séquençage du génome complet par la méthode d'amplifications spécifique</i>	112
	6.3.3 <i>La phylogénie avec les génomes complets et incomplets</i> .....	114
	6.3.4 <i>Les analyses de datations moléculaires à partir des génomes complets et génomes incomplets</i> .....	118
6.4	Discussion.....	121
<b>7</b>	<b>Discussion générale – Conclusion Perspective .....</b>	<b>126</b>
<b>8</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>128</b>

# Liste des figures

Figure 1 Arbre montrant la relation phylogénétique entre les différents morbillivirus basée sur les séquences nucléotidiques de leur nucléoprotéine (Barrett et al., 1993). .....	20
Figure 2 Schéma du génome d'un morbillivirus (PPRV) (Banyard et al., 2010).....	21
Figure 3 Le cycle du PPRV (Kumar et al., 2014). .....	24
Figure 4 Photos d'animaux malades (écoulements nasaux et oculaires) dans un foyer de suspicions dans la région de Sikasso en 2015 (Photos Kadidia Tounkara). .....	25
Figure 5 La répartition globale du PPRV de 1942-2014, ainsi que la répartition des différentes lignées (Parida et al., 2016). (a) Image obtenue de la FAO : Food and Agriculture Organisation (FAO, 2009), répartition globale du PPRV de 1942 à 2009 en couleur rouge. (b) Répartition des différentes lignées de PPRV en Afrique de 2009 à 2014.....	32
Figure 6 Flux de commerce de bétail au Mali (CIRAD). .....	34
Figure 7 Cartographie des circuits régionaux commercialisation du bétail (Guibert B et al., 2009). ...	35
Figure 8 Schéma explicatif de l'amorce snapback forward, la PCR asymétrique et la courbe de dissociation (Zhou et al., 2008). .....	44
Figure 9 Exemples (a et b) de régions choisies pour le choix du couple d'amorce à partir du gène M. La zone encadrée montre les différences spécifiques de chaque lignée du PPRV.....	46
Figure 10 Analyse phylogénétique par la méthode de Maximum de Vraisemblance avec la séquence complète du gène M. Lignée I (LI), Lignée II, (LII), Lignée III (LIII), Lignée IV (LIV). .....	50
Figure 11 Analyse phylogénétique par la méthode de Maximum de Vraisemblance avec la séquence partielle du gène N. Lignée I (LI), Lignée II, (LII), Lignée III (LIII), Lignée IV (LIV).....	51
Figure 12 Les température de dissociation du gène M en fonction de la lignée des souches : Les souches de la lignée I et IV (a), les souches de la lignée II (b) et les souches la lignée III (c). .....	53
Figure 13 Les température de dissociation du gène N en fonction des lignées : Lignée IV (a) et la Lignée I (b). .....	54
Figure 14 Les températures de dissociation du gène M pour les échantillons de Kropopen (Mopti). .....	59
Figure 15 Les températures de dissociation du gène M pour les échantillons de Krounikoto (Kayes) .....	59
Figure 16 Les température de dissociation du gène N pour les échantillons de Kropopen (Mopti) ...	60
Figure 17 Géo-localisation des différents échantillons de notre étude.....	75
Figure 18 Photo d'animaux malades dans un foyer de suspicions dans la région de Sikasso en 2015(Photo Kadidia Tounkara). .....	76
Figure 19 Un exemple de test multiplex qui montre la détection des quatre maladies respiratoires des petits ruminants : PPR, PPCC, Pasteurellose, Capripox. ....	77
Figure 20 Exemple du profil du résultat du test multiple. La couleur verte représente l'amplification des échantillons du PPRV. ....	80
Figure 21 Profil électrophorétique des produits PCR. M : Marqueur, Ctrl- : Contrôle négatif, Kropopen et Krounikoto : échantillons provenant de Kropopen et Krounikoto. ....	82
Figure 22 Analyse phylogénétique par la méthode de Maximum de Vraisemblance. ....	91
Figure 23 Analyse phylogénétique des souches de la lignée IV du PPRV par la méthode de Maximum de Vraisemblance. Les points rouges représentent nos échantillons. ....	93
Figure 24 Analyse phylogénétique des souches de PPRV de la lignée II du Mali (Kayes) et du Sénégal (Tambacounda et Kédougou) par la méthode de Maximum de Vraisemblance. ....	94
Figure 25 Analyse phylogénétique des souches de la lignée II du PPRV en Afrique de l'Ouest par la méthode de Maximum de Vraisemblance. ....	96
Figure 26 Analyse phylogénétique des souches de la lignée I du PPRV en Afrique de l'Ouest par la méthode de Maximum de Vraisemblance. ....	97
Figure 27 La distribution des différentes lignées du PPRV au Mali. ....	100
Figure 28 Schéma montrant les amorces spécifiques dessinées pour le séquençage du génome complet du PPRV ainsi que la taille des fragments obtenus après amplification.....	104

Figure 29	Visualisation d'un génome incomplet comportant quelques trous d'une souche du Mali (MALI_KEN_49_KAYES_2016) avec le logiciel IGV. Alignement des reads de la souche avec un génome référence du PPRV. Les barres grises représentent les reads spécifiques alignés à une région du génome du PPRV et les zones blanches représentent les trous. ....	112
Figure 30	Visualisation d'un génome complet d'une souche du Mali (MALI_AN9_NAS_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014) avec le logiciel IGV. ....	114
Figure 31	Visualisation d'un génome quasi complet comportant un trou d'une souche du Mali (MALI_KEN_44_KAYES_2016) avec le logiciel IGV. ....	114
Figure 32	Analyse phylogénétique avec les génomes complets par la méthode de Maximum de Vraisemblance. Les souches de notre étude sont représentées par des points rouges. ....	116
Figure 33	Analyse phylogénétique avec les génomes incomplets par la méthode de Maximum de Vraisemblance. Les souches de notre étude sont représentées par des points rouges. ....	117
Figure 34	Arbre phylogénétique MCC basé sur le génome complet de 62 souches du PPRV. Les différentes couleurs représentent les différentes lignées : bleu pour lignée IV, rose pour lignée II, vert pour lignée I et violet pour lignée III. L'arbre a été construit en utilisant le modèle UCED et une croissance exponentielle. Les noms des souches comportant leur date de collecte et les longueurs de branches reflètent le temps écoulé. Les valeurs à 95% HPD de l'intervalle correspondant du TMRCA sont représentées par des barres bleues. L'axe horizontal indique la durée (dates) en années. Nos souches sont représentées en lettres capitales. ....	119
Figure 35	Arbre phylogénétique MCC basé sur le génome incomplet de 67 souches du PPRV. Les différentes couleurs représentent les différentes lignées : bleu pour lignée IV, rose pour lignée II, vert pour lignée I et violet pour lignée III. L'arbre a été construit en utilisant le modèle UCED et une croissance exponentielle. Les noms des souches comportant leur date de collecte et les longueurs de branches reflètent le temps écoulé. Les valeurs à 95% HPD de l'intervalle correspondant du TMRCA sont représentées par des barres bleues. L'axe horizontal indique la durée en années. Nos souches sont représentées en lettres capitales. ....	120



## Liste des tableaux

Tableau 1 Pourcentage de similitude (identité nucléotidique) du virus de la peste bovine par rapport aux autres Morbillivirus (Selon Barrett et al., 2006).....	39
Tableau 2 Liste des 65 souches et séquences utilisée pour le diagnostic de la PPR en utilisant le gène M et le récapitulatif des lignées à partir du gène N partiel et du gène M.....	39
Tableau 3 La séquence des amorces et les tailles des produits d'amplification des amorces dessinées pour le séquençage du gène M. ....	43
Tableau 4 Tableau récapitulatif des 27 séquences utilisées pour le dessin du couple d'amorce snapback forward et reverse du gène M.....	45
Tableau 5 Liste des amorces snapback des gènes M et N.....	47
Tableau 6 Liste des échantillons utilisés pour les premiers essais de la différenciation des lignées du PPRV.....	48
Tableau 7 Récapitulatif des températures de dissociation des 64 échantillons ainsi que les lignées qui y sont associées .....	55
Tableau 8 Le récapitulatif des températures de dissociation en fonction des différents gènes .....	58
Tableau 9 Résultat du test multiplex des échantillons du Mali.....	79
Tableau 10 Résultat de l'isolement.....	80
Tableau 11 Résultat de la RT-PCR .....	81
Tableau 12 Résultat du séquençage.....	82
Tableau 13 Liste des séquences obtenues dans notre étude et de ceux provenant de GenBank.....	83
Tableau 14 Tableau récapitulatif des échantillons séquencés par la méthode SISPA.....	102
Tableau 15 Séquence des amorces taguées .....	103
Tableau 16 Les couples d'amorces spécifiques (F1 à F5) utilisés pour le séquençage du génome complet avec la technique des longs fragments .....	105
Tableau 17 Récapitulatif des échantillons du Mali de 1999 à 2016 séquencés suivant la méthode d'amplification spécifique.....	105
Tableau 18 Tableau récapitulatif des différentes conditions de PCR (température d'hybridation et temps d'élongation) pour chaque couple d'amorces.....	107
Tableau 19 Liste des séquences de génomes provenant de notre étude (*), de la thèse de H.Salami (§) et de GenBank utilisées pour l'analyse de datation moléculaire .....	109
Tableau 20 Le récapitulatif du séquençage avec la méthode SISPA .....	111
Tableau 21 Le récapitulatif du séquençage avec la méthode d'amplification spécifique.....	112
Tableau 22 Récapitulatif du taux d'évolution en fonction du génome.....	118
Tableau 23 Récapitulatif du TMRCA des 4 lignées du PPRV.....	120
Tableau 24 Récapitulatif du TMRCA de chaque lignée du PPRV.....	121
Tableau 25 Tableau de comparaison du taux d'évolution du PPRV.....	123
Tableau 26 Tableau de comparaison des dates de TMRCA des 4 lignées de PPRV .....	124
Tableau 27 Tableau de comparaison des dates des ancêtres communs (TMRCA) de chaque lignée du PPRV .....	124

## Liste des abréviations

PPR : Peste des Petits Ruminants

PPRV : Virus de la Peste des Petits Ruminants

SISPA: Sequence Independent Single Primer Amplification

Rapport-Gratuit.com

# 1 Introduction

## 1.1 Le contexte

La peste des petits ruminants (PPR) est une maladie respiratoire très contagieuse des petits ruminants. Cette maladie à déclaration obligatoire auprès de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE), inflige des pertes importantes dans les élevages. La peste des petits ruminants (PPR) est endémique dans la plupart des pays d'Afrique de l'ouest, et au Mali en particulier où nous avons positionné le champ d'investigation.

La PPR se distingue par une extension constante sur les dernières décennies, ce qui est une menace accrue pour les zones indemnes. Les travaux récents de l'équipe de virologie de ASTRE, laboratoire de référence mondiale sur cette maladie, ont porté notamment sur la mise au point du séquençage de génomes complets du PPRV (Habib Salami et al., 2014).

En 2014, le CIRAD (thèse Habib Salami), l'ISRA, et le CNERV, ont conjointement mis en évidence un bassin épidémiologique de diffusion de souches de PPRV proches au plan génétique centré sur le Sénégal et la Mauritanie, et sous-tendu par des mouvements animaux à courtes distances de part et d'autre des frontières (Apolloni A et al., 2018; El Arbi AS et al., 2014). L'actualisation des données virales à l'occasion des enquêtes de surveillance épidémiologique à des fins de recherche, ont bouleversé les connaissances sur la répartition géographique des souches virales et des lignées, notamment au Sénégal et d'autres pays de la sous-région tels que la Mauritanie et la Côte d'Ivoire.



## 1.2 Problématique

Sur la base de séquences partielles des gènes N et F, les souches de PPRV ont été classées en quatre lignées génétiquement distinctes (I, II, III et IV) (Banyard et al., 2010; Kwiatak et al., 2011). La prééminence et la forte capacité d'expansion de la lignée II et le remplacement de la lignée I, historiquement présente dans l'Ouest africain est soutenue par des études récentes notamment la thèse de Habib Salami. Il a effectué un état des lieux du PPRV au Sénégal. En effet les foyers de maladie dans cette partie de l'Afrique sont maintenant associés quasi systématiquement à un virus de lignée II. L'analyse d'échantillons pathologiques collectés au cours des différentes épidémies de PPR durant la dernière décennie a révélé la propagation de cette lignée de PPRV (Adombi CM et al., 2017 ; Boussini H et al., 2016; Dundon WG et al., 2014; Dundon WG et al., 2018; El Arbi AS et al., 2014; Woma et al., 2016) dans tous les pays situés entre l'océan Atlantique, le désert du Sahara et l'Afrique subhumide / humide alors que son front de migration se situait au Mali en 1999 (Banyard et al., 2010; Munir et al., 2012). Cette expansion peut être attribuée à une sélection naturelle donnant aux virus un potentiel épidémiologique plus important, ou être le résultat de l'intensification du mouvement et du commerce des animaux. Des travaux sont en cours dans cette région de l'Afrique pour mieux comprendre les schémas spatio-temporels de la mobilité de l'hôte, facteur amplificateur potentiel de la propagation virale (Apolloni A et al., 2018). En Afrique de l'Est, un scénario similaire a lieu avec la lignée IV, mettant en compétition les lignées autochtones (III et II). Historiquement, les virus de certains pays de l'Afrique de l'Est tels que l'Éthiopie, le Soudan, la Tanzanie appartenaient à la lignée III. Mais cette lignée a progressivement été remplacée au cours des années par la lignée IV du PPRV (Banyard et al., 2010; Cosseddu et al., 2013; Kwiatak et al., 2011; Kwiatak et al., 2007; Muniraju et al., 2014c).

Sur le phénomène de remplacement et d'extinction, aucune explication n'est encore toutefois avancée. Il est évident que plus les séquences sont générées mieux l'évolution des virus et le mouvement transfrontalier d'animaux ayant conduit à la diffusion de la maladie seront compris. Toutefois si les courtes séquences de gènes viraux telles que N et F permettent par analyse phylogénétique une définition en lignées elles semblent avoir un potentiel restreint à permettre la reconstruction des mouvements dans le temps et l'espace des PPRV. Un séquençage de fragments longs du génome, voire du génome entier, s'impose donc.

## 1.3 Hypothèses et questions de recherche

Les ARN polymérases virales des virus à ARN négatifs ont un taux d'erreur de l'ordre de  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  nucléotides par cycle lors des réplifications. Cette forte capacité à muter pendant la réplification est causée par une absence de la fonction de relecture et de correction d'erreurs de réplification des enzymes virales ARN polymérase ARN-dépendantes. Ce taux rapide de changement évolutif des virus à ARN offre des opportunités particulièrement intéressantes pour étudier les processus épidémiques car leurs dynamiques évolutives ont lieu à des échelles de temps similaires (Pybus and Rambaut, 2009). En effet, la rapidité d'évolution des virus à ARN est telle que les relations phylogénétiques entre les souches peuvent être résolues à partir d'échantillons recueillis à seulement quelques jours d'intervalle (Cottam et al., 2006; Cottam et al., 2008).

Au cours de sa thèse qui a porté sur le PPRV au Sénégal, Habib Salami a étudié l'ampleur de la diversité génétique au cours d'infections naturelles des petits ruminants dans un foyer de PPR et l'accumulation de ces mutations dans un circuit de diffusion du PPRV. Il a ainsi établi, grâce à la diversité génétique qu'il a utilisée comme marqueur épidémiologique, les circuits de diffusion des petits ruminants au Sénégal. Pour cela, il s'est basé sur l'étude des séquences courtes et des séquences concaténées de deux gènes.

Dans notre étude, nous avons étudié la dynamique évolutive et épidémiologique de souches de PPRV collectées sur le Grand Ouest africain à partir de génomes complets.

## 1.4 Objectifs

Le projet de thèse a pour ambition de clarifier la situation épidémiologique de la PPR au Mali. Les travaux de thèse ont été menés en cotutelle entre l'unité ASTRE du CIRAD et le Laboratoire Central Vétérinaire de Bamako (Mali) pour la collecte et l'analyse des virus. En outre pour la collecte des échantillons et les informations de terrain nécessaires pour celle-ci, ils ont bénéficié de la collaboration des Services Vétérinaires du Mali.

Les objectifs principaux sont :

- 1) La collecte des échantillons au Mali.

Les zones les plus propices à l'étude sont définies sur les données de densités animales et sérologiques existantes afin d'optimiser la collecte des échantillons.

- 2) Evaluer la diversité génétique des agents pathogènes incriminés au Mali et élargie dans la sous-région en Afrique de l'Ouest.

Nous avons procédé à la collecte des échantillons biologiques sur foyers cliniques. Les séquences de génomes entiers des souches de PPRV du Mali et d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest ont été générées afin d'appréhender la diversité.

- 3) Intégration de l'analyse épidémiologique du pathogène.

L'étude conduite sur les foyers de maladie en territoire malien, a permis d'actualiser nos connaissances en termes de prévalence et de diversité génétique du pathogène. Le lien avec des souches distantes dans le temps et l'espace (hors des frontières du Mali, les pays de l'Afrique de l'Ouest) est également étudié pour tracer leur origine spatio-temporelle et estimer les modalités de leur introduction dans le territoire. Les données sont mises en lien avec celles obtenues au Sénégal (thèse Habib Salami). L'intégration des données épidémiologiques ont permis de déterminer leurs conditions de maintien, de réémergence et de diffusion liés à la mobilité animale, en vue d'optimiser les moyens de lutte.

## 1.5 Méthodologie

Tâche 1. Cette phase de la thèse a permis de collecter le matériel biologique grâce à un dispositif de surveillance et de diagnostic en partenariat avec le Laboratoire Central Vétérinaire (LCV, Bamako, Mali) ainsi qu'avec la collaboration des services vétérinaires nationaux.

Les enquêtes ont été initiées en lien avec les services vétérinaires du Mali alertés par des suspicions de foyers de PPR. Sur les trois années successives du projet, elles ont été réalisées avec recueil des commémoratifs détaillés. Les échantillons mentionnent la date de récolte (mois/année) et la localité et sont accompagnés des commémoratifs d'enquête (espèces, composition des troupeaux, systèmes d'élevage). Les services vétérinaires ont pu informer des liens avec des marchés à bétail ou des routes de transhumance susceptibles d'avoir introduit et diffusé les pathogènes. Les informations recueillies auprès des éleveurs ont permis également de mieux connaître leurs pratiques en termes d'utilisation de vaccins (PPR). Les prélèvements contenant des charges de pathogènes importantes (larmes, poumons pour PPR) ont été collectés et maintenus au froid (à 4°C sur glace) pendant la durée des missions de terrain.

Tâche 2. Evaluer la diversité génétique de l'agent pathogène incriminé.

Au LCV de Bamako, les aliquots des échantillons récoltés ont été conservés à -80°C et l'identification par PCR entreprise directement sur l'échantillon sans passer par l'isolement. Un test multiplex PCR permettant l'identification des agents de la PPR, de la PPCC, de la variole caprine et de la pasteurellose développé à APHL à Vienne en Autriche (Unité de Production et Santé Animale) a été utilisé pour le criblage des prélèvements. Les parties typage et séquençage NGS et isolement ont été

réalisées au CIRAD, Montpellier. Les séquences d'une petite portion du gène N du PPRV ont été obtenues pour les échantillons positifs, afin de réaliser une première étude de la diversité génétique dans les régions échantillonnées. Deux méthodes de séquençage de génomes complets, mises au point au CIRAD, ont été utilisées sur une sélection d'échantillons représentatifs de la diversité génétique de la PPRV observée.

Tache 3. Intégration de l'analyse épidémiologique du pathogène.

Les études phylogénétiques réalisées à partir des échantillons des foyers de PPR au Mali permettent d'évaluer le risque pour les filières de productions et de proposer des stratégies de contrôle adaptées. Cette dernière phase consiste à confronter les données de séquences aux données épidémiologiques (espèces animales concernées, dates et lieu de prélèvement...), de manière à établir la biodiversité des souches au Mali. La plasticité des génomes dans les prélèvements d'hôtes malades (caprins) permet de mesurer cette biodiversité et également de dater l'apparition de la PPR au Mali.

L'obtention de séquences génomiques complètes et leur alignement avec les données accessibles de GenBank ont permis d'ouvrir la voie à des études de phylogénie (analyse par maximum de vraisemblance ou maximum de parcimonie), des études de datation moléculaire (inférences bayésiennes et chaînes de Markov comme implémentées par exemple dans le programme BEAST) et de phylogéographie. Les arbres phylogénétiques ont permis d'évaluer le nombre de groupes de souches circulant au Mali. L'intégration à ces analyses des informations des souches des pays de l'Afrique de l'Ouest permettent une meilleure compréhension des mécanismes de diffusion et à terme d'affiner les stratégies de lutte.

## 2 Synthèse bibliographique PPR

### 2.1 Généralités sur la Peste des Petits Ruminants

#### 2.1.1 La peste des petits ruminants

La Peste des Petits Ruminants (PPR) est une maladie transfrontalière très contagieuse des petits ruminants. Elle affecte principalement les caprins, les ovins et les petits ruminants sauvages. L'agent responsable de la PPR est le virus de la peste des petits ruminants (PPRV). Le PPRV est un virus du genre *Morbillivirus*, qui appartient à la famille des *Paramyxoviridae*. Appartiennent également au genre *Morbillivirus* les virus de la peste bovine (RPV, pour Rinderpest Virus), de la rougeole (MV pour Measles Virus) de la maladie du Carré (CDV pour Canine Distemper) et le virus de maladie du phoque (PDV pour Phocines Distemper Virus). La PPR se caractérise par une forte fièvre, une forte diarrhée qui provoque une déshydratation, une anorexie, une respiration douloureuse, des écoulements nasaux et oculaires et l'érosion de différents muqueuses (Gibbs et al., 1979). Les symptômes de la PPR sont similaires à ceux de la peste bovine qui a été récemment éradiquée.

Maladie à incidence économique, la PPR fait partie de la liste des maladies à notifier à l'Office Internationale des Epizooties (OIE, Organisation mondiale de la santé animale) en cas d'apparition d'épizooties. Elle a été décrite dans le passé sous plusieurs dénominations : peste des petits ruminants, peste des espèces ovines et caprines, « pseudo-rinderpest », complexe stomato-pneumo-entérique ou encore « kata » (mot pidgin pour catarrhe) au Nigeria. La dénomination française « peste des petits ruminants », donnée par les premiers auteurs (Gargadennec and Lalanne, 1942) a été retenue comme nom scientifique de la maladie. Toutes ces dénominations ont fait référence aux symptômes observés sur le terrain.

#### 2.1.2 Etendue géographique de la maladie

La PPR a été décrite pour la première fois en Côte d'Ivoire en 1942. Elle est présente dans certains pays de l'Afrique de l'Ouest depuis près de sept décennies : au Togo, au Bénin et au Nigeria depuis les années quarante, au Sénégal en 1955 (Mornet et al., 1956). La maladie a ensuite été observée dans deux pays de l'Afrique de l'Est : au Soudan en 1972 (El-Hag and Taylor, 1984) puis en Ethiopie en 1977 (Pegram and Tereke, 1981). Durant les années 1980, la maladie s'est répandue dans la péninsule arabique : Oman en 1983, Les Emirats Arabes Unis (1987), l'Arabie Saoudite en 1988, en Inde en 1988 puis l'Asie du Sud-Est (Banyard et al., 2010). La présence de la PPR est notée en Afrique du Nord, notamment en Egypte en 1989. La PPR a continué à s'étendre et est devenue enzootique de 1990 à 2000 dans plusieurs pays de l'Afrique (Mali, Burkina Faso, Guinée, Ghana, Guinée Bissau, Soudan, Tchad Ethiopie), au Moyen Orient (Jordanie, Israël, Iran, Liban) et en Asie (Pakistan, Inde, Bangladesh) (Banyard et al., 2010).

De 2001 à 2013, est observée une progression rapide de l'aire de répartition mondiale de la maladie qui peut être liée à l'accroissement important des mouvements d'animaux et de leur population. On observe alors une expansion de la PPR vers certains pays de l'Afrique qui étaient jusque-là indemnes, notamment la Tanzanie (2008), l'Ouganda (2007), le Kenya (2006), le Gabon (2007), le Congo (2006), le Cameroun (2009), l'Angola (2012), le Maroc (2008), l'Algérie (2011), la Tunisie (2006) (Banyard et al., 2010; Swai et al., 2009 ; FAO. 2013). La PPR est décrite pour la première fois aux Comores en 2010. Il faut également noter la propagation de la maladie dans certains pays bordant l'Union Européenne : la Turquie (1992, notifiée à l'OIE en 1999) et sa région de Thrace (partie européenne, 2004) et plus récemment en Géorgie en janvier 2016 (Rajko-Nenow PZ et al., 2017). La PPR est depuis peu présente à l'intérieur des frontières de l'Union Européenne (Bulgarie, notification à l'UE et à OIE en juin ; Alizé Mercier, <http://www.pplateforme-esa.fr/>).

Présente depuis la fin des années 80 dans les pays asiatiques comme l'Inde, les républiques d'Asie Centrale, la PPR éclate au Tibet, région autonome de Chine, en 2007 (Wang et al., 2009), puis à partir de 2013 dans de nombreuses provinces de Chine où elle se répand très rapidement, impliquant également des espèces sauvages malgré une vaccination massive (Liu., 2018). Récemment, de nouveaux foyers de PPR ont été déclarés pour la première fois dans la partie Ouest de la Mongolie entre août et septembre 2016 (Shatar M et al., 2017).

### 2.1.3 Le virus de la peste des petits ruminants

#### *Taxonomie – Classification*

Le PPRV appartient à l'Ordre des *Mononegavirales* dans la famille des *Paramyxoviridae*. Cette famille compte sept genres distincts : Le genre *Morbillivirus* (dont le virus de la peste des petits ruminants, et le virus de la peste bovine), le genre *Respirovirus*, le genre *Henipavirus* (dont le virus Hendra), le genre *Rubulavirus* (dont le virus des oreillons), le genre *Avulavirus* (dont le virus de la maladie de Newcastle), le genre *Ferlavirus* et le genre *Aquaparamyxovirus*.

Les paramyxovirus sont des virus à ARN enveloppé. Ce sont des particules sphériques contenant une enveloppe lipoprotéine externe présentant de multiples projections ; une nucléocapside interne, pelotonnée et filamenteuse, à symétrie hélicoïdale qui entoure le génome viral.

Les virus PPRV, RPV, CDV et PDV sont classés dans le genre *Morbillivirus*. Ces virus présentent une grande ressemblance morphologique commune aux *Paramyxovirus* : les effets cytopathogènes en culture cellulaire (syncytium, inclusions intra-cytoplasmiques et nucléaires), un aspect histopathologique commun (cellules géantes multi-nucléées), une forte proximité antigénique (forte homologie entre les protéines des différents membres du groupe). Une des caractéristiques les distinguant des autres genres est l'absence d'activité neuraminidase, activité qui est cependant présente chez PPRV et RPV (Seth S and Shaila MS, 2001).

La forte ressemblance clinique entre la PPR et la RP ainsi que la forte immunité croisée entre leur agent causal, ont conduit à considérer le PPRV comme un variant du virus de la peste bovine, mieux adapté aux petits ruminants. Cependant, l'isolement du virus en 1962 (Gilbert and Monnier, 1962), les études sérologiques ainsi que celles sur la protection croisée en 1970 ont permis de faire la différence entre les deux maladies et de montrer un lien étroit entre les deux virus (Gibbs et al., 1979). Cette distinction s'est trouvée confirmée à la fin des années 1980 par les études épidémiologiques, qui montrent une évolution indépendante des deux virus dans les foyers de maladies (Diallo, 2006). Sur la base des études de réactions croisées et de protections croisées, la PPR a ainsi été classée en 1979 comme un membre du genre *Morbillivirus* dans la famille des *Paramyxoviridae* avec RPV, MV et CDV. A la fin des années 1980, un autre groupe de virus émergents affectant les mammifères aquatiques a également été rajouté au genre *Morbillivirus* appelés virus de la maladie des phoques (Phocine Distemper Virus, PDV), morbillivirus des dauphins (dolphin morbillivirus, DMV) et morbillivirus des marsouins (propoise morbillivirus, PMV) (Barrett et al., 2006; Kennedy, 1998). Un autre morbillivirus a été identifié chez le chat, appelé morbillivirus félin (FmoPV), grâce à une étude des séquences de génome. Ce dernier provoque une néphrite tubulo-interstitielles chez les chats domestiques (Woo et al., 2012).

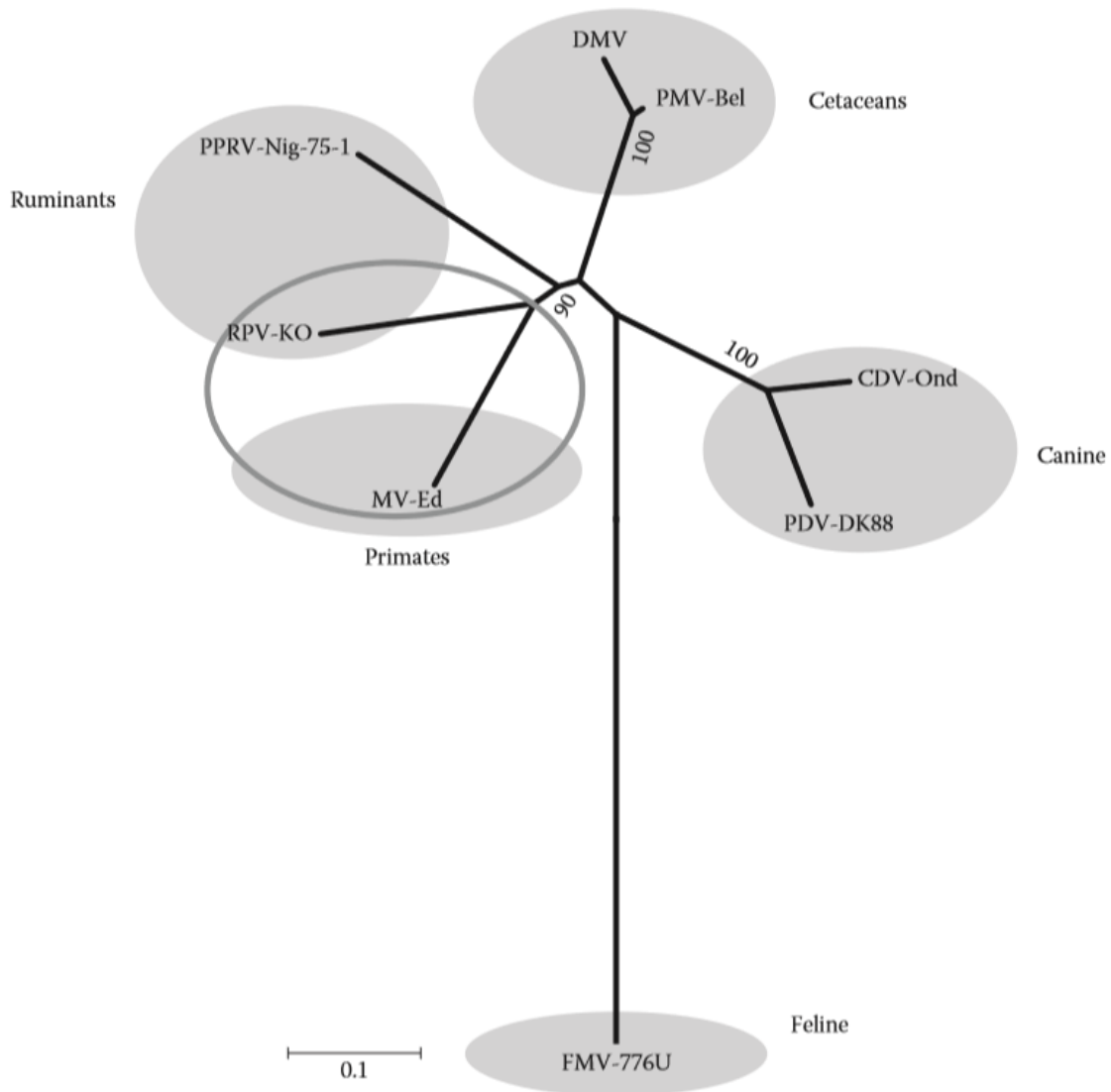


Figure 1 Arbre montrant la relation phylogénétique entre les différents morbillivirus basée sur les séquences nucléotidiques de leur nucléoprotéine (Barrett et al., 1993).

Contrairement à ce qui était attendu, à savoir le PPRV et le RPV très proche au sein des morbillivirus, l'analyse phylogénétique montre que le RPV est en fait plus proche phylogénétiquement de MV que de PPRV.

#### *Structure du PPRV*

Le virus de la peste des petits ruminants, comme tous les membres du genre *Morbillivirus* est composé d'une nucléocapside entourée par une enveloppe. C'est une particule pléomorphe de taille variable entre 150 et 700 nm, avec une taille moyenne de 500 nm (Bourdin and Laurent-Vautier, 1967; Durojaiye et al., 1985).

Le génome est composé d'un seul brin d'ARN de polarité négative (-) qui ne peut pas être utilisé comme matrice pour la traduction en protéine. Pour la traduction, le brin d'ARN (-) doit être transcrit



en ARN messenger (ARNm). Pour la transcription, le virus utilise une polymérase codée par le génome viral, une ARN-polymérase ARN-dépendante qui assure les fonctions de transcription et de réplication du génome viral. Pour la réplication, la polymérase synthétise un antigénome, l'ARN de polarité positive (+) (une copie complémentaire du génome complet) qui ensuite sert de matrice pour la production de nouveaux génomes à ARN (-). Pour la transcription, la polymérase synthétise à partir de l'ARN (-) des ARNm sub-génomiques correspondant aux parties codantes de chaque gène. Ces ARNm seront traduits en protéines par les ribosomes de la cellule.

La taille du génome est de 15948 nucléotides, supérieure à celle du RPV qui fait 15882 nucléotides. Comme tous les morbillivirus, le génome à simple brin d'ARN du PPRV est enveloppé dans une nucléocapside de symétrie hélicoïdale formée de nombreuses copies de la nucléoprotéine (N) assemblées. Le génome code pour six protéines structurales : la nucléoprotéine (N), la protéine de matrice (M), la phosphoprotéine (P), la protéine de fusion (F), l'hémagglutinine (H) et l'ARN polymérase ARN dépendante (L pour protéine large) et deux protéines non structurales (C et V) (Figure 2).



Figure 2 Schéma du génome d'un morbillivirus (PPRV) (Banyard et al., 2010).

En partant de l'extrémité 3' du génome, l'ordre de transcription des gènes est la suivante : N-P-M-F-H-L. Le gradient de transcription fait que la N est la plus abondante et la L, la moins abondantes de toutes les protéines virales. Le gène de la nucléoprotéine est précédé par un petit fragment de 52 nucléotides appelé le Leader (positions 1 à 54). A l'extrémité 5', le gène de la polymérase est suivi par le Trailer qui fait 37 nucléotides (positions 15909 à 15948). Les différents gènes sont séparés par une séquence de trois nucléotides bien conservée (CTT) appelée séquence inter-génique (IG) identique pour tous les morbillivirus sauf pour celle reliant H et L. Le Leader, le Trailer et les séquences intergéniques CTT ne sont jamais transcrits en ARN messenger. Le Leader et le Trailer servent de point d'attachement à l'ARN polymérase sur l'ARN. La séquence inter-génique sert de signal de fin de transcription pour l'ARN polymérase (Figure2).

### Structure et fonction des protéines

#### ➤ La Ribonucléoprotéine virale

La ribonucléoprotéine (RNP) constitue la structure minimale essentielle pour la transcription et la réplication du génome viral dans le cytoplasme de la cellule hôte. La ribonucléoprotéine est formée de l'association d'homopolymères de protéines N, ou nucléocapside enveloppant l'ARN génomique viral et de deux autres protéines structurales, la P et la L.

La N est la plus abondante des protéines virales. Elle s'assemble en une structure nucléocapsidique autour de l'ARN en forme de tubes d'environ 1µm de long et 18 nm de diamètre (Durojaiye et al., 1985; Gibbs et al., 1979). Elle est composée de 525 acides aminés. Une comparaison des séquences de la nucléoprotéine avec celles des autres morbillivirus a permis d'identifier une région bien conservée au milieu de la protéine et une région C-terminale avec une faible homologie (A. Diallo et al., 1995). Le fragment de la partie C-terminale, située à la surface de la protéine est impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire grâce à son interaction avec la phosphoprotéine (P) et certaines protéines de la cellule hôte (Bourhis et al., 2005; Couturier M et al., 2010).

La P est la deuxième protéine associée au complexe ribonucléoprotéine (RNP). Elle fait 509 acides aminés. Elle a deux fonctions. La première est une fonction de chaperonne au niveau de la nucléoprotéine pour maintenir sa solubilité dans le cytoplasme afin d'éviter qu'elle s'auto-assemble ou qu'elle s'assemble avec des ARN non spécifiques. La deuxième fonction de la P est son implication au

niveau de la synthèse des ARNm et la réplication de l'ARN viral génomique. Pour cela, elle interagit avec la polymérase virale pour former le complexe de polymérisation de l'ARN polymérase ARN dépendant, qui est responsable de la synthèse des ARNm et de la réplication.

La L, troisième protéine du complexe RNP est composée de 2183 acides aminés comme tous les virus du genre *Morbillivirus*. C'est la protéine la plus grande mais la moins abondante parmi toutes les protéines virales de la PPR. Elle possède toutes les activités enzymatiques nécessaires à la polymérisation de l'ARN, à l'initiation, l'élongation, la terminaison, le coiffage, la méthylation et la polyadénylation.

#### ➤ Les protéines de l'enveloppe

La protéine M est la première protéine de l'enveloppe virale en contact direct avec la nucléoprotéine. Composée de 335 acides aminés, c'est l'une des protéines les plus conservées parmi les membres du genre *Morbillivirus* (Haffar A et al., 1999). La matrice forme un manteau à l'intérieur de l'enveloppe virale permettant de faire le lien entre la nucléocapside et la surface glycoprotéique du virus. Cependant, à la suite d'une étude de cryotomographie électronique Liljeroos L et collègues (Liljeroos L et al., 2011) ont montré que la protéine de matrice de MV forme des hélices de revêtement de la ribonucléocapside plutôt qu'un revêtement interne de la membrane comme on le pensait auparavant. Le complexe qui se forme à l'intérieur du cytoplasme est en outre transporté vers la membrane de la cellule hôte dans laquelle les deux autres glycoprotéines de l'enveloppe externe, les protéines F et H, sont insérées. En plus de ces fonctions, la matrice joue un rôle dans la formation de nouveaux virions qui sont libérés de la cellule infectée par bourgeonnement.

La protéine H est composée de 609 acides aminés. Elle permet la fixation du virus au récepteur de la cellule hôte. Elle a deux fonctions biologiques : l'hémagglutination et une activité neuraminidase.

La protéine F est composée de 546 acides aminés. Elle est responsable de la fusion entre les membranes du virus et de la cellule hôte. Elle est synthétisée sous une forme inactive, F0. Cette forme F0 est ensuite clivée par une endopeptidase cellulaire en deux fragments, F1 et F2, liés par un pont disulfure. Ce clivage permet la libération d'un peptide hydrophile à l'extrémité N-ter du fragment F1 appelé le peptide de fusion car il est responsable de l'activité de fusion de la protéine F.

Les protéines F et H forment des spicules à la surface de l'enveloppe virale. Les deux protéines jouent des rôles importants dans les premières étapes de l'infection virale : le virus s'attache à la membrane de la cellule hôte par la protéine H. Puis les membranes virale et cellulaire fusionnent via la protéine F, ce qui va permettre l'introduction de la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire.

#### ➤ Les protéines non structurales

Le génome viral code également pour deux protéines non structurales, C et V, qui sont retrouvées uniquement dans la cellule infectée. Leur synthèse est dirigée par la protéine du gène P.

La protéine C est composée de 177 acides aminés. Elle est le produit de la traduction de l'ARNm qui permet la synthèse de la protéine P mais à partir d'un autre cadre de lecture (open reading frame, ORF). En effet le codon d'initiation de la traduction AUG de la protéine C se trouve en aval de celui qui permet la synthèse de la protéine P (en position 23). La protéine C a un rôle dans la transcription du génome viral.

La deuxième protéine non structurale du PPRV est la protéine V. Elle est le produit de la traduction d'un ARNm qui provient de la transcription non-fidèle du gène P. En effet, cet ARNm comporte une insertion d'un nucléotide (G) à la position 751 de l'ARNm lors de la transcription. Cette insertion provoque un décalage du cadre de lecture en générant un nouveau codon stop à la position 894. Ceci provoque donc la synthèse d'une protéine différente de la protéine P et qui est plus courte. La protéine V est composée de 229 acides aminés. Elle est impliquée dans la réplication du génome viral.



#### 2.1.4 Le cycle viral

Le cycle viral dure 6 à 8 heures dans la cellule en culture cellulaire (Kumar et al., 2014). Ce cycle peut être divisé en trois étapes :

- L'attachement et l'entrée du virus dans la cellule hôte
- La transcription et la réplication qui vont permettre la synthèse des protéines codées par le génome viral et la multiplication du génome
- L'assemblage et la libération des particules virales infectieuses, capables de propager l'infection à d'autres cellules.

##### *L'attachement et l'entrée du virus*

Les premières étapes de l'infection, à savoir la fixation du virus sur la cellule cible et la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule hôte, jouent un rôle très important dans la pathogénie du virus et la réplication du virus dans la cellule hôte. La première interaction entre le virus et la cellule hôte se fait par la fixation du virus au récepteur cellulaire par l'intermédiaire de la protéine H (Figure 3). Tout comme MV et CDV, le PPRV a deux récepteurs cellulaires : le 'signalling lymphocyte activation molecule' (SLAM) ou protéine CD150 et la Nectin-4. Le récepteur SLAM est exclusivement exprimé sur les cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages et la surface des cellules dendritiques) alors que le récepteur Nectin-4 est exprimé sur les cellules épithéliales. Les paramyxovirus pénètrent dans la cellule hôte via la fusion des membranes virales et cellulaires. Pendant la fusion, les domaines HR1 et HR2 de la protéine de fusion interagissent ensemble pour rapprocher les membranes virales et cellulaires et donc permettre la fusion (Lee et al., 2007; Muhlebach et al., 2008).

##### *La transcription et la réplication*

Après la libération de la nucléocapside de l'enveloppe virale, la transcription virale commence dans le cytoplasme de la cellule hôte. La protéine L commence alors la synthèse des ARNm dans le cytoplasme grâce à son activité d'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp). La RdRp s'attache au promoteur de l'ARN génomique où la transcription est initiée. L'unité de transcription individuelle de chaque gène est transcrite d'une manière 'start-stop'. La réplication virale nécessite une quantité de protéines qui est régulée par un gradient d'ARNm transcrits pour chaque gène. Ainsi, le gène codant la protéine N qui est nécessaire en grande quantité, est situé plus près du promoteur génomique (GP) et est par conséquent le plus abondamment transcrit (Figure 3). En revanche la protéine L se trouve la plus éloignée du GP et donc transcrite en plus faible quantité (Meng et al., 2011).

##### *L'assemblage et la libération des particules virales*

Le processus d'assemblage et de libération des virus du genre *Morbillivirus* n'est pas très bien compris. Comme tous les virus enveloppés, les paramyxovirus aussi forment des particules virales quand tous les composants structuraux du virus y compris les glycoprotéines et les RNP virales sont assemblés dans les sites sélectionnés où les virions bourgeonnent. Les virions assemblés sont ensuite libérés par pincement de la membrane ce qui permet la transmission de l'infection de la cellule infectée aux nouvelles cellules sensibles (Harrison et al., 2010; Kumar et al., 2014).

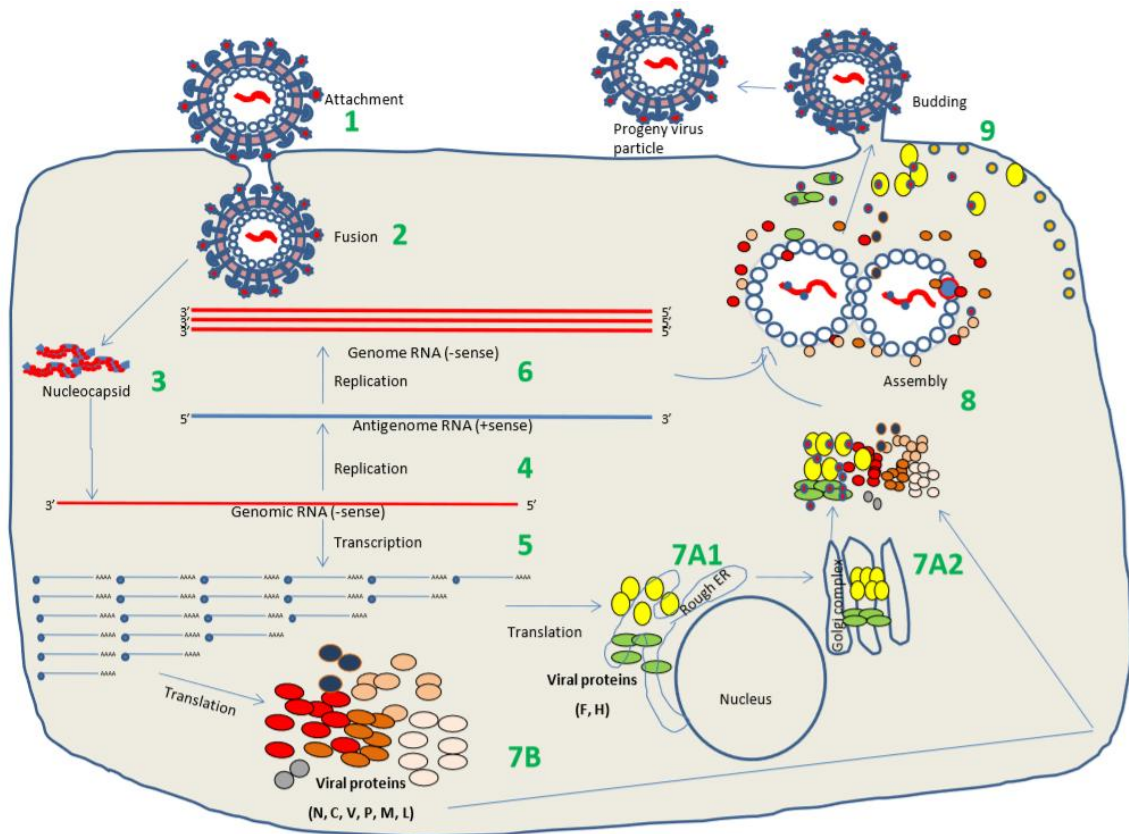


Figure 3 Le cycle du PPRV (Kumar et al., 2014).

(1). Attachement du virus aux récepteurs de la cellule hôte (SLAM/Nectin-4) via sa protéine H. (2). Fusion avec la membrane plasmique de la cellule hôte via les protéines F et H. (3). Libération du génome viral dans le cytoplasme. (4). Réplication du génome viral par la RdRp codée du virus. (5). Synthèse des ARNm par la RdRp en mode start-stop (un mécanisme de contrôle de la quantité de protéine produite). (6). Synthèse de l'ARN génomique viral de sens positif (ARN antigénomique ou ARN complémentaire, ARNc). (7) Synthèse des protéines virales : les protéines F et H sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique rugueux (7A1) puis translocation à travers le complexe de l'appareil de Golgi (7A2), où des modifications post-traductionnelles ont lieu. D'autres protéines virales (N, P, C, V, M, L) sont synthétisées sur les ribosomes (7B). (8). Assemblage des virions. (9). Le bourgeonnement des virions formés à la membrane plasmique.

## 2.1.5 Les signes cliniques de la maladie – le Pouvoir pathogène

### *Les signes cliniques*



Figure 4 Photos d'animaux malades (écoulements naseaux et oculaires) dans un foyer de suspicions dans la région de Sikasso en 2015 (Photos Kadidia Touunkara).

La PPR est une maladie qui affecte à la fois les systèmes digestifs et respiratoires. La forme classique est d'évolution aiguë: il s'agit du syndrome pneumo-entérique avec des lésions érosives des muqueuses, notamment de la muqueuse buccale, d'où la dénomination du « complexe stomato-pneumo-entérique » décrite par certains auteurs (Rowland et al., 1971; Whitney et al., 1967). Au début de la maladie, l'animal s'isole du reste du troupeau et se déplace difficilement. C'est la période d'hyperthermie : l'animal est abattu et ne mange plus, le poil est piqué. Les muqueuses buccales et oculaires sont congestionnées (Figure 4). Très rapidement surviennent du larmoiement et du jetage, sero-muqueux au début, puis muco-purulent. Les naseaux sont dès lors en partie obstrués par le pus, rendant ainsi la respiration difficile. De temps en temps, l'animal tousse. Ces signes de bronchopneumonie sont les résultats d'une surinfection bactérienne, notamment par des pasteurelles. Quatre à cinq jours après le début de la maladie, la fièvre commence à baisser et apparaissent alors la diarrhée et les érosions de la muqueuse buccale. Celles-ci sont cachées par un enduit pulvérulent blanchâtre, nauséabond qui, une fois enlevé, laisse apparaître des ulcères hémorragiques. L'animal, fatigué par la diarrhée, reste couché, les yeux mi-clos, indifférent à tout ce qui l'entoure. Chez les femelles, du pus et des lésions érosives sont visibles sur les muqueuses vulvo-vaginales. Le taux de mortalité de cette forme de la PPR est de l'ordre de 70%, la mort survient en moyenne 10 jours après le début de l'hyperthermie. En cas de guérison, la convalescence est rapide et s'effectue sur une semaine en général. L'autopsie d'un animal mort de la forme aiguë de PPR révèle surtout des lésions ulcérotives des muqueuses buccales qui sont présentes sur le pharynx et l'œsophage, et génitales. La trachée, congestionnée, contient du muco-pus ou un exsudat spumeux. Des lésions congestives sont observées dans l'intestin grêle, le côlon et surtout le rectum où elles sont parfois hémorragiques. Les plaques de Peyer sont souvent le siège de foyers de nécrose.

A côté de cette forme classique de la PPR, existent des formes suraiguës et subaiguës. Dans le premier cas, observé surtout chez les jeunes caprins, le taux de mortalité est de 100%, la mort survient avant



l'apparition des lésions érosives des muqueuses et des signes cliniques liés à des surinfections bactériennes, notamment de bronchopneumonie. Le tableau clinique est dominé par une forte hyperthermie, 41-42°C, le larmolement et le jetage séro-muqueux abondants. Dans la forme subaiguë, en revanche, tous ces signes sont discrets et peuvent passer inaperçu, mis à part la présence de croûtes sur les lèvres, entraînant la confusion avec l'ecthyma contagieux dans la plupart des cas.

L'examen histopathologique révèle des inclusions intra-cytoplasmiques et intranucléaires virales ainsi que la présence de granules éosinophiles dans les cellules des différents tissus (poumon, muqueuse buccale, reins et épithélium de l'intestin), qui peuvent fusionner pour former des syncytia.

### *La pathogénie*

La pathogénie du PPRV est très peu connue, la plupart des connaissances obtenues sont basées sur la comparaison avec d'autres virus du genre *Morbillivirus* comme CDV, RPV et MV. La voie principale d'infection du PPRV est la voie respiratoire comme tous les morbillivirus. Dans le cas de MV, il a longtemps été pensé que la première étape de l'infection et la réplication primaire du virus dans les cellules épithéliales de la voie respiratoire étaient suivies d'une seconde amplification dans les tissus lymphoïdes puis une dissémination dans tout l'organisme. L'identification de la molécule d'activation de signalisation lymphocytaire (CD150 ou SLAM) (une protéine exprimée à la surface des cellules dendritique ou des lymphocytes mais pas des cellules épithéliales) comme le principal récepteur des morbillivirus a permis de mieux comprendre le modèle d'infection de l'hôte par MV (Adombi et al., 2011; Baron, 2005; Barrett et al., 1993; Meng et al., 2011; Pawar et al., 2008; Tatsuo H et al., 2000; Yanagi et al., 2006). Cette découverte suggère fortement que MV pénètre dans son hôte au niveau alvéolaire en infectant les macrophages et les cellules dendritiques qui vont ensuite transporter le virus dans le tissu lymphoïde associée aux muqueuses (BALT pour bronchus-associated lymphoid tissue et dans les ganglions lymphatiques trachéo-bronchiques). Cette infection se traduit par une amplification locale du virus et sa dissémination systémique à partir des lymphocytes CD150<sup>+</sup> infectés.

Cependant, les morbillivirus ne sont pas seulement lymphotropes mais également épithéliotropes. Le PPRV est retrouvé dans différents tissus non lymphoïdes de l'hôte tel que le poumon, le cœur, les reins et même le cerveau comme dans le cas de MV et CDV. Ainsi, tous ces virus utilisent d'autres récepteurs alternatifs exprimés sur la surface des cellules épithéliales ce qui va permettre leur dissémination chez l'hôte. Ce récepteur cellulaire, Nectin-4 ou CD46 a été identifié en 2011 (Mühlebach MD et al., 2011; Noyce RS et al., 2011). Les récepteurs SLAM et Nectin-4 ont des fonctions équivalentes et sont tous les deux impliqués dans la formation de syncytia et la diffusion du virus de cellule à cellule. Pendant les infections à morbillivirus, les aérosols contenant le virus entrent par les voies respiratoires supérieures et ciblent les cellules dendritiques et les macrophages. Ces cellules infectées colonisent les ganglions lymphatiques locaux où le virus peut infecter une nouvelle population de cellules qui expriment le récepteur SLAM. Les lymphocytes infectés disséminent le virus chez l'hôte via le système sanguin et lymphatique périphérique puis les cellules épithéliales respiratoires, gastro-intestinales, urinaires et le système endocrinien via le récepteur épithéliale Nectin-4. Le récepteur Nectin-4 fonctionne alors comme un 'récepteur de sortie', permettant l'amplification et la libération du virus via différentes sécrétions. Les deux récepteurs sont donc nécessaires pour la pathogénie complète du virus (Kato et al., 2012 ; Sawatsky B et al., 2012).

Le PPRV, comme tous les autres morbillivirus, est un virus lymphotrope et provoque une immunosuppression chez l'hôte infecté. Cette immunosuppression, même si elle n'est que transitoire, favorise une infection bactérienne secondaire contribuant à aggraver la maladie chez l'animal (Jagtap SP et al., 2012; Rajak KK et al., 2005; Schneider-Schaulies S et al., 2001). Cela est en partie le résultat de la réplication du virus dans les cellules lymphoïdes et de leur destruction (Schobesberger M et al., 2005; Von Messling et al., 2004). Cependant, des études ont montré que cet effet peut aussi être causé par les protéines virales. Il a été montré que l'interaction des deux glycoprotéines virales, H et F, avec la surface des cellules lymphoïdes induit une immunosuppression (Heaney et al., 2002; Schlender J et al., 1996). La protéine N des morbillivirus, à travers ses interactions avec certains récepteurs cellulaires, est impliquée dans l'apoptose et dans l'inhibition des facteurs de réaction inflammatoire de la cellule hôte (Kerdiles YM et al., 2006a; Kerdiles YM et al., 2006b; Laine D et al., 2005; Takayama I et al., 2012). En effet, beaucoup de protéines virales contribuent à la dérégulation de la réponse

immunitaire de la cellule hôte. En plus des protéines H, F et N, les deux protéines non-structurales C et V inhibent l'action de l'interféron (Nanda and Baron, 2006; Ohno S et al., 2004; Shafer et al., 2003). Les vaccins ont des effets immunosuppresseurs résiduels et transitoires mais une réponse immunitaire forte et de longue durée s'établit quelques jours après (Baron et al., 2016) vaccination. Dans le cas de RPV, il a été démontré que la lymphopénie est corrélée à la virulence du virus et à la gravité de la maladie qu'il cause (Rey Nores and McCullough, 1997; Wohlsein et al., 1995).

### 2.1.6 Le diagnostic de la PPR

La PPR a longtemps été négligée au profit de nombreuses maladies qui sont associées à des signes cliniques similaires (telles que la pasteurellose, la RP, la PPCC), et dans beaucoup de cas de suspicions de PPR, l'infection est due à *Pasteurella Hemolytica*. Afin de faire un diagnostic différentiel, le diagnostic clinique doit être confirmé par des tests de laboratoire.

#### *Le diagnostic sérologique*

Dans le « Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres » de l'OIE, le test sérologique prescrit est le test de neutralisation virale (VNT) (<http://www.oie.int/fr/normes/manuel-terrestre/acces-en-ligne/>) (Rossiter et al., 1985). Cependant, le test sérologique le plus utilisé est l'ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) de compétition ou c-ELISA. C'est la technique la mieux adaptée pour analyser de nombreux échantillons de manière rapide et il est recommandé comme alternative au VNT. La compétition requiert un anticorps monoclonal (Mab) anti-PPRV. Les tests basés sur le Mab anti-N (Libeau et al., 1995) ou anti-H (Anderson and McKay, 1994) ont été développés. Le c-ELISA le plus utilisé actuellement et disponible dans le commerce repose sur un Mab anti-N, et une protéine N recombinante produite par un système d'expression baculovirus. D'autres tests ELISA, c-ELISA (Singh RP et al., 2004) ou ELISA indirect (Balamurugan V et al., 2007) ont été développés. Tous ces tests permettent de déterminer le statut sérologique contre la PPR mais ne permettent pas de faire une différenciation entre les animaux vaccinés et ceux qui ont été infectés.

#### *Le diagnostic virologique*

##### ➤ Les techniques de détection de l'antigène

Une grande variété de techniques a été développée afin permettre une détection directe du PPRV à partir d'échantillons de tissus ou d'écouvillons avec une grande sensibilité et spécificité. L'un de ces tests basés sur le principe de l'ELISA sandwich utilise deux anticorps monoclonaux pour une meilleure spécificité. Le test ELISA d'immunocapture développé par Libeau et al., (1994) par sa rapidité et sa simplicité permet une utilisation de routine dans les pays en voie de développement. De plus il constitue une solution alternative à l'isolement. Le test est basé sur la détection de la protéine N. Son seuil de détection s'approche de celle des techniques de diagnostic moléculaire actuelles. Un autre test similaire a été développé par Singh et al., (Singh RP et al., 2004). Des tests d'immunochromatographie ont été développés pour la détection antivirales dans les écouvillons oculaires utilisables directement sur le terrain (Brüning-Richardson A et al., 2011), (Libeau, communication personnelle). Un test d'hémagglutination utilisant les globules rouges de poulet a aussi été développé (Ezeibe et al., 2004).

#### *Le diagnostic moléculaire*

Une reverse transcription associée à une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) pour amplifier les acides nucléiques du PPRV a été développée. Ce test reste un outil important de diagnostic pour identifier avec certitude le virus et effectuer ensuite une caractérisation phylogénétique des isolats. Les gènes N et F sont tous les deux utilisés comme cible pour la RT-PCR conventionnelle (Couacy-Hymann et al., 2002; Forsyth and Barrette, 1995). La RT-PCR peut également être utilisée directement sur les échantillons collectés sur du papier filtre et stockés en absence de chaîne de froid (Michaud V et al., 2007). Des protocoles pour la RT-PCR quantitative sont disponibles pour le

diagnostic de la PPR (Bao J et al., 2008; Batten CA et al., 2011; Kwiatek O et al., 2010). 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 L et al., 2010). Cette technique pourrait être utilisée sur le terrain avec une extraction de l'ARN simplifiée.

### *L'isolement du virus*

Malgré une amélioration considérable des tests de diagnostics, avec le développement de l'ELISA et les techniques de détection des acides nucléiques, la constitution de banques virales reste d'actualité et nécessite que des isolements soient réalisés autant que possible. Pour l'isolement du PPRV, l'échantillon doit être collecté pendant la première phase de la maladie (la phase érosive) ou sur des carcasses fraîches. Les échantillons pathologiques idéaux pour l'isolement du PPRV sont les écouvillons nasaux ou oculaires, les poumons et les ganglions lymphatiques. D'autres tissus tels que l'intestin ou les globules blancs peuvent aussi être utilisés. Les cultures primaires et secondaires de reins de veau ou de mouton ont longtemps été utilisées pour l'isolement du PPRV. Par la suite, des lignées de cellules faciles à maintenir en culture et qui ne présentent pas d'inconvénients liés à la disponibilité et qualité des cellules primaires ont été utilisées. Les lignées cellulaires provenant de rein de singe africain (Vero) sont encore utilisées pour l'isolement du PPRV (Hamdy F.M et al., 1976; Lefèvre and Diallo, 1990) mais nécessitent plusieurs passages à l'aveugle avant d'observer les effets cytopathogènes (Saliki JT et al., 1994). Dès lors qu'il a été démontré que les morbillivirus utilisent préférentiellement le récepteur cellulaire SLAM (Baron et al., 2016; Tatsuo H et al., 2000; Yanagi et al., 2006) différentes lignées cellulaires exprimant le récepteurs d'hôtes sensibles ont été produites pour améliorer l'efficacité de l'isolement. L'isolement du PPRV est maintenant possible en moins d'une semaine grâce à une lignée cellulaire appelée CHS20 qui a été développée sur ce principe (Adombi et al., 2011). Pour ce faire, la lignée de cellules de singe CV1 a été transfectée avec la séquence d'ADNc correspondant à la séquence codant pour la protéine SLAM de la chèvre pour l'exprimer de façon constitutive.

## 2.1.7 Epidémiologie, Hôtes et Transmission

### *Les hôtes du PPRV*

Parmi les espèces domestiques, la PPR affecte principalement les ovins et les caprins. En général, les chèvres sont plus sévèrement affectées que les moutons (Lefèvre and Diallo, 1990), mais certaines études ont montré une forte susceptibilité de certaines races de moutons (Fakri et al., 2017) à la PPR. La séroprévalence de la PPR chez ces espèces semble être différente selon le type de d'élevage (Shaila MS et al., 1989; Yesilbağ K et al., 2005). Certaines études ont montré que dans les populations d'élevage mixte, la séroprévalence est plus élevée chez les ovins que chez les caprins. Cette différence est due au taux de survie plus élevé chez les moutons (Abraham G et al., 2005; Ozkul A et al., 2002). Au contraire, d'autres études ont démontré la situation opposée où les caprins sont moins sensibles que les moutons et ont donc une probabilité plus élevée de produire des anticorps contre la PPR (Al-Majali AM et al., 2008; Ayari-Fakhfakh E et al., 2011; Delil et al., 2012). Il faudra noter cependant qu'il est très difficile d'interpréter de manière complète les résultats sérologiques obtenus à partir des études du terrain car, en plus de l'espèce et la race de l'hôte, d'autres facteurs comme le type d'élevage, le nombre d'animaux par troupeau et les commerces d'animaux peuvent influencer la susceptibilité de l'animal (Abubakar M et al., 2009; Diop et al., 2005; Ezeokoli C.D et al., 1986; Hammouchi M et al.). Les études de surveillance épidémiologique menées dans les zones où la PPR est enzootique, ont montré une séroprévalence de la maladie chez les bovins, les buffles et les chameaux (Abraham G et al., 2005; Ozkul A et al., 2002). Cette séroprévalence peut aller jusqu'à 41% et 67% chez les buffles et bovins respectivement d'après une étude au Pakistan (Khan H.A et al., 2008). Cependant, malgré ces taux élevés, les bovins et probablement les buffles sont considérés comme des culs-de-sac épidémiologiques pour la PPR. Des études menées par Mornet et al., (Mornet et al., 1956) décrivent le PPRV comme peu enclin à infecter les bovins, même par contact. Après inoculation, il entraîne une immunité solide et durable contre la peste bovine, sans pour autant engendrer de signes cliniques manifestes, mis à part une hyperthermie passagère. Ceci a été confirmé plus récemment par Sen et al.,

2014 et Couacy-Hymann (communication personnelle). Une exception cependant, rapportée uniquement en Inde, décrit un taux de létalité de 96% chez des buffles domestiques (*Bubalus bubalis*), causé par un virus qui a été isolé et identifié comme le PPRV (Govindarajan R et al., 1997). Plus récemment, des enquêtes épidémiologiques et cliniques associées à des résultats de laboratoire montrent que la PPR induit un syndrome respiratoire chez le dromadaire. Les principaux signes cliniques observés en Iran et au Soudan, et similaires à ceux observés précédemment lors d'une épidémie en Ethiopie entre 1995 et 1996, sont des problèmes respiratoires, neurologiques et des avortements (Khalafalla AI et al., 2010; Megersa B et al., 2012; Roger et al., 2000). Le virus qui a été identifié chez les dromadaires malades et les petits ruminants qui partagent les mêmes zones de pâturage sont phylogénétiquement identiques (Kwiatek et al., 2011). Les espèces sauvages de petits ruminants des différentes familles d'ongulés y compris les sous-familles de Gazellinae, Tragelaphinae et Caprinae peuvent également être affectées et présenter un fort taux de morbidité et de mortalité (Bao J et al., 2011; Furly et al., 1987; Kinne J et al., 2010). L'impact très important de la PPR affecte maintenant la faune dans son milieu naturel comme le démontrent les milliers de morts de la récente épidémie survenue chez les antilopes Saïga (*Saiga tatarica*) en Mongolie. Ceci met en exergue l'impact de la PPR sur les espèces sauvages menacées. Il semble, comme pour la peste bovine, qu'il n'y ait cependant pas de réservoir d'infection en dehors de la population des petits ruminants domestiques.

### *Le mode de transmission*

La maladie se propage principalement par contact direct entre animaux sains et infectés. Des systèmes d'élevage extensifs, les migrations saisonnières, les marchés et les rassemblements facilitent la propagation des maladies. En effet, la PPR est une maladie très contagieuse, se propageant très rapidement. Les sources de contaminations sont les différentes excréments des animaux malades : les sécrétions nasales et oculaires, la salive, les matières fécales et l'urine (Abegunde and Adu, 1977; Gibbs et al., 1979). Les animaux infectés peuvent excréter le virus au moins trois jours avant le début de la maladie (Couacy-Hymann E et al., 2007). Les aérosols de particules virales formés à partir de ces différentes excréments infectieuses, sont inhalés par les animaux sensibles. Comme le PPRV est un virus très fragile, étant rapidement inactivé aux températures tropicales par les UV et par la dessiccation, la transmission requiert un contact étroit entre animal infecté et naïf. Ces conditions sont idéalement réunies dans les zones d'abreuvement et de pâturage. Ces conditions sont également trouvées sur les marchés d'animaux vivants où des animaux apparemment sains (mais qui excrètent le virus) sont sources de contaminations et de dissémination de la maladie. C'est pour cette raison que dans les pays endémiques musulmans, les pics de foyers de PPR sont enregistrés juste après la fête religieuse de l'Aïd au cours de laquelle le commerce de mouton augmente énormément. Une autre période à haute fréquence de foyers de PPR, en Afrique subsaharienne, est la saison froide (Décembre-Février), probablement en raison d'une meilleure conservation du virus dans des conditions d'hivernage et/ou la tendance qu'ont les animaux à se blottir les uns aux autres pour garder la chaleur (Abubakar M et al., 2009; Lancelot et al., 2002). Dans les pays endémiques, les foyers de PPR dans une même zone se produisent tous les trois ans. Cela est dû au fait que le virus ne peut se maintenir qu'à travers de nouveaux hôtes sensibles (tels que les jeunes ayant perdu leurs anticorps maternels, les animaux naïfs des troupeaux de transhumants ou nouvellement achetés), les autres ayant guéri de la maladie sont protégés à vie. En considérant le fait que le renouvellement des troupeaux de petits ruminants est de 100% tous les trois ans, une population sensible à la transmission du virus est régénérée après deux-trois ans.

#### 2.1.8 Les moyens de traitement et de prévention

Certaines études ont montré le traitement des animaux atteints de la PPR par une administration de sérum anti-PPR ou d'antibiotiques associés avec des médicaments contre la diarrhée (Anene et al., 1987). Un traitement efficace et rapide de la PPR pourrait être envisagé en utilisant des antiviraux si leur prix devient abordable. Les antiviraux basés sur de courts ARN interférents synthétiques (siRNA), une nouvelle classe de molécules avec des applications thérapeutiques potentiellement importantes, sont de bons candidats si ils sont délivrés par des vecteurs, y compris des vecteurs viraux (Libeau G et

al., 2015). Cependant pour l'instant, ces approches thérapeutiques par les anti-sérums et les anti-viraux ne peuvent être utilisées sur le terrain car trop coûteuses au regard de leur efficacité sur les moutons et les chèvres. De ce fait, maintenant le contrôle de la PPR est assuré uniquement par la mise en place d'une prophylaxie efficace.

### *La prophylaxie sanitaire*

La peste des petits ruminants est une maladie à déclaration obligatoire auprès de l'OIE selon les conditions énoncées dans le code sanitaire pour les animaux terrestres de l'OIE. Les mesures de prophylaxie sanitaire sont indiquées dans le chapitre 7.6 du code (<http://www.oie.int/fr/normes/code-terrestre/acces-en-ligne/>).

Lorsque la maladie apparaît dans une zone antérieurement indemne, le virus doit être identifié rapidement au laboratoire, les animaux malades ainsi que ceux en contact doivent être abattus tout en respectant les contraintes liées au bien-être animal. Les carcasses doivent être brûlées ou enterrées. Le mouvement des animaux doit être contrôlé et une quarantaine doit être appliquée. Les zones contaminées peuvent être désinfectées par des produits chimiques de pH inférieur ou supérieur à 11. Le nettoyage des vêtements et de tous les équipements de la ferme peut se faire par des détergents actifs sur le PPRV.

Lorsque la maladie réapparaît dans une zone endémique, le moyen de contrôle le plus couramment utilisé est la vaccination d'urgence. Les ovins et les caprins vaccinés avec une souche atténuée de PPRV ou rétablis de la PPR développent une immunité à vie contre la maladie. Un suivi des animaux sauvages et en captivité doit être mis en place afin d'éviter le contact avec les moutons et les chèvres domestiques. La vaccination préventive des espèces zoologiques peut être envisagée. Dans tous les cas, les animaux exposés ou infectés doivent être abattus et les carcasses brûlées ou enterrées.

### *La prophylaxie médicale (la vaccination)*

En raison de son importance épidémiologique et économique dans de nombreux pays, la PPR est devenue après la peste bovine une priorité pour les organisations internationales comme la FAO et l'OIE en termes de contrôle et d'éradication. Des vaccins homologues PPR très efficaces ont été développés, et en Afrique, plus de 20 laboratoires sont producteurs de vaccins (Diallo et al., 1987; Diallo et al., 2007; SEN et al., 2010). De nouveaux vaccins sont en développement, essentiellement pour répondre à la question de la thermostabilité en conditions tropicales et à la question du marquage antigénique du vaccin pour différencier les animaux infectés des animaux vaccinés (vaccins DIVA). Ainsi, pour la produire un vaccin recombinant thermostable protégeant à la fois contre la PPR et la variole caprine, deux maladies d'importance économique et ayant les mêmes répartitions géographiques, les gènes des protéines F et H de PPRV ont été insérés dans le génome du virus capripox (Berhe G. et al., 2003; Chen W et al., 2010). Même s'il n'est pas encore validé sur la durée d'immunité requise pour une utilisation sur le terrain, ce vaccin capripox recombinant peut être considéré comme efficace, thermostable et DIVA puisque les tests de criblages sérologiques peuvent se baser sur l'absence de détection d'anticorps anti-N. Ce type de vaccin est de nature à améliorer l'efficacité des programmes de contrôle de la PPR et notamment à en réduire la durée et donc les coûts pour parvenir à l'éradication.

## **2.2 La répartition géographique**

Les différentes souches du PPRV ont été classées en quatre lignées phylogénétiques nommées lignée I à IV grâce à une étude phylogénétique des séquences partielles des gènes de la Nucléoprotéine (N, 255 nucléotides) (Couacy-Hymann et al., 2002) ou de la protéine de la Fusion (F, 322 nucléotides) (Dhar P et al., 2002) ou de l'hémagglutinine (H, 298 nucléotides) (K. Senthil Kumar et al., 2014). La nomenclature des lignées I et II est différente selon que l'analyse phylogénétique est basée sur le gène N ou le gène F : la lignée II en utilisant le gène F est considérée comme la lignée I en utilisant le gène



N et vice versa. Cependant, récemment, une comparaison a été effectuée entre les analyses phylogénétiques basées sur les gènes N, F ou H. Ces études ont montré que la séquence partielle du gène N présente plus de variabilité que les gènes H et F. L'analyse phylogénétique en utilisant le gène N est donc la plus précise pour identifier la lignée génétique d'appartenance de nouvelles souches. Cela s'explique par le fait que la région du gène N utilisée pour l'analyse est la plus divergente entre les lignées et entre les isolats au sein des lignées (K. Senthil Kumar et al., 2014).

Les lignées I, II et III ont été initialement trouvées en Afrique et ont ensuite été numérotées en fonction de la propagation apparente du virus de l'Afrique de l'Ouest (I et II) vers l'Afrique de l'Est. La lignée I est la lignée présente dans certains pays d'Afrique de l'Ouest dans les années 1980 (Mali, le Sénégal, le Burkina Faso). Des études menées récemment, ont montrées que la lignée II est présente dans les pays de l'Afrique de l'Ouest tels que le Mali, le Sénégal, le Bénin, le Burkina Faso, la Côte d'Ivoire. La lignée II a donc remplacé la lignée I dans ces pays (Baazizi et al., 2017; Habib Salami et al., 2014; Libeau et al., 2014). La lignée IV était une lignée principalement présente en Asie, au Moyen Orient mais laissant place également à la lignée III présente au Yémen et à Oman et à un mélange des lignées III et IV aux Emirats Arabes Unis et au Qatar. Mais la lignée IV est maintenant présente dans les régions où la PPR est endémique, et en Afrique cette lignée semble être en expansion au détriment des autres lignées notamment les lignées II et III, dont les bassins de diffusion respectifs étaient historiquement l'Afrique Centrale et l'Afrique de l'Est (Kwiatek et al., 2011; Libeau et al., 2014; Mantip et al., 2016; Muniraju et al., 2014b; Woma et al., 2016). L'expansion apparente de la lignée IV asiatique à travers l'Afrique est constatée au travers des nouvelles apparitions en constante augmentation du virus de cette lignée, suggérant une virulence accrue du PPRV (Libeau et al., 2014).

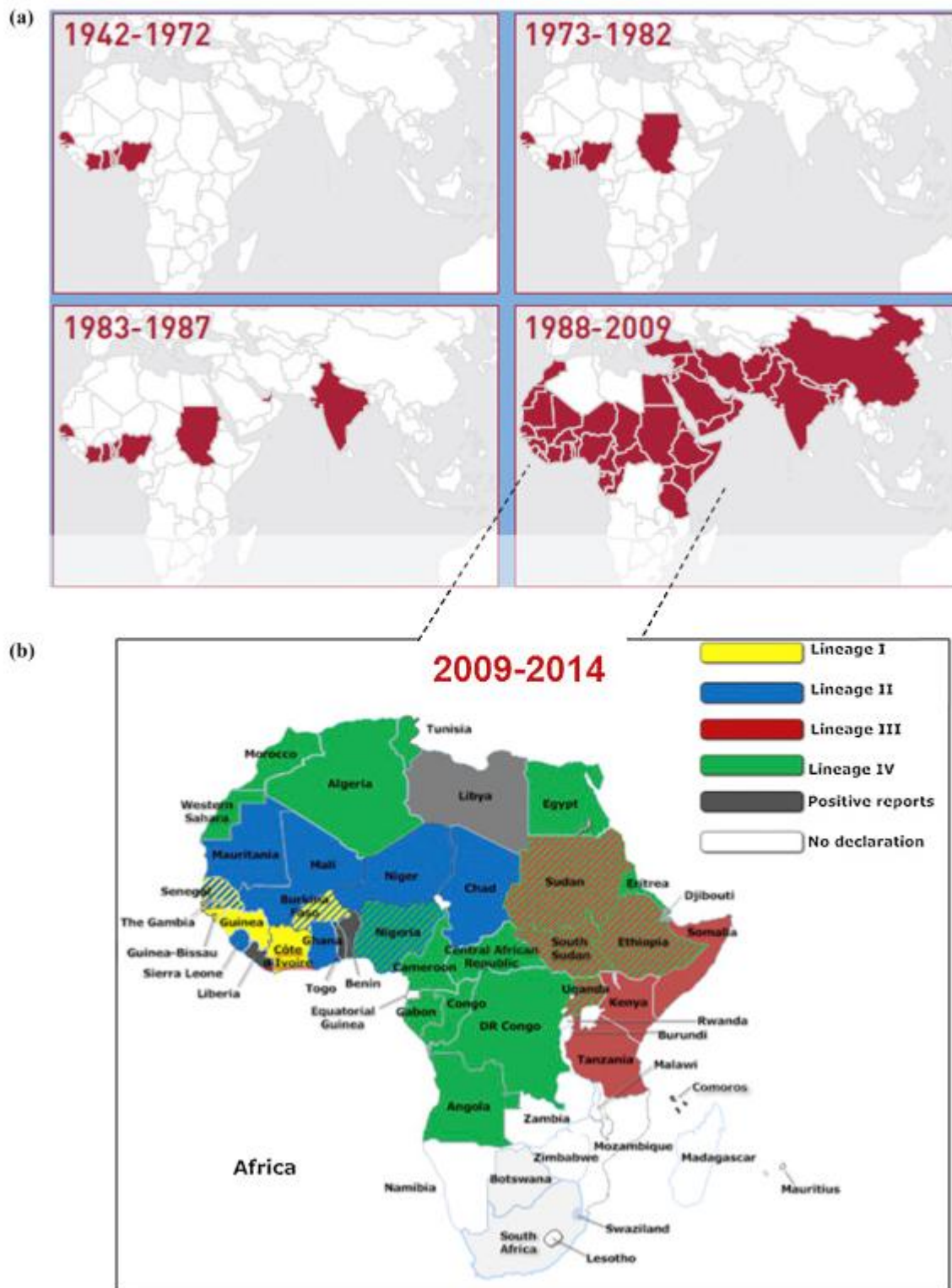


Figure 5 La répartition globale du PPRV de 1942-2014, ainsi que la répartition des différentes lignées (Parida et al., 2016). (a) Image obtenue de la FAO : Food and Agriculture Organisation (FAO, 2009), répartition globale du PPRV de 1942 à 2009 en couleur rouge. (b) Répartition des différentes lignées de PPRV en Afrique de 2009 à 2014.

## 2.3 L'élevage et le commerce de petits ruminants au Mali et en Afrique de l'Ouest

### 2.3.1 L'élevage des petits ruminants

L'élevage joue un rôle important dans l'économie des pays ouest-africains avec une contribution au PIB agricole allant parfois jusqu'à 44%. L'Afrique de l'Ouest est une région d'élevage avec plus de 63 millions de bovins et 225 millions de petits ruminants. Par rapport à l'effectif total en Afrique subsaharienne, l'Afrique de l'Ouest compte 25% de bovins, 33% d'ovins et 40% de caprins (Kamuanga et al., 2008).

Avec un cheptel estimé à 15.52 millions de caprins, 11.86 millions d'ovins et 9.16 millions de bovins, le Mali est le plus grand pays d'élevage de l'Union Economique et Monétaire Ouest africain (UEMOA) et le deuxième de la Communauté Economique des Etats de l'Afrique de l'Ouest (CEDEAO) après le Nigéria. En plus de l'importance de son cheptel et de ses atouts, la longue tradition agropastorale du Mali donne à l'élevage une place importante dans l'économie du pays. En effet, le secteur de l'élevage occupe la troisième place des produits d'exportation. Bien que la productivité des troupeaux soit faible, l'élevage contribue pour près de 14% au produit intérieur brut et constitue une source significative de subsistance pour 80% de la population. Le taux d'exploitation du bétail est de l'ordre de 14% pour le bovin et 34% pour les petits ruminants. Le bétail malien fait l'objet d'exportation vers d'autres pays de la sous-région, à savoir le Burkina Faso, le Sénégal, la Guinée, le Niger, la Mauritanie et la Côte d'Ivoire.

Il existe trois systèmes d'élevage principaux au Mali.

Le premier se caractérise par des systèmes pastoraux nomades en saison sèche, basé sur la transhumance. Ce système se retrouve surtout dans le Nord du Mali et Mopti, 56% des éleveurs nomades se trouvant dans les régions de Gao, Tombouctou et Mopti.

Le deuxième est le système agropastoral sédentaire extensif. Il est prédominant dans le sud du pays avec 65.7% d'éleveur sédentaires dans les régions de Kayes, Koulikoro, Sikasso et Ségou. Parmi les éleveurs sédentaires, 85% ne pratiquent pas de transhumance. Il est surtout pratiqué par les ménages agriculteurs ou agropasteurs qui confient leurs animaux à des bergers. Le bétail pâture loin des villages et les centres urbains. Les effectifs, plus réduits, se limitent à quelques moutons, chèvres et surtout bovins. Ces troupeaux sont exploités pour couvrir les besoins en viandes des ménages.

Enfin, il existe des élevages semi-intensifs. Ces systèmes se retrouvent surtout en périphérie des centres urbains. Mais malgré leur constante augmentation, ils ne contribuent qu'à hauteur de 20% de l'offre total de produits animaux et de bétail sur le marché.

### 2.3.2 Le flux de commerce des petits ruminants

Les circuits nationaux de commercialisation des petits ruminants convergent généralement vers la capitale du Mali, Bamako. Les régions de Mopti et de Ségou drainent le commerce du bétail du Nord et du Centre du Mali. Organisés autour des marchés terminaux d'exportation comme ceux de Nioro (région de Ségou), les animaux transitent généralement par Ségou avant de se diriger en camions ou à pieds vers Bamako. Au Mali, il existe différents types de marchés à bétail:

- Les marchés de collecte, sont des petits marchés situés dans les zones d'élevage ou le long des chemins de transhumance. Ils sont des lieux de transaction entre producteurs et collecteurs.
- Les marchés secondaires ou de regroupement, permettent le rassemblement d'animaux collectés. Les transactions se font entre collecteurs et commerçants.

- Les marchés terminaux, se situent généralement à proximité d'une ville ou dans la ville. Les transactions se déroulent entre commerçants, bouchers et exportateurs.
- Les marchés frontaliers, se situe près d'une frontière, et constituent une étape des circuits d'échanges internationaux (essentiellement d'exportation) ; les principales transactions se déroulent entre collecteurs, commerçants et exportateurs.

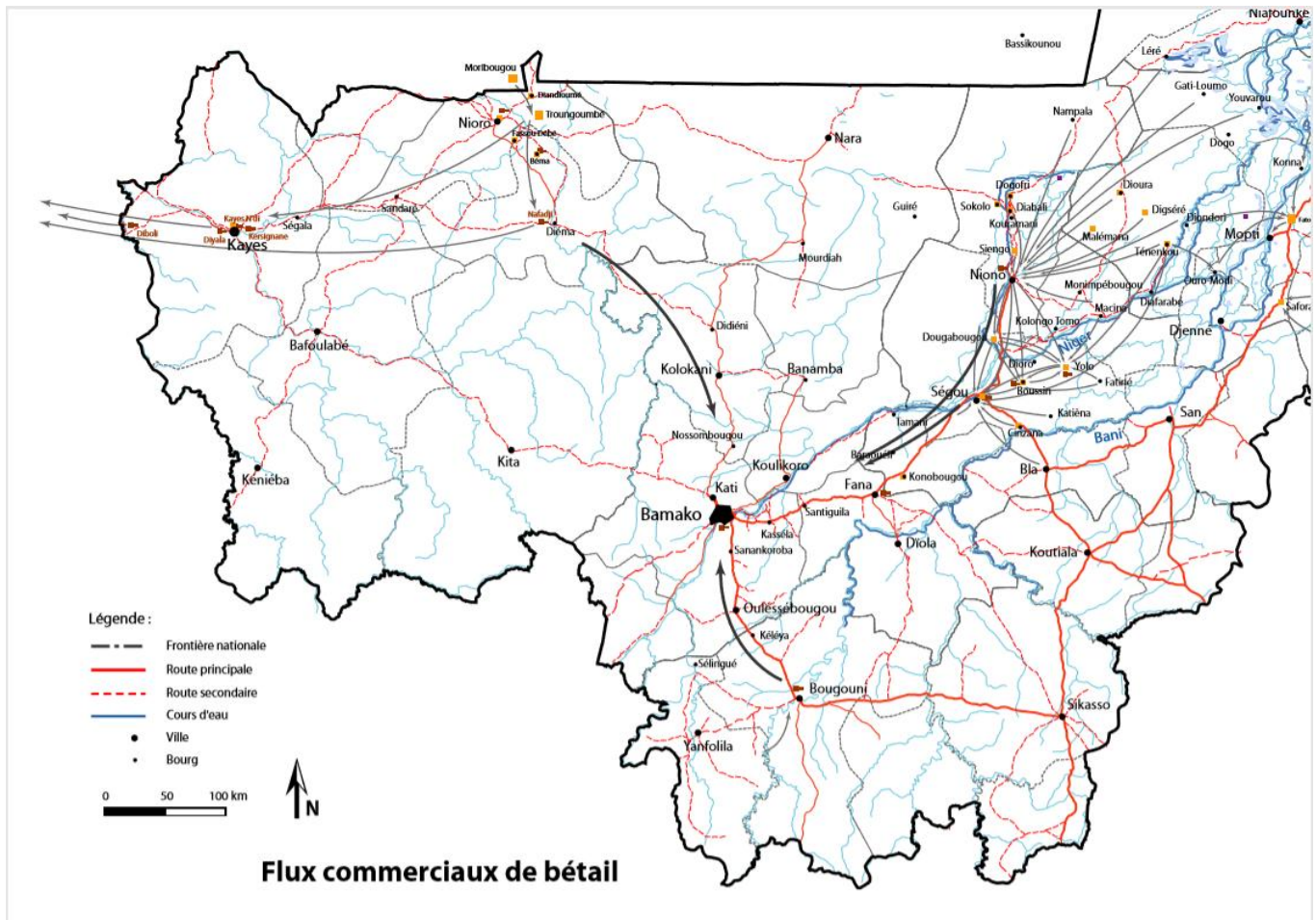


Figure 6 Flux de commerce de bétail au Mali (CIRAD).

Les axes de commerces du bétail entre les pays de l'Afrique de l'Ouest et du centre sont constitués d'itinéraires bien structurés. En Afrique de l'Ouest, le Mali constitue le principal pourvoyeur du marché en animaux sur pied. On distingue deux grandes catégories de circuits de commercialisation (Guibert B et al., 2009).

- Les circuits verticaux qui sont composés des :
  - Circuits occidental : du Mali vers le Sénégal, la Gambie, la Guinée Bissau, la Sierra Leone, Mauritanie et le Libéria ;
  - Circuit central : du Mali, le Burkina Faso, le Niger vers la Côte d'Ivoire, le Ghana et le Togo ;
  - Circuit oriental : du Niger vers le Nord du Nigéria
- Les circuits horizontaux qui sont composés des :
  - Circuit Ouest/Est qui part des zones de production du Nord Est du Mali vers le Centre Ouest du Nigéria en passant par le Nord du Bénin ;
  - Circuit de l'Afrique Centrale (Tchad et République centrafricaine RCA) vers le Nigéria ;



- Circuit RCA vers la République Démocratique du Congo RDC et le Congo.

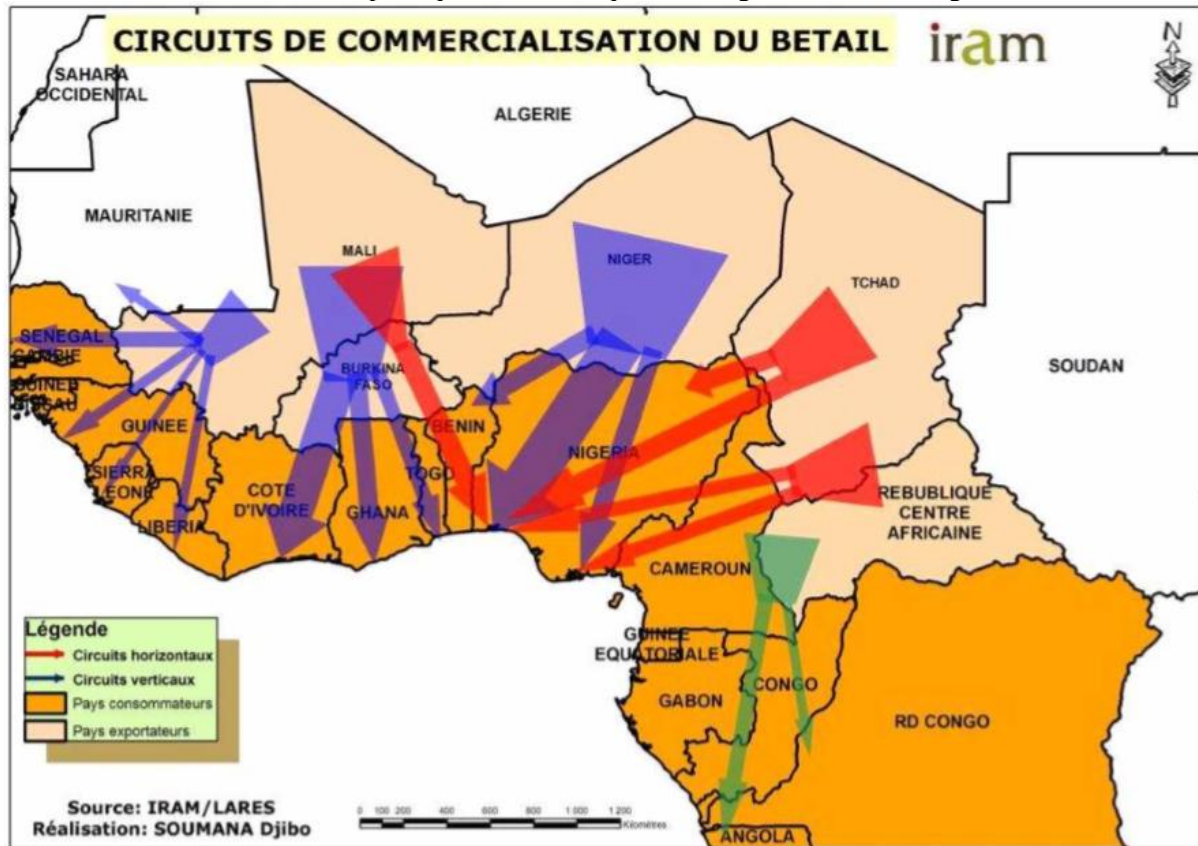


Figure 7 Cartographie des circuits régionaux commercialisation du bétail (Guibert B et al., 2009).

## 2.4 Etat des connaissances sur la biologie évolutive de PPRV qui sous-tendent la propagation de la maladie

Les virus à ARN constituent de bons modèles pour les approches d'épidémiologie moléculaire car ils ont un génome de petite taille variant entre 2 kb et 1,2Mb et un taux de mutations élevé compris entre  $10^{-3}$  et  $10^{-5}$  mutations par site et par réplication (Duffy et al., 2008). Cette vitesse de mutation donne à ces virus la possibilité de s'adapter facilement aux changements environnementaux. Cette adaptabilité est souvent à l'origine de l'émergence ou la réémergence de maladies infectieuses dues aux virus à ARN.

Les études sur l'évolution moléculaire des virus ont bénéficié de grands développements majeurs : l'augmentation du nombre et de la qualité des séquences virales, l'augmentation de la capacité des outils informatiques et le développement de méthodes de reconstruction phylogénétique basées sur des modèles d'évolution plus sophistiqués et des analyses statistiques modernes renforçant la confiance dans les hypothèses et les résultats générés. Les méthodes de reconstruction phylogénétique basées sur des séquences hétérochrones permettent de calibrer une horloge moléculaire et définissent ainsi une relation entre les distances génétiques et le temps (Pybus and Rambaut, 2009). Ces méthodes permettent d'estimer la vitesse d'évolution virale ainsi que l'âge de l'ancêtre commun le plus récent (Muniraju et al., 2014a). La datation de l'ancêtre commun le plus récent permet d'établir l'origine des virus nouvellement apparus dans une région donnée.

La phylogéographie constitue une approche simple prenant en compte les données génétiques et géographiques et cherchant l'historique des événements de migration compatibles avec la phylogénie observée selon le principe de parcimonie. Cette méthode a été utilisée dans la reconstruction de la dynamique d'invasion des virus de la rage aux USA. La vitesse de la propagation du virus a été calculée à partir de la corrélation entre les distances spatiales et temporelles (Roman et al., 2007).

Chez les *Morbillivirus*, la relation phylogénétique entre les différents groupes a été établie par Barrett et al (Barrett et al., 1993). Alors qu'on pensait que les deux morbillivirus de ruminants seraient relativement les plus proches génétiquement, la réalité moléculaire relate plutôt une parenté génétique étroite entre RPV et MV. Aussi, pour faire la lumière sur l'histoire évolutive des *Morbillivirus*, les approches de coalescence bayésiennes ont été utilisées pour situer la date de spéciation phylogénétique ayant eu lieu entre les virus ancestraux de MV et de RPV. Celle-ci est estimée autour des 11<sup>ème</sup>-12<sup>ème</sup> siècles (Furuse et al., 2010; Pomeroy et al., 2008).

Ces approches ouvrent ainsi de nouvelles perspectives sur les études d'évolution du PPRV (Bao et al., 2017; Clarke et al., 2017; Muniraju et al., 2014a). La diversité génétique actuellement observée entre les quatre lignées de la PPR date de la moitié du 19<sup>ème</sup> siècle. Ces études suggèrent que la lignée III qui circule en Afrique orientale et dans le sud de la péninsule arabique est la lignée la plus ancienne. Les analyses réalisées par ces auteurs s'appuient sur des séquences du gène N. Ce gène est un bon marqueur phylogénétique car il porte de petites séquences variables appropriées. Les mêmes analyses peuvent être effectuées avec d'autres gènes de protéines du PPRV notamment la protéine de la matrice M, la protéine de fusion F, l'hémagglutinine H (Balamurugan et al., 2010). Habib Salami pendant sa thèse a analysé l'évolution du PPRV au Sénégal et élargi dans certains autres pays de l'Afrique de l'Ouest en utilisant les gènes N et H ainsi que les deux gènes concaténés. Ces études lui ont permis d'estimer le taux d'évolution de toutes les lignées de PPRV à  $7,11 \times 10^{-4}$  substitution/site/an. Il a ensuite estimé l'âge de l'ancêtre commun le plus récent des 4 lignées de PPRV correspondant également à celui de la divergence des virus de lignes III à 1898.

Les études récentes portant sur l'évolution des PPRV sont basées sur l'utilisation du génome complet grâce à une augmentation du nombre de techniques permettant un séquençage en grand nombre du génome complet du PPRV (Clarke et al., 2017). L'utilisation du génome complet permet une analyse plus approfondie et plus générale de l'évolution du PPRV. Ainsi Clark et al., en 2017 ont étudié l'évolution du PPRV en utilisant la séquence du génome complet de 18 souches provenant d'Israël au cours d'épidémies apparues entre 1997 et 2014. Ces études ont permis d'estimer un taux d'évolution à  $9,22 \times 10^{-4}$ . L'âge de l'ancêtre commun le plus récent des 4 lignées est estimé à 1870, ce qui correspond aussi à la divergence des virus de la lignée III.

Dans notre étude, nous avons utilisé le génome complet de multiples souches de PPRV pour retracer l'histoire évolutive de la PPR, et plus spécialement en Afrique de l'Ouest. L'analyse de l'évolution de ces génomes complets du PPRV peut nous aider à interpréter les données d'épidémiologie de terrain et donc à mettre en œuvre des mesures de contrôle efficaces.



# 3 PCR en temps réel asymétrique basé sur le gène M du PPRV pour le diagnostic et la différenciation des lignées du virus

## 3.1 Introduction

La PPR est une maladie très contagieuse qui cause d'énormes pertes chez les éleveurs dans les pays pauvres notamment dans la plupart des pays Africains. Le diagnostic de la PPR est basé sur le diagnostic immunologique (la technique de c-ELISA) et le diagnostic moléculaire avec la RT-PCR dont le gène N et F sont les cibles (Couacy-Hymann et al., 2002; Forsyth and Barrette, 1995). Les données de séquences provenant de ces gènes sont ensuite utilisées pour définir la lignée phylogénétique des échantillons. La détermination des lignées des échantillons est un moyen de mieux comprendre la dynamique de transmission transfrontalière de la PPR, notamment entre les pays liés par un commerce de bétail.

Dans la plupart des pays en voie de développement, comme ceux l'Afrique de l'Ouest tel que le Mali, le coût prohibitif de l'équipement des laboratoires de diagnostic vétérinaires et leur maintenance font que les techniques mises en place sont souvent plus modeste que celles des laboratoires des pays industrialisés. Pour ce qui est de la PPR, l'activité de diagnostic dépend fortement d'une aide par l'intermédiaire de projets internationaux ou du soutien des laboratoires partenaires tels que l'AIEA ou le CIRAD. La détermination de la lignée du PPRV, qui devrait être un diagnostic de routine, reste compliquée pour les laboratoires du sud, car ils n'ont pas les moyens d'accéder aux plateformes de séquençage. Cette détermination passe par l'envoi des échantillons vers l'Europe. Le Laboratoire Central Vétérinaire (LCV) à Bamako collabore généralement avec le CIRAD dans cet objectif. Mais cette méthode coûte très cher et demande beaucoup de temps. De ce fait, les échantillons sont très souvent diagnostiqués mais pas génotypés.

Dans ce chapitre, nous présentons une technique que nous avons développée et qui permet de déterminer directement la lignée des échantillons de terrain par RT-PCR sans faire de séquençage. En effet, l'alignement du gène M du PPRV nous a permis d'identifier des zones de variation spécifique de chaque lignée. A partir de ces zones de variations spécifiques, nous avons dessiné des amorces spécifiques de chaque lignée (snapbacks). Une méthode de PCR en temps réel basée sur l'utilisation de ces amorces va permettre de différencier directement les quatre lignées de la PPR sans faire de séquençage. L'analyse des courbes de dissociation obtenues va permettre de définir pour chaque lignée une température de dissociation spécifique. Cette méthode de génotypage a déjà été appliquée, notamment au virus de la rougeole (Waku-Kouomou et al., 2006).

En effet, nous avons choisi le gène M car il est le plus conservé chez les Morbillivirus (Barrett et al., 2006) (Tableau 1). De ce fait, une petite variation dans la séquence du gène M entre les différentes souches du PPRV doit être très significative, et donc très importante dans l'étude phylogénétique.



Tableau 1 Pourcentage de similitude (identité nucléotidique) du virus de la peste bovine par rapport aux autres Morbillivirus (Selon Barrett et al., 2006).

Virus	Gène N	Gène M	Gène F	Gène P	Gène C	Gène V	Gène H	Gène L
<b>PPRV</b>	79,99	<b>89,82</b>	82,74	58,65	54,61	54,61	59,14	83,44
<b>MV</b>	82,70	<b>92,26</b>	85,98	63,35	65,34	64,55	67,33	87,73
<b>CDV</b>	75,38	<b>83,93</b>	78,75	53,57	52,91	44,67	46,26	81,05
<b>DMV</b>	79,69	<b>89,29</b>	84,54	57,91	55,29	50,50	57,14	83,29

Dans la présente étude, la méthode a été utilisée pour caractériser le génotype de 64 souches provenant de différents pays d'Afrique, d'Asie et du Moyen Orient. Les résultats de cette méthode ont été confirmés pour l'ensemble des échantillons par les techniques directes de séquençage.

Ces travaux ont été réalisés à l'AIEA en collaboration avec le CIRAD.

Cette nouvelle technique est un outil qui permettra au Mali ainsi qu'à tous les pays ayant des moyens limités de pouvoir déterminer rapidement la ou les lignées du PPRV qui circulent dans leur pays et de mettre en place de manière rapide des moyens de contrôle adaptés.

## 3.2 Matériels et méthodes

### 3.2.1 Utilisation du gène M du PPRV pour le diagnostic de la PPR

#### ✓ Souches utilisées

Cette partie repose sur l'étude de 21 échantillons/souches de l'AIEA provenant du Niger, Nigéria, Sierra Leone, Cameroun, Ethiopie et Turquie dans des foyers de PPR. Les échantillons ont été conservés dans un Laboratoire de Sécurité P3 à Mödling (Institute for Veterinary Disease Control) en Autriche. En plus de cela, 17 séquences du CIRAD ont également été utilisées. Nous avons ajouté à ces séquences, 27 séquences provenant de GenBank (Tableau 2).

Tableau 2 Liste des 65 souches et séquences utilisée pour le diagnostic de la PPR en utilisant le gène M et le récapitulatif des lignées à partir du gène N partiel et du gène M.

Nom des échantillons	Pays	Lignée avec les gènes N et M	Numéro d'accession
<b>Benin/B1/1969</b>	<i>Benin</i>	<i>II</i>	<i>KR781450</i>
<b>BKFPBRLN/Burkina/2014</b>	<i>Burkina Faso</i>	<i>II</i>	<i>AIEA</i>
<b>Cameroon/19LG</b>	<i>Cameroon</i>	<i>IV</i>	<i>AIEA</i>
<b>Cameroon/28LG</b>	<i>Cameroon</i>	<i>IV</i>	<i>AIEA</i>
<b>Cameroun/04LG</b>	<i>Cameroon</i>	<i>IV</i>	<i>AIEA</i>
<b>Ethiopia/04/NIV/APHL</b>	<i>Ethiopia</i>	<i>IV</i>	<i>AIEA</i>

<b><i>Kenya/APHL/CHS/2011</i></b>	<i>Kenya</i>	<i>III</i>	AIEA
<b><i>NIG10/Nigeria/APHL</i></b>	<i>Nigeria</i>	<i>IV</i>	AIEA
<b><i>NIG28/Nigeria/APHL</i></b>	<i>Nigeria</i>	<i>IV</i>	AIEA
<b><i>NIG29/Nigeria/APHL</i></b>	<i>Nigeria</i>	<i>IV</i>	AIEA
<b><i>NIG03/Nigeria/APHL</i></b>	<i>Nigeria</i>	<i>IV</i>	AIEA
<b><i>NIG30/Nigeria/APHL</i></b>	<i>Nigeria</i>	<i>IV</i>	AIEA
<b><i>NIG40/Nigeria/APHL</i></b>	<i>Nigeria</i>	<i>IV</i>	AIEA
<b><i>NIG43/Nigeria/APHL</i></b>	<i>Nigeria</i>	<i>IV</i>	AIEA
<b><i>NIG56/Nigeria/APHL</i></b>	<i>Nigeria</i>	<i>IV</i>	AIEA
<b><i>NIG68/Nigeria/APHL</i></b>	<i>Nigeria</i>	<i>IV</i>	AIEA
<b><i>Niger/2014_APHL</i></b>	<i>Niger</i>	<i>IV</i>	AIEA
<b><i>Senegal/APHL</i></b>	<i>Senegal</i>	<i>II</i>	AIEA
<b><i>Sierra leone/APHL</i></b>	<i>Sierra Leone</i>	<i>II</i>	AIEA
<b><i>Sinnar/APHL</i></b>	<i>Soudan</i>	<i>III</i>	AIEA
<b><i>TUK02PM/APHL/Turkey</i></b>	<i>Turkey</i>	<i>IV</i>	AIEA
<b><i>TUK10PM/APHL/Turkey</i></b>	<i>Turkey</i>	<i>IV</i>	AIEA
<b><i>Senegal/16/Thiès/13001</i></b>	<i>Senegal</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>

<b>Comores/9/2012</b>	<i>Comores</i>	<i>III</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Mali/6/4/2014</b>	<i>Mali</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Guinee/4/2013</b>	<i>Guinée</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Mali/7/6/2014</b>	<i>Mali</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Senegal/10/Pakour/2013</b>	<i>Senegal</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Senegal/1/Thies05002/2010</b>	<i>Senegal</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Senegal/2/thies14006/2010</b>	<i>Senegal</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Mali/8/18/2014</b>	<i>Mali</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Senegal/14/Mecke/2013</b>	<i>Senegal</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Mauritanie/3/2012</b>	<i>Mauritania</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Algerie/5/2012</b>	<i>Algeria</i>	<i>IV</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Senegal/12/Mecke3/2012</b>	<i>Senegal</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Senegal/15/Soum/2012</b>	<i>Senegal</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Senegal/13/Mbour/Joal/2013</b>	<i>Senegal</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Mali/11/P/10/2014</b>	<i>Mali</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>Vaccine/CIRAD/pathoquest</b>	<i>Nigeria</i>	<i>II</i>	<i>CIRAD</i>
<b>CH/GDDG/2014</b>	<i>China</i>	<i>IV</i>	<i>NCBI/KP868655.1</i>
<b>CH/HNNY/2014</b>	<i>China</i>	<i>IV</i>	<i>NCBI/KM089830.1</i>
<b>CH/HNZK/2014</b>	<i>China</i>	<i>IV</i>	<i>NCBI/KM089831.1</i>
<b>CH/HNZM/2014</b>	<i>China</i>	<i>IV</i>	<i>NCBI/KM089832.1</i>
<b>China/BJ/2014</b>	<i>China</i>		<i>NCBI/KP260624.1</i>

		IV	
<i>China/Tibet/Bharal/2008/Lineage IV</i>	<i>China</i>		<i>NCBI/JX217850.1</i>
		IV	
<i>China/Tibet33/2007/Lineage IV goat</i>	<i>China</i>		<i>NCBI/JF939201.1</i>
		IV	
<i>China/TibetGeg30/2007/Lineage IV</i>	<i>China</i>		<i>NCBI/FJ905304.1</i>
		IV	
<i>CIV/01P/2009</i>	<i>Ivory coast</i>	<i>II</i>	<i>NCBI/KR781451.1</i>
<i>Ethiopia/1994/Lineage III goat</i>	<i>Ethiopia</i>	<i>III</i>	<i>NCBI/KJ867540.1</i>
<i>Ethiopia/2010/Lineage IV goat</i>	<i>Ethiopia</i>	<i>IV</i>	<i>NCBI/KJ867541.1</i>
<i>Ghana/NK1/2010</i>	<i>Ghana</i>	<i>II</i>	<i>NCBI/KJ466104.1</i>
<i>IND/TN/GIN/2014/01</i>	<i>India</i>	<i>IV</i>	<i>NCBI/KT270355.1</i>
<i>IND/TN/Gingee/2014</i>	<i>India</i>		<i>NCBI/KR261605.1</i>
		IV	
<i>India/Sungri/1996/Lineage IV goat-vaccine</i>	<i>India</i>		<i>NCBI/KF727981</i>
		IV	
<i>Ivory/Coast/1989/Lineage I goat</i>	<i>Ivory coast</i>	<i>I</i>	<i>NCBI/EU267273</i>
<i>KN5/2011</i>	<i>Kenya</i>	<i>III</i>	<i>NCBI/KM463083.1</i>
<i>Morocco/2008/Lineage IV</i>	<i>Morocco</i>	<i>IV</i>	<i>NCBI/KC594074.1</i>
<i>Nigeria/1975/Lineage II goat vaccine</i>	<i>Nigeria</i>	<i>II</i>	<i>NCBI/X74443.2</i>
<i>Nigeria/1976/Lineage II sheep</i>	<i>Nigeria</i>	<i>II</i>	<i>NCBI/EU267274.1</i>
<i>Oman/1983/Lineage III goat</i>	<i>Oman</i>	<i>III</i>	<i>NCBI/KJ867544.1</i>
<i>Senegal/2013 SnDk11113</i>	<i>Senegal</i>	<i>II</i>	<i>NCBI/KM212177.1</i>
<i>Senegal/E32/1969</i>	<i>Senegal</i>	<i>I</i>	<i>NCBI/KP789375.1</i>
<i>Turkey/2000/lineage IV</i>	<i>Turkey</i>	<i>IV</i>	<i>NCBI/AJ849636.2</i>
<i>UAE/1986/Lineage III Dorcas gazelle</i>	<i>UAE</i>	<i>III</i>	<i>NCBI/KJ867545.1</i>
<i>Uganda/2012/Lineage III goat</i>	<i>Uganda</i>	<i>III</i>	<i>NCBI/KJ867543.1</i>

#### *Extraction de l'acide nucléique, l'amplification et le séquençage du gène M et N du PPRV*

L'ARN viral des 21 échantillons de l'AIEA (voir Tableau 2), écouvillons et isolats, ont été extraits en utilisant le kit RNeasy plus RNA extraction Kit (Qiagen, Allemagne) selon les indications du fournisseur.

Les échantillons ont ensuite été amplifiés par RT-PCR en utilisant le couple d'amorces NP3/NP4 ciblant une portion de 355pb du gène N (Couacy-Hymann et al., 2002) pour les études phylogénétiques ultérieures. Pour cela, le kit One Step RT-PCR de Qiagen a été utilisé et l'amplification a été réalisée selon le programme suivant : un cycle de 30 minutes à 50°C permettant la transcription inverse des ARN viraux, un cycle de 15 minutes à 95°C permettant la dénaturation des ADNc générés et inactivation de l'enzyme de la reverse transcription, puis 40 cycles composés de 30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation des amorces à 60°C et 30 secondes d'élongation à 72°C. La taille des fragments amplifiés a été contrôlée après migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 1,5% en TAE 1X et visualisation par illumination au rayonnement UV. Les produits d'amplification d'une taille d'environ 350pb ont alors été purifiés à l'aide du Kit Wizard purification Kit (Promega, USA). Les produits de l'amplification ont été envoyés à séquencer à LGC genomics à Berlin.

De même, ces échantillons ont été utilisés pour le séquençage du gène M. L'ARN viral des échantillons a été retro transcrit en cDNA en utilisant le kit First Strand cDNA synthesis Kit (Invitrogen, USA) en suivant les instructions du fournisseur. Le choix du kit a été ici fixé par le laboratoire de l'AIEA où cette partie a été faite. Les cDNA obtenus ont été utilisés pour une amplification avec des amorces spécifiques du gène M afin d'obtenir la séquence complète du gène M. Ces amorces ont été développées à partir de l'alignement de 28 séquences de génomes complets du PPRV disponible sur GenBank. Quatre couples d'amorces, se chevauchant, ont été dessinés couvrant le gène de la protéine M (Tableau 3). Les échantillons ont été amplifiés en utilisant le kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, USA) en suivant les instructions du fournisseur.

La taille des fragments amplifiés a été contrôlée après migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 1,5% en TAE 1X et visualisation par illumination au rayonnement UV. Les produits d'amplification à la bonne taille ont alors été purifiés à l'aide du Kit Wizard purification Kit (Promega, USA) et envoyés à séquencer à LGC Genomics à Berlin.

Les séquences obtenues avec les 4 couples d'amorces ont été assemblés avec le logiciel Bioedit pour obtenir la séquence complète du gène M (1008bp).

Tableau 3 La séquence des amorces et les tailles des produits d'amplification des amorces dessinées pour le séquençage du gène M.

Nom de l'amorce	Séquences 5' → 3'	Taille de l'amplicon (bp)
<b>M_7F</b>	AACATCYGAGGTTGAGTTRAA	678
<b>M_7Rb</b>	AGACAGGGGGTCGTTATCCT	
<b>M_8F</b>	AATCAGCATGGGATGTCAAAG	537
<b>M_8R</b>	AGGCKACTGCATTGGCTGAG	
<b>M_9F</b>	CCCAGAGRTTCAGGGTTGTG	505
<b>M_9R</b>	TAGACACGGAATTCCTGGGG	
<b>M_10F</b>	CCCCCTAATGGATRRTAATGA	617
<b>M_10R</b>	TGRCCCCTAAGTTTTGTTTG	

Les 17 souches du CIRAD ont été séquencées (séquençage du génome complets) par H.Salami au cours de sa thèse (Voir Thèse H. Salami).

### Analyse phylogénétique

Les séquences des gènes M et N obtenus des 21 échantillons de l'AIEA, des 17 souches du CIRAD et des 27 séquences de GenBank ont été alignées en utilisant le logiciel MEGA 6 (Kumar et al., 2013) avec la méthode Clustal W. A partir des alignements obtenus, les arbres phylogénétiques ont été construits avec la méthode de Maximum de Vraisemblance basée sur le modèle Kimura 2-parameter, avec une distribution Gamma discrète pour modéliser les différences de taux d'évolution entre les sites et un ré-échantillonnage de 1000 (bootstraps). Le bootstrap permet de vérifier la robustesse et la fiabilité de l'arbre obtenu. Le bootstrap consiste à échantillonner les positions de l'alignement pour relancer la construction phylogénétique de façon itérative puis de comparer les résultats obtenus après

plusieurs répétitions. Sa valeur est représentée en pourcentage et est associée à chaque branche et indique la robustesse d'un nœud.

### 3.2.2 Génotypage du PPRV par analyse de séquence

*Conception d'amorces spécifiques (snapback) pour identifier les polymorphismes mononucléotidiques spécifiques (SNP).*

Pour la différenciation des lignées du PPRV, nous avons utilisé la stratégie de PCR basée sur l'utilisation d'amorces snapback et l'intercalant d'ADN Evergreen (Esayas et al., 2013; Zhou et al., 2008). La courbe de dissociation de la fluorescence obtenue avec la PCR est ensuite analysée pour différencier les différentes lignées.

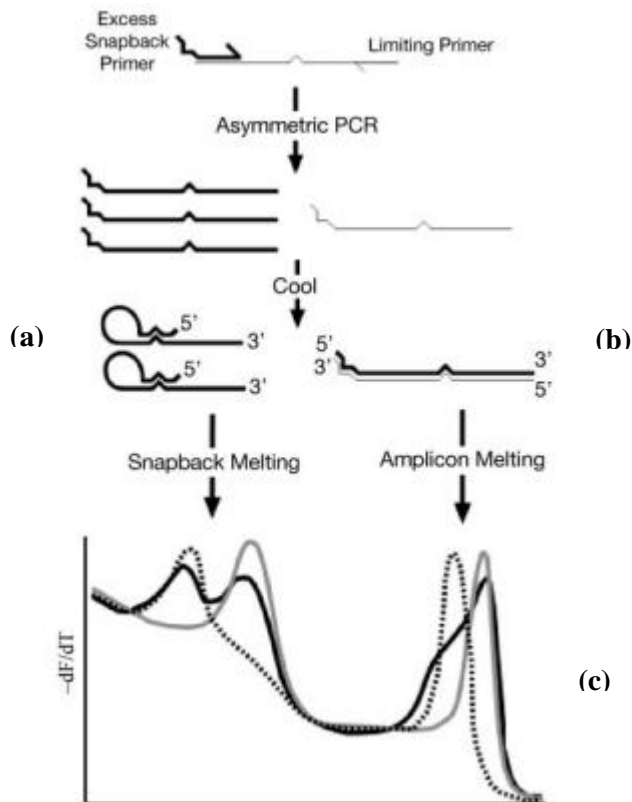


Figure 8 Schéma explicatif de l'amorce snapback forward, la PCR asymétrique et la courbe de dissociation (Zhou et al., 2008).

Les amorces snapbacks sont des oligonucléotides qui comportent à leur extrémité 5' une sonde non marquée et qui est complémentaire au produit d'extension de l'amorce. La PCR en temps réel asymétrique est réalisée avec un excès d'amorce snapback forward. Lors de l'hybridation, il y a formation de l'hybride de l'amorce snapbak forward sur l'amplicon (b) et de l'hybride de l'amorce snapback forward qui forme une boucle en épingle à cheveux (a). La température de dissociation (c) de l'amplicon (b) est plus élevée que celle de la boucle en épingle à cheveux (a). La température de dissociation de la boucle en épingle à cheveux (a) va nous permettre de déterminer la lignée du PPRV.

Les couples d'amorces snapback forward et reverse sont dessinés pour cibler les gènes M et N du PPRV.

Pour cela, 27 séquences du gène M appartenant à toutes les lignées du PPRV ont été utilisées (Tableau 4). Parmi les 27 séquences, 6 ont été choisies parmi les 21 séquences obtenues dans la partie précédente (voir partie 3.2.1 et Tableau 4). Les 21 autres séquences proviennent de Genbank. Les 27 séquences ont été alignées avec le logiciel Mega6 (Kumar et al., 2013). Le couple d'amorce a été

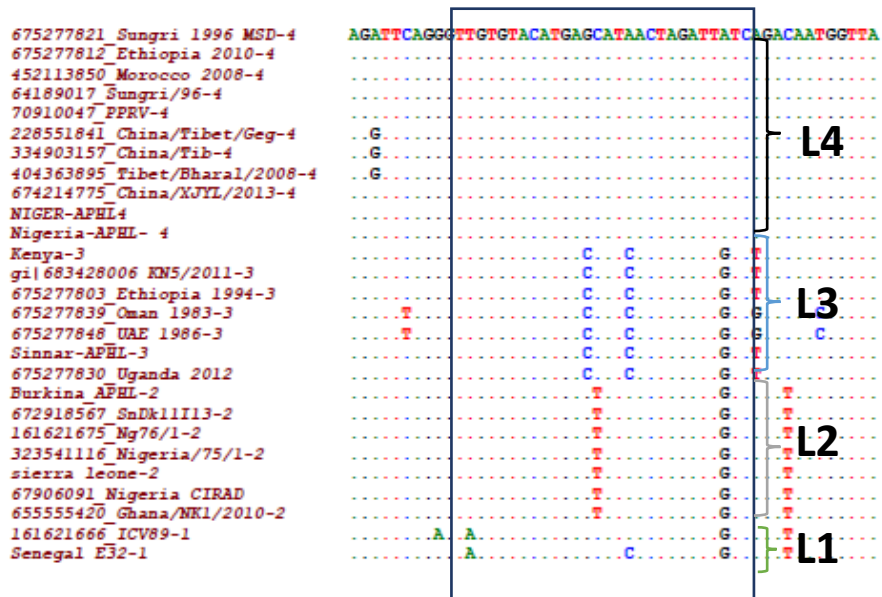
dessiné au niveau des régions présentant 2 ou 3 différences nucléotidiques entre les quatre lignées mais des différences qui sont spécifiques à chaque lignée (Figure 9). L'amorce snapback forward est dessinée de manière spécifique aux lignées IV et I, mais présentant un mismatch C/T--T/C avec la lignée III et un mismatch A/C avec la lignée II (Tableau 5). Le couple d'amorce a été dessiné à l'aide du logiciel Primer3Plus. Ces mismatches entre les lignées vont créer, lors de la PCR en temps réel, des températures de dissociations différentes et qui sont spécifiques à chaque lignée.

Tableau 4 Tableau récapitulatif des 27 séquences utilisées pour le dessin du couple d'amorce snapback forward et reverse du gène M.

Nom	Pays	Lignée	Numero d'accesion
<b>Ethiopia/2010/Lineage IV goat</b>	Ethiopia	IV	NCBI/KJ867541.1
<b>India/Sungri/1996/Lineage IV goat-vaccine</b>	India	IV	NCBI/KF727981
<b>India/Sungri/1996/Lineage IV goat-vaccine</b>	India	IV	NCBI/KF727981
<b>Morocco/2008/Lineage IV</b>	Morocco	IV	NCBI/KC594074.1
<b>Turkey/2000/lineage IV</b>	Turkey	IV	NCBI/AJ849636.2
<b>China/Tibet33/2007/Lineage IV goat</b>	China	IV	NCBI/JF939201.1
<b>China/TibetGeg30/2007/Lineage IV</b>	China	IV	NCBI/FJ905304.1
<b>China/Tibet/Bharal/2008/Lineage IV</b>	China	IV	NCBI/JX217850.1
<b>China/BJ/2014</b>	China	IV	NCBI/KP260624.1
<b>IND/TN/Gingee/2014</b>	India	IV	NCBI/KR261605.1
<b>NIG68/Nigeria/APHL</b>	Nigeria	IV	AIEA
<b>Niger/2014_APHL</b>	Niger	IV	AIEA
<b>KN5/2011</b>	Kenya	III	NCBI/KM463083.1
<b>Kenya/APHL/CHS/2011</b>	Kenya	III	AIEA
<b>Ethiopia/1994/Lineage III goat</b>	Ethiopia	III	NCBI/KJ867540.1
<b>Oman/1983/Lineage III goat</b>	Oman	III	NCBI/KJ867544.1
<b>UAE/1986/Lineage III Dorca gazelle</b>	UAE	III	NCBI/KJ867545.1
<b>Sinnar/APHL</b>	Soudan	III	AIEA
<b>Uganda/2012/Lineage III goat</b>	Uganda	III	NCBI/KJ867543.1
<b>BKFPBRLN/Burkina/2014</b>	Burkina Faso	II	AIEA
<b>Nigeria/1975/Lineage II goat vaccine</b>	Nigeria	II	NCBI/X74443.2
<b>Nigeria/1976/Lineage II sheep</b>	Nigeria	II	NCBI/EU267274.1
<b>Sierra leone/APHL</b>	Sierra Leone	II	AIEA
<b>Senegal/2013 SnDk11113</b>	Senegal	II	NCBI/KM212177.1
<b>Ghana/NK1/2010</b>	Ghana	II	NCBI/KJ466104.1
<b>Ivory/Coast/1989/Lineage I goat</b>	Ivory coast	I	NCBI/EU267273
<b>Senegal/E32/1969</b>	Senegal	I	NCBI/KP789375.1



a)



b)

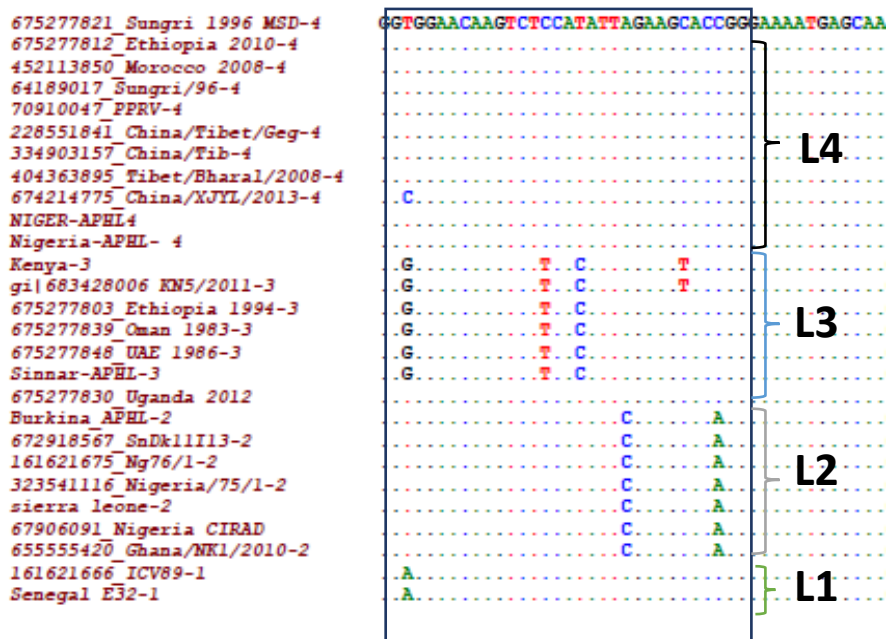


Figure 9 Exemples (a et b) de régions choisies pour le choix du couple d'amorce à partir du gène M. La zone encadrée montre les différences spécifiques de chaque lignée du PPRV.

Pour la différenciation des lignées IV et I, un autre couple d'amorce snpaback forward et reverse a été dessiné au niveau du gène N. Pour cela, 39 séquences du gène complet de la nucléoprotéine (N) ont été utilisées. Ces séquences proviennent de GenBank. Pour cela, la stratégie utilisée pour le gène M a été appliqué au gène N.



Tableau 5 Liste des amorces snapback des gènes M et N.

Nom de l'amorce snapback	Séquence de l'amorce
<b>R1SBF1_M (Snapback forward du gène M)</b>	CACTTCGAATATGGAGACTTGTTCCA <b>Y</b> GTGGGCAACTTTAG AAGA
<b>R1Rev_M (snapback reverse du gène M)</b>	CATGGAGGGT <b>Y</b> TTGCTCATT
<b>N_SBF1v4For (Snapback forward du gène N)</b>	GATGTIATCCGCTGTATCAATTGTCTTTGTTCGTGGAGTCAC C
<b>N_RevB (snapback reverse du gène N)</b>	TCAACAAG <b>R</b> CGGAT <b>R</b> CT <b>R</b> AC

#### *Test des couples d'amorces snapbacks pour le génotypage du PPRV*

Nous avons testé la capacité des couples d'amorces à différencier les lignées du PPRV en utilisant 64 échantillons. Ces échantillons proviennent de différents pays d'Afrique, d'Asie et du Moyen Orient (Tableau 7). Nous avons commencé à déterminer dans un premier temps la lignée de ces 64 échantillons. Puis ces mêmes échantillons ont été amplifiés par RT-PCR en temps réel afin d'étudier les courbes de dissociations.

- Extraction de l'acide nucléique

Nous avons utilisé les amorces NP3/NP4 pour déterminer la lignée des 64 échantillons (Tableau 7). Les échantillons sont conservés dans un Laboratoire de Sécurité P3 à Mödling (Institute for Veterinary Disease Control) en Autriche. L'ARN viral des échantillons, écouvillons et isolats, a été extrait en utilisant le kit RNeasy plus RNA extraction Kit (Qiagen, Allemagne) selon les indications du fournisseur.

- PCR

Pour la PCR, nous avons suivi le même protocole que précédemment (voir *extraction de l'acide nucléique, l'amplification et le séquençage du gène M et N du PPRV* du point 3.2.1).

Pour déterminer la lignée des 64 souches, les séquences du gène partiel N de ces échantillons ont été alignés en utilisant le logiciel MEGA 6 (Kumar et al., 2013) avec la méthode Clustal W (voir la partie *Analyse phylogénétique* du point 3.2.1).

#### *RT-PCR en temps réel asymétrique*

La RT-PCR en temps réel est réalisée dans un volume réactionnel de 20µl contenant 600nM d'amorce snapback forward et 40nM d'amorce reverse, 1x SsoFast EvaGreen Supermix (Biorad) et 2 µl d'ARN. La PCR est effectuée avec la machine CFX96 Real Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Inc). La PCR est initiée par une étape de reverse transcription à 50°C pendant 20 minutes, suivi par une PCR en temps réel selon le programme suivant : une première étape de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, puis 45 cycles composés de 1 minute de dénaturation à 95°C, 1 minute d'hybridation des amorces à 40°C suivi d'une étape de dissociation continue en augmentant la température de 0.5°C/10sec (pour la dissociation des deux brins d'ADN) avec une acquisition de la température de dissociation entre 40°C à 90°C (courbe de dissociation du snapback). La courbe de dissociation est analysée en utilisant le logiciel CFX Manager version 3.0 (Bio-Rad).

La température de dissociation de la boucle en épingle à cheveux va nous permettre de déterminer la lignée du PPRV (Figure 8).

La PCR a été réalisée avec les 64 souches, mais pour la confirmation de certains résultats, certaines souches ont été testées plusieurs fois (voir Tableau 7 dans la section résultats).

### *Premiers essais de la détermination des lignées avec des échantillons du Mali*

Nous avons testé notre technique de différenciation des lignées avec 6 échantillons récoltés au Mali en 2017 dans deux régions : 3 dans à Kayes et 3 à Mopti (Tableau 6).

L'ARN viral des échantillons, écouvillons, ont été extraits en utilisant le kit RNeasy plus RNA extraction Kit (Qiagen, Allemagne) selon les indications du fournisseur.

Ensuite nous avons effectué la PCR en temps réel avec les couples d'amorce snapback forward et reverse des gènes M et N (voir de la PCR dans la partie « La PCR en temps réel asymétrique »).

Ces échantillons du Mali ont ensuite été séquencés afin de confirmer leur lignée (Voir Chapitre VI).

Tableau 6 Liste des échantillons utilisés pour les premiers essais de la différenciation des lignées du PPRV

Nom de l'échantillon	Région de collecte	Année
<b>Kopropen 1</b>	Mopti	2017
<b>Kopropen 8</b>	Mopti	2017
<b>Kopropen 15</b>	Mopti	2017
<b>Kounikoto 7</b>	Kayes	2017
<b>Krounikoto 8</b>	Kayes	2017
<b>Krounikoto 9</b>	Kayes	2017

## 3.3 Résultats

### 3.3.1 Génotypage par analyse de séquences

#### *Analyses phylogénétiques*

Afin de savoir si nous pouvons aussi utiliser le gène M pour le diagnostic de la PPR tel que l'est le gène N partiel, nous avons produit les arbres phylogénétiques correspondants.

Les arbres phylogénétiques ont été construits avec 65 séquences alignées du gène partiel de la Nucléoprotéine (N) et la séquence complète du gène de la Matrice (M).

L'arbre phylogénétique obtenu à partir de la séquence complète de la matrice (M) présente les quatre lignées génétiques de la PPR (Figure 10). Conformément à la répartition phylogénétique des différentes souches, les anciennes souches appartiennent aux lignées I et II et se trouvent en Afrique de l'Ouest comme les souches du Sénégal et Côte d'Ivoire de 1989 (lignée I) et du Bénin de 1989 (lignée II). Les souches plus récentes de la lignée II proviennent de l'Afrique de l'Ouest telles que les souches du Mali de 2004, le Sénégal de 2010, le Burkina Faso de 2014, le Ghana de 2010 et la Guinée de 2013. Les souches de la lignée IV, beaucoup plus répandue, se situent en Asie (p. ex. Chine et Inde), en Afrique de l'Est (p. ex. Ethiopie), en Afrique du Nord (p. ex. Maroc et Algérie) et en Afrique Centrale (p. ex. Cameroun) (Figure 10). Les souches de la lignée III regroupent les anciennes souches du Moyen Orient telles que celles des Emirats Arabes Unis de 1986 et l'Oman de 1983. Dans ce groupe, se trouvent également les souches de l'Afrique de l'Est comme le Kenya (Voir Tableau 2).

L'arbre phylogénétique obtenu à partir du gène partiel N a également permis d'obtenir les quatre lignées différentes de la PPR (Figure 11). Le profil de répartition des 65 échantillons de l'étude est identique à ce que nous avons obtenu avec la séquence du gène M.

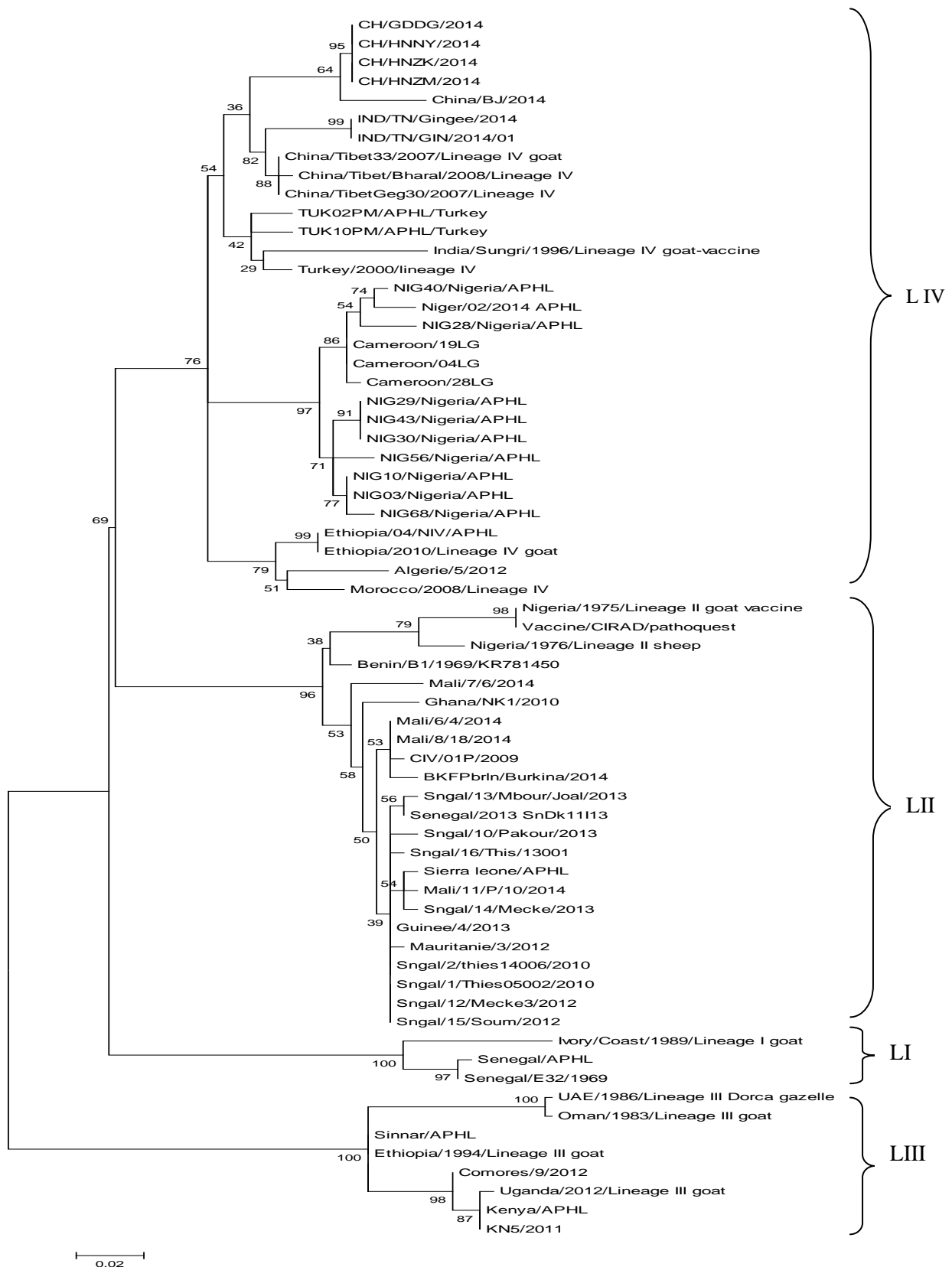


Figure 10 Analyse phylogénétique par la méthode de Maximum de Vraisemblance avec la séquence complète du gène *M*. Lignée I (LI), Lignée II, (LII), Lignée III (LIII), Lignée IV (LIV).

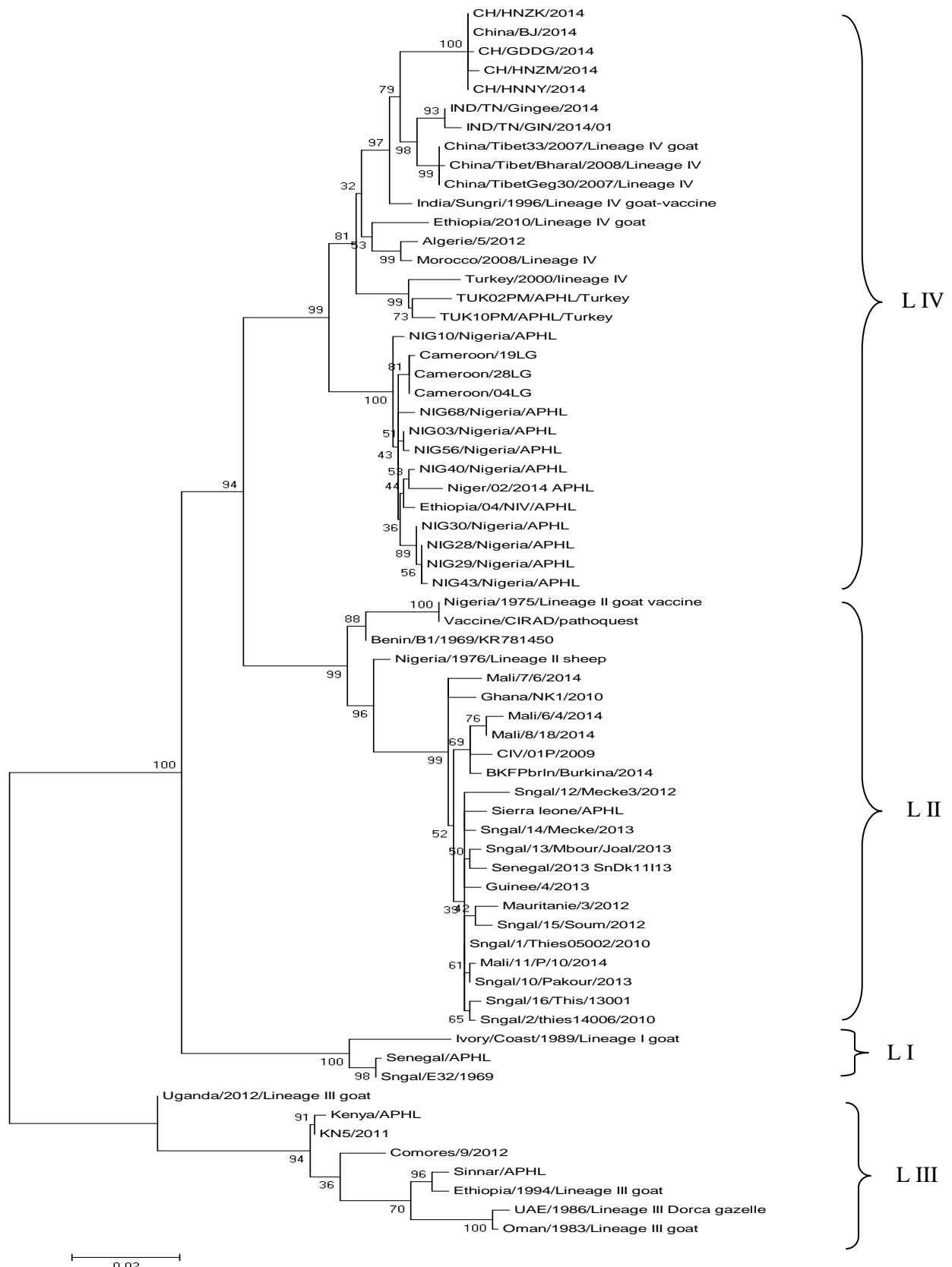


Figure 11 Analyse phylogénétique par la méthode de Maximum de Vraisemblance avec la séquence partielle du gène N. Lignée I (LI), Lignée II, (LII), Lignée III (LIII), Lignée IV (LIV).

### 3.3.2 Génotypage par PCR en temps réel asymétrique

#### *Détermination de la lignée des échantillons par NP3/NP4*

L'arbre phylogénétique obtenu avec la séquence du gène partiel de la nucléoprotéine avec les 64 échantillons nous a permis de déterminer leur lignée. La lignée de tous les échantillons est récapitulée dans le Tableau 7.

#### *L'analyse des courbes de dissociation*

Les courbes de dissociation obtenues avec le gène M montrent une température de dissociation pour la lignée I et IV à 59.5°C - 60°C (Figure 13), pour la lignée II à 64.5°C - 67°C (Figure 14), et la lignée III à 49.5°C - 52.5°C (Figure 15).

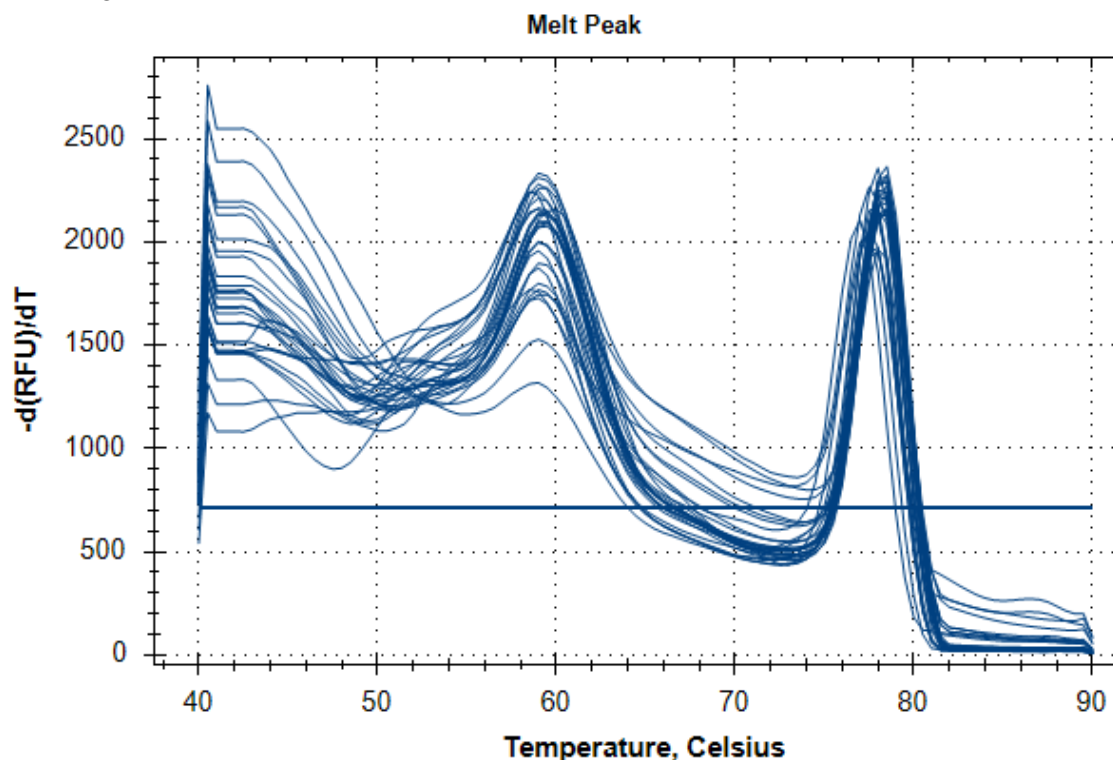
Comme nous pouvons le voir sur la Figure 12 (a), les températures de dissociation de la lignée I et IV sont identiques (59.5°C - 60°C), ce qui ne permet pas de différencier les échantillons appartenant à la lignée I et à la lignée IV.

Pour différencier la lignée I de la lignée IV, nous avons donc analysé les températures de dissociation obtenues avec le gène N en effectuant la PCR avec les amorces snapbacks du gène N (Tableau 5). La température de dissociation de la lignée I est de 67°C - 67.5°C et celle de la lignée IV est de 57.5°C - 61.5°C (Figure 13). Etant donné que la PCR avec les amorces du gène M permettent de bien différencier les lignées II et III, nous n'avons pas déterminé la température de dissociation de ces dernières avec le gène N.

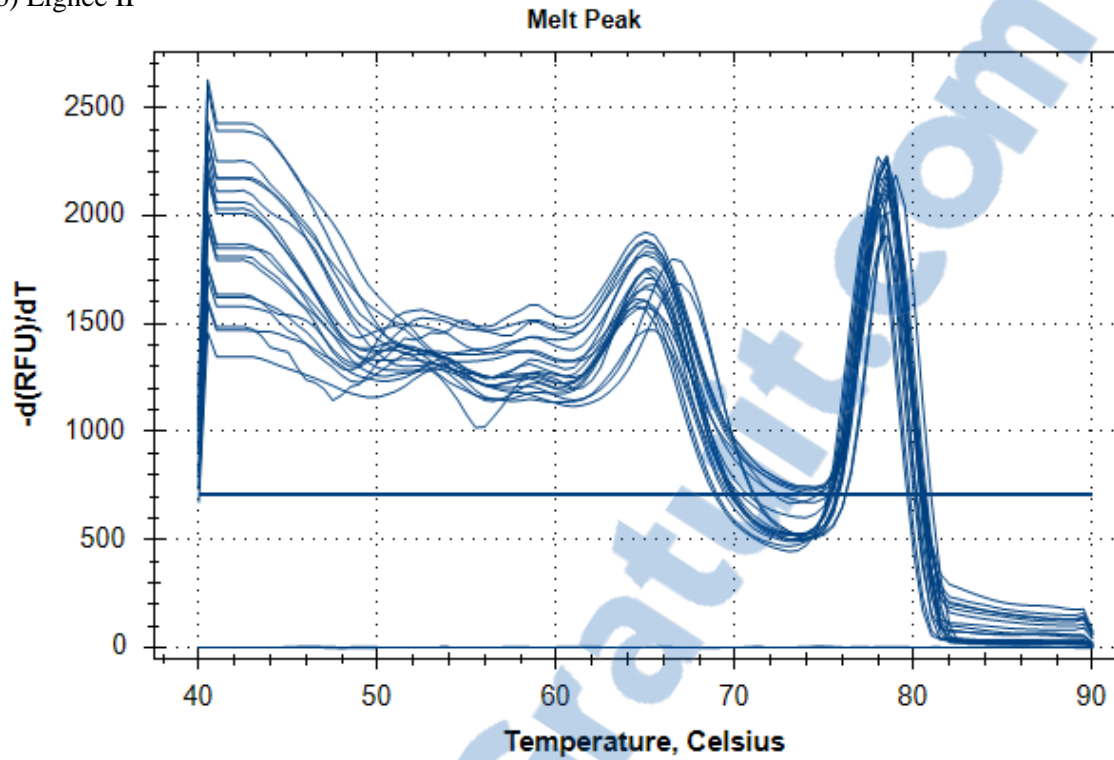
Le Tableau 7 montre le récapitulatif des températures de dissociation des 64 échantillons utilisés au cours de notre étude.

Le Tableau 8 donne le récapitulatif des températures de dissociation en fonction des différents gènes.

(a) Lignée I et IV



(b) Lignée II



(c) Lignée III

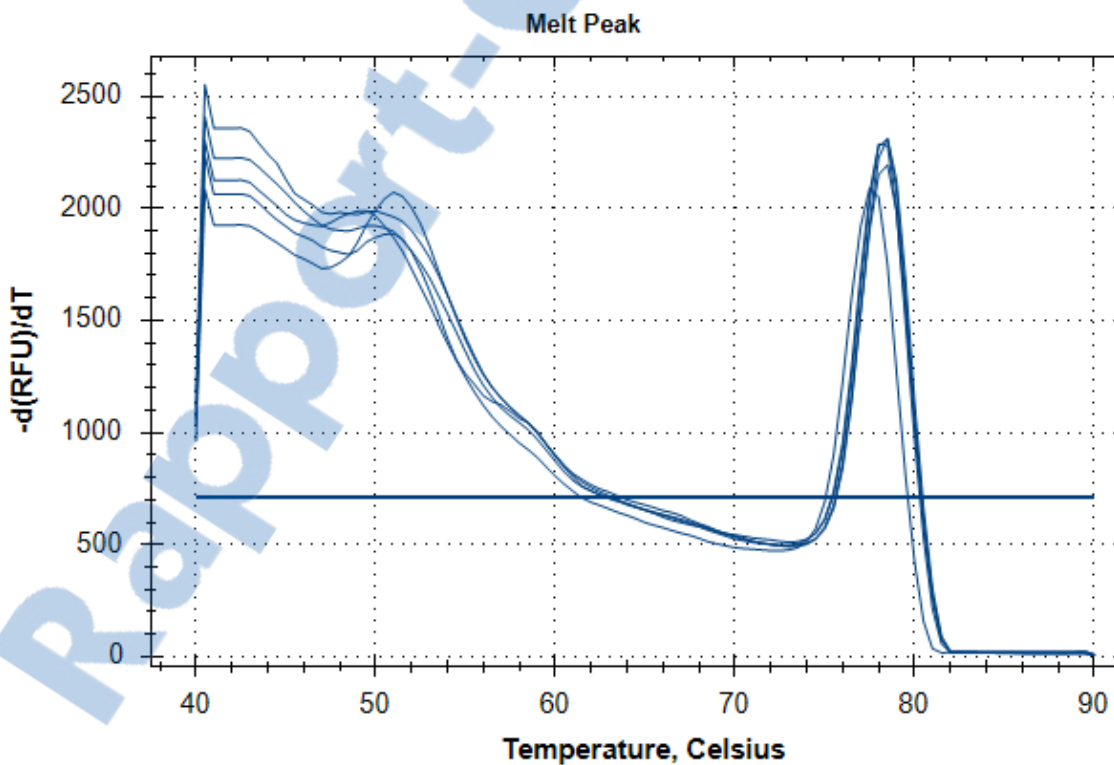
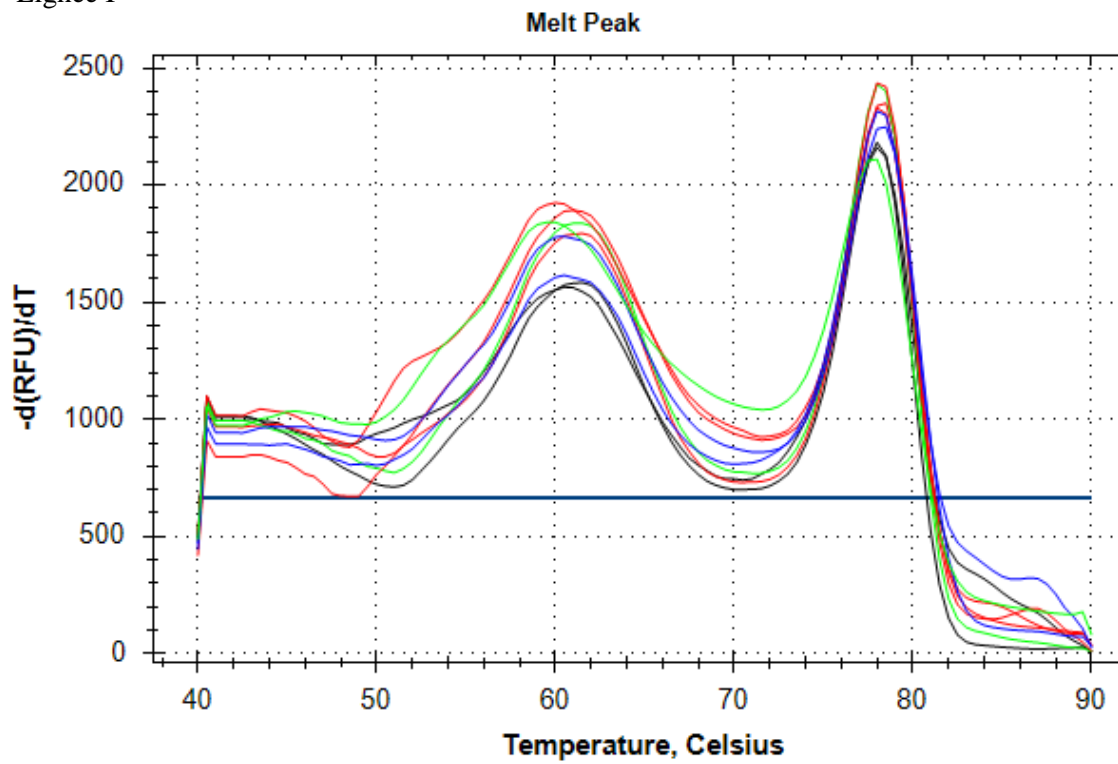


Figure 12 Les température de dissociation du gène M en fonction de la lignée des souches : Les souches de la lignée I et IV (a), les souches de la lignée II (b) et les souches la lignée III (c).

(a) Lignée I



(b) Lignée IV

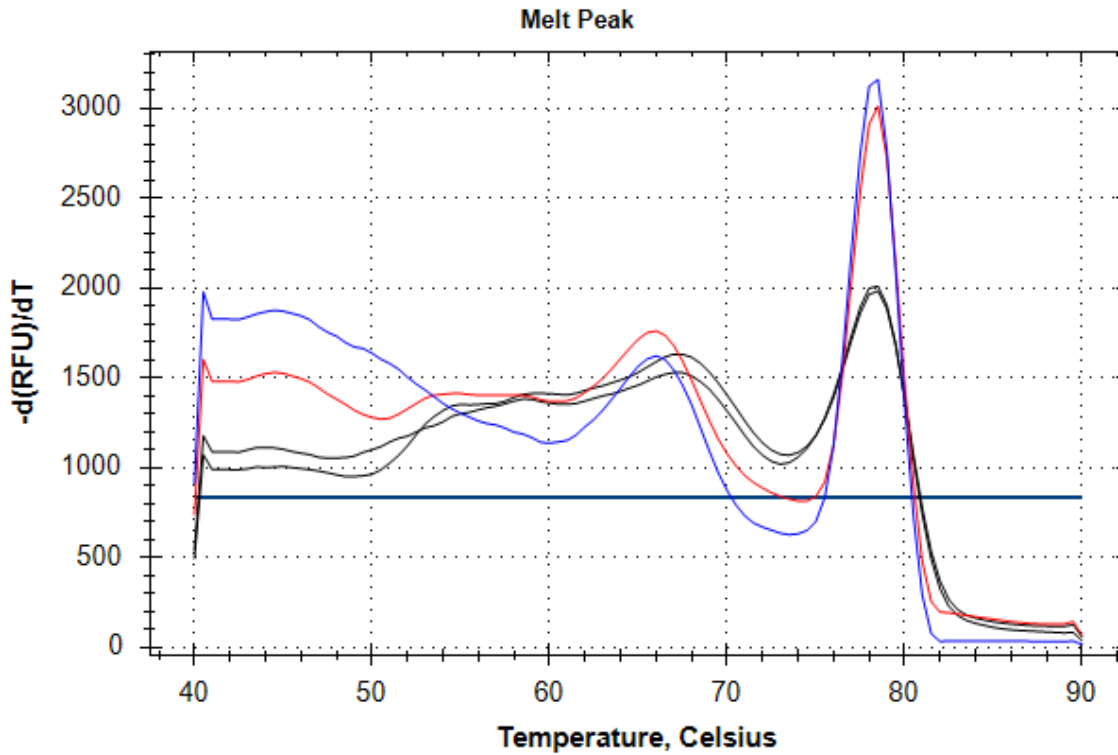


Figure 13 Les température de dissociation du gène N en fonction des lignées : Lignée IV (a) et la Lignée I (b).



Tableau 7 Récapitulatif des températures de dissociation des 64 échantillons ainsi que les lignées qui y sont associées

Nom de l'échantillon	Pays	Lignée déterminée par NP3/NP4	Température de dissociation du gène M	Température de dissociation du gène N	Lignée en fonction de la température de dissociation
<b>E32</b>	SENEGAL	L1	59,50	67,50	L1
<b>NGITH</b>	SENEGAL	L1	60,00	67,00	L1
<b>NGITH</b>	SENEGAL	L1	60,00	67,00	L1
<b>AM LG GHANA</b>	GHANA	L2	65,00		L2
<b>AM LG GHANA</b>	GHANA	L2	65,00		L2
<b>BENIN 10</b>	BENIN	L2	66,50		L2
<b>BENIN 10</b>	BENIN	L2	66,50		L2
<b>BENIN 4</b>	BENIN	L2	67,00		L2
<b>BKF PBR LUNG</b>	BURKINA FASO	L2	65,00		L2
<b>BKF PBR Lymph Node</b>	BURKINA FASO	L2	65,00		L2
<b>BKF PBR SPLEEN</b>	BURKINA FASO	L2	65,00		L2
<b>BKF PBR SPLEEN</b>	BURKINA FASO	L2	66,00		L2
<b>BKF PBR SPLEEN</b>	BURKINA FASO	L2	66,50		L2
<b>CIV CHI</b>	COTE D'IVOIRE	L2	65,50		L2
<b>CIV CHII</b>	COTE D'IVOIRE	L2	65,50		L2
<b>GAMBIA</b>	GAMBIA	L2	65,00		L2
<b>GAMBIA G10</b>	GAMBIA	L2	65,00		L2
<b>GAMBIA G4</b>	GAMBIA	L2	65,00		L2
<b>GAMBIA G5</b>	GAMBIA	L2	65,00		L2
<b>GAMBIA G5</b>	GAMBIA	L2	65,00		L2
<b>GAMBIA G6</b>	GAMBIA	L2	65,00		L2
<b>GAMBIA G6</b>	GAMBIA	L2	65,00		L2
<b>GAMBIA G6</b>	GAMBIA	L2	65,00		L2

<b>GAMBIE G10</b>	GAMBIA	L2	65,00		L2
<b>KAMBIA</b>	SIERRA LEONE	L2	65,00		L2
<b>N32</b>	NIGERIA	L4	65,00	60,50	L4
<b>NK1 GHANA</b>	GHANA	L2	65,00		L2
<b>TM GHANA</b>	GHANA	L2	64,50		L2
<b>TM1LG GHANA</b>	GHANA	L2	64,50		L2
<b>AM Ghana</b>	GHANA	L2	66,00		L2
<b>Gambia (4)</b>	GAMBIA	L2	65,50		L2
<b>Gambia G5</b>	GAMBIA	L2	66,00		L2
<b>DORCAS 396</b>	MIDDLE EAST	L3	51,00		L3
<b>DORCAS 396</b>	MIDDLE EAST	L3	52,50		L3
<b>MIELIK</b>	SUDAN	L3	51,00		L3
<b>MIELIK</b>	SUDAN	L3	51,00		L3
<b>MIELIK</b>	SUDAN	L3	49,50		L3
<b>MIELIK</b>	SUDAN	L3	49,50		L3
<b>MIELIK</b>	SUDAN	L3	51,00		L3
<b>SINNAR</b>	SUDAN	L3	51,00		L3
<b>SINNAR</b>	SUDAN	L3	51,00		L3
<b>SINNAR</b>	SUDAN	L3	51,50		L3
<b>ETH7 NIV</b>	ETHIOPIA	L4	52,50	59,00	L4
<b>16 LG CAM</b>	CAMEROUN	L4	58,50	59,50	L4
<b>19 LG CAM</b>	CAMEROUN	L4	59,00	60,00	L4
<b>19 CAMEROUN</b>	LG CAMEROUN	L4	58,50	59,50	L4
<b>19 PANVAC</b>	LG ETHIOPIA	L4	59,00	60,00	L4
<b>28 CAMEROUN</b>	LG CAMEROUN	L4	59,00	61,00	L4
<b>4</b>	LG CAMEROUN	L4	59,50	61,50	L4

<b>CAMEROUN</b>					
<b>DRC 098/10</b>	DRC	L4	59,00	60,50	L4
<b>DRC C85</b>	DRC	L4	59,00	58,50	L4
<b>DRC KV25</b>	DRC	L4	59,00	60,50	L4
<b>ETH10</b>	ETHIOPIA	L4	59,00	60,50	L4
<b>ETH10</b>	ETHIOPIA	L4	59,50	61,00	L4
<b>ETH10</b>	ETHIOPIA	L4	59,00	60,00	L4
<b>ETH10</b>	ETHIOPIA	L4	59,50	61,00	L4
<b>G43 BKF</b>	BURKINA FASO	L2	66,50		L2
<b>LG PANVAC</b>	ETHIOPIA	L4	59,50	57,50	L4
<b>N28</b>	NIGERIA	L4	59,00	60,50	L4
<b>N40</b>	NIGERIA	L4	59,00	60,00	L4
<b>N40</b>	NIGERIA	L4	59,00	60,00	L4
<b>N68</b>	NIGERIA	L4	59,00	61,00	L4
<b>NIGER OS 10</b>	NIGER	L4	59,50	61,50	L4
<b>NIGER OS 11</b>	NIGER	L4	59,00	60,50	L4
<b>NIGER OS 2</b>	NIGER	L4	59,00	60,00	L4
<b>NIGER OS 4</b>	NIGER	L4	59,00	60,00	L4
<b>NIGER OS 5</b>	NIGER	L4	59,00	59,00	L4
<b>NIGER OS 5</b>	NIGER	L4	59,00	61,50	L4
<b>NIGER OS 7</b>	NIGER	L4	59,00	61,50	L4
<b>NIGER OS 8</b>	NIGER	L4	59,50	60,50	L4
<b>NIGER OS 8</b>	NIGER	L4	59,50	59,00	L4
<b>NIGER OS 8</b>	NIGER	L4	59,00	60,50	L4
<b>NIGER OS 9</b>	NIGER	L4	60,00	61,50	L4
<b>TU K10 PM</b>	TURKEY	L4	59,00	60,50	L4
<b>TU K4 PM</b>	TURKEY	L4	59,00	59,50	L4
<b>TU K7 PM</b>	TURKEY	L4	59,00	60,00	L4
<b>TU K7 PM</b>	TURKEY	L4	59,00	60,00	L4
<b>TU K8 PM</b>	TURKEY	L4	59,00	58,50	L4
<b>TU K8 PM</b>	TURKEY	L4	59,00	59,00	L4

<b>TUC 10 PM</b>	TURKEY	L4	59,00	60,50	L4
<b>1 LG CAMEROUN</b>	CAMEROUN	L4	59,00	58,50	L4
<b>16 LG PANVAC</b>	CAMEROUN	L4	60,50	60,50	L4
<b>K5 BKF</b>	BURKINA FASO	L2	66,00		L2
<b>LG 29 PANVAC</b>	ETHIOPIE	L4	58,50	61,00	L4
<b>N30</b>	NIGERIA	L4	59,50	61,00	L4
<b>NIGER OS 1</b>	NIGER	L4	59,00	58,50	L4
<b>NIGER OS 5</b>	NIGER	L4	60,50	61,50	L4
<b>TU K10 PM</b>	TURKEY	L4	60,50	61,00	L4
<b>TU K2 PM</b>	TURKEY	L4	60,50	61,00	L4
<b>TU K9 PM</b>	TURKEY	L4	58,50	54,50	L4

Tableau 8 Le récapitulatif des températures de dissociation en fonction des différents gènes

Lignée	Gène M	Gène N
<b>I</b>	59.5-60.0	67.0-67.5
<b>II</b>	64.5-67.0	
<b>III</b>	49.5-52.5	
<b>IV</b>	58.5-60.0	57.5-61.5

*Les premiers essais de la détermination des lignées avec des échantillons du Mali*

L'analyse des courbes de dissociation du gène M des échantillons du Mali montre une température de dissociation de 59°C pour les échantillons de Kopropen (Mopti) (Figure 14) et de 66°C pour les échantillons de Krounikoto (Kayes) (Figure 15).

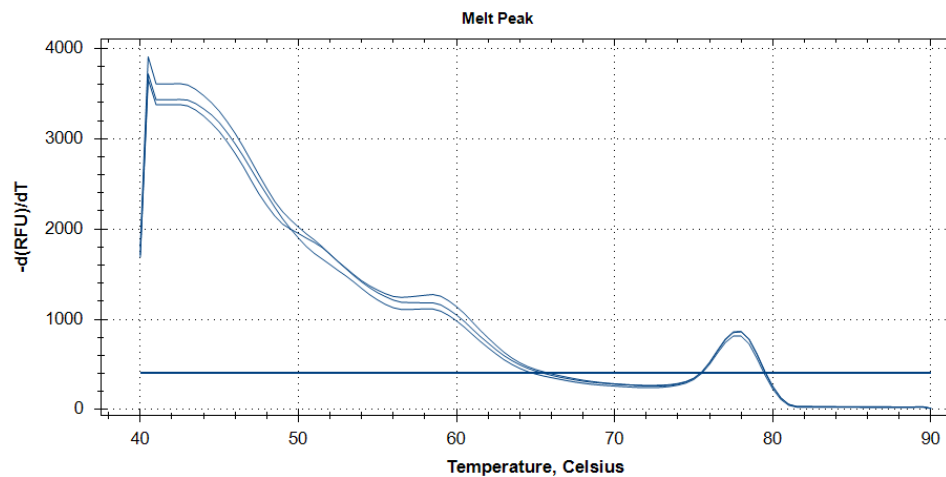


Figure 14 Les températures de dissociation du gène M pour les échantillons de Kropropen (Mopti)

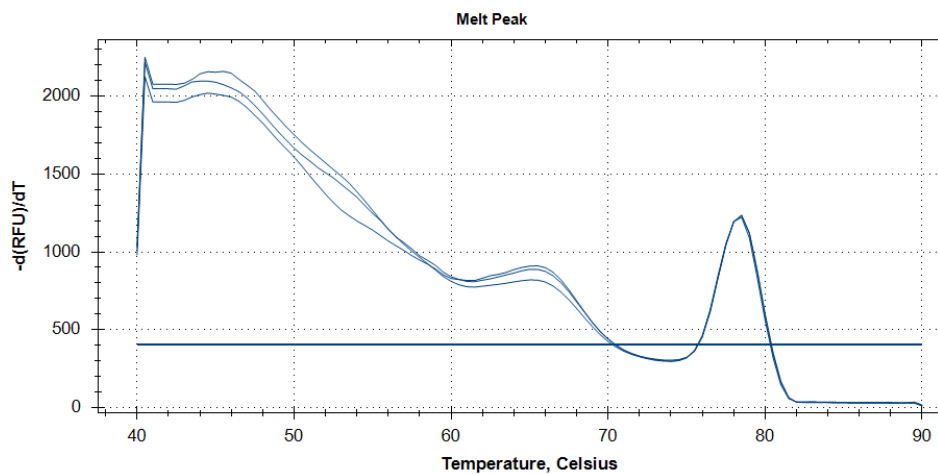


Figure 15 Les températures de dissociation du gène M pour les échantillons de Krounikoto (Kayes)

Les échantillons de Kayes appartiendraient à la lignée II d'après la température de dissociation. Cependant, pour les échantillons de Mopti, nous avons analysé la courbe de dissociation du gène N afin de déterminer si les échantillons seraient de la lignée I ou IV.

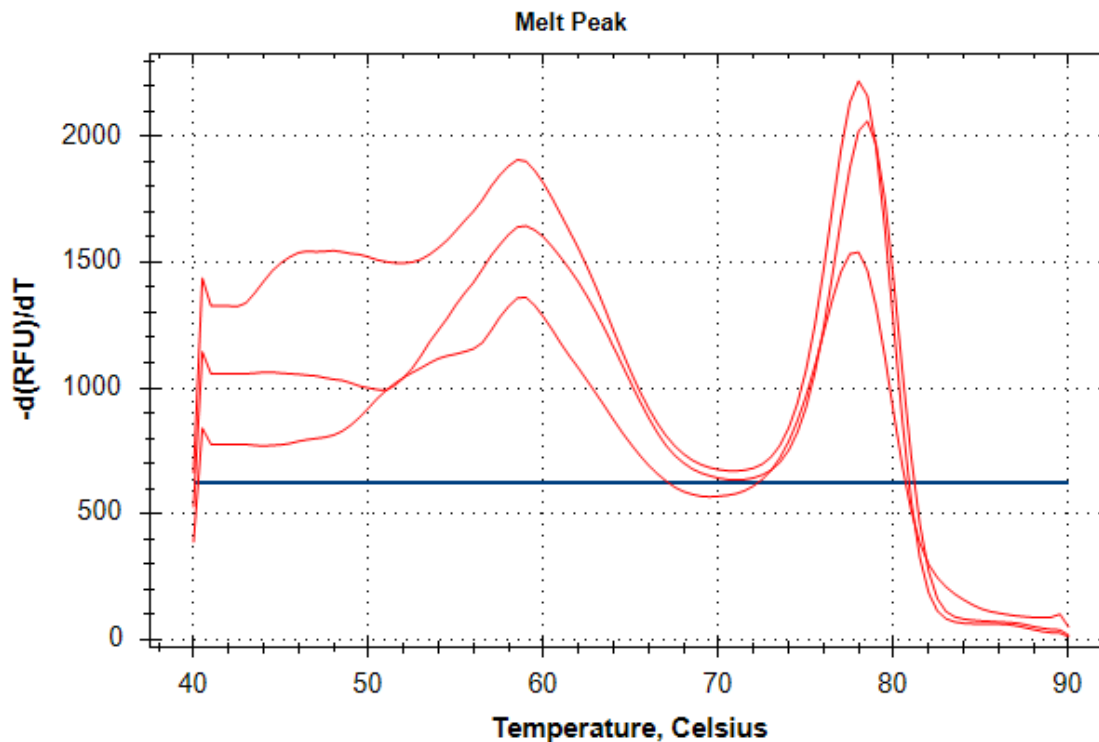


Figure 16 Les température de dissociation du gène N pour les échantillons de Kropropen (Mopti)

La température de dissociation obtenue avec le gène N est de 59°C. Donc les échantillons de Mopti appartiennent à la lignée IV (Figure 16).

Ces résultats ont été confirmés par séquençage dans le Chapitre VI.

### 3.4 Discussion

Dans ce chapitre, nous avons montré l'utilisation du gène M pour la différenciation des lignées et le diagnostic du PPRV en plus des gènes N et H (Couacy-Hymann et al., 2002; Dhar P et al., 2002).

Nous avons analysé l'arbre phylogénétique de 65 souches différentes à partir de la séquence du gène M complet et de la séquence partielle du gène N. Les arbres phylogénétiques obtenus montrent une répartition phylogénétique identique entre les quatre lignées du PPRV des 65 différentes souches. Ce résultat nous permet donc de conclure que l'étude phylogénétique du PPRV peut également être effectuée en utilisant le gène M.

L'alignement des séquences du gène M nous a permis de constater qu'il existe très peu de variations de séquences entre les quatre lignées mais elles sont cependant spécifiques à chacune lignées (Figure 8). Cela nous a donc permis de développer à partir de ces zones de variations spécifiques, une méthode de PCR en temps réel basée sur des amorces snapbacks capables de différencier directement chacune des lignées de PPRV sans passer par le séquençage. L'analyse des courbes de dissociation obtenues à partir de la PCR a permis de définir pour chaque lignée une température de dissociation spécifique (Tableau 8). Cependant nous obtenons la même température pour les lignées I et IV. Enfin de les différencier, nous avons utilisé la même stratégie en utilisant le gène N qui est également un des gènes les mieux conservés parmi les Morbillivirus après le gène M. Le gène N, nous permet de différencier les souches appartenant à la lignée I de la lignée IV (Tableau 8).

Nous avons donc développé à partir de PCR en temps réel une méthode qui permet de déterminer de manière très rapide la lignée d'un échantillon sans faire de séquençage.

Nous avons effectué les premiers tests au LCV au Mali sur des échantillons récoltés au Mali en 2017 à Kayes et à Mopti (Voir chapitre suivant). Ces tests démontrent l'efficacité et l'utilité de cette technique.

Cette méthode de différenciation des souches de la PPR est très utile pour les pays qui ont beaucoup de difficultés à faire le séquençage. Elle va permettre de déterminer rapidement la ou les lignées qui circulent dans le pays et de mettre en place de manière rapide et efficace des moyens de contrôle adaptés. Cela est particulièrement intéressant dans les pays affectés par plusieurs lignées de PPRV (p. ex. Niger et Mali, voir les autres chapitres de la thèse), dont la lignée IV asiatique en train de se propager en Afrique de l'Ouest et dans d'autres régions.



## 4 Etude de la diversité génétique du PPRV au Niger

### 4.1 Introduction

Les études menées en Afrique de l'Ouest sur le PPRV ont montré que les souches qui circulent dans ces pays appartiennent à la lignée II (Habib Salami et al., 2014; Libeau et al., 2014). Cependant, des études récentes ont fait état pour la première fois de l'entrée de la lignée IV du PPRV en Afrique de l'Ouest, au Nigéria (Mantip et al., 2016; Woma et al., 2016).

Le Niger, situé au Nord du Nigéria est un pays dans lequel des activités épizootiques de PPR ont été régulièrement rapportées. Les preuves sérologiques et les observations cliniques montrent que la PPR est une contrainte majeure pour la production de petits ruminants dans la zone pastorale du Niger (Bloch and Diallo, 1991). Récemment, un cas de PPR a été confirmé par l'analyse du gène N par PCR dans des fermes dans la région de Maradi (Farougou et al., 2013). Mais les auteurs n'ont pas effectué d'isolement ni de séquençage pour déterminer la lignée du PPRV. Le CIRAD conservait également dans sa collection des tissus prélevés d'animaux malades sur un foyer de PPR au Niger en 2001. Détectés positifs en PCR, les séquences des virus n'avaient pas été étudiées, pas même sur le court fragment diagnostique NP3-NP4 couramment effectué au laboratoire et aucune tentative d'isolement n'avait été effectuée. De ce fait, jusqu'à présent, aucune souche de PPRV provenant du Niger n'avait été isolée et il n'existait aucune donnée phylogénétique du PPRV pour ce pays.

L'occasion nous a été donnée lors de la thèse de comparer des génomes viraux provenant de prélèvements effectués au Niger à des dates relativement éloignées. En 2001, les prélèvements ont été effectués dans la région de Dosso (au Sud-Ouest) dans deux villages (Falmey et Kena) et en 2013 dans la région de Maradi au Sud à la frontière avec le Nigéria. L'objectif de notre étude est de statuer sur les différentes lignées du PPRV qui circulent au Niger, afin d'améliorer nos connaissances sur l'épidémiologie de la maladie. Notamment, il est important de vérifier si la lignée IV, présente au Nigéria, s'est répandue jusqu'au Niger.

Cette étude constitue une première caractérisation des lignées de PPRV présentes au Niger, permettant de les inclure dans une étude phylogéographique de ce virus dans la grande région de l'Ouest africain (voir chapitre III).

Les résultats montrent que trois lignées différentes de PPRV circulent ou ont circulé récemment au Niger. En 2001, nous avons détecté la présence des lignées I et II dans la région de Dosso. En 2013, la lignée IV était présente dans la région de Maradi.

Une partie de ces travaux a été réalisée à l'IAEA (International Atomic Energy Agency). Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Transboundary and Emerging Diseases*.

### 4.2 First genetic characterization of Peste des Petits Ruminants (PPR) from Niger: On the advancing front of the Asian virus lineage

First genetic characterization of Peste des Petits Ruminants (PPR) from Niger: On the advancing front of the Asian virus lineage

Kadidia Tounkara<sup>1</sup>, Arnaud Bataille<sup>1</sup>, Caroline M. Adombi<sup>2,3</sup>, Issoufou Maikano<sup>4</sup>, Gamatié Djibo<sup>4</sup>, Tirumala Bharani K Settypalli<sup>2</sup>, Angelika Loitsch<sup>6</sup>, Adama Diallo<sup>7,8</sup>, Geneviève Libeau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France.

ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier, France.

<sup>4</sup>LABOCEL, Ministère de l'Agriculture et de l'Elevage, BP 12091, Niamey, Niger

<sup>2</sup>Animal Production and Health Laboratory, FAO/IAEA Agriculture and & Biotechnology Laboratory, IAEA Laboratories Seibersdorf, International Atomic Energy Agency (IAEA), Wagramer Strasse 5, P.O. Box 100, A1400, Vienna, Austria

<sup>3</sup>Institute of Agropastoral Management, University Peleforo GON COULIBALY, Korhogo, Côte d'Ivoire

<sup>6</sup>Institute for veterinary Disease Control, Austrian Agency for Health and Food Safety, Moedling, Austria

<sup>7</sup>Former address: CIRAD, UMR ASTRE, A-2444 Seibersdorf, Austria.

<sup>8</sup>CIRAD, UMR ASTRE, Dakar Hann, Sénégal.

ASTRE, Univ Montpellier, CIRAD, INRA, Montpellier, France.

Corresponding author: Kadidia Tounkara, e-mail: [tounkara.katia@hotmail.com](mailto:tounkara.katia@hotmail.com).

## Summary

Peste des Petits Ruminants (PPR) is a serious transboundary infectious disease of small ruminants. The causal agent, PPR virus (PPRV), can be separated into four genetically distinct lineages using phylogenetic analysis. In recent decades, lineage IV of PPRV has dramatically extended its geographic distribution from Asia to the Middle East and to Africa, where it has progressively replaced other PPRV lineages. Lineages I and II are historically distributed in West Africa. Currently, lineage II appears to dominate the region, whereas the last recorded occurrence of lineage I dates back to 1994. Recent studies reported the presence of lineage IV in Nigeria, suggesting that this lineage is expanding in West Africa. In Niger, a close neighbour of Nigeria, PPRV has never been genetically characterised, despite reports of PPR incidence. In this study, pathological samples collected from sick goats were collected in 2013 during a suspected PPR outbreak in southern Niger close to the Nigerian border were compared to samples collected in a previous investigation in October 2001 in south-western Niger. These strains were characterised by sequencing and phylogenetic analysis to identify their genetic lineage. Our results show that in 2001, lineages I and II were co-circulating in south-western Niger, whereas the strain that caused the outbreak in 2013 belonged to lineage IV and is closely related to strains identified in Nigeria. These results confirm the progression of lineage IV in West Africa. The process of PPRV lineage replacement and its implications for the epidemiology and the control of the disease in this region are unclear and should be the subject of further studies in the field.

**Keywords:** Co-circulation, virus spread, Niger, Peste des petits ruminants, phylogeny, transboundary.

## Introduction

Peste des Petits Ruminants (PPR) is a highly contagious disease of small ruminants, primarily sheep and goats. PPR is endemic in large parts of Africa, the Middle East and Asia (Libeau et al., 2014). The disease is characterised by high fever, diarrhoea with severe dehydration, anorexia, respiratory distress, mucopurulent oculo-nasal discharge, necrotic oral lesions and bronchopneumonia, sometimes abortion in pregnant animals and in many cases can lead to death. PPR has been classified among diseases that must be notified to the World Organization for Animal Health (OIE) and is now the target of a global eradication campaign (OIE/FAO, 2015). The causal agent of the disease is the Peste des Petits Ruminants virus (PPRV), a virus belonging to the genus *Morbillivirus* in the family *Paramyxoviridae*. The genome of PPRV encodes two non-structural proteins C and V, and six structural proteins: a nucleoprotein (N), a phosphoprotein (P), a matrix protein (M), a fusion protein (F), a hemagglutinin protein (H) and a viral RNA-dependant polymerase (L) (Bailey et al., 2005). The PPRV strains have been classified in four different lineages (I, II, III, and IV) based on the partial

sequences of the N and the F genes. All four lineages have been identified in Africa: lineages I and II in West Africa, lineage III in East Africa, and lineage IV in East, North, Central and West Africa (Baazizi et al., 2017; Banyard et al., 2010; Kwiatak et al., 2011; Muniraju et al., 2014c).

Of these lineages, two, lineages II and IV, appear to have an outstanding capacity for expansion. For example, in East Africa, PPRV strains which have been historically present in some countries including Ethiopia, Sudan, Uganda, Tanzania, belong to lineage III. Currently, in this part of Africa, this lineage is slowly being replaced by PPR viruses belonging to lineage IV, a lineage of Asian origin (Muniraju et al., 2014c). In West Africa, lineage I was last officially detected in 1994 in Senegal. From this date until early 2010, no information is available on PPRV characterisation at molecular level. Since then, all surveys undertaken in different West African countries report the detection of PPRV strains belonging to lineage II (Baazizi et al., 2017; Banyard et al., 2010; Farougou et al., 2013; Libeau et al., 2014; Mantip et al., 2016). Moreover, recent studies reported the introduction of the PPRV lineage IV in Nigeria for the first time, suggesting that this lineage is expanding its range further into what was previously lineage II-dominated West Africa (Mantip et al., 2016; Woma et al., 2016). Niger, situated north of Nigeria, is a country in which regular epizootic activities of PPR are known to occur like those in neighbouring countries. Serological evidence and clinical observations show that PPR is a major constraint for small-ruminant production in the pastoral zone of Niger (Bloch and Diallo, 1991; Stem, 1993). A suspected case of PPR was also recently confirmed by PCR analysis of the N gene in farms surveyed in the region of Maradi (Farougou et al. 2013). However, those authors did not sequence the PPRV they identified. So until now, not only is there no PPRV isolated, but also no phylogenetic data on PPRV from Niger available. Such data, in comparison with those from other countries within the region would give more information on the distribution of PPRV lineages and their evolution in Africa.

The aim of the present study was thus to confirm the presence of PPRV in Niger and to identify the lineages of the viruses circulating in Niger to improve our understanding of the epidemiology of the disease.

## **Materials and methods**

### *Sampling and RNA extraction*

A total of 14 samples collected between November and December 2013 in the region of Maradi in southern Niger (Fig. 1), were received at the Austrian Agency for Health and Food Safety in Vienna (Austria): 12 ocular swabs and two tissue samples (lung and lymph nodes); (Table 1). The samples were processed in a biosafety level 3 containment laboratory.

In addition, eight samples (four lymph nodes, three lungs and one spleen) collected in October 2001 in two different villages in the southwestern region of Dosso, Kena (n = 5) and Falmey (n = 3) were also analysed (Fig. 1). To improve our understanding of the phylogenetic relationship of PPRV in Niger and in other West African countries, two positive samples from Burkina Faso (2008 and 2014) and one from Ghana (2014) were included in the study. These samples were processed in a biosafety level 3 containment laboratory belonging to CIRAD *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* (Montpellier, France).

Tissues samples were ground in a mortar using sterile sand at a proportion of 10% W/V in serum-free DMEM medium containing 1% mixed antibiotic-antimycotic solution (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). The suspension was then clarified at 1200RCF for 5 min and the supernatant collected.

Ocular swabs contents were squeezed into DMEM medium, the supernatant was collected and filtered through a 45 µm filter. Total RNA was extracted from the supernatant of samples collected from Maradi in 2013 using Qiagen RNeasy Plus RNA extraction Kit (Qiagen, Germany), and from samples collected from Dosso in 2001 using the Macherey-Nagel NucleoSpin RNA virus extraction Kit, according to the manufacturer's instructions.

A reverse transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was performed with 2 µl of the extracted RNA using the Qiagen one-step RT-PCR (Qiagen, Germany) to amplify a 351 base pair (bp)

segment of the PPRV N gene with the NP3/NP4 primer pair (Forward NP3: 5'-GTC-TCG-GAA-ATC-GCC-TCA-CAG-ACT-3' and Reverse NP4: 5'-CCT-CCT-CCT-GGT-CCT-CCA-GAA-TCT-3') diagnostic primers (Couacy-Hymann et al., 2002). PCR was set up under the following programme: 50°C for 30 min; 95°C for 15 min and 40 amplification cycles (10 sec at 95°C, 30 sec at 60°C and 30 sec at 72°C) and a final extension step at 72°C for 5 min. PCR products were resolved on 1.5% agarose gel to reveal the expected band size. The F1/F2 (Forward F1: 5'-ATC-ACA-GTG-TTA-AAG-CCT-GTA-GAG-G-3' and Reverse F2: 5'-GAG-ACT-GAG-TTT-GTG-ACC-TAC-AAG-C-3') primers were also used to amplify a 370 bp of the F gene segment using the same one-step RT-PCR kit with samples identified as positive using N gene segment PCR amplification. PCR was performed with 2 µl of the extracted RNA. The PCR programme for the F gene was: 50°C for 30 min; 95°C for 15 min and 40 amplification cycles (10 sec at 95°C, 30 sec at 55°C and 30 sec at 72°C) and a final extension step at 72°C for 5 min. PCR products were resolved on 1.5% agarose gel to reveal the expected band size.

#### *Sequencing and phylogenetic analysis*

Some of the positive PCR products resulting from the N and F gene amplifications from each outbreak were sequenced (Table 1). Sequencing was carried out in both forward and reverse directions by LGC Genomics (Germany) for samples from Maradi 2013 and by Cogenics (France) for samples from Dosso 2001, Burkina Faso (2008 and 2014) and Ghana (2014). Sequences of Niger were submitted to GenBank under Accession Numbers MG694464- MG694472.

Forward and reverse DNA sequences were assembled using Geneious v. 8.1.6. Corrected sequences were aligned with 44 PPRV N gene sequences, or 29 PPRV F gene sequences publicly available in GenBank using MEGA6. A phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method with node supports evaluated by bootstrap analyses (1000 replicates) implemented in MEGA6.

#### *Isolation of the virus*

Isolation of PPRV was only attempted with 10 samples from Maradi 2013, two samples from Kena and two samples from Falmey using the CHS-20 cells (Adombi et al., 2011) (Table 1). Cells were examined under the microscope daily to detect cellular pathogenic effects (CPE). The reduction of the concentration of the antibiotics to 1% started on day 5. Cells in flasks in which no CPE was detected after one week of incubation were trypsinised for a blind passage in a T75 flask containing 25 ml of fresh medium with only 5% of FBS. After 12 days of infection, the cells in flasks in which CPE was detected were stored in the freezer at -80°C. The virus isolation was considered negative if no CPE was observed after two weeks. Two controls, one negative and one positive (PPRV isolate from Ivory Coast) were included.

### **Results and discussion**

Twenty-two samples were tested by RT-PCR based on the use of NP3/NP4 primers that target the N gene. A total of 12 out of 14 samples collected in Maradi in 2013 were found to be positive, including two lung and lymph node samples and 10 ocular swabs (Table 1). The N gene segment was also successfully amplified in four samples collected in the region of Dosso in 2001 including one lung and one spleen sample from the village of Kena, and two lymph node samples from the village of Falmey (Table 1). Amplification of the F gene using F1/F2 primers was successful for all N gene positive samples tested.

PPRV was successfully isolated from one ocular swab sample from Maradi 2013 (Table 1). CPE was observed with the infected positive control cells. No modification was observed in the other infected cells or in the uninfected negative control. Attempts to isolate PPRV from the samples from Dosso failed (Table 1).

Phylogenetic analysis of partial N gene sequences showed that the PPRV strains collected in 2001 from Kena and Falmey in the region of Dosso belonged to lineages I and II, respectively (Fig. 2). PPRV samples collected in 2013 from Maradi clustered in lineage IV (Fig. 2). Similar results were obtained with the phylogenetic analysis of partial F gene sequences (Fig. 3).

The PPRV strains of lineage IV obtained in this study are genetically closely related to strains collected in the same year in north-eastern Nigeria (Woma et al 2016). In this cluster, the Nigerian isolates have a more basal position, suggesting that lineage IV entered Niger from north Nigeria at the latest in 2013. This can be explained by the absence of natural geographic barriers between the two countries and the movement of animals migrating south in the dry season, although Nigeria, a country with a fast-growing population, is by far the largest importer of livestock from Niger. More work with more complete genomic data would be necessary to verify this hypothesis.

Another important result is the first detection of lineage I in West Africa since 1994, year of the last official PPRV lineage I identification that was in Senegal. Up to now, it was believed to be being replaced by lineage II across the region (Kwiatek et al. 2007, 2011; Salami et al. 2014), but our results suggest that it was still circulating in Niger, a land-locked country, at least 15 years ago. Strains of lineage II were also detected in 2001 in south-western Niger, suggesting that both lineages I and II were circulating concomitantly in the region at that time. PPRV samples collected in the more recent period from neighbouring countries (Benin, Burkina Faso, Senegal, Ghana, Niger, Nigeria; Fig. 2) belong to lineage II, supporting the hypothesis of the current dominance of this lineage in the region. Sampling in most West African countries is still limited, so it is impossible to determine whether lineage I is still circulating in the region or if it has been totally replaced in the last 10 years. Our results prove that further sampling is warranted in the region to resolve this question.

The PPRV sequences with which the strains from Niger were compared in the present study derived from strains isolated over a period of roughly 50 years. They consisted of ‘‘historical’’ strains from the late 1960s (Senegal) and 1970s (Nigeria and Ghana) as well as strains collected from the 1980s to 2016 in West, Central, and North Africa, in addition to representative strains from Asia and the Middle East. The results of the phylogenetic analysis suggest that the strains identified in Niger from lineages I and II in 2001 are distributed according to a classical geographical breakdown. Indeed, an obvious feature of PPRV observed in early phylogenetic studies was genetic stability within regions and strong geographic grouping, as described by Kwiatek et al. (2007), a feature suggesting that lineages I and II were evolving in isolation in West and West Central Africa, respectively. These areas contain all animal movements in the region and constitute an epidemiologic basin for the two lineages of PPR. The same geographical breakdown does not apply to the phylogeny of PPRV lineage IV in Africa.

Equally interesting is the discovery of lineage IV in Niger in the samples collected in 2013, a lineage that was already detected in Cameroon in 1997 (see Fig 2). Its presence in Gabon (Maganga et al. 2013) and now its widespread distribution in Nigeria (Woma et al., 2016) and Niger indicate that this Asian lineage is spreading slowly in Africa in both a southwards and westwards direction. Taken together, all these results suggest the spread and progression of PPRV lineage IV from East and Central Africa into West Africa, where lineage II is currently predominant. It is not yet clear if the arrival of lineage IV in West Africa will lead to changes in the epidemiology of the disease in the region. The rapid spread of strains belonging to lineage IV may be due to higher virulence in a wide diversity of environments or hosts, or some other unknown factors that give them a selective advantage. If this is the case, PPRV outbreaks due to lineage IV strains may have a higher impact on ruminant populations than other lineages that are currently endemic in West Africa.

Further studies should be undertaken to closely monitor the spread of lineage IV and to map the current distribution of the lineages I and II in the region in more detail. A better understanding of the factors which determine the spread of lineage IV in Africa is needed in order to control the disease and limit its economic impact.

### **Acknowledgements**

The research was supported by internal funds from CIRAD and by a grant from the European Commission Animal Health and Welfare European Research Area Network for the IUEPPR Project ‘‘Improved Understanding of Epidemiology of PPR,’’ in the framework of ANIHWA 2013 and the IAEA African Renaissance Fund (ARF) project funded by the Republic of South Africa. K. Tounkara

was the successive recipient of IAEA and then CIRAD supported intern fellowships. We sincerely thank the staff of UMR ASTRE (France).



## References

- Adombi C, M, Lelenta M, Lamien CE, Shamaki D, Koffi YM, Traore A, Silber R, E. Couacy-Hymann, Bodjo SC, Djaman JA, Luckins AG, Diallo A. (2011). Monkey CV1 cell line expressing the sheep-goat SLAM protein: a highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens. *J Virol Methods*, 173, 306-313. [doi: 10.1016/j.jviromet.2011.02.024](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.02.024).
- Baazizi R, Mahapatra M, Clarke BD, Ait-Oudhia K, Khelef D, Parida S. (2017). Peste des petits ruminants (PPR): A neglected tropical disease in Maghreb region of North Africa and its threat to Europe. *PLoS One*, 12, e0175461. [doi: 10.1371/journal.pone.0175461](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175461).
- Bailey D, Banyard A, Dash P, Ozkul A, Barrett T. (2005). Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus. *Virus Res*, 110, 119-124. [doi: 10.1016/j.virusres.2005.01.013](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.01.013).
- Banyard AC, Parida S, Batten C, Oura C, Kwiatak O, Libeau G. (2010). Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *Journal of General Virology*, 91, 2885-2897. [doi: 10.1099/vir.0.025841-0](https://doi.org/10.1099/vir.0.025841-0).
- Bloch N., Diallo I. (1991). Serological survey of small ruminants in 4 districts of Niger. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 44(4):397-404.
- Cosseddu GM, Pinoni C, Polci A, Sebhatu T, Lelli R, Monaco F (2013). Characterization of peste des petits ruminants virus, Eritrea, 2002-2011. *Emerg Infect Dis*, 19, 160-161. [doi: 10.3201/eid1901.121072](https://doi.org/10.3201/eid1901.121072).
- Couacy-Hymann E, Roger F, Hurard C, Guillou JP, 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.
- Farougou S, Gagara M, Mensah GA. (2013). Prevalence of peste des petits ruminants in the arid zone in the Republic of Niger. *Onderstepoort J Vet Res*, 80, 544. [doi: 10.4102/ojvr.v80i1.544](https://doi.org/10.4102/ojvr.v80i1.544).
- Kwiatak O, Minet C, Grillet C, Hurard C, Carlson E, Karimov B, Albina E, Diallo A. (2007). Peste des Petits Ruminants (PPR) Outbreak in Tajikistan. *J.Comp.Path*, 136, 111-119. [doi: 10.1016/j.jcpa.2006.12.002](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.12.002).
- Kwiatak O, Ali YH, Saeed IK, Khalafalla AI, Mohamed OI, Obeida AA, Abdelrahman MB, Osman HM, Taha KM, 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. *Emerg Infect Dis*, 17, 1223-1231. [doi: 10.3201/eid1707.101216](https://doi.org/10.3201/eid1707.101216).
- Libeau G, Diallo A, Parida S. (2014). Evolutionary genetics underlying the spread of peste des petits ruminants virus. *Animal Frontiers*, 4(1), 14-20. [doi: 10.2527/af.2014-0003](https://doi.org/10.2527/af.2014-0003).
- Maganga GD1, Verrier D, Zerbinati RM, Drost C, Drexler JF, Leroy EM. Molecular typing of PPRV strains detected during an outbreak in sheep and goats in south-eastern Gabon in 2011. *Virology*. 2013 Mar 11;10:82. doi: 10.1186/1743-422X-10-82.
- Mantip S, Quan M, Shamaki D, Van Vuuren M. (2016). Comparison of nucleotide sequences of recent and previous lineages of peste-des-petits-ruminants viruses of sheep and goats in Nigeria. *Onderstepoort J Vet Res*, 83, e1-e10. [doi: 10.4102/ojvr.v83i1.1163](https://doi.org/10.4102/ojvr.v83i1.1163).
- Muniraju M, Munir M, Banyard AC, Ayebazibwe C, Wensman J, Zohari S, Berg M, Parthiban AR, Mahapatra M, Libeau G, Batten C, Parida S. (2014). Complete Genome Sequences of Lineage III Peste des Petits Ruminants Viruses from the Middle East and East Africa. *Genome Announc*, 2, e01023-01014. [doi: 10.1128/genomeA.01023-14](https://doi.org/10.1128/genomeA.01023-14).
- OIE/FAO, (2015, March 31-April 2). FAO and OIE International Conference for the Control and Eradication of Peste des Petits Ruminants. <http://www.oie.int/fr/PPR2015/background.html>.
- Salami H, Croville G, Kwiatak O, Mariette J, Klopp C, Valière S, Guérin JL, Lo M, Thiongane Y, Albina E, Libeau G. (2014). Complete genome sequence of a field strain of Peste des Petits Ruminants Virus isolated during 2010\_2014 Epidemics in Senegal. *Genome Announc*, 2, e00772-14. [doi: 10.1128/genomeA.00772-14](https://doi.org/10.1128/genomeA.00772-14).
- Stem C. An economic analysis of the prevention of peste des petits ruminants in Nigerien goats. *Preventive Veterinary medicine*, 1993, 16: 141-150



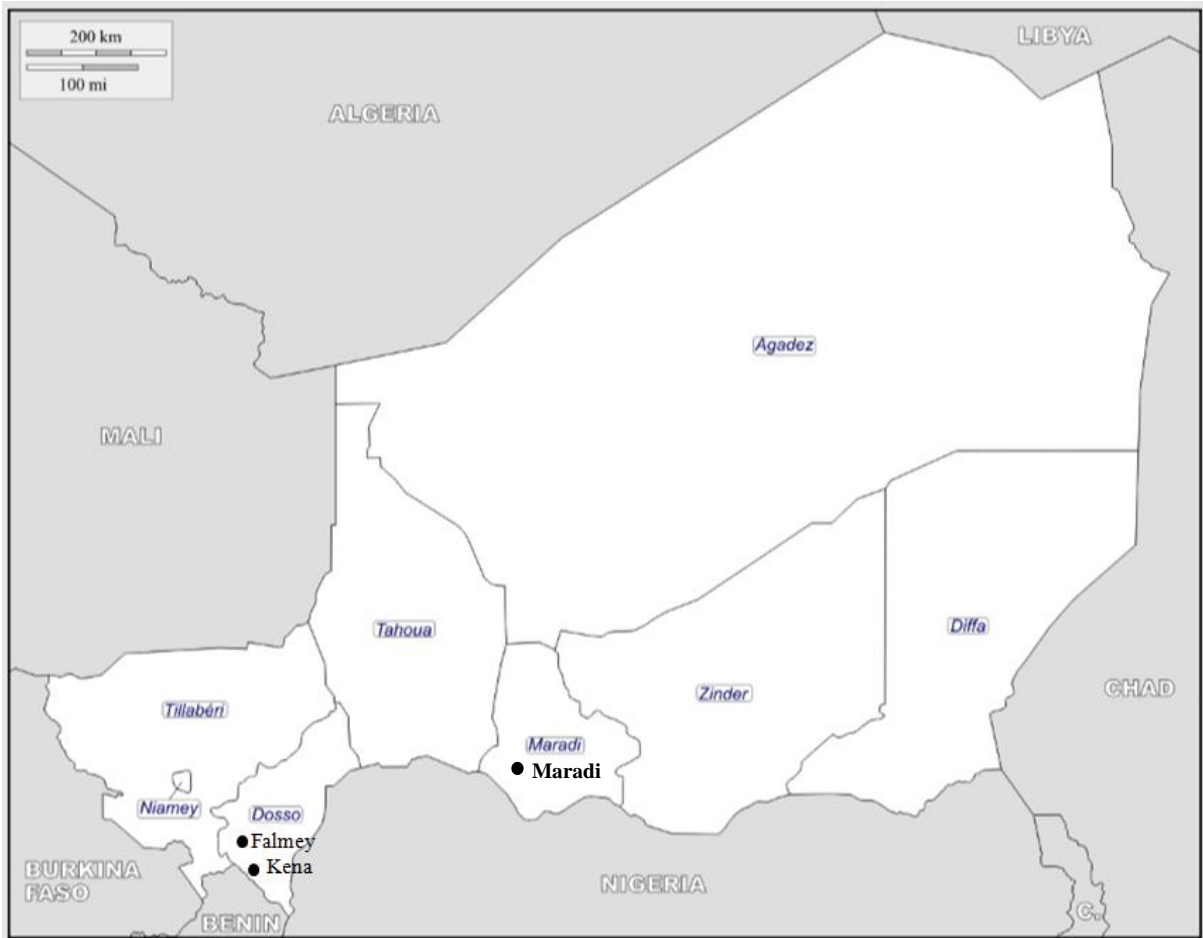
Woma TY, Adombi CM, Yu D, Qasim AM, Sabi AA, Maurice NA, Olaiya OD, Loitsch A, Bailey D, Shamaki D, Dundon WG, Quan M. (2016). Co-circulation of Peste-des-Petits-Ruminants Virus Asian lineage IV with Lineage II in Nigeria. *Transbound Emerg Dis*, 63, 235-242. [doi: 10.1111/tbed.12387](https://doi.org/10.1111/tbed.12387).

## Tables

Table 1. List of samples used in this study, the analysis performed on the samples and the results of the analysis.

Type	N	RT-PCR positive	Isolation trial	Isolation success	N gene sequence	F gene sequence
<b>Maradi (2013)</b>						
Ocular swab	12	10	10	1	1	1
Lung	1	1			1	
Lymph node	1	1				
<b>Dosso (2001)</b>						
<b>Kena</b>						
Lung	3	1	1	0	1	
Lymph node	1	0				
Spleen	1	1	1	0	1	
<b>Famley</b>						
Lymph node	3	2	2	0	2	2

N is the number of samples collected from different regions of Niger. RT-PCR positive shows the number of samples which tested PPRV positive by RT-PCR. Isolation trial and isolation success show respectively the number of samples used for the isolation and the number of samples isolated. N and F gene sequence show the number of sequences obtained for N and F genes, respectively.



**Figures**

Fig. 1. Map of Niger showing the location of villages where samples were collected in 2001 and 2013. Villages are indicated in black within the different regions of Niger (in italic and blue).

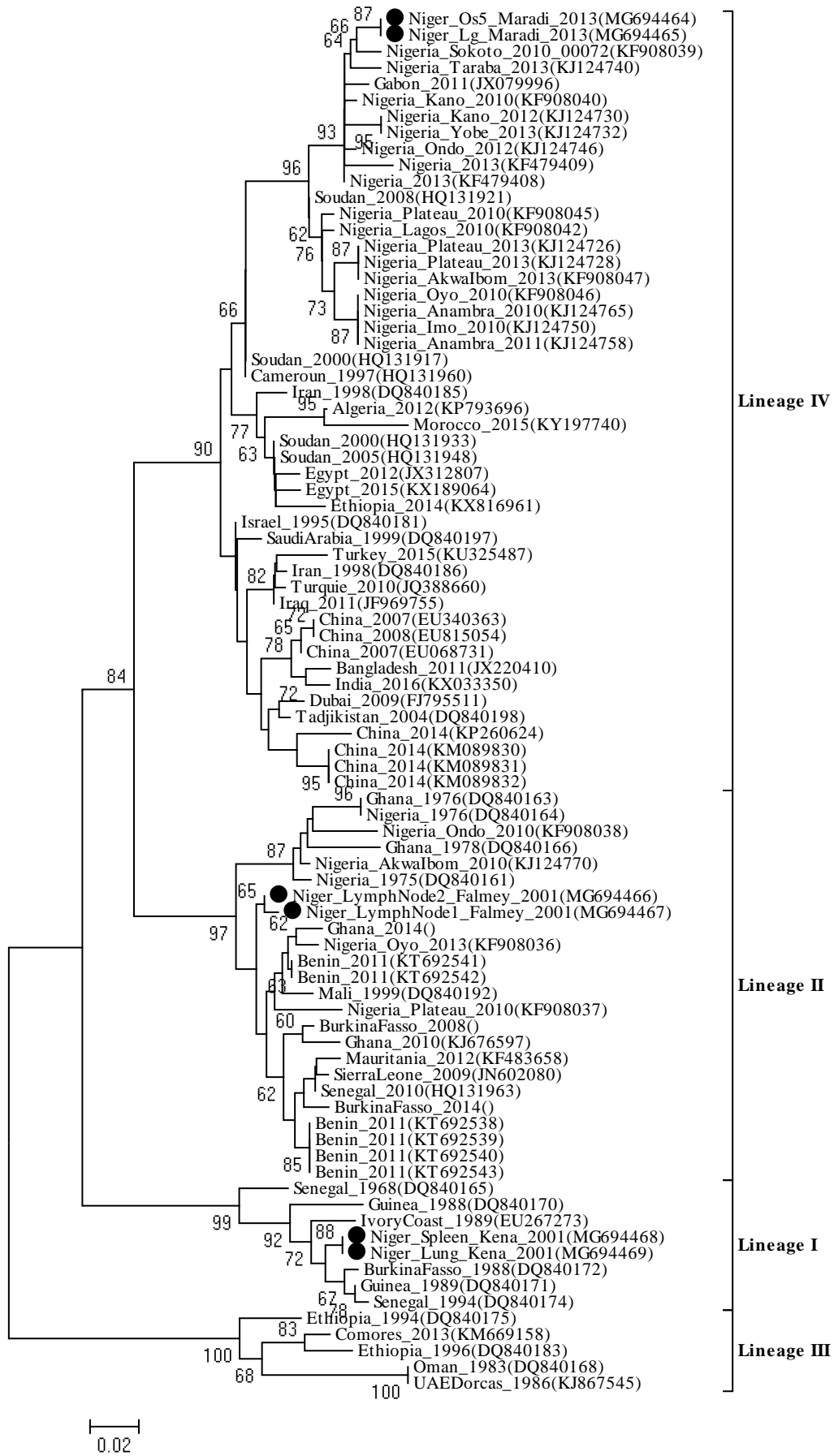


Fig 2. PPR N gene phylogenetic analysis. Neighbour-joining tree showing the relationship between the

N gene sequences in the present study (indicated by black dots, country and sample name, the year the samples were collected) with sequences obtained from GenBank (indicated by the country and sample name, the year and the GenBank Accession Number). The numbers at the nodes are bootstrap values obtained from 1000 replicates. Only bootstrap values > 60 are shown.

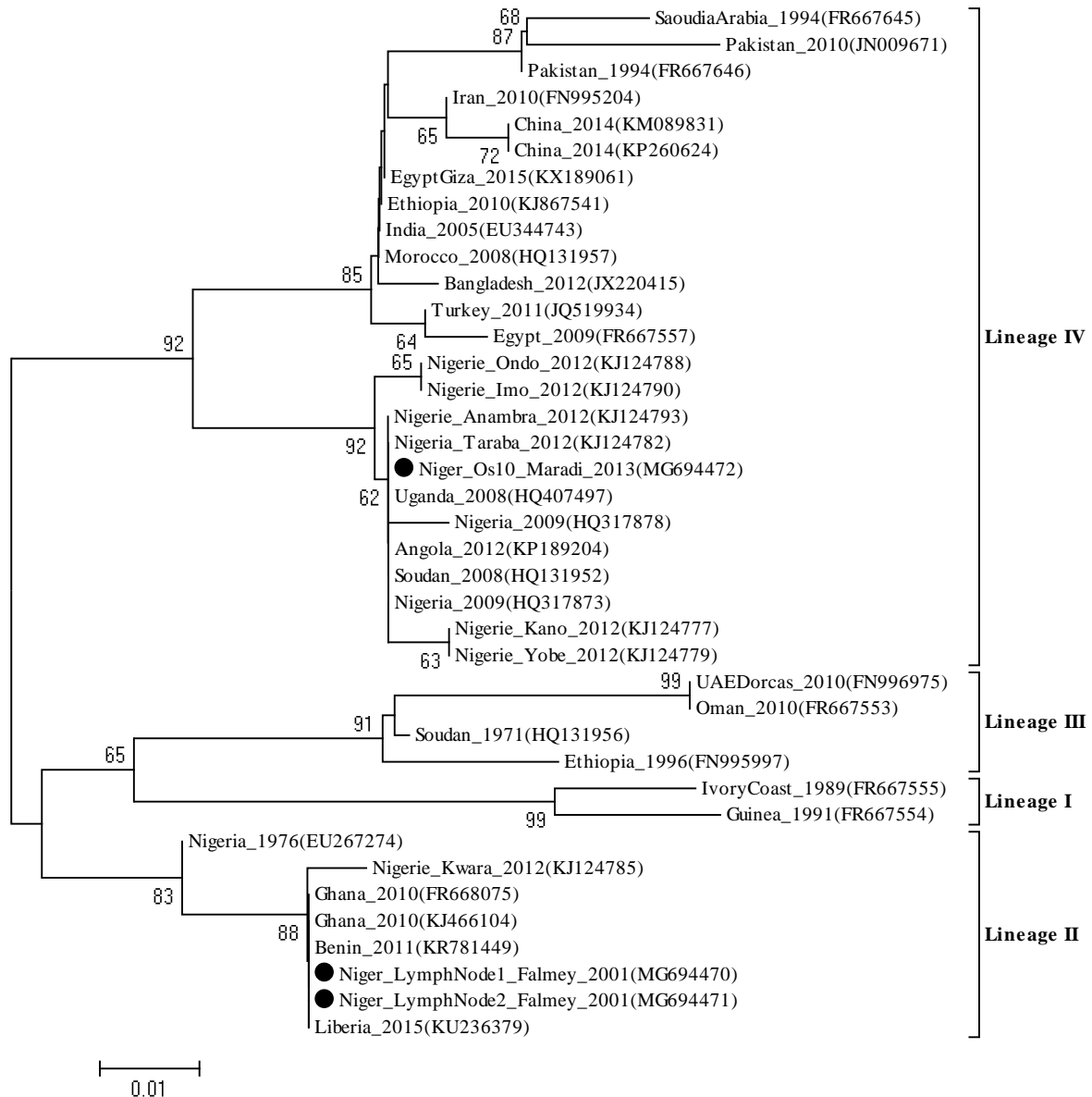


Fig. 3. PPR F gene phylogenetic analysis. Neighbour-joining tree showing the relationship between the F gene sequences in the present study (indicated by black dots, country and sample name, the year the sample was collected) with sequences obtained from GenBank (indicated by the country and sample name, the year and the Accession Number). The numbers at the nodes are bootstrap values obtained from 1000 replicates. Only bootstrap values > 60 are shown.

### 4.3 Discussion

L'étude menée au Niger sur des échantillons récoltés dans des foyers d'épidémie de la PPR en 2001 et 2013 a permis d'identifier, grâce à une étude phylogénétique des gènes N et F du PPRV, les différentes lignées qui circulent dans ce pays.

Pour la première fois depuis 1994, la lignée I est retrouvée en Afrique de l'Ouest, année de l'identification de cette lignée au Sénégal. Longtemps considérée comme disparue car remplacée par la lignée II, la lignée I a donc continué de circuler dans cette région en même temps que la lignée II au moins jusqu'en 2001.

Nous avons également découvert la présence de la lignée IV au sud du Niger. Cette lignée, présente en Afrique Centrale, au Cameroun (en 1997) et au Gabon (Maganga et al., 2013), a récemment été découverte dans un autre pays de l'Afrique de l'Ouest, au Nigeria (Woma et al., 2016). Ces résultats suggèrent que cette lignée IV d'origine asiatique se propage lentement de l'Afrique de l'Est et du Centre vers l'Afrique de l'Ouest où la lignée II est actuellement prédominante.

Il faut noter que ces souches de la lignée IV obtenues lors de cette étude ont été utilisées pour le développement de la RT-PCR décrite dans le chapitre 3.

Comme nous l'avons décrit dans la partie synthèse bibliographique, il existe en Afrique de l'Ouest, notamment entre le Mali et le Niger un fort mouvement d'animaux ce qui fait de cette région un bassin épidémiologique pour les lignées du PPRV qui s'y trouvent.

Ainsi dans cette logique, dans le chapitre suivant, des études phylogénétiques plus poussées ont été entreprises au Mali sur l'ensemble du territoire (sauf le Nord) et dans d'autres pays d'Afrique de l'Ouest afin de mieux comprendre la diversité et la répartition de la PPR en Afrique de l'Ouest. Les analyses au Mali vont également permettre de voir si la lignée IV continue sa progression dans la région Ouest africain.

# 5 Répartition et diversité génétique du PPRV au Mali et d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest

## 5.1 Introduction

L'objectif de ce chapitre est d'étudier la diversité et la distribution des souches du PPRV présentes au Mali. Notre étude inclut également d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest notamment le Sénégal, le Burkina Faso et le Niger qui sont des pays frontaliers du Mali. L'étude phylogénétique et phylogéographique des différentes souches de la PPR détectées nous permet d'effectuer un état des lieux précis de la répartition des différentes lignées génétiques de PPRV au Mali et de la dynamique de circulation transfrontalière de ces lignées dans la région d'Afrique de l'ouest.

Jusqu'ici très peu de souches PPRV ont été récoltées au Mali pour décrire leur appartenance à une des quatre lignées, maintenant toutes présentes en Afrique (Kwiatek et al. 2010). Des souches échantillonnées au Mali en 1999 étudiées par analyse phylogénétique du gène partiel N ont été identifiées comme appartenant à la lignée II (Kwiatek et al., 2007). Ceci a été confirmé plus récemment par Salami et al., (2014) sur des échantillons récoltés en 2014 provenant de différentes localisations au Mali. Sur 5 souches analysées, l'une d'elles appartient à la lignée I, lignée qui historiquement prévalait plus largement en Afrique l'ouest. La présence de deux lignées plaide en faveur d'une diversité de souches PPRV au Mali.

Pour pallier le manque de données moléculaires et faire le bilan des lignées présentes au Mali, cette étude se base sur un échantillonnage important provenant de différentes régions et réparti sur plusieurs années. Elle a également bénéficié de collectes d'échantillons provenant du Sénégal, du Burkina Faso et du Niger. Les échantillons ont été séquencés en utilisant le gène partiel N de PPRV.

Le choix d'utiliser une courte séquence nucléotidique de 255pb du gène N pour connaître la répartition en lignées est basé sur les observations précédentes (Kwiatek et al., 2007). La zone variable du gène N permet en effet, comparativement au gène F (Shaila et al., 1996) de regrouper efficacement les souches en lignées. Les séquences obtenues à partir des échantillons ont été alignées à d'autres séquences de PPRV accessibles dans le domaine public afin d'étudier leurs relations phylogénétiques.



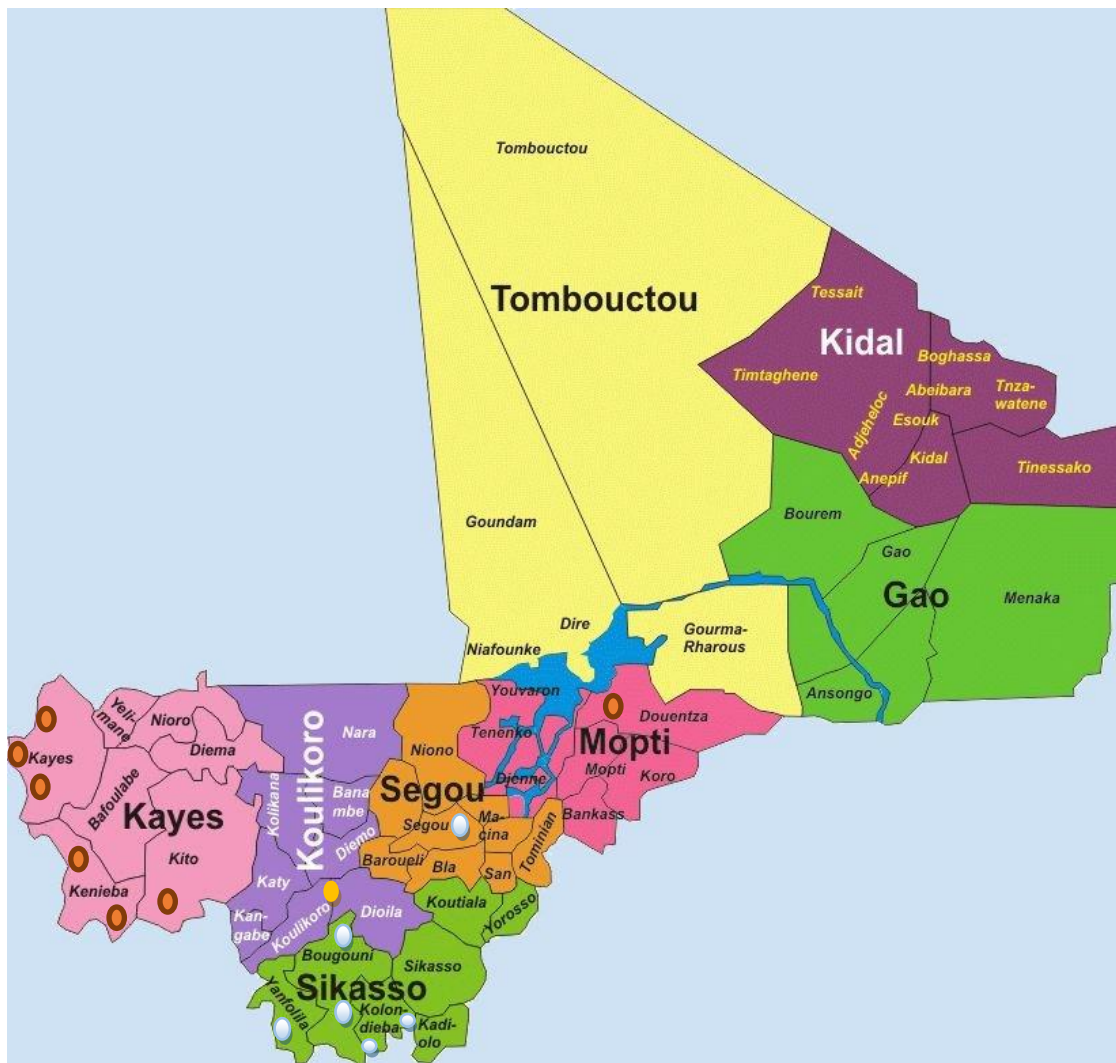


Figure 17 Géo-localisation des différents échantillons de notre étude.

Légende :

- Echantillons prélevés pendant la thèse
- Echantillons du LCV
- Echantillons du Cirad

## 5.2 Matériels et méthodes

### 5.2.1 La collecte du matériel biologique

#### La zone d'étude

Au cours des trois années d'études, nous avons échantillonné trois régions dans la partie Ouest du Mali : la région de Sikasso (prélèvements effectués en 2015), la région de Kayes (en 2016 et 2017) et la région de Mopti (en 2017) (Figure 17). En plus de ces trois régions, nous avons des échantillons de Bamako, prélevés en 1999, qui étaient déjà conservés au CIRAD. Nous avons également ajouté d'autres échantillons qui étaient présents au LCV et qui n'avaient pas encore été analysés. Ces échantillons proviennent de la région de Ségou (de 2014) et de la région de Sikasso (de 2014) (Figure 17).

Aucun prélèvement n'a été effectué dans le Nord du Mali à cause des conditions d'insécurité dans cette partie du pays. Il faut noter que la région de Mopti est la région la plus proche du Nord du Mali.

Les enquêtes étaient déclenchées à l'occasion des déclarations de suspicions basées sur les signes cliniques du PPRV en collaboration avec les services vétérinaires du Mali. Nous recherchions des foyers actifs de PPR afin de pouvoir isoler le virus et/ou séquencer son génome. Au cours de la thèse, un total de 14 sites a été enquêté sur le territoire du Mali (Figure 17).

#### *Les signes cliniques*

Dans les troupeaux suspects, la sélection des animaux échantillonnés s'est faite si ces symptômes étaient observés : l'hyperthermie, larmoiements, les jetages, les érosions buccales et la diarrhée (Figure 18)



Figure 18 Photos d'animaux malades dans un foyer de suspicions dans la région de Sikasso en 2015(Photo Kadidia Tounkara).

#### *Le matériel biologique*

Le matériel biologique a été recueilli grâce à des missions sur le terrain avec le LCV. Au total 313 échantillons ont été prélevés (voir Tableau 9 dans la section Résultat 5.3.). En plus de ces échantillons, nous avons ajouté 199 échantillons qui étaient déjà conservés au LCV. Des échantillons cliniques ont également été prélevés au Sénégal en partenariat avec l'Institut Sénégalais de Recherche Agricole (ISRA). Les prélèvements ont été effectués dans deux villes du Sénégal à la frontière avec le Mali (Région de Kayes) : Tambacounda et Kédougou. Des échantillons cliniques récents du PPRV, provenant d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest et centrale, reçus par le CIRAD ont été ajoutés à notre études : le Burkina, le Niger, le Congo, la RCA, la Mauritanie et le Ghana (voir Tableau 13 dans la section Résultats 5.3.).

Les échantillons cliniques étaient composés d'écouvillons buccaux, naseaux et oculaires. Les échantillons post-mortem étaient composés de poumons, de rate et de ganglions lymphatiques. Les échantillons ont été conservés dans de la glace pendant l'enquête, puis à  $-80^{\circ}\text{C}$  au LCV sauf quand il y avait des problèmes de coupure d'électricité. Dans ce cas, un groupe électrogène prenait parfois le relais. Les échantillons ont ensuite été transportés sous carboglace vers le CIRAD puis conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur analyse.

### 5.2.2 Les analyses de laboratoires

#### *Le test multiplex*

Le test multiplex développé par l'AIEA (Organisation Internationale de l'Energie Atomique) en collaboration avec le CIRAD est un nouveau test rapide qui vient d'être introduit dans plusieurs laboratoires vétérinaires en Afrique dont le Mali par l'AIEA (Settypalli et al., 2016). Ce test est décrit par ces auteurs comme étant capable de détecter simultanément par PCR en temps réel quatre maladies respiratoires des petits ruminants : la PPR, la PPCC, la Pasteurellose et le Capripox (Figure 19). Il a été évalué comme test de criblage rapide. La mise en place de ce test au laboratoire du LCV avec des

échantillons de terrain doit également permettre d'évaluer les résultats préliminaires obtenus dans l'étude afin de l'établir comme un outil de diagnostic de surveillance systématique.

L'acides (ARN et ADN) nucléiques de tous les échantillons collectés du Mali (512 échantillons, Tableau 9) ont été extraits en utilisant le kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valencia, CA, USA) selon les indications du fournisseur.

Les extraits d'acides nucléiques ont ensuite été amplifiés par RT-PCR en temps réel en utilisant les couples d'amorces spécifiques des quatre pathogènes cibles et en suivant le protocole fourni par l'AIEA (Settypalli et al., 2016a).

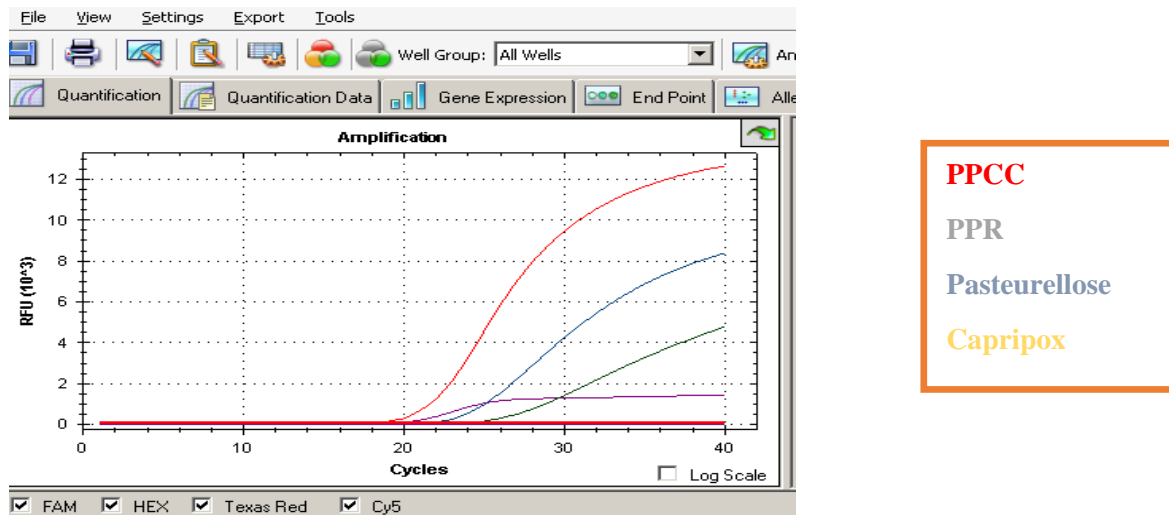


Figure 19 Un exemple de test multiplex qui montre la détection des quatre maladies respiratoires des petits ruminants : PPR, PPCC, Pasteurellose, Capripox.

### L'isolement viral

Les cellules utilisées pour l'isolement du PPRV sont des cellules CV1 modifiées (BTS-34 exprimant le récepteur SLAM du bovin) (don de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique, AIEA, par le Dr A. Diallo). Les cellules ont été cultivées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> en milieu MEM (Invitrogen) complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 2mM de L-Glutamine (Invitrogen) et 1% de gentamicine (Invitrogen). Au total, 20 échantillons (écouvillons et poumons) ont été utilisés pour l'isolement (Tableau 10).

Les échantillons de poumon (0,5g) prélevés après autopsie sur des chèvres infectées ont été mis en suspension dans 2ml de milieu MEM et 1% de gentamycine (Invitrogen) et broyés. Ils ont été ensuite clarifiés par centrifugation (5000g pendant 3min à +4°C). Les échantillons d'écouvillons ont été mis en suspension dans 2 ml de milieu de MEM et 1% de gentamycine (Invitrogen).

Des cellules de BTS-34 à 80% de confluence, réparties en boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup> (T25), ont été mises en contact pendant 1 heure à 37° C et 5% de CO<sub>2</sub> avec 2ml de la solution d'échantillon. Après incubation, l'inoculum a été retiré et les cellules ont été recouvertes avec du milieu complet et remises à l'étuve à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> jusqu'à l'apparition d'un effet cytopathogène (ECP). A environ 80% d'ECP, le virus a été récolté. Le flacon de culture a été soumis à trois cycles de congélation (-70°C) et décongélation (37°C). Cellules et surnageant ont été récoltés et centrifugés 10 minutes à 1 500 tours par minute à 4°C. Le virus a été réparti en aliquots et stocké à -70°C.

*L'extraction de l'ARN, la RT-PCR et le séquençage partiel du gène de la nucléoprotéine*

L'ARN viral a été extrait des isolats et des échantillons à l'aide du kit "Viral DNA/RNA isolation" (Macherey Nagel) selon les indications du fournisseur. Ensuite, une RT-PCR a été réalisée en suivant le protocole décrit dans le chapitre 3.2.1

Le séquençage de chacun des deux brins d'ADN des produits d'amplification a ensuite été réalisé par la méthode de Sanger par la société Beckman Coulter Genomics. L'analyse des séquences générées a été réalisée au moyen du logiciel Geneious version 8.1.9 (Biomatters <http://www.geneious.com/>).

#### *L'analyse phylogénétique à partir du gène de la nucléoprotéine et détermination des lignées phylogénétiques*

Toutes les séquences obtenues lors du séquençage du gène N partiel ont été utilisées pour l'analyse phylogénétique en suivant le protocole décrit dans le chapitre 3.2.1. (voir Tableau 13 dans la section résultats). Cependant, certaines de nos séquences provenant du même village étaient identiques. Dans ce cas, une seule séquence représentative du groupe de séquence a été utilisée pour faire l'arbre phylogénétique par souci de lisibilité. Au total, nous avons donc sélectionné 25 séquences représentatives de chaque groupe (Tableau 13). Ces séquences ont ensuite été alignées avec d'autres séquences de PPRV représentatives des lignées génétiques de la PPR récupérées sur GenBank (Tableau 13).

#### *Analyse phylogénétique détaillée des souches du Mali*

Pour une analyse plus en profondeur des relations phylogénétiques des séquences obtenues au sein de chaque lignée (lignée I, II et IV), nous avons effectué différentes analyses avec différents jeux de séquences. Tout d'abord, nous avons réalisé une analyse phylogénétique spécifique de la lignée IV en utilisant 40 séquences appartenant à la lignée IV dont 9 provenant du Mali. Pour l'analyse de la lignée II, nous avons effectué deux analyses différentes : une première qui a porté sur les 23 séquences de la lignée II à la frontière du Mali et du Sénégal (Kayes, Tambacounda et Kédougou) afin de mieux comprendre les risques de transmission transfrontalière de la PPR entre ces deux pays et une deuxième analyse sur 56 séquences de la lignée II qui circulent au Mali et les autres pays de l'Afrique de l'Ouest. L'analyse spécifique de la lignée I a porté sur 11 séquences de la lignée I du Mali et des anciennes souches. Le Tableau 13 liste les séquences utilisées pour chaque type d'analyses phylogénétiques.

## **5.3 Résultats**

### **5.3.1 Description de foyers**

Les enquêtes ont été réalisées pendant le mois de Novembre à Février de 2015, de Février à Avril 2016 et de Janvier à Mars 2017. Ces périodes correspondent à notre présence au Mali au LCV (Octobre à Avril 2015-2017). En 2015, nous avons identifié un foyer de PPR dans la région de Sikasso dans le village Dialan au Sud du Mali. Les foyers de PPR de 2016 se localisent dans la région de Kayes à l'Ouest du Mali. Les prélèvements ont été effectués dans 4 villages (Kéniéba, Sitakili, Kayes et Diboli). En partenariat avec l'Institut Sénégalais de Recherche Agricole (ISRA) des échantillons cliniques ont également été prélevés au Sénégal dans 2 villes du Sénégal à la frontière du Mali (avec la région de Kayes), Tambacounda et Kédougou. En 2017, les foyers de PPR se localisaient dans 2 villages de la région de Kayes (Krounikoto et Séroumé) et dans 1 village de la région de Mopti (Kropopen) (Figure 17).

### 5.3.2 Le profil du test multiplex

Le test multiplex a été réalisé sur l'ensemble des échantillons prélevés au Mali entre 2014 et 2017 et ceux qui étaient déjà présents au LCV. Le Tableau 9 présente le résultat d'un test multiplex et la Figure 20 montre un exemple du profil du résultat du test multiplex.

Tableau 9 Résultat du test multiplex des échantillons du Mali.

Echantillons (Nombre d'échantillons)	PPRV	Mccp	Pasteurellose	Capripox	PPRV/Past.
<b>Dialan (16)</b>	7	0	6	0	1
<b>Kéniéba (110)</b>	9	0	6	0	0
<b>Sitakili (55)</b>	10	0	8	0	0
<b>Kayes (57)</b>	0	0	15	0	0
<b>Diboli (50)</b>	5	0	5	0	0
<b>Krounikoto (10)</b>	8	0	1	0	0
<b>Séroumé (6)</b>	0	0	1	0	0
<b>Kopropen (9)</b>	9	0	2	0	0
<b>LCV (199)</b>	31	0	27	0	0
<b>Total (512)</b>	79	0	71	0	1

Sur l'ensemble des 512 échantillons testés au total, nous avons obtenu 48 échantillons positifs récoltés sur le terrain pour le PPRV provenant de la région de Kayes (Dialan, Kéniéba, Sitakili, Diboli) et Mopti (Krounikoto). Aucun échantillon positif n'a été obtenu à Kayes et à Séroumé. Nous avons également obtenu 31 échantillons positifs pour le PPRV parmi les 199 échantillons du LCV. Nous avons obtenu 71 échantillons positifs pour la pasteurellose. Aucun positif n'a été obtenu pour la Mccp et Capripox. Nous avons obtenu un échantillon doublement positif pour le PPRV et la pasteurellose.



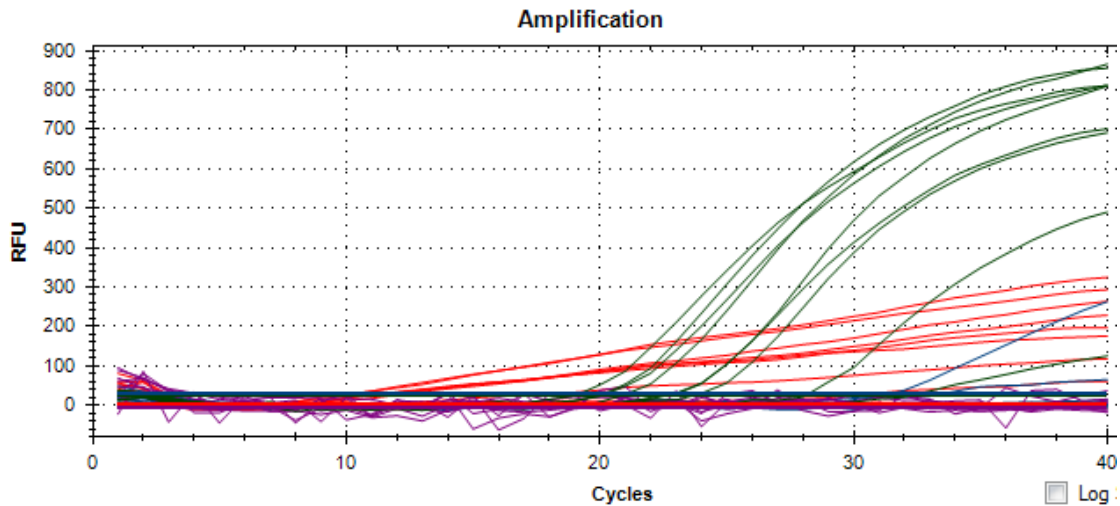


Figure 20 Exemple du profil du résultat du test multiple. La couleur verte représente l'amplification des échantillons du PPRV.

### 5.3.3 Isolement du PPRV

Pour l'isolement du virus, 20 suspensions virales issues d'écouvillons ou de broyats d'organes (du Mali, du RCA, Burkina Faso et du Ghana) ont été utilisées (Tableau 10). Ces échantillons ont été choisis afin d'avoir une sélection représentative de chaque région du Mali, de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Au total, 3 virus de PPRV ont pu être isolés sur des cellules de BTS-34. Ces souches sont les suivantes :

MALI\_373\_ISOLAT\_BAMAKO\_1999,  
GHANA\_5\_2014,  
MALI\_AN13\_NAS\_SAMAKO\_LFMacrog\_2014.

Ces échantillons isolés ont ensuite été utilisés pour extraire l'ARN viral.

Tableau 10 Résultat de l'isolement.

Nom de l'échantillon	Pays	Année	Lignée	Résultat isolement
MALI_366_BAMAKO_1999	Mali/Bamako	1999	II	Non isolé
MALI_373_ISOLAT_BAMAKO_1999	Mali/Bamako	1999	II	Isolé
MALI_CP1_LAC_DIALAN_SIKASSO_2015	Mali/Sikasso	2015	I	Non isolé
MALI_CP1_NAS_DIALAN_SIKASSO_2015	Mali/Sikasso	2015	I	Non isolé
MALI_CP2_LAC_DIALAN_SIKASSO_2015	Mali/Sikasso	2015	I	Non isolé
MALI_CP2_NAS_DIALAN_SIKASSO_2015	Mali/Sikasso	2014	II	Non isolé
BKF_BINDE_ECOUV4_2014	Burkina/Bindé	2014	II	Non isolé
BKF_BINDE_ECOUV3_2014	Burkina/Bindé	2014	II	Non isolé
BKF_D20_2008	Burkina	2008	II	Non isolé
GHANA_3_2014	Ghana	2014	II	Non isolé
GHANA_5_2014	Ghana	2014	II	Isolé

<b>Mauritanie_2709_EC_2014</b>	Mauritanie	2014	II	Non isolé
<b>RCA_6_2006</b>	RCA	2006	IV	Non isolé
<b>RCA_7_2006</b>	RCA	2006	IV	Non isolé
<b>MALI_AN13_NAS_SAMAKO_LFMacrog_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	Isolé
<b>MALI_CP1_LAC_KOLONDIÉBA_KAKOLI_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	Non isolé
<b>MALI_AN3_NAS_SEKOU_YEMFOLILA_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	Non isolé
<b>MALI_AN5_LAC_DIALAFARA_YEMFOLILA_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	Non isolé
<b>MALI_2_F9_SEGOU_2014</b>	Mali/Ségou	2014	I	Non isolé
<b>MALI_F1_NAS_SEGOU_2014</b>	Mali/Ségou	2014	I	Non isolé

### 5.3.4 La RT-PCR et le profil électrophorétique des produits de PCR

Nous avons testé par RT-PCR les mêmes échantillons du Mali (512, Tableau 9) que ceux du test multiplex, additionnés des échantillons provenant du Sénégal, du Niger, du Congo, du Burkina Faso, du Ghana, de la Mauritanie et la RCA.

Tableau 11 Résultat de la RT-PCR

Pays de l'échantillon (Nombre d'échantillons)	Nombre d'échantillons positifs	Nombre négatifs	d'échantillons
<b>Mali (512)</b>	79	433	
<b>Burkina Faso (14)</b>	7	7	
<b>RCA (32)</b>	10	22	
<b>Congo (2)</b>	2	0	
<b>Mauritanie (6)</b>	2	4	
<b>Niger (12)</b>	8	4	
<b>Sénégal (42)</b>	13	29	
<b>Ghana (9)</b>	9	0	
<b>Total (625)</b>	126	499	

Au total, nous avons obtenu 126 échantillons positifs sur les 625 échantillons testés dont 79 échantillons positifs du Mali (même nombre que pour le test multiplex), 7 positifs du Burkina Faso, 13 positifs provenant du Sénégal, 10 positifs de la RCA, 2 échantillons positifs du Congo et de la Mauritanie, 8 positifs du Niger et 9 du Ghana (Tableau 11).

La Figure 21 présente la visualisation sur gel des produits d'amplification du gène partiel de la nucléoprotéine de PPRV.



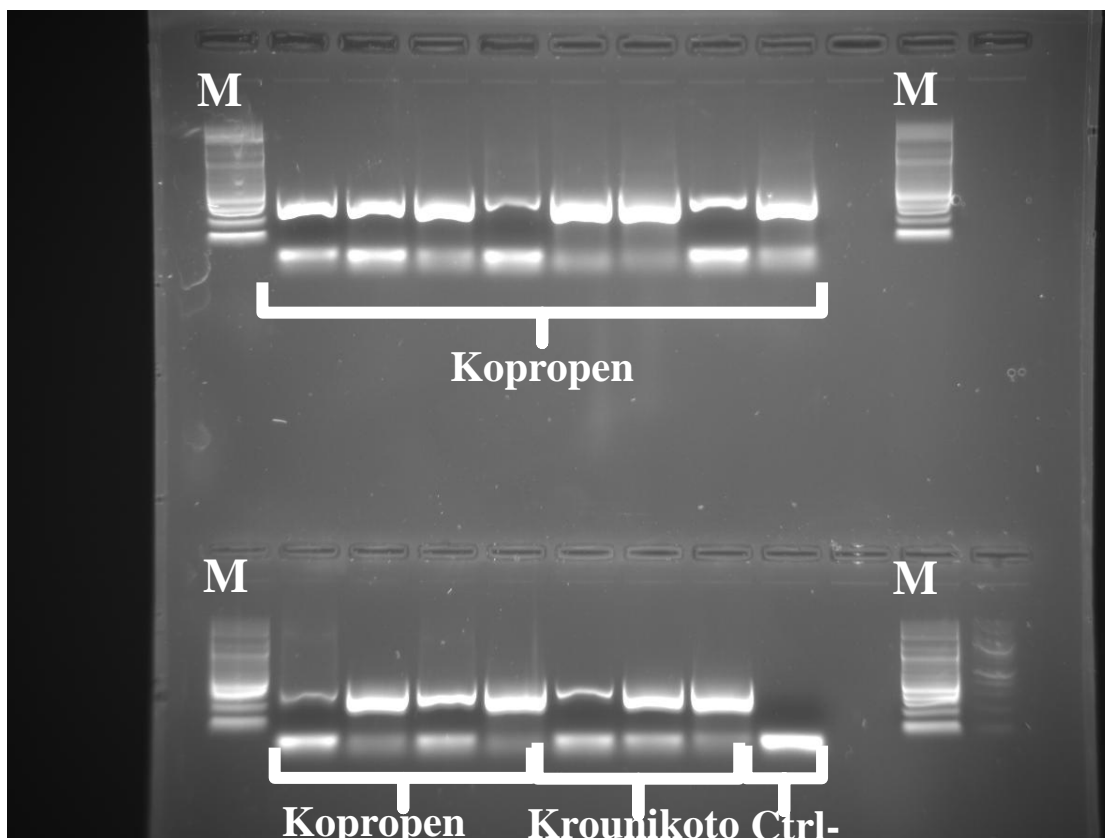


Figure 21 Profil électrophorétique des produits PCR. M : Marqueur, Ctrl- : Contrôle négatif, Kopropen et Krounikoto : échantillons provenant de Kopropen et Krounikoto.

### 5.3.5 Les séquences et l'analyse de l'arbre phylogénétique basé sur 255 nucléotides du gène N

Les 126 échantillons positifs obtenus ont été envoyés à séquencer. Nous avons obtenu 83 séquences (Tableau 12). Le nom de toutes les séquences est donné dans le Tableau 13.

Tableau 12 Résultat du séquençage

Pays de l'échantillon (Nombre d'échantillons)	Nombre d'échantillons envoyés à séquencer	Nombre de séquence obtenues
<b>Mali (512)</b>	79	54
<b>Burkina Faso (14)</b>	7	3
<b>RCA (32)</b>	10	3
<b>Congo (2)</b>	2	1
<b>Mauritanie (6)</b>	2	1
<b>Niger (12)</b>	8	6
<b>Sénégal (42)</b>	13	13
<b>Ghana (9)</b>	9	2
<b>Total (625)</b>	126	83

L'arbre phylogénétique a été construit avec 61 séquences alignées, dont 25 sélectionnés parmi nos séquences (voir Tableau 13). Au total, nous avons obtenu pour l'ensemble des 83 séquences, 59 appartenant à la lignée II, 10 appartenant à la lignée I et 14 appartenant à la lignée IV.

Tableau 13 Liste des séquences obtenues dans notre étude et de ceux provenant de GenBank.

Les séquences identiques provenant du même village sont représentées par une même couleur et l'échantillon représentatif de chaque village est représenté en caractère gras.

Nom de l'échantillon	Pays / Région	Année de collecte	Lignée	Numéro d'accèsion sur Genbank	Type d'analyse phylogénétique effectuée avec l'échantillon
MALI_AN3_LAC_SEKOU_YEMFOLILA_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
<b>MALI_AN4_NAS_SEKOU_YEMFOLILA_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_AN3_NAS_SEKOU_YEMFOLILA_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_AN5_LAC_DIALAFARA_YEMFOLILA_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_AN9_NAS_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_AN10_BUCC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_AN10_LAC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_AN12_LAC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
<b>MALI_AN13_NAS_SAMAKO_LFMacrog_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_AN8_LAC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
<b>MALI_AN8_NAS_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_AN9_LAC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_AN10_NAS_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_AN14_LAC_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_AN14_NAS_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest

<b>MALI_AN15_LAC_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_AN15_NAS_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_CP1_LAC_KOLONDIEBA_KAKOLI_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_CP1_NAS_KOLONDIEBA_KAKOLI_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
<b>MALI_CP5_LAC_KOLONDIEBA_KAKOLI_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_CP6_LAC_KOLONDIEBA_KAKOLI_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_CP2_LAC_KOLONDIEBA_KAKOLI_SIKASSO_2014	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_CP1_LAC_DIALAN_SIKASSO_2015	Mali/Sikasso	2015	I		Détermination de la lignée/Analyse spécifique de la lignée I
MALI_CP1_NAS_DIALAN_SIKASSO_2015	Mali/Sikasso	2015	I		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_CP2_LAC_DIALAN_SIKASSO_2015	Mali/Sikasso	2015	I		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
<b>MALI_CP2_NAS_DIALAN_SIKASSO_2015</b>	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée
MALI_KEN_34_KAYES_2016	Mali/Kayes	2016	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali
MALI_KEN_39BIS_KAYES_2016	Mali/Kayes	2016	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali
MALI_KEN_43BIS_KAYES_2016	Mali/Kayes	2016	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali
<b>MALI_KEN_47_KAYES_2016</b>	Mali/Kayes	2016	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali
MALI_KOPROPEN3_NAS_MOPTI_2017	Mali/Mopti	2017	IV		Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
MALI_KOPROPEN5_NAS_MOPTI_2017	Mali/Mopti	2017	IV		Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
MALI_KOPROPEN7_NAS_MOPTI_2017	Mali/Mopti	2017	IV		Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV

MALI_KOPROPEN1_NAS_MOPTI_2017	Mali/Mopti	2017	IV		Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
MALI_KOPROPEN8_NAS_MOPTI_2017	Mali/Mopti	2017	IV		Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
MALI_KOPROPEN9_NAS_MOPTI_2017	Mali/Mopti	2017	IV		Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
MALI_KOPROPEN10_NAS_MOPTI_2017	Mali/Mopti	2017	IV		Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
MALI_KOPROPEN14_NAS_MOPTI_2017	Mali/Mopti	2017	IV		Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
MALI_KOPROPEN15_NAS_MOPTI_2017	Mali/Mopti	2017	IV		Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
MALI_KROUNIKOTO_N3_BUC_KAYES_2017	Mali/Kayes	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_KROUNIKOTO_N3_NAS_KAYES_2017	Mali/Kayes	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_KROUNIKOTO_N3_OCC_KAYES_2017	Mali/Kayes	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_KROUNIKOTO_N4_BUC_KAYES_2017	Mali/Kayes	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_KROUNIKOTO_N4_OCC_KAYES_2017	Mali/Kayes	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_366_BAMAKO_1999	Mali/Bamako	1999	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_373_ISOLAT_BAMAKO_1999	Mali/Bamako	1999	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_1F_SEGOU_2014	Mali/Ségou	2014	I		Détermination de la lignée
MALI_2F_SEGOU_2014	Mali/Ségou	2014	I		Détermination de la lignée
MALI_2_F9_SEGOU_2014	Mali/Ségou	2014	I		Détermination de la lignée
MALI_F1_NAS_SEGOU_2014	Mali/Ségou	2014	I		Détermination de la lignée

MALI_I_M6_SEGOU_2014	Mali/Ségou	2014	I		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_SIT_6_KAYES_2016	Mali/Kayes	2016	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_SIT_55_KAYES_2016	Mali/Kayes	2016	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
MALI_BIO_SIT_55_KAYES_2016	Mali/Sikasso	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
SENEGAL_MISSION1_14_2017	Sénégal/Kédougou	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
SENEGAL_MISSION1_31_2017	Sénégal/Kédougou	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
SENEGAL_MISSION1_15_2017	Sénégal/Kédougou	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
SENEGAL_MISSION1_32_2017	Sénégal/Kédougou	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
SENEGAL_MISSION1_15_2017	Sénégal/Kédougou	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali
SENEGAL_MISSION1_32_2017	Sénégal/Kédougou	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali
SENEGAL_MISSION2_88_2017	Sénégal/Tambacounda	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali
SENEGAL_MISSION3_21_2017	Sénégal	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali
SENEGAL_MISSION3_33_2017	Sénégal	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali-Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
SENEGAL_MISSION3_67_2017	Sénégal	2017	II		Détermination de la

					lignée/Analyse lignée II frontière Mali
SENEGAL_MISSION3_47_2017	Sénégal	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali
SENEGAL_MISSION3_75_2017	Sénégal	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali
SENEGAL_MISSION3_96_2017	Sénégal	2017	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II frontière Mali- Sénégal/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
BKF_BINDE_ECOUV4_2014	Burkina/Bindé	2014	II		Détermination de la lignée
<b>BKF_BINDE_ECOUV3_2014</b>	Burkina/Bindé	2014	II		Détermination de la lignée
BKF_D20_2008	Burkina	2008	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
Congo_2006	Congo	2006	IV		Détermination de la lignée
GHANA_3_2014	Ghana	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
<b>GHANA_5_2014</b>	Ghana	2014	II		Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
Mauritanie_2709_EC_2014	Mauritanie	2014	II		Détermination de la lignée
RCA_6_2006	RCA	2006	IV		Détermination de la lignée
<b>RCA_7_2006</b>	RCA	2006	IV		Détermination de la lignée
RCA_BAS_CP1_2004	RCA	2004	II		Détermination de la lignée
<b>Niger_LymphNode2_Falmey_2001(MG694466)</b>	Niger/Falmey	2001	II	MG694466	Détermination de la lignée
Niger_LymphNode1_Falmey_2001(MG694467)	Niger/Falmey	2001	II	MG694467	Détermination de la lignée
Niger_Lg_Maradi_2013(MG694465)	Niger/Maradi	2013	IV	MG694465	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
<b>Niger_Os5_Maradi_2013(MG694464)</b>	Niger/Maradi	2013	IV	MG694464	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
<b>Niger_Spleen_Kena_2001(MG694468)</b>	Niger/Kena	2001	I	MG694468	Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
Niger_Lung_Kena_2001(MG694469)	Niger/Kena	2001	I	MG694469	Détermination de la lignée/Analyse lignée II

					Afrique de l'Ouest
Mali_1999	Mali	1999	II	DQ840192	Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
Algeria_2012	Algérie	2012	IV	KP793696	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
BurkinaFasso_1988	Burkina Faso	1988	II	DQ840172	Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
Comores_2013	Comores	2013	III	KM669158	Détermination de la lignée
Dubai_2009	Dubaï	2009	IV	FJ795511	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
Ethiopia_1996	Ethiopie	1996	III	DQ840183	Détermination de la lignée
Ghana_1978	Ghana	1978	II	DQ840166	Détermination de la lignée
Guinea_1988	Guinée	1988	I	DQ840170	Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
Israel_1995	Israël	1995	IV	DQ840181	Détermination de la lignée
IvoryCoast_1989	Côte d'Ivoire	1989	I	EU267273	Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
Mauritania_2012	Mauritanie	2012	II	KF483658	Détermination de la lignée
Oman_1983	Oman	2012	III	DQ840168	Détermination de la lignée
SaudiArabia_1999	Arabie Saoudite	1999	IV	DQ840197	Détermination de la lignée
Senegal_1968	Sénégal	1968	I	DQ840165	Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
Senegal_1994	Sénégal	1994	I	DQ840174	Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
UAEDorcas_1986	Oman	1986	III	KJ867545	Détermination de la lignée
India_2016	Inde	2016	IV	KX033350	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
Egypt_2015	Egypte	2015	IV	KX189064	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
Morocco_2015	Maroc	2015	IV	KY197740	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV



Ethiopia_2014	Ethiopie	2014	IV	KX816961	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
Ghana_2010	Ghana	2010	II	KJ676597	Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
Senegal_2010	Sénégal	2010	II	HQ131963	Détermination de la lignée
SierraLeone_2009	Sierra Leone	2009	II	JN602080	Détermination de la lignée
Benin_2011	Benin	2011	II	KT692538	Détermination de la lignée
Nigeria_Oyo_2013	Nigéria	2013	II	KF908036	Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
Nigeria_Ondo_2010	Nigéria	2010	II	KF908038	Détermination de la lignée/Analyse lignée II Afrique de l'Ouest
Nigeria_Lagos_2010	Nigéria	2010	IV	KF908042	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
Soudan_2008	Soudan	2008	IV	HQ131921	Analyse de la lignée IV
China_2014	Chine	2014	IV	KP260624	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
Nigeria_Akwalbom_2013	Nigéria	2013	IV	KF908047	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
Nigeria_Kano_2012	Nigéria	2012	IV	KJ124730	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
Iran_1998	Iran	1998	IV	DQ840186	Analyse de la lignée IV
Turquie_2010	Turquie	2010	IV	JQ388660	Analyse de la lignée IV
Gabon_2011	Gabon	2011	IV	JX079996	Détermination de la lignée/Analyse spécifique lignée IV
Guinea_1989	Guinée	1989	I	DQ840171	Détermination de la lignée
Nigeria_2013	Nigéria	2013	IV	KF479408	Analyse de la lignée IV
Nigeria_2013	Nigéria	2013	IV	KF479409	Analyse de la lignée IV
Nigeria_Taraba_2013	Nigéria	2013	IV	KJ124740	Analyse de la lignée IV
Nigeria_Sokoto_2010	Nigéria	2010	IV	KF908039	Analyse de la lignée IV
Nigeria_Oyo_2010	Nigéria	2010	IV	KF908046	Analyse de la lignée IV
Bangladesh_2011	Bangladesh	2011	IV	JX220410	Analyse de la lignée IV
Egypt_2012	Egypte	2012	IV	JX312807	Analyse de la lignée IV
Tadjikistan_2004	Tadjikistan	2004	IV	DQ840198	Analyse de la lignée IV
Turkey_2015	Turquie	2015	IV	KU325487	Analyse de la lignée IV

Nigeria_Anambra_2010	Nigéria	2010	IV	KJ124765	Analyse de la lignée IV
Nigeria_Imo_2010	Nigéria	2010	IV	KJ124750	Analyse de la lignée IV
Nigeria_Plateau_2010	Nigéria	2010	IV	KF908045	Analyse de la lignée IV
Nigeria_Kano_2010	Nigéria	2010	IV	KF908040	Analyse de la lignée IV
Nigeria_Plateau_2013	Nigéria	2013	IV	KJ124726	Analyse de la lignée IV
Nigeria_Kano_2012	Nigéria	2012	IV	KJ124730	Analyse de la lignée IV
Nigeria_Yobe_2013	Nigéria	2013	IV	KJ124732	Analyse de la lignée IV
Nigeria_Ondo_2012	Nigéria	2012	IV	KJ124746	Analyse de la lignée IV
Nigeria_Anambra_2011	Nigéria	2011	IV	KJ124758	Analyse de la lignée IV
Nigeria_Plateau_2013	Nigéria	2013	IV	KJ124728	Analyse de la lignée IV
China_2014	Chine	2014	IV	KM089830	Analyse de la lignée IV
Turquie_2010	Turquie	2010	IV	JQ388660	Analyse de la lignée IV
Gabon_2011	Gabon	2011	IV	JX079996	Analyse de la lignée IV

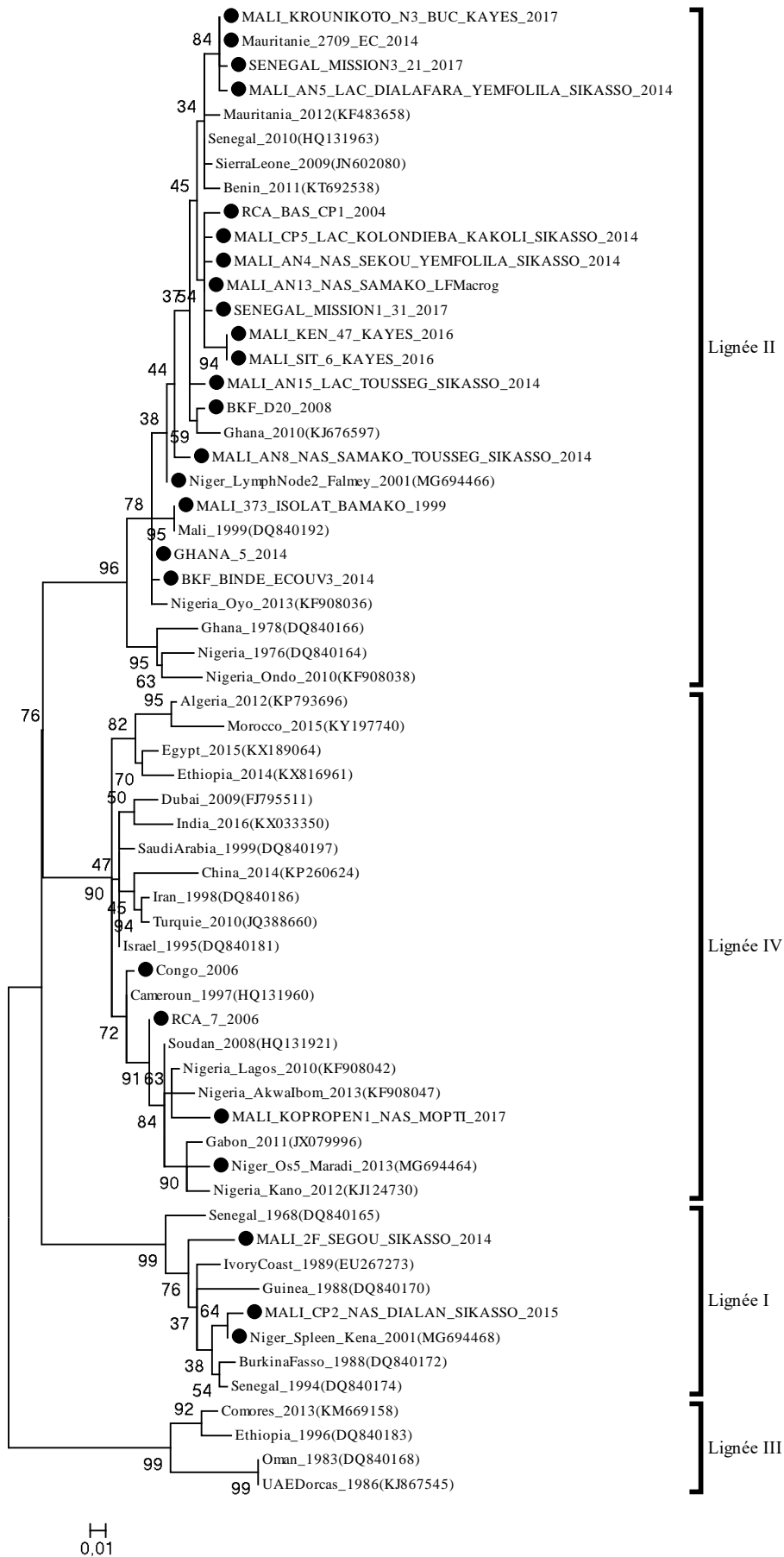


Figure 22 Analyse phylogénétique par la méthode de Maximum de Vraisemblance.

L'analyse phylogénétique par maximum de vraisemblance à partir de courtes séquences de la nucléoprotéine nous a permis d'obtenir une phylogénie présentant les quatre lignées différentes du PPRV (I, II, III, et IV). Conformément à la répartition phylogéographique des différentes souches du PPRV, les anciennes souches appartiennent aux lignées I et II et se localisent en Afrique de l'Ouest, comme le montrent les souches de la lignée I détectées au Sénégal en 1968, au Burkina Faso en 1988, en Guinée en 1988 et en Côte d'Ivoire en 1989, et les souches de la lignée II, récoltées au Nigéria en 1976, au Ghana en 1978 et au Mali en 1999. Les plus anciennes souches de la lignée III se trouvent en Afrique de l'Est comme celle d'Ethiopie en 1996 et d'Oman en 1983. Les souches de la lignée IV, qui est beaucoup plus répandue, se distribuent en Asie, avec la souche provenant de Chine en 2014 et d'Inde en 2016. Cette lignée est également présente en Afrique, notamment en Afrique du Nord, détectée lors des foyers de 2008 au Maroc et récemment en 2015, en Afrique Centrale comme en Cameroun en 1999 et Gabon en 2012, elle se trouve aussi en Afrique de l'Est comme en Ethiopie en 2014 (Baazizi et al., 2017) (Figure 22).

Les différentes souches de PPRV récoltées au Sénégal (en 2016), au Burkina Faso (en 2008 et 2014) et au Ghana (en 2014) sont regroupées dans le clade de la lignée II. Cette classification récente des pays de l'Afrique de l'Ouest montre l'émergence de cette lignée au niveau régional, là où la lignée I était dominante.

Le chapitre V décrit en détail l'analyse phylogénétique des souches du Niger.

Les souches de l'Afrique centrale: le Cameroun, 1997, le Congo (2006) et de la RCA (en 2006) sont regroupées dans le clade de la lignée IV.

Les différentes souches de PPRV du Mali de 1999, 2014 à 2017 sont regroupées dans toutes les clades sauf celui de la lignée III.

### 5.3.6 Analyse phylogénétique détaillée des souches du Mali

#### *La lignée IV*

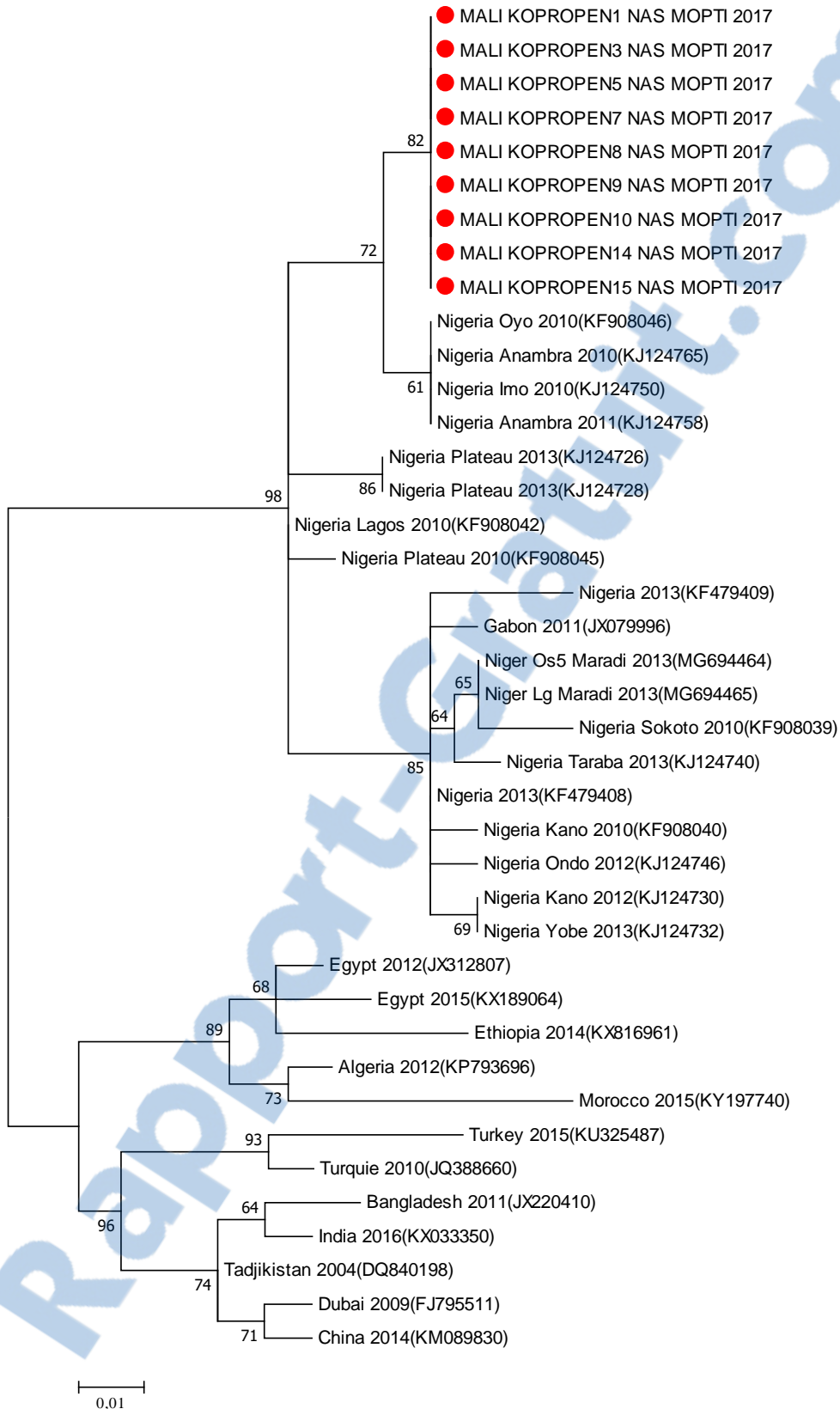


Figure 23 Analyse phylogénétique des souches de la lignée IV du PPRV par la méthode de Maximum de Vraisemblance. Les points rouges représentent nos échantillons.

Les souches du Mali de la région de Mopti font parties du clade de la lignée IV. Sur l'arbre phylogénétique (Figure 23), qui ne montre que les souches de la lignée IV, nous constatons la formation de deux groupes au sein des souches de cette lignée. Nous avons un premier qui rassemble

toutes les souches de l’Afrique de l’Ouest dont le Mali, le Niger, le Nigéria et Afrique Centrale (Gabon). Au sein de ce groupe, nous distinguons deux sous-groupes : celui du Mali - Nigeria dans sa partie Centrale, et le sous-groupe Niger- Nigéria du Nord – Gabon.  
Le deuxième cluster regroupe les séquences provenant de l’Asie (comme la Chine), Afrique du Nord (comme le Maroc) et de l’Afrique de l’Est (telle que l’Ethiopie).

### *La lignée II du Mali*

Au Mali, la lignée II est présente dans différentes régions échantillonnées : Kayes, Sikasso et Bamako.

La région de Kayes est à la frontière avec le Sénégal notamment les villes de Kédougou et Tambacounda. Les études phylogénétiques effectuées avec les souches de Kayes et du Sénégal (Figure 24) nous montrent plusieurs clusters comprenant chacun des séquences provenant du Mali et du Sénégal.

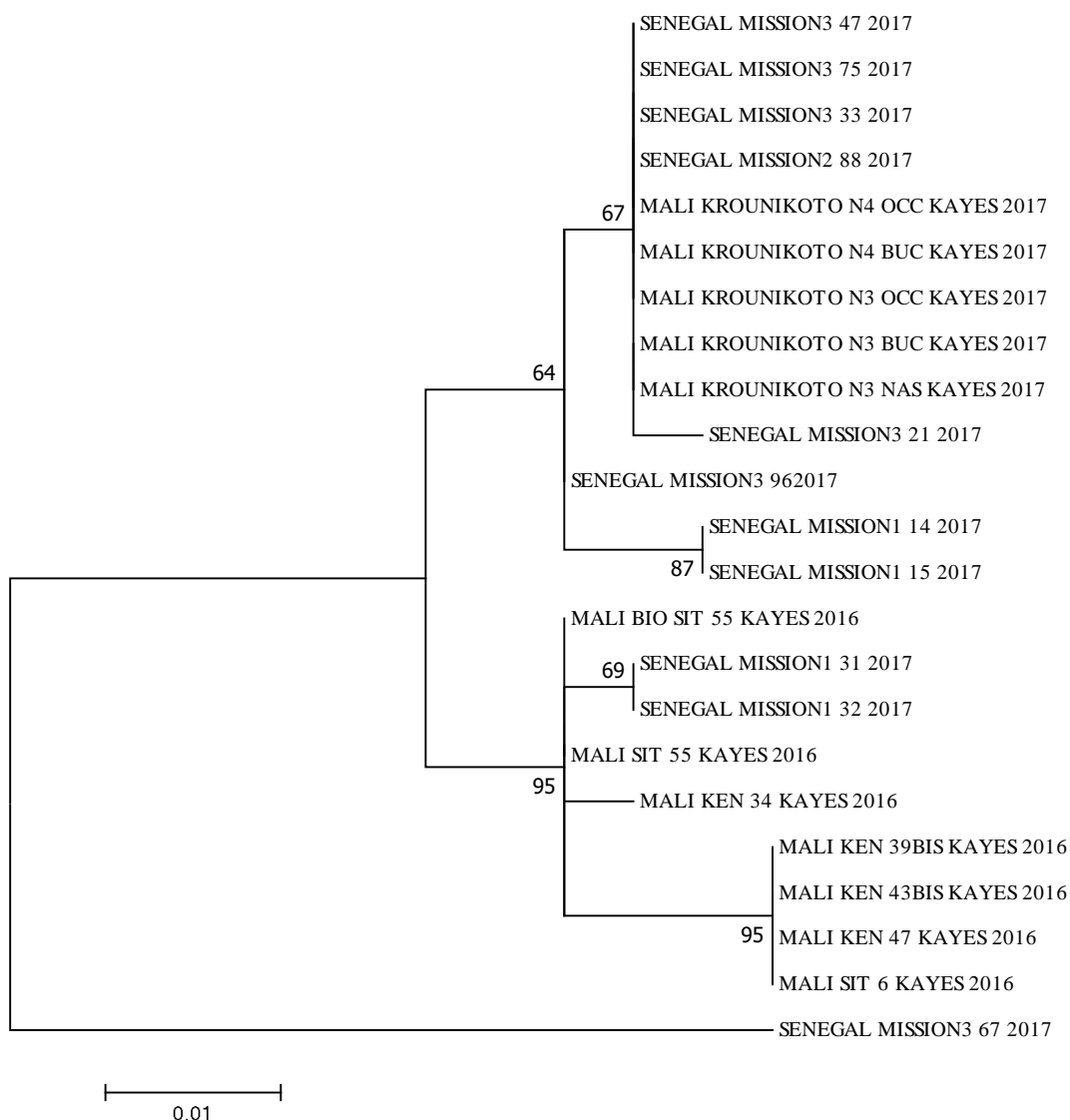


Figure 24 Analyse phylogénétique des souches de PPRV de la lignée II du Mali (Kayes) et du Sénégal (Tambacounda et Kédougou) par la méthode de Maximum de Vraisemblance.

Nous avons fait une analyse phylogénétique spécifique à la lignée II (Figure 25), en incluant des échantillons de la lignée II du Mali, du Sénégal et d’autres pays de l’Afrique de l’Ouest (Niger, Nigéria, Ghana, Burkina Faso et Bénin). L’arbre phylogénétique obtenu montre plusieurs sous-

groupes à l'intérieur de cette lignée II. Nous pouvons remarquer que les souches du Mali se retrouvent dans plusieurs de ces sous-groupes proches des souches du Sénégal, du Burkina Faso, du Niger et le Bénin.



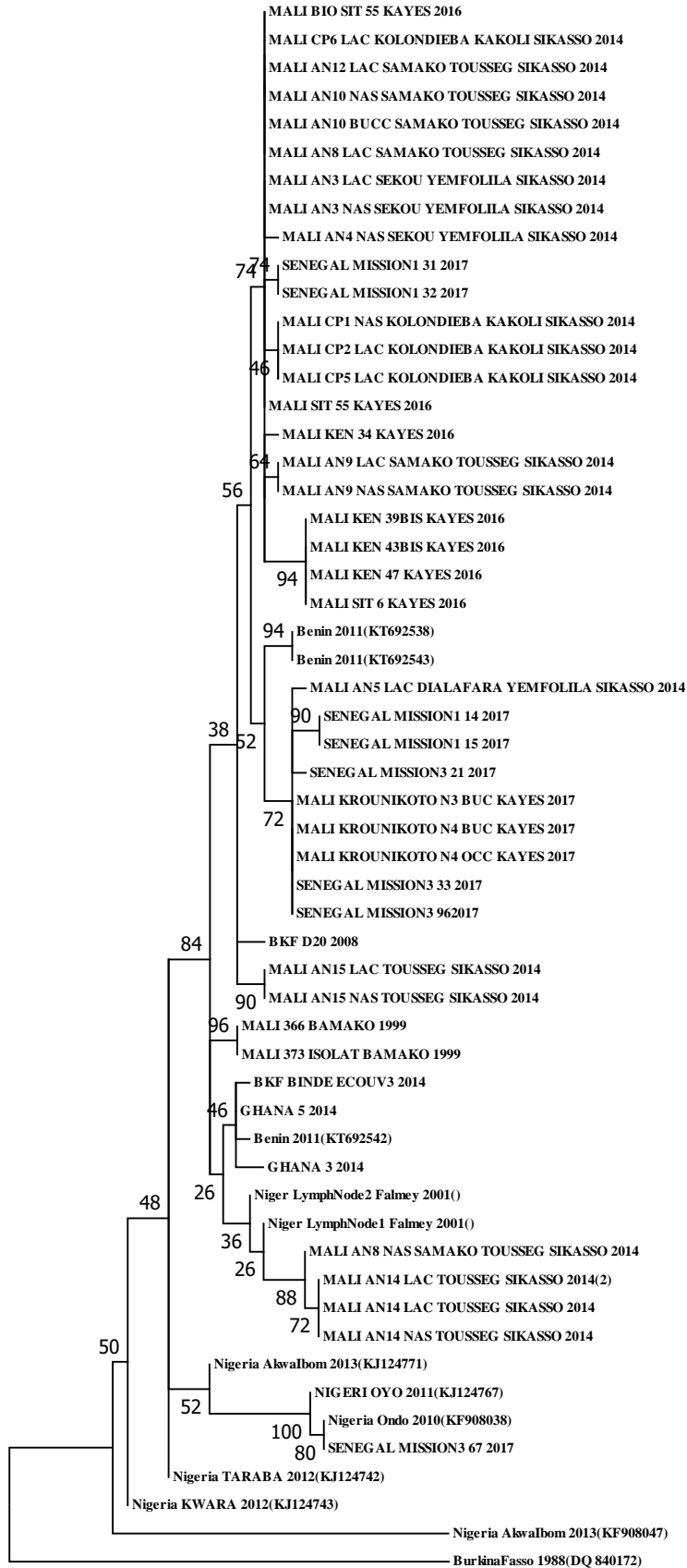


Figure 25 Analyse phylogénétique des souches de la lignée II du PPRV en Afrique de l'Ouest par la méthode de Maximum de Vraisemblance.

## La lignée I

Sur l'arbre phylogénétique (Figure 22), nous pouvons voir que la lignée I est présente dans deux Régions du Mali, à Ségou en 2014 et à Sikasso en 2015 dans deux petits villages.

Nous pouvons noter sur l'arbre phylogénétique spécifique aux souches de la lignée I (Figure 26) que les souches de la Région de Ségou sont assez différenciées phylogénétiquement en comparaison aux séquences de Sikasso. L'ensemble des séquences de souches récentes sont séparées des anciennes souches du Burkina Faso, Guinée et Côte d'Ivoire et du Sénégal des années 1980.

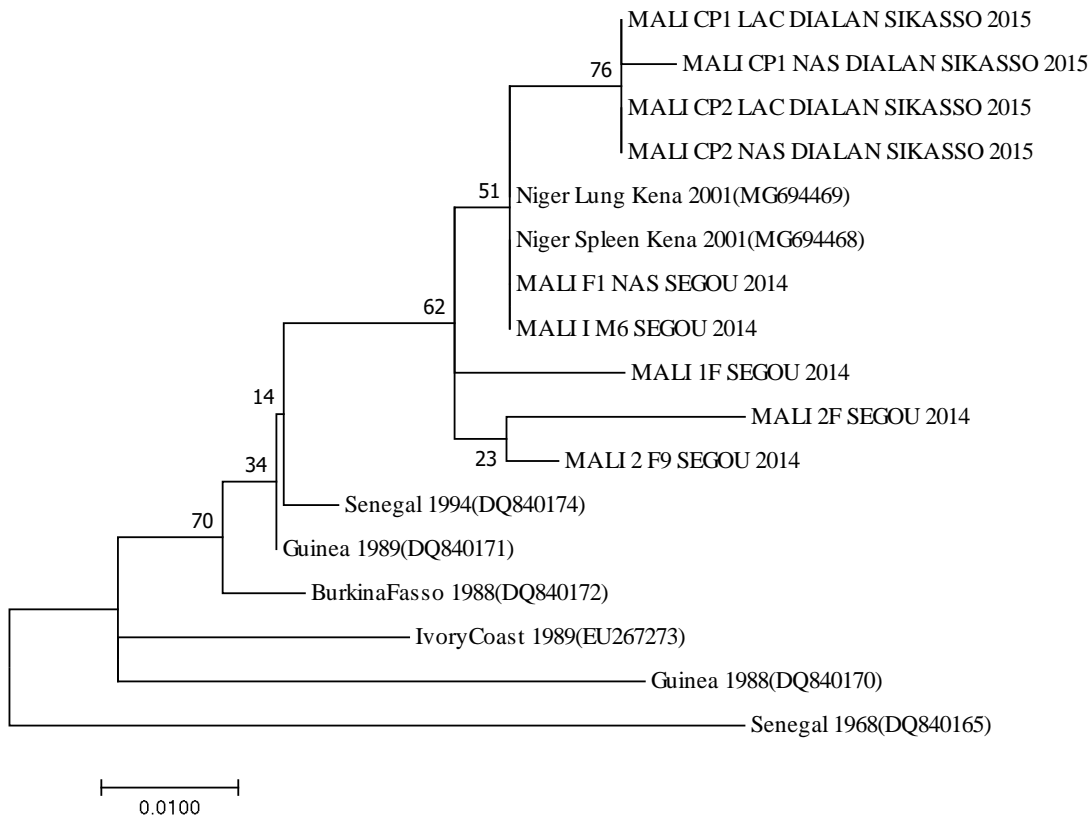


Figure 26 Analyse phylogénétique des souches de la lignée I du PPRV en Afrique de l'Ouest par la méthode de Maximum de Vraisemblance.

## 5.4 Discussion

### Les difficultés liées à l'échantillonnage sur le terrain

L'échantillonnage basé sur les déclarations des éleveurs ou des agents vétérinaires peut générer des données incomplètes. Les foyers de PPR dans les pays endémiques sont rarement déclarés par les éleveurs, ces derniers préférant traiter eux-mêmes leurs animaux. Cela peut constituer une entrave majeure à ce type d'étude. Une enquête de longue durée à l'échelle nationale aurait permis d'augmenter la quantité de prélèvements dans le temps. Cependant un tel échantillonnage sur l'ensemble du territoire malien implique de grands moyens financiers.

Au cours de nos échantillonnages, le matériel biologique a été représenté par les écouvillons (oculaire et nasal) et les organes tels que le poumon. Les écouvillons se conservent facilement sous glace et donnent de bons résultats en PCR qualitative par rapport au sang. En plus d'être facilement acceptés par les éleveurs (ne touchant pas à l'intégrité des animaux), les prélèvements sur écouvillons

imprégnés dans des tubes contenant du MEM (milieu de culture cellulaire) peuvent aussi servir à isoler le virus s'ils sont conservés à -80°C.

Les poumons et les écouvillons contiennent des charges virales importantes, ils peuvent être utilisés pour la détection PCR mais surtout pour l'isolement viral, s'ils sont conservés dans de bonnes conditions. En effet, le faible taux de réussite de l'isolement viral résulte sans doute de la condition de conservation du virus (sous glace) pendant la durée des missions de terrain (7 jours). Le PPRV est un virus fragile, incapable de survivre longtemps en dehors de l'hôte avec une demi-vie estimée à 2,2 minutes à 56°C et à 3,3 heures à 37°C (Rossiter, 1994). La conservation du virus sous glace (+4°C) pendant 7 jours de terrain permet sans doute de conserver l'ARN viral à moyen terme mais entame la viabilité du virus PPR. Il aurait été intéressant de faire une cinétique de survie à 4°C pour étudier la problématique de la conservation de l'ARN dans ces conditions. Les prélèvements d'organes ou de sécrétions virales doivent donc être immédiatement conservés dans de l'azote liquide, puis transférés à -80°C au laboratoire.

### *Le test multiplex*

Les échantillons du Mali (poumons et écouvillons) ont tous été testés avec le test multiplex. Les mêmes échantillons ont ensuite été analysés par RT-PCR. Nous avons obtenu les mêmes résultats avec les deux méthodes. Les résultats obtenus correspondent aux attentes de ceux qui l'ont développé. En effet, les résultats obtenus ont été communiqués aux auteurs afin de pouvoir finaliser la validation du test (notamment avec les échantillons du terrain).

### *Analyse phylogénétique des différentes souches qui co-circulent au Mali*

Pour la première fois nous avons révélé la présence de la lignée IV au Mali dans la Région de Mopti. En effet la lignée IV est une lignée à l'origine Asiatique. Mais des études phylogénétiques ont mis en évidence son introduction en Afrique notamment en Afrique de l'Est et du Nord, en Algérie et au Maroc et dans les pays comme l'Ethiopie qui était précédemment dominée par la lignée III, (Banyard et al., 2010; Cosseddu et al., 2013; Kwiatek et al., 2011; M. Muniraju et al., 2014). Nos études effectuées au Niger (voir Chapitre V) montrent également la présence de la lignée IV dans ce pays. L'ensemble de nos études réalisées au Mali et au Niger nous confirme une présence ainsi qu'une progression de la lignée IV en Afrique de l'Ouest. D'après les analyses phylogénétiques, nous pouvons penser que l'introduction de la lignée IV dans la région de Mopti au Mali (Figure 27) est d'origine Africaine, provenant probablement du Nigéria ou du Niger d'après la proximité phylogénétique des souches de ces pays. Un commerce de bétail assez important existe entre ces pays, notamment entre Mopti (Mali), le Nigeria et le Niger (qui sont assez proches géographiquement). De plus, d'après les informations recueillies par les vétérinaires sur les foyers à Mopti, certains des animaux malades faisaient effectivement partie de bétail importé. Il est à noter qu'aucune souche du Burkina qui importe le bétail malien, n'appartient à notre connaissance à la lignée IV.

L'analyse phylogénétique montre également la persistance de la lignée I au Mali. La lignée I a longtemps été considérée comme lignée disparue. En effet, présente en Afrique de l'Ouest dans les années 1980, elle n'a été décrite dans aucun pays depuis 1994. Les séquences obtenues pour des souches de cette lignée semblent démontrer une certaine diversité génétique (en tout cas dans la région de Ségou), ce qui suggère que la lignée continue à circuler dans d'autres régions non échantillonnées. La persistance et la conservation de cette lignée au Mali au niveau de ces villages montre que le commerce de bétail n'est pas très important entre ces villages et les autres villages de la région, ce qui est corroboré par les informations récoltées sur le terrain auprès des habitants. La difficulté qu'il y a de collecter ces régions, au Mali et dans le pays frontalier, Burkina Faso, Niger, constitue certainement un biais à l'évaluation de l'étendue et de la diversité des souches de lignée I. En effet, ces villages sont très difficiles à atteindre à cause du manque de moyens de transport. L'élevage est pratiqué pour des besoins personnels. L'isolement relatif de ces villages par rapport aux réseaux commerciaux typiques

du Mali pourrait expliquer la persistance de la lignée I dans ces zones malgré la dominance de la lignée II dans le reste de la région. D'après nos études au Niger, la lignée I était également présente au Niger au moins jusqu'en 2001 (voir Chapitre II), et ces souches sont proches de celles du Mali.

Si dans les années 1980, les pays de l'Afrique de l'Ouest hébergeaient des souches de lignée I, aujourd'hui, c'est la lignée II qui est prédominante et elle semble progressivement la remplacer. Au Mali, nous avons trouvé la lignée II dans trois régions.

La liste exhaustive des souches récoltées pour cette étude et celles publiées au moment de la thèse montre que le bassin d'extension de la lignée II est délimitée autour du Mali, par le Sénégal, la Mauritanie (H. Salami), le Bénin, Burkina, le Ghana, le Niger et le Nigéria. La diversité génétique de cette lignée est très importante. Cette diversité génétique est plus importante au Mali que celle observée au Sénégal dans les travaux de thèse de H. Salami. Cela pourrait être lié à la position centrale du Mali comme carrefour de rencontre des mouvements commerciaux de ruminants provenant des confins de la région Ouest africaine, alors qu'avec le Sénégal, les distances de mouvements sont plus restreintes et stoppées par l'atlantique

L'analyse phylogénétique montre le lien de proximité des souches du Mali avec chacune de celles des autres pays de l'Afrique de l'Ouest. Le brassage dû aux mouvements d'animaux de diverses origines pourrait expliquer la grande diversité de souches qui circulent au Mali. Nous savons que le Mali exporte en période de fête musulmane (Aid El Fitr ou fête de mouton) des centaines de milliers d'animaux vers plusieurs pays dont le Sénégal, la Niger, le Bénin, le Nigéria, le Ghana, le Burkina Faso. L'analyse phylogénétique du génome complet de ces souches vient en confirmation de celles faites dans ce chapitre et tout en fournissant plus d'information par rapport à l'évolution de cette lignée II dans ces pays (Chapitre suivant).

En résumé, notre étude a montré que la lignée I continue toujours de persister malgré la dominance de la lignée II et est conservée au Mali dans au moins deux régions, à Ségou et à Sikasso. Cela peut être dû à l'isolement de certaines communautés (telle que Dialan) et de leurs animaux.

En 2017, nous avons également trouvé la lignée IV à Mopti. La région de circulation et la difficulté d'échantillonnage peut expliquer le manque de diversité de la lignée IV observé au Mali, mais cela peut également suggérer une introduction très récente dans le pays. D'autres études récentes portant sur le Niger (voir Chapitre II) et le Nigéria (Woma et al. 2016 ; Mantip et al. 2016) ont également montré la présence de la lignée IV. Cette lignée est en passe d'envahir les pays de l'Afrique de l'Ouest. Pour mieux comprendre sa progression, il serait intéressant de faire le bilan de sa répartition dans d'autres pays tels que le Burkina Faso, le Ghana ou la Cote d'Ivoire.

Au final, actuellement, nous avons trois lignées différentes de PPRV qui co-circulent au Mali (Figure 27). La grande diversité des souches de PPRV identifiées dans ce pays suggère d'importants mouvements transfrontaliers de la PPR entre le Mali et le reste de l'Afrique de l'Ouest.

Comprendre le mouvement des animaux entre ces pays où le commerce de bétail n'est pas contrôlé est très important pour les campagnes d'éradication de la PPR. Cela va permettre de proposer des stratégies de contrôle les mieux adaptées afin de limiter la propagation de la maladie.

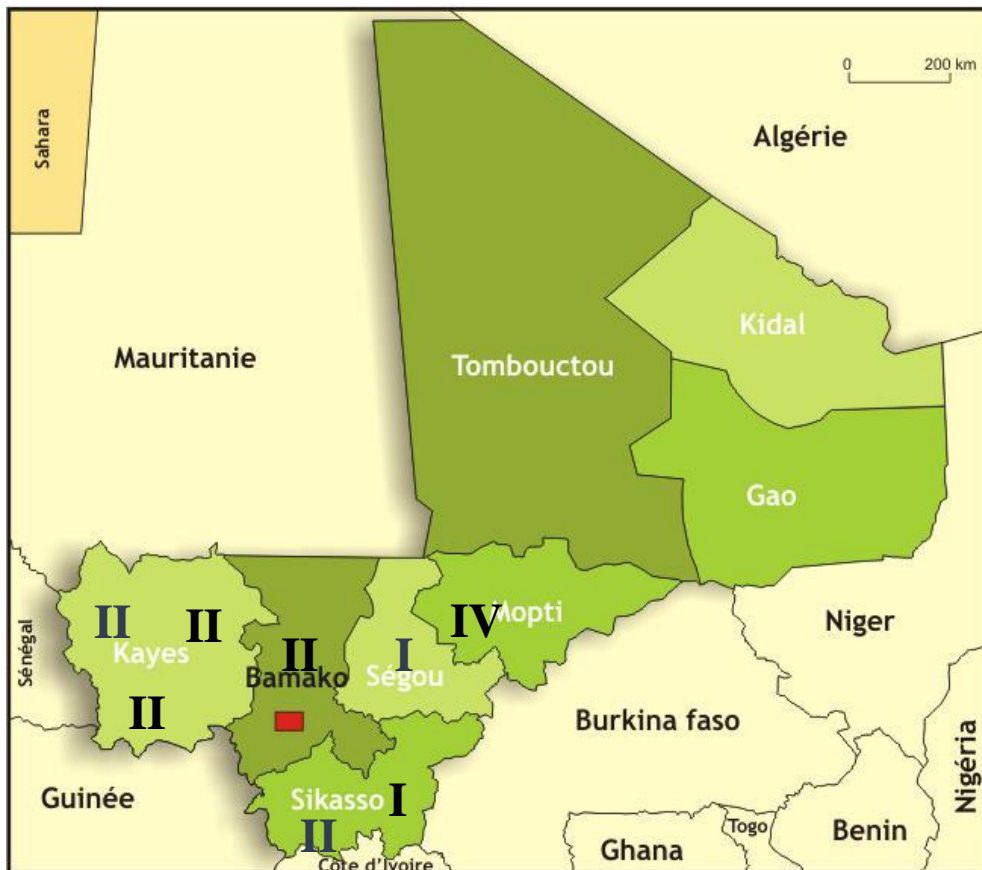


Figure 27 La distribution des différentes lignées du PPRV au Mali.

# 6 Etude génomique de la diversité des souches de PPRV au Mali et dans d'autres pays d'Afrique de l'Ouest

## 6.1 Introduction

Les études phylogénétiques réalisées dans le chapitre précédent, sur l'analyse d'un fragment court du gène N, montrent que toutes les lignées virales exceptée la lignée III sont représentées au Mali, ainsi que dans d'autres pays de l'Afrique de l'Ouest et du Centre. Les études précédentes portant sur ces régions montraient plutôt une domination par la lignée I (Kwiatek et al., 2007) alors que les études plus récentes font apparaître une domination de la lignée II sur ces mêmes territoires avec en surcroît une introduction de la lignée IV jusque-là présente uniquement en Asie (Baazizi et al., 2017; Kwiatek et al., 2011; M. Muniraju et al., 2014).

Malgré l'usage de la vaccination en Afrique depuis le début des années 90, plus particulièrement de la souche Nigéria 75-1 (Diallo A et al., 1989), la question se pose de savoir pourquoi toutes les lignées sont maintenant représentées et plus particulièrement en Afrique de l'ouest, et pourquoi nous observons une propagation de la maladie que nous visualisons par le changement de répartition des lignées historiques et l'émergence de la lignée asiatique. Pour tenter d'apporter une réponse à ces questions, nous proposons d'évaluer la vitesse d'évolution et d'estimer les dates d'émergence des lignées de PPRV circulant sur le territoire Ouest africain.

L'étude fine de l'évolution du PPRV ne peut pas se faire à partir de courtes séquences du gène de la nucléoprotéine. Ces courtes séquences permettent une bonne définition des souches virales en lignées mais elles ont un potentiel restreint à retracer la circulation de ces souches sur le terrain ou à déterminer la filiation entre différentes souches d'une même lignée. Pour une étude plus précise et complète, nous avons décidé d'effectuer un séquençage du génome complet de souches collectées durant la thèse et celles encore non étudiées présentes au CIRAD. Ces génomes complets vont permettre une meilleure compréhension du mécanisme d'évolution de ces différentes souches et leur diffusion dans le temps et dans l'espace en Afrique de l'Ouest.

Pour séquencer le génome complet du PPRV, nous avons utilisé des techniques de séquençage de haut débit. Ces techniques permettent théoriquement de s'affranchir de l'isolement et de la culture des souches virales, et de séquencer le génome du virus ciblé à partir d'échantillons cliniques.

Nous avons tout d'abord appliqué une technique d'amplification aléatoire mise en place par Habib Salami au cours de sa thèse en se basant sur une publication de Victoria et al. (2009). L'amplification aléatoire de type *sequence independent single primer amplification* (SISPA) est une technique de séquençage sans a priori utilisant des amorces aléatoires. Cette approche permet d'amplifier l'ensemble des ARNs présents dans un échantillon. L'utilisation de cette méthode pour l'approche « diagnostique » d'un seul virus est très utile quand le pathogène causant l'émergence d'une maladie est inconnu ou que son génome complet n'a pas encore été obtenu. Ce genre de méthode est devenu plus accessible grâce à l'augmentation constante des capacités de séquençage et à la diminution de son coût. Un défi cependant pour les méthodes sans a priori, reste le traitement bio-informatique de grandes quantités de séquences nécessaire pour extraire les données du pathogène d'intérêt hors de la masse de données obtenues.

Nous avons aussi mis en place et validé une autre approche basée sur l'amplification spécifique du génome de PPRV par PCR avant séquençage. Ce type de méthode est utilisé couramment pour l'étude de la diversité virale, notamment pour le virus de la fièvre du Nil de l'Ouest, celui de la Dengue, ou

encore de la maladie de Newcastle (Ehrbar et al., 2017; Lequime et al., 2016; Satharasinghe et al., 2016).

En combinant les deux méthodes de séquençage, nous avons réussi à obtenir le génome complet de 22 souches du Mali, du Ghana et du Sénégal de 1999 à 2016. Ces nouvelles données ont été utilisées pour réaliser de nouvelles analyses phylogénétiques de la PPRV, avec un intérêt particulier pour l'histoire évolutive de la PPR en Afrique de l'Ouest.

## 6.2 Matériels et méthodes

### 6.2.1 Séquençage par amplification aléatoire (SISPA)

#### *Le matériel biologique*

Les échantillons utilisés sont les écouvillons nasaux, oculaires et buccaux provenant d'animaux testés positifs par PCR qui ont été préalablement criblés en utilisant les amorces NP3/NP4 spécifiques de PPRV. Des souches isolées du PPRV sur des cellules CHS et BTS-34 ont également été utilisées. La sélection des souches à séquencer a été faite pour obtenir le génome complet des souches représentatives de toutes les lignées circulant au Mali de 1999 à 2016 (Tableau 14).

Tableau 14 Tableau récapitulatif des échantillons séquencés par la méthode SISPA

Nom de l'échantillon	Pays / Région	Année de collecte	Lignée	Souches isolées
<b>MALI_AN3_LAC_SEKOU_YEMFOLILA_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_AN5_LAC_DIALAFARA_YEMFOLILA_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_AN8_LAC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_AN3_NAS_SEKOU_YEMFOLILA_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_AN14_LAC_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_AN15_NAS_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_CP1_LAC_KOLONDIÉBA_KAKOLI_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>DIALAN_NAS_AGAP_06_2017</b>	Mali/Sikasso	2015	I	
<b>MALI_KEN_49_KAYES_2016</b>	Mali/Kayes	2016	II	
<b>MALI_KEN_40_KAYES_2016</b>	Mali/Kayes	2016	II	
<b>MALI_KOPROPEN7_NAS_MOPTI_2017</b>	Mali/Mopti	2017	IV	
<b>MALI_KOPROPEN8_NAS_MOPTI_2017</b>	Mali/Mopti	2017	IV	
<b>MALI_KOPROPEN9_NAS_MOPTI_2017</b>	Mali/Mopti	2017	IV	
<b>MALI_373_ISOLAT_BAMAKO_1999</b>	Mali/Bamako	1999	II	Isolée
<b>SEGOU_I_M6_NASAL</b>	Mali/Ségou	2014	I	
<b>SENEGAL_MISSION2_88_2017</b>	Sénégal/Tambacounda	2017	II	
<b>SENEGAL_MISSION3_21_2017</b>	Sénégal	2017	II	
<b>BKF_BINDE_ECOUV4_2014</b>	Burkina/Bindé	2014	II	



<b>GHANA_5_2014</b>	Ghana	2014	II	Isolée
<b>Mauritanie_2709_EC_2014</b>	Mauritanie	2014	II	
<b>RCA_6_2006</b>	RCA	2006	IV	
<b>Niger_LymphNode1_Falmey_2001(MG694467)</b>	Niger/Falmey	2001	II	
<b>Niger_Lg_Maradi_2013(MG694465)</b>	Niger/Maradi	2013	II	
<b>Niger_Spleen_Kena_2001(MG694468)</b>	Niger/Kena	2001	II	

### *La RT-PCR et la purification des produits d'amplification*

L'ARN viral a été extrait à l'aide du kit Nucleospin RNA (Macherey Nagel) selon les indications du fournisseur.

L'ARN viral a été reverse-transcrit en utilisant des amorces universelles taguées (Joseph G. Victoria et al., 2009) (Tableau 15). Chaque échantillon a été assigné d'un tag (séquence connue de 20 paires de bases), permettant de grouper plusieurs échantillons sur un même tour ("run") de séquençage. Pour la reverse transcription, 7.5 µl d'ARN viral ont été mis en mélange avec un volume de 5µl d'amorces taguées (de 20µM) (Tableau 14), puis incubés pendant 5 min à 65°C. Ensuite ont été ajoutés à ce mélange, 4 µl de tampon de réaction 5X du kit RevertAid First Strand cDNA synthetisis (Fischer scientifique), 0.5 µl de RNaseOut (RevertAid First Strand cDNA synthetisis, Fischer scientifique), 2 µl de désoxynucléosidetriphosphate (dNTP) de concentration 10mM (Fisher scientifique) et 1 µl de la reverse transcriptase RevertAid (RevertAid First Strand cDNA synthetisis, Fischer scientifique). La réaction de reverse transcription a été effectuée selon le programme suivant : une étape de chauffage à 25°C pendant 10 minutes, puis la reverse transcription à 42°C pendant 60 minutes et la réaction a été terminée par un chauffage finale à 70°C pendant 10 minutes.

Tableau 15 Séquence des amorces taguées

Amorces tagués	Séquences
<b>A</b>	ATCGTCGTCGTAGGCTGCTC
<b>B</b>	GTATCGCTGGACACTGGACC
<b>C</b>	CGCATTGGTTCGGCACTTGGT
<b>D</b>	CGTAGATAAGCGGTTCGGCTC
<b>E</b>	CGCAGGACCTCTGATACAGG
<b>F</b>	CGCAGGACCTCTGATACAGG
<b>I</b>	CCGAGGTTCAAGCGAGGTTG
<b>J</b>	ACGGTGTGTTACCGACGTCC

Le second brin d'ADNc a été synthétisé en rajoutant à 10 µl d'ADNc synthétisé, 2.5µl des mêmes amorces taguées utilisées précédemment (20µM), 3 µl de tampon de réaction de 10X du kit DNA polymérase I, large (Klenow) Fragment (Fisher scientifique), 1µl de solution de dNTP à 0.5mM, 0.5 U de la polymérase. Le volume réactionnel a été complété à 30µl en rajoutant de l'eau. La réaction de synthèse du second brin a été effectuée à température ambiante pendant 60 minutes.

Pour la PCR, le kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase a été utilisé en préparant le mix suivant: 10µl de tampon 5X, 1 µl de dNTP (10mM), 2µl d'amorces taguées (5µM), 0.5µl d'enzyme de phusion, 5µl d'ADNc double brin et 31.5 µl d'eau. La PCR a été réalisée selon le programme suivant : une étape de dénaturation de 30 secondes à 98°C, puis 40 cycles composés de 10 secondes de dénaturation à 98°C, 20 secondes d'hybridation des amorces à 65°C et 30 secondes d'élongation à 72°C, et pour finir la PCR, une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Les bandes de 300bp ont été coupées du gel. Les bandes de gel ont ensuite été purifiées en utilisant le kit QIAquick

Gel Extraction (Qiagen) en suivant les indications du fournisseur. Le produit de PCR a ensuite été élué dans un volume de 20µl d'eau distillée. L'appareil Qubit® a été utilisé pour déterminer la concentration en ARN et ADN contenue dans le produit de PCR.

#### *Le séquençage et les analyses bio-informatiques*

Les produits de PCR ont ensuite été envoyés à MacroGen pour un séquençage du génome complet. La compagnie a d'abord préparé les bibliothèques de séquençage avec le kit TruSeq puis a effectué le séquençage sur un HiSeq2500, en mode 250bp paired-end.

Les lectures ou reads (petites séquences générées lors du séquençage) de sens forward et reverse obtenues sont démultiplexées et triées en fonction du tag utilisé lors de la PCR. Les séquences correspondantes à chaque échantillon de PPRV ont été regroupées dans un dossier unique sous format fastq. Les tags ont été enlevés des reads et les reads forward et reverse assemblés.

Les reads ainsi obtenus ont été alignés sur un génome complet de référence de la PPR (en première intention celui de la souche vaccinale Nigeria 75/1). L'ensemble de ses manipulations de données ont été réalisées en utilisant les outils disponibles sur les logiciels SAMtools (LI et al., 2009) et bwa (LI and Durbin, 2009) accessibles sur la plateforme Genotoul (Université de Toulouse). Le résultat de l'assemblage final obtenu a été visualisé avec le logiciel IGV (Robinson et al., 2011). La séquence consensus du génome (complet ou partiel) finale a été obtenue avec Geneious v. 8.1.6.

#### 6.2.2 Séquençage par amplification spécifique.

Cette technique se base sur l'amplification par PCR de longs fragments du génome virale en utilisant des amorces spécifiques dessinées le long du génome du PPRV. Le séquençage se fait à partir des produits PCR obtenus. A partir de l'alignement de 48 génomes complets de la PPR (de GenBank et des génomes du CIRAD non publiés), cinq couples d'amorces dénommés F1, F2, F3, F4 et F5 ont été dessinés dans des régions conservées du génome. Ces amorces amplifient des fragments de 3000 à 4000bp et se chevauchent sur environ 300 à 400bp (Figure 28).

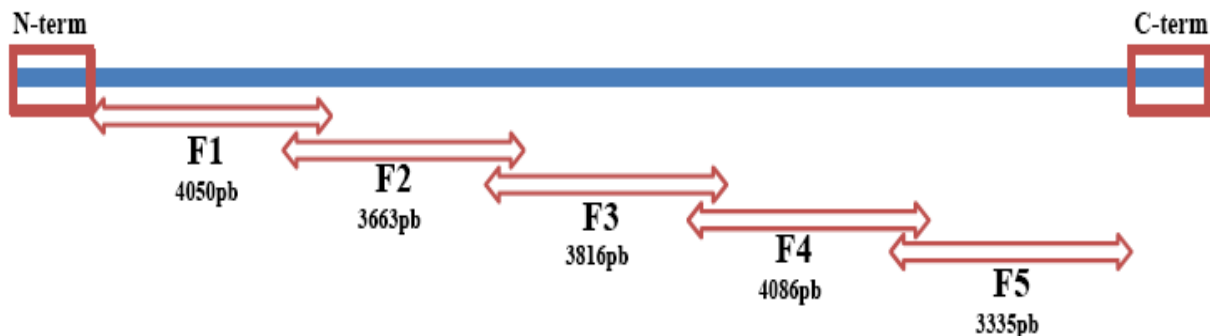


Figure 28 Schéma montrant les amorces spécifiques dessinées pour le séquençage du génome complet du PPRV ainsi que la taille des fragments obtenus après amplification.

Tableau 16 Les couples d'amorces spécifiques (F1 à F5) utilisés pour le séquençage du génome complet avec la technique des longs fragments

Nom de l'amorce	Orientation	Séquence	Position (taille de l'amplicon)
<b>Fragment F1</b>	Forward	CAAACAAAGTTGGGTAAGGA	3 < 4053 (4050bp)
<b>Fragment F1</b>	Reverse	TTCTCCCATGAGCCGACTATGTA	
<b>Fragment F2</b>	Forward	TATTACAAAAAAGCTTAGGAGCAAGGG	3394 < 7057 (3663bp)
<b>Fragment F2</b>	Reverse	CAGCAGCATATTAATGTGACAAG	
<b>Fragment F3</b>	Forward	CTTGCAAATAAGGAGACCATACT	6025 < 9841 (3816bp)
<b>Fragment F3</b>	Reverse	GGCATATATGGGACTGTTCTTT	
<b>Fragment F4</b>	Forward	CACAACCCAGCCAACAATGTTAT	9247 < 13066 (3800bp)
<b>Fragment F4</b>	Reverse	GCTAGCATCCAAGCTTCACTCCATGA	
<b>Fragment F5</b>	Forward	CGCCTTTCCAATTATGATTA	12607 < 15942 (3335bp)
<b>Fragment F5</b>	Reverse	GAGACAAAGCTGGGAATAGA	

#### Le matériel biologique

Les échantillons utilisés sont les écouvillons nasaux, oculaires et buccaux provenant d'animaux testés positifs par PCR en utilisant les amorces NP3/NP4 spécifiques de PPRV. Des souches de PPRV isolées sur des cellules CHS et BTS-34 ont également été utilisées.

Tout comme pour la méthode SISPA, la sélection des souches à séquencer a été faite pour obtenir le génome complet des souches représentatives de toutes les lignées circulant au Mali de 1999 à 2016. (Tableau 17). Les échantillons sont un peu différents de ceux utilisés avec la méthode SISPA car le stock de certains échantillons était épuisé. Néanmoins, les échantillons finis ont été remplacé par d'autres provenant de la même zone.

Au total, 22 échantillons provenant des différents pays de l'Afrique ont été préparés et envoyés à séquencer (19 échantillons du Mali, un du Ghana et 2 du Sénégal).

Tableau 17 Récapitulatif des échantillons du Mali de 1999 à 2016 séquencés suivant la méthode d'amplification spécifique

Nom des souches	Pays / Région	Année de collecte	Lignée	Souches isolées
<b>MALI_CPI_NAS_KOLONDIÉBA_KAKOLI_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_AN3_LAC_SEKOU_YEMFOLILA_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_CPI_LAC_KOLONDIÉBA_KAKOLI_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_AN9_LAC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	



<b>MALI_AN9_NAS_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_AN10_BUCC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_KEN_39BIS_KAYES_2016</b>	Mali/Kayes	2014	II	
<b>SENEGAL_MISSION1_31_2017</b>	Sénégal/Kédougou	2017	II	
<b>MALI_AN12_LAC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_AN10_NAS_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_AN13_LAC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_AN14_LAC_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_AN14_NAS_TOUSSEG_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>GHANA_5_ISOLAT_2014</b>	Ghana	2014	II	Isolée
<b>MALI_KEN_44_KAYES_2016</b>	Mali/Kayes	2014	II	
<b>MALI_KEN_47_KAYES_2016</b>	Mali/Kayes	2014	II	
<b>SENEGAL_MISSION1_32_2017</b>	Sénégal/Kédougou	2017	II	
<b>MALI_AN3_NAS_SEKOU_YEMFOLILA_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_CP5_LAC_KOLON DIEBA_KAKOLI_SIKASSO_2014</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>MALI_373_ISOLAT_BAMAKO_1999</b>	Mali/Sikasso	2014	II	Isolée
<b>MALI_2014_LFMacrog</b>	Mali/Sikasso	2014	II	
<b>DIALAN_NAS_AGAP_06_2017</b>	Mali/Sikasso	2015	I	

✓ La synthèse de l'ADNc à partir des cinq couples d'amorces spécifiques

L'ARN viral a été extrait à l'aide du kit Nucleospin RNA (Macherey Nagel) selon les indications du fournisseur.

L'ARN viral a été reverse-transcrit en ADNc en utilisant pour chaque échantillon les 5 couples d'amorces spécifiques (F1 à F5) (Tableau 16). Pour la reverse transcription, ont été mis en mélange, 2 µl d'ARN viral, 2 µl d'amorce Forward (de 10 µM), 2 µl d'amorce Reverse (de 10 µM) et le mix a été complété à 12 µl avec 6 µl d'eau distillée. Le mix a été incubé pendant 5 min à 65°C, puis gardé dans la glace. Ensuite, nous avons ajouté à ce mélange, 4 µl de tampon 5X du kit RevertAid First Strand cDNA synthesis (Fischer scientifique), 1 µl de RNaseOut (RevertAid First Strand cDNA synthesis, Fischer scientifique), 2 µl de désoxynucléosidetriphosphate (dNTP) de concentration 10mM (Fisher scientifique) et 1 µl de la reverse transcriptase RevertAid (RevertAid First Strand cDNA synthesis, Fischer scientifique). La réaction de reverse transcription a été effectuée à 42°C pendant 60 minutes et la réaction a été terminée par un chauffage finale à 70°C pendant 5 minutes. L'ADNc obtenu a été conservé à -20°C avant l'étape de la PCR.

*L'amplification des échantillons avec les amorces spécifiques*

Pour amplifier les échantillons, deux types de kit PCR ont été utilisés: les kits Kapa (Biosystems) et Phusion (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Science). Ces deux kits sont des enzymes (ADN polymérase) qui ont une activité de polymérisation très efficace et font moins d'erreur grâce à leur activité exonucléasique. Nous avons utilisé deux kits afin de voir si l'un d'eux amplifiait mieux les échantillons. Partant du protocole initial du fournisseur, nous avons mis au point deux protocoles qui permettent d'amplifier de manière efficace les souches contenant le PPRV avec les 5 couples d'amorces spécifiques.

- Pour le kit Phusion

La PCR a été effectuée avec les mêmes amorces spécifiques que celles de la reverse transcription.

Pour la PCR, à 5µl d'ADNc a été rajouté le mix de PCR suivant en utilisant le kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase: 10µl de tampon 5X, 1 µl de dNTP (10mM), 2µl d'amorce forward (10µM), 2µl d'amorce reverse (10µM), 0.5µl d'enzyme de phusion et 29.5 µl d'eau. La PCR a été réalisée selon différents programmes en fonction du couple d'amorces. En effet pour chaque couple d'amorces, il faut une température d'hybridation spécifique pour un temps d'élongation spécifique. La PCR a été réalisée selon le programme suivant : une étape de dénaturation initiale de 1 minute à 95°C, puis 40 cycles composés de 20 secondes de dénaturation à 98°C, 20 secondes d'hybridation (voir Tableau 18 pour la température) et l'élongation à 72°C (voir Tableau 18 ), et pour finir la PCR, une étape d'élongation finale à 72°C pendant 10 minutes.

Tableau 18 Tableau récapitulatif des différentes conditions de PCR (température d'hybridation et temps d'élongation) pour chaque couple d'amorces

Fragment	Température d'hybridation	Temps d'élongation
<b>Fragment 1 (F1)</b>	60°C	5min
<b>Fragment 2 (F2), Fragment 4 (F4) et Fragment 5 (F5)</b>	55°C	5min
<b>Fragment 3 (F3)</b>	62°C	3min

- Pour le kit Kapa

Pour la PCR, à 5µl d'ADNc a été rajouté le mix de PCR suivant en utilisant le kit Kapa: 10µl de tampon 5X, 1.5 µl de dNTP (10mM), 1.5µl d'amorce forward (10µM), 1.5µl d'amorce reverse (10µM), 1µl d'enzyme de kapa et 29.5 µl d'eau. La PCR a été réalisée selon le programme suivant pour les couples d'amorces F2, F3, F4 et F5 : une étape de dénaturation initiale de 3 minute à 95°C, puis 10 cycles composés de 20 secondes de dénaturation à 98°C, 15 secondes d'hybridation à 50°C et 5 minutes d'élongation à 72°C, puis 25 cycles composés de 20 secondes de dénaturation à 98°C, 15 secondes d'hybridation à 55.2°C et 5 minutes d'élongation à 72°C et pour finir la PCR, une étape d'élongation finale à 72°C pendant 4 minutes. Pour le couple d'amorces F1, la PCR a été réalisée selon le programme suivant : une étape de dénaturation initiale de 3 minute à 95°C, puis 10 cycles composés de 20 secondes de dénaturation à 98°C, 15 secondes de d'hybridation à 55°C et 4 minutes d'élongation à 72°C, puis 25 cycles composés de 20 secondes de dénaturation à 98°C, 15 secondes de d'hybridation à 58.9°C et 4 minutes d'élongation à 72°C et pour finir la PCR, une étape d'élongation finale à 72°C pendant 4 minutes.

Les produits d'amplification obtenus des PCR avec le kit Kapa ou Phusion ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5%. Les bandes ont été coupées du gel à la taille attendue (entre 3000bp et 4000bp). Les bandes de gel sont ensuite purifiées en utilisant le kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) en suivant les indications du fournisseur. Le produit de PCR a ensuite été élué

dans un volume de 42µl d'eau distillée. L'appareil Qubit® a été utilisé pour déterminer la concentration en ADN contenue dans le produit de PCR.

#### *Préparation des librairies de séquençage*

Les banques (librairies) de séquençage ont été préparées pour le séquençage du génome complet en suivant le protocole Nextera® XT DNA. La préparation des librairies Nextera contient trois étapes essentielles. La première étape consiste à effectuer une tagmentation de l'ADN. C'est un processus qui fragmente l'ADN puis marque l'ADN avec des séquences d'adaptateurs en une seule étape. La seconde étape est l'amplification des librairies. Cette étape amplifie l'ADN tagmenté en ajoutant les adaptateurs index 1 et index 2 requis pour la formation des clusters. Une troisième étape permet le nettoyage des librairies. Cette étape utilise des billes AMPure XP pour purifier l'ADN de la librairie et effectuer une sélection en fonction de la taille des fragments. Cette étape élimine les fragments de la librairie trop petits pour être utiles lors du séquençage.

#### *Vérification de la qualité des librairies*

Une étape de vérification des librairies est nécessaire avant le séquençage. Tout d'abord, une PCR quantitative (Q-PCR) (kit Library quantification, Takara Cloneteck) permet d'évaluer la quantité exacte de matériel pour chaque librairie. Ensuite, une analyse avec le bio analyser (Agilent 2100 Bioanalyser, kit Agilent High Sensitivity DNA, Agilent technologies) permet d'évaluer la distribution des tailles des fragments au sein de chaque librairie. La quantité et la taille moyenne de chaque librairie ont été utilisées pour pooler de manière équimolaire les librairies à séquençer dans un même run sur plateforme Illumina.

#### *Le séquençage et les analyses bio-informatiques.*

Les données obtenues ont été soumises au traitement bioinformatique décrit dans la section 6.2.1.

### 6.2.3 Les analyses phylogénétiques et de datations moléculaires à partir des génomes complets et incomplets

Les analyses en datation moléculaire ont été effectuées sur un alignement de séquences de génomes PPR complets ou quasi complets (sans 1-5 nucléotides aux extrémités) incluant les séquences obtenues pendant ce projet, ainsi que des génomes complets provenant de GenBank et de travaux non publiés du CIRAD (Tableau 19). Les mêmes analyses ont été effectuées sur un alignement incluant des génomes incomplets (couverture >90%) à l'alignement de base. Cela permet d'ajouter des séquences additionnelles obtenues pendant le projet ainsi que des séquences historiques (1972-78) très rares et utiles pour ce genre d'analyses de datation (Tableau 19).

Le logiciel MEGA 7 (Kumar S. et al., 2016) a été utilisé pour réaliser les alignements avec la méthode Clustal W. A partir des alignements obtenus, le meilleur modèle de substitution a été choisi par AICM sur MEGA 7. Le modèle de type GTR (General Time Reversible) avec sites Invariables et une distribution Gamma (+I+G) a été retenu. Les arbres phylogénétiques ont été construits avec la méthode de Maximum de Vraisemblance avec un ré-échantillonnage de 1000 (bootstraps).

Les mêmes analyses ont été effectuées pour les deux bases de données.

Le logiciel BEAST (Suchard MA et al., 2018) a été utilisé pour réaliser les analyses de datations. A chaque séquence des alignements a été associée la date d'échantillonnage. Une horloge moléculaire de type relâché ayant une distribution exponentielle non-corrélée (UCED) a été choisie, car des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que cette horloge était la plus appropriée pour ce type de données (communication personnelle). Trois modèles de coalescence démographique ont été testés : un modèle de population de taille constante, un de croissance exponentiel, et un dernier de croissance en expansion. Ces trois modèles ont été testés sur nos deux bases de données (génomes complets et génomes incomplets).

Chacun des modèles a ensuite été soumis à une analyse des Chaînes de Monte Carlo Markov (MCMC) de 200.000.000 itérations avec un échantillonnage toutes les 5000 itérations. Le modèle le plus adapté



à notre jeu de données a été déterminée par comparaison des valeurs de vraisemblance (marginal log likelihoods) en calculant le Bayes factor pour chaque modèle sur le logiciel Tracer. La convergence des paramètres d'analyse obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel Tracer par le calcul des probabilités postérieures (ESS > 100 au minimum).

L'arbre consensuel (MCC Tree, Maximum Clade Credibility) a été calculé par le logiciel Tree Annotator et visualisé dans le logiciel Figtree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) après élimination des 2000 premiers arbres générés (burn-in).

Tableau 19 Liste des séquences de génomes provenant de notre étude (\*), de la thèse de H.Salami (§) et de GenBank utilisées pour l'analyse de datation moléculaire

Nom de la séquence	Pays	Date de collecte	de Lignée	Taille de la séquence analysée	N° d'accension
*MALI_CP1_NAS_KOLONDI IEBA_KAKOLI_SIKASSO_2014	Mali	2014	II	Complète	
*MALI_AN3_LAC_SEKOU_YEMFOLILA_SIKASSO_2014	Mali	2014	II	Complète	
*MALI_CP1_LAC_KOLONDI DIEBA_KAKOLI_SIKASSO_2014	Mali	2014	II	Complète	
*MALI_AN9_LAC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali	2014	II	Complète	
*MALI_AN9_NAS_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali	2014	II	Complète	
*MALI_AN10_BUCC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali	2014	II	Complète	
*MALI_KEN_39BIS_KAYES_2016	Mali	2016	II	Complète	
*SENEGAL_MISSION1_31_2017	Sénégal	2017	II	Complète	
*MALI_AN12_LAC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali	2014	II	Complète	
*MALI_AN10_NAS_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali	2014	II	Complète	
*MALI_AN13_LAC_SAMAKO_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali	2014	II	Complète	
*MALI_AN14_LAC_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali	2014	II	Complète	
*MALI_AN14_NAS_TOUSSEG_SIKASSO_2014	Mali	2014	II	Complète	
*GHANA_5_ISOLAT_2014	Ghana	2014	II	Complète	
*MALI_KEN_44_KAYES_2016	Mali	2016	II	Complète	
*MALI_KEN_47_KAYES_2016	Mali	2016	II	Complète	
*SENEGAL_MISSION1_32_2017	Sénégal	2017	II	Complète	

<b>*MALI_AN3_NAS_SEKOU_YEMFOLILA_SIKASSO_2014</b>	Mali	2014	II	Complète	
<b>*MALI_CP5_LAC_KOLON_DIEBA_KAKOLI_SIKASSO_2014</b>	Mali	2014	II	Complète	
<b>*MALI_373_ISOLAT_BAM_AKO_1999</b>	Mali	1999	II	Complète	
<b>*MALI_2014_LFMacrog</b>	Mali	2014	II	Complète	
<b>*MALI_373_ISOLAT_BAM_AKO_1999</b>	Mali	1999	II	Complète	
<b>*SEGOU_I_M6_NASAL</b>	Mali	2014	I	Incomplète	
<b>*DIALAN_NAS_AGAP_06_2017</b>	Mali	2015	I	Incomplète	
<b>*MALI_KEN_49_KAYES_2016</b>	Mali	2016	II	Incomplète	
<b>*MALI_KEN_40_KAYES_2016</b>	Mali	2016	II	Incomplète	
<b>§ SnNgu2_2010</b>	Sénégal	2010	II	Complète	
<b>§ SnNga9_2010</b>	Sénégal	2010	II	Complète	
<b>§ MrTa_2012</b>	Sénégal	2012	II	Complète	
<b>§ Guinee_2013</b>	Guinée	2013	II	Complète	
<b>Algerie_2012</b>	Algérie	2012	IV	Complète	
<b>§ Mali_4_2014</b>	Mali	2014	II	Complète	
<b>§ Mali_6_2014</b>	Mali	2014	II	Complète	
<b>§ Mali_18_2014</b>	Mali	2014	II	Complète	
<b>§ Comores_2012</b>	Comores	2012	III	Complète	
<b>§ SnPaI_2013</b>	Sénégal	2013	II	Complète	
<b>§ Mali_10_2014</b>	Mali	2014	II	Complète	
<b>§ SnMe3_2012</b>	Sénégal	2012	II	Complète	
<b>§ SnJoI_2013</b>	Sénégal	2013	II	Complète	
<b>§ SnMe_2013</b>	Sénégal	2013	II	Complète	
<b>§ SnSoI_2012</b>	Sénégal	2012	II	Complète	
<b>§ SnNgaII_2010</b>	Sénégal	2010	II	Complète	
<b>Turkey2000</b>	Turquie	2000	IV	Complète	AJ849636
<b>Nigéria_Ng76</b>	Nigéria	1976	II	Complète	ET267274
<b>China_Tibet_Geg_07-30</b>	Chine	2007	IV	Complète	FJ905304
<b>China_Tib_07</b>	Chine	2007	IV	Complète	JF939201
<b>Tibet_Bharal_2008</b>	Chine	2008	IV	Complète	JX217850
<b>Morocco_2008</b>	Maroc	2008	IV	Complète	KC594074
<b>Ghana_NK1_2010</b>	Ghana	2010	II	Complète	KJ466104
<b>Ethiopia_1994</b>	Ethiopie	1994	III	Complète	KJ867540
<b>Ethiopia_2010</b>	Ethiopie	2010	IV	Complète	KJ867541
<b>Uganda_2012</b>	Uganda	2012	III	Complète	KJ867543
<b>Oman_1983</b>	Oman	1983	III	Complète	KJ867544
<b>TAE_1986</b>	Emirats Arabes Unis	1986	III	Complète	KJ867545
<b>CH_HNNY_2014</b>	Chine	2014	IV	Complète	KM089830
<b>CH_HNZK_2014</b>	Chine	2014	IV	Complète	KM089831
<b>CH_HNZM_2014</b>	Chine	2014	IV	Complète	KM089832
<b>Senegal_SnDk11I_2013</b>	Sénégal	2013	II	Complète	KM212177
<b>Kenya_KN5_2011</b>	Kenya	2011	III	Complète	KM463083



<b>China_BJ_2014</b>	Chine	2014	IV	Complète	KP260624
<b>E32_1969</b>	Sénégal	1969	I	Complète	KP789375
<b>CH_GDDG_2014</b>	Chine	2014	IV	Complète	KP868655
<b>India_TN_Gingee_2014</b>	Inde	2014	IV	Complète	KR261605
<b>CIV_01P_2009</b>	Côte d'Ivoire	2009		Complète	KR781451
<b>Senegal_E32_1969</b>	Sénégal	1969	I	Complète	
<b>Benin_B1_1969</b>	Benin	1969	II	Complète	KR781450
<b>Benin_10_2011</b>	Benin	2011	II	Complète	KR781449
<b>Ghana_76</b>	Ghana	1976	II	Incomplète	
<b>Accra_76</b>	Ghana	1976	II	Incomplète	
<b>Ghana_78</b>	Ghana	1978	II	Incomplète	
<b>Soudan_1972</b>	Soudan	1972	III	Incomplète	

## 6.3 Les résultats

### 6.3.1 Le séquençage du génome complet par amplification aléatoire (SISPA)

Au total 24 échantillons provenant des différents pays de l'Afrique ont été séquencés. Les pays concernés sont : le Mali, le Ghana, le Congo et le Burkina Faso. Sur ces 24 échantillons, nous avons obtenu le génome complet du PPRV d'un seul échantillon MALI\_373\_ISOLAT\_BAMAKO\_1999 (un échantillon récolté au Mali en 1999) et pour 4 autres, un génome quasi complet (échantillons provenant également du Mali et récoltés en 2014 et 2016).

Tableau 20 Le récapitulatif du séquençage avec la méthode SISPA

Nom des souches	Nombre total de reads	Nombre de reads spécifiques PPR	de	Commentaire sur la couverture
<b>MALI_373_ISOLAT_BAMAKO_1999</b>	71168	2101 (2.9%)		Génome complet
<b>SEGOU_I_M6_NASAL</b>	285530	1865 (0.7%)		Génome incomplet comportant six trous et beaucoup de nucléotides manquants aux extrémités
<b>DIALAN_NAS_AGAP_06_2017</b>	377274	1942 (0.5%)		Génome incomplet avec deux trous et beaucoup de nucléotides manquants aux extrémités
<b>MALI_KEN_49_KAYES_2016</b>	211443	8487 (4%)		Génome incomplet comportant plusieurs (24) trous et beaucoup de nucléotides manquants aux extrémités
<b>MALI_KEN_40_KAYES_2016</b>	327910	1256 (0.38%)		Génome incomplet comportant plusieurs (12) trous et beaucoup de nucléotides manquants aux extrémités

Le nombre de reads obtenus spécifiques au génome du PPRV est très faible (entre 0.38% à 4%) (Tableau 20) comparé au nombre total de reads obtenus. Ces reads n'ont pas permis de couvrir

l'ensemble du génome du PPRV sauf pour MALI\_373\_ISOLAT\_BAMAKO\_1999. Il en résulte cependant des génomes incomplets avec des trous importants (Tableau 20, Figure 29).

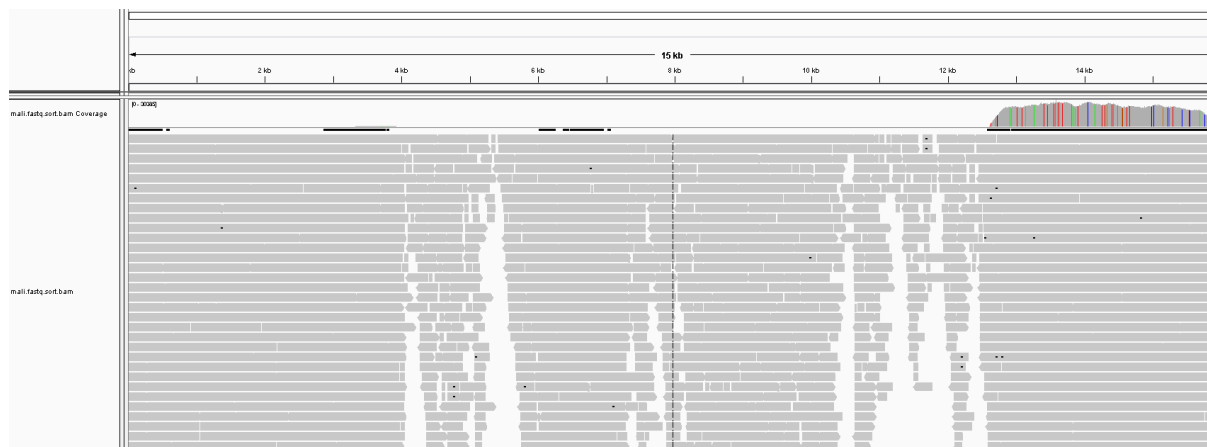


Figure 29 Visualisation d'un génome incomplet comportant quelques trous d'une souche du Mali (MALI\_KEN\_49\_KAYES\_2016) avec le logiciel IGV. Alignement des reads de la souche avec un génome référence du PPRV. Les barres grises représentent les reads spécifiques alignés à une région du génome du PPRV et les zones blanches représentent les trous.

### 6.3.2 Le séquençage du génome complet par la méthode d'amplifications spécifique

Nous avons obtenu pour l'ensemble des échantillons un nombre de reads compris entre 800.000 et 2 millions.

Sur l'ensemble des 22 échantillons envoyés pour le séquençage, nous avons obtenu le génome quasi complet pour 21 échantillons. Dans la plupart des cas, seuls quelques nucléotides (entre 1 et 5 nucléotides) manquent à chaque extrémité du génome (Tableau 21). Les Figure 30 et Figure 31 nous montrent la visualisation de génomes complet et quasi complet avec le logiciel IGV. Tous ces échantillons appartiennent à la lignée II du PPRV.

Tableau 21 Le récapitulatif du séquençage avec la méthode d'amplification spécifique.

Nom des souches	Nombre de reads total	Nombre de reads spécifiques PPR (Pourcentage)	Commentaire sur la couverture
MALI_CPI_NAS_KOLON DIEBA_ KAKOLI_SIKASSO_2014	807234	769539 (95%)	Manque 3 nucléotides aux extrémités
MALI_AN3_LAC_SEKOU_YEMFO LILA_SIKASSO_2014	2059637	1043780 (51%)	Manque 8 nucléotides aux extrémités
MALI_CPI_LAC_KOLON DIEBA_ KAKOLI_SIKASSO_2014	1151056	1111217 (97%)	Manque 3 nucléotides aux extrémités
MALI_AN9_LAC_SAMAKO_TOUS SEG_SIKASSO_2014	1952223	928955 (48%)	Manque 1 nucléotide aux extrémités
MALI_AN9_NAS_SAMAKO_TOUSS	1506296	1475585 (98%)	Manque 2 nucléotides aux extrémités

<b>EG_SIKASSO_2014</b>			extrémités	
<b>MALI_AN10_BUCC_SAMAKO_TO USSEG_SIKASSO_2014</b>	1555165	1492200 (96%)	Manque nucléotides extrémités	3 aux
<b>MALI_KEN_39BIS_KAYES_2016</b>	1602859	756143 (47%)	Manque nucléotides extrémités	9 aux
<b>SENEGAL_MISSION1_31_2017</b>	1263045	955380 (76%)	Manque nucléotides extrémités	6 aux
<b>MALI_AN12_LAC_SAMAKO_TOU SSEG_SIKASSO_2014</b>	1720915	1698817 (99%)	Manque nucléotides extrémités	3 aux
<b>MALI_AN10_NAS_SAMAKO_TOUS SEG_SIKASSO_2014</b>	1448378	932324 (64%)	Manque 1 nucléotide aux extrémités	
<b>MALI_AN13_LAC_SAMAKO_TOU SSEG_SIKASSO_2014</b>	98275	94187 (96%)	Manque nucléotides extrémités	2 aux
<b>MALI_AN14_LAC_TOUSSEG_SIKA SSO_2014</b>	2200573	2149574 (98%)	Manque nucléotides extrémités	3 aux
<b>MALI_AN14_NAS_TOUSSEG_SIKA SSO_2014</b>	1902815	1667578 (88%)	Manque nucléotides extrémités	3 aux
<b>GHANA_5_ISOLAT_2014</b>	1468044	1423048 (97%)	Manque nucléotides extrémités	2 aux
<b>MALI_KEN_44_KAYES_2016</b>	1917588	1657307 (86%)	Manque nucléotides extrémités et un trou	2 aux
<b>MALI_KEN_47_KAYES_2016</b>	1672571	1418625 (85%)	Manque nucléotides extrémités	2 aux
<b>SENEGAL_MISSION1_32_2017</b>	930486	447084 (48%)	Manque nucléotides extrémités	5 aux
<b>MALI_AN3_NAS_SEKOU_YEMFO LILA_SIKASSO_2014</b>	1395318	131837 (94%)	Manque nucléotides extrémités	6 aux
<b>MALI_CP5_LAC_KOLONDIÉBA_K AKOLI_SIKASSO_2014</b>	166043	162447 (98%)	Manque nucléotides extrémités	3 aux
<b>MALI_373_ISOLAT_BAMAKO_199 9</b>	185588	165069 (89%)	Manque nucléotides extrémités	8 aux
<b>MALI_2014_LFMacrog</b>			Génome complet	

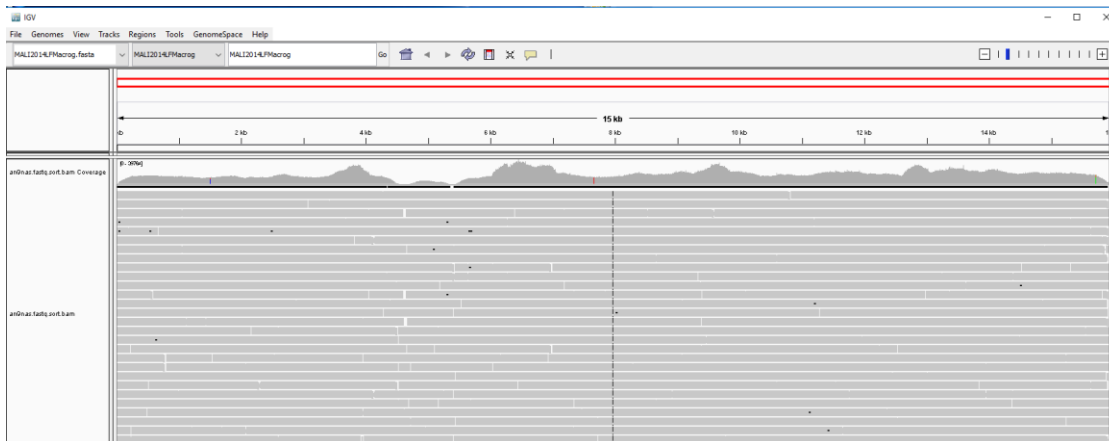


Figure 30 Visualisation d'un génome complet d'une souche du Mali (MALI\_AN9\_NAS\_SAMAKO\_TOUSSEG\_SIKASSO\_2014) avec le logiciel IGV.

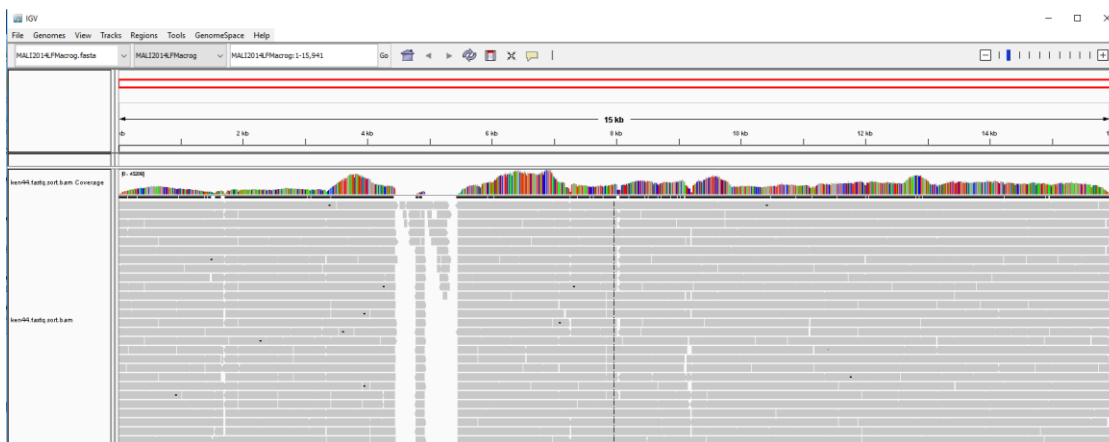


Figure 31 Visualisation d'un génome quasi complet comportant un trou d'une souche du Mali (MALI\_KEN\_44\_KAYES\_2016) avec le logiciel IGV.

Avec la technique d'amplification spécifique, nous avons obtenu un nombre plus important de reads (jusqu'à 2 millions de reads) par échantillon. En plus de cela, le nombre de reads spécifiques au génome du PPRV était très élevé pouvant atteindre jusqu'à 99% des reads totaux.

Nous avons testé la technique avec les échantillons de la lignée IV du Mali (les souches provenant de Mopti) afin d'obtenir le génome complet des souches représentatives de toutes les lignées de PPRV présentes au Mali. Mais malheureusement, nous n'avons pas réussi à amplifier ces souches avec toutes les amorces.

### 6.3.3 La phylogénie avec les génomes complets et incomplets

L'analyse phylogénétique par maximum de vraisemblance à partir de génomes complets et incomplets nous a permis d'obtenir une phylogénie présentant les quatre lignées différentes du PPRV (I, II, III, et IV) (Figure 32 et Figure 33). Conformément à la répartition phylogéographique des différentes souches de la PPR, les anciennes souches de lignées I et II se localisent en Afrique de l'Ouest comme le montre la souche du Sénégal de 1969 et les souches de la lignée II du Mali de 1999, du Nigéria de 1976 et du Bénin en 1969. Cette même répartition est obtenue avec les génomes complets et incomplets. Les génomes incomplets regroupent deux souches anciennes supplémentaires du Ghana de 1976 et 1978 qui se localisent dans le clade des anciennes souches de la lignée II de l'Afrique de l'Ouest.

Les analyses phylogénétiques montrent également qu'en Afrique de l'Est les souches Ethiopie 1994, Soudan 1972 et Oman 1983 forment un clade ancien de la lignée III, séparée des souches plus récentes Kenya 2011, Ouganda 2012 et Comores 2012 (Figure 32 et Figure 33).

Les souches de la lignée IV, beaucoup plus répandues, se distribuent en Asie, comme celles de Chine 2014 et Inde de 2014. Elles se trouvent également en Afrique, notamment en Afrique de l'Est avec la souche de l'Ethiopie de 2010, et en Afrique du Nord détectée lors de foyers en 2008 au Maroc et en 2012 en Algérie. Cette répartition phylogénétique est obtenue avec les deux types de données (Figure 32 et Figure 33).

Les différentes souches de PPRV récoltées au Mali en 2014, 2016, au Sénégal en 2010, 2012, 2013, 2016 et au Ghana en 2014 sont toutes regroupées dans le clade de la lignée II (Figure 32 et Figure 33). Différents sous-groupes peuvent être observés. L'ensemble des souches anciennes de la lignée II provenant du Ghana et Benin forme un clade séparé de la souche Nigéria 1976 et de l'ensemble des souches récentes de lignée II. Deux sous-groupes de souches récentes de lignée II sont spécifiques au Mali. Un autre associe des souches du Mali et des souches du Sénégal à la frontière du Mali. Un autre associe des souches du Mali, Sénégal, Mauritanie et Guinée.

Les analyses phylogénétiques réalisées à partir de données de génomes incomplets placent les souches du Mali de la région de Ségou et Sikasso (Segou\_I\_M6\_Nasal et DIALAN\_NAS\_AGAP\_06\_2017) au sein de la lignée I (Figure 33).

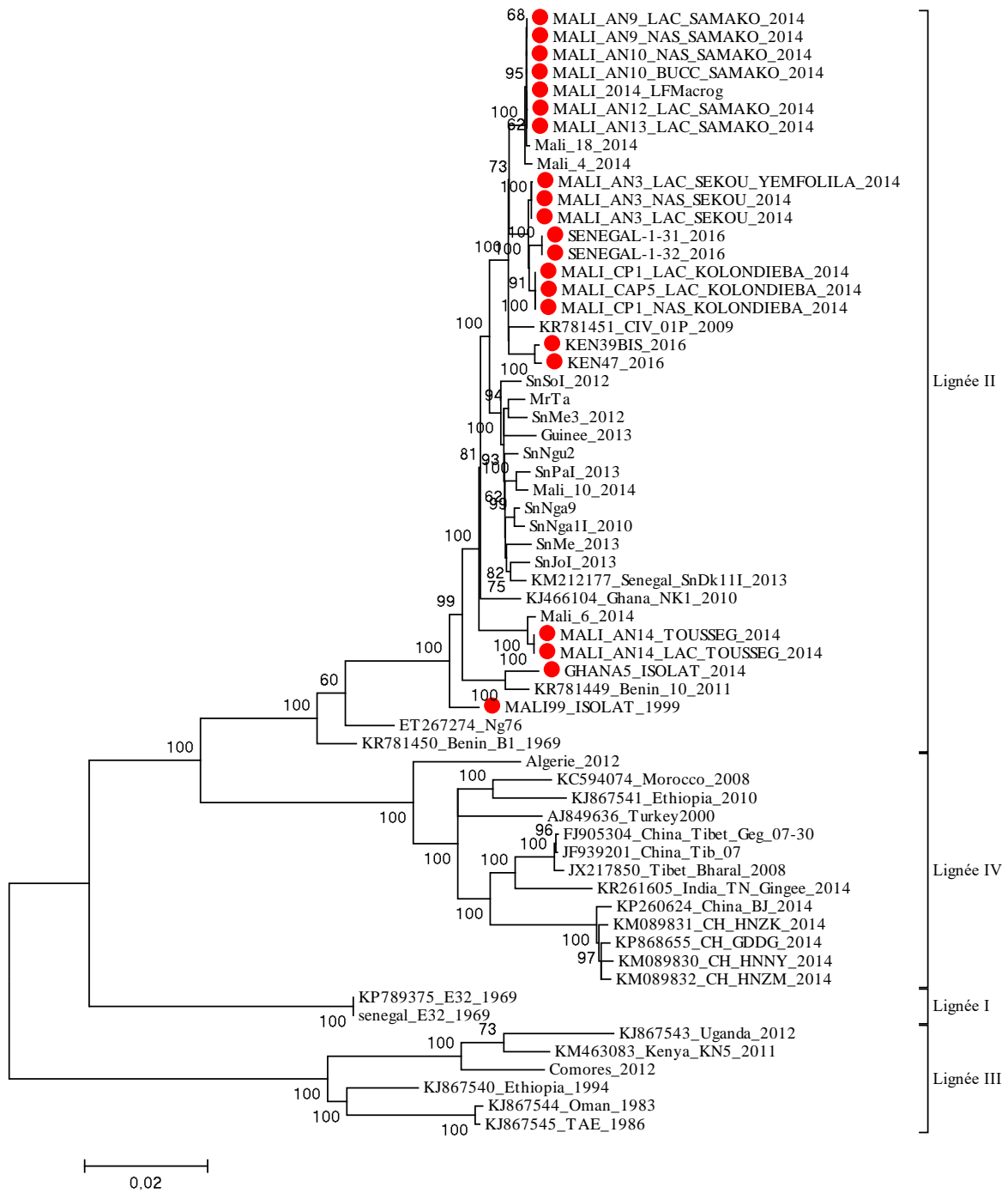


Figure 32 Analyse phylogénétique avec les génomes complets par la méthode de Maximum de Vraisemblance. Les souches de notre étude sont représentées par des points rouges.

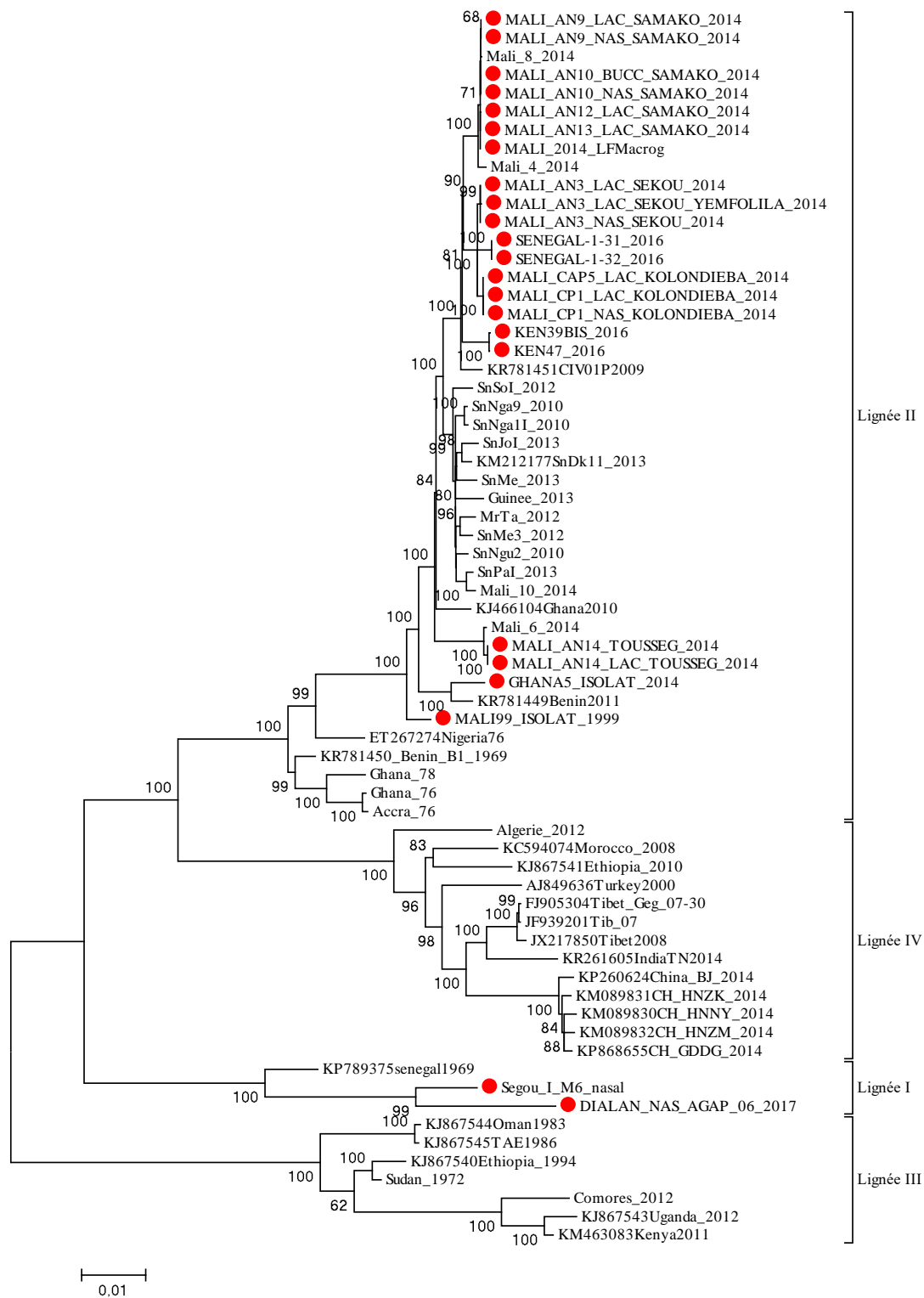


Figure 33 Analyse phylogénétique avec les génomes incomplets par la méthode de Maximum de Vraisemblance. Les souches de notre étude sont représentées par des points rouges.



### 6.3.4 Les analyses de datations moléculaires à partir des génomes complets et génomes incomplets

#### *Estimation du taux d'évolution*

Le logiciel BEAST a été utilisé pour calculer les taux de substitutions nucléotidiques des génomes complets et incomplets. Sous ces différents paramètres, le taux moyen d'évolution de toutes les lignées de PPRV pour les génomes complets a été estimé à  $1,01 \times 10^{-3}$  substitution/site/an (95% HPD  $6,76 \times 10^{-4}$ ,  $1,38 \times 10^{-3}$ ) et pour les génomes incomplets il a été estimé à  $7,42 \times 10^{-4}$  substitution/site/an (95% HPD  $4,91 \times 10^{-4}$ ,  $1,03 \times 10^{-3}$ ) (Tableau 22).

Tableau 22 Récapitulatif du taux d'évolution en fonction du génome

Type de génome	Estimation du taux d'évolution
<b>Génome complet</b>	<b><math>1,01 \times 10^{-3}</math> substitution/site/an (95% HPD <math>6,76 \times 10^{-4}</math>, <math>1,38 \times 10^{-3}</math>)</b>
<b>Génome incomplet</b>	<b><math>7,42 \times 10^{-4}</math> substitution/site/an (95% HPD <math>4,91 \times 10^{-4}</math>, <math>1,03 \times 10^{-3}</math>)</b>

#### *Estimation des TMRCA des différentes lignées*

L'arbre consensuel (MCC Tree, Maximum Clade Credibility) a permis d'estimer à partir des génomes complets et incomplets le *time since most recent common ancestor* (TMRCA) des différentes lignées. L'âge de l'ancêtre commun le plus récent des 4 lignées du PPRV a été estimé pour le génome complet autour de 1899 (95% HPD 1822-1950) et pour le génome incomplet, autour de 1863 (95% HPD 1754-1938) (Tableau 23). L'ancêtre commun le plus récent de la lignée I est estimé autour de 1968 (95% HPD 1968-1969) pour le génome complet et autour de 1953 (95% HPD 1935-1968) pour le génome incomplet. Le TMRCA des virus de la lignée II est estimé autour de 1961 (95% HPD 1952-1969) pour le génome complet et estimé autour de 1956 (95% HPD 1967-1944) pour le génome incomplet. Le TMRCA des virus de la lignée III est estimé autour de 1955 (95% HPD 1948-1980) pour le génome complet et autour de 1949 (95% HPD 1923-1968) pour le génome incomplet. L'ancêtre commun le plus récent des souches de la lignée IV est daté autour de 1988 (95% HPD 1978-1998) pour le génome complet et autour de 1984 (95% HPD 1972-1996) pour le génome incomplet (Tableau 24). Au niveau du groupe de la lignée IV, nous avons deux sous-clades, l'un correspondant à la lignée IV Africaine qui émergé en 1998 (95% HPD 1991-2004) pour le génome complet et autour de 1994 (95% HPD (1986-2003) pour le génome incomplet et l'autre à la lignée IV Asiatique qui a émergé en 1991 (95% HPD 1983-1998) pour le génome complet et en 1987 (95% HPD 1979-1997) pour le génome incomplet.

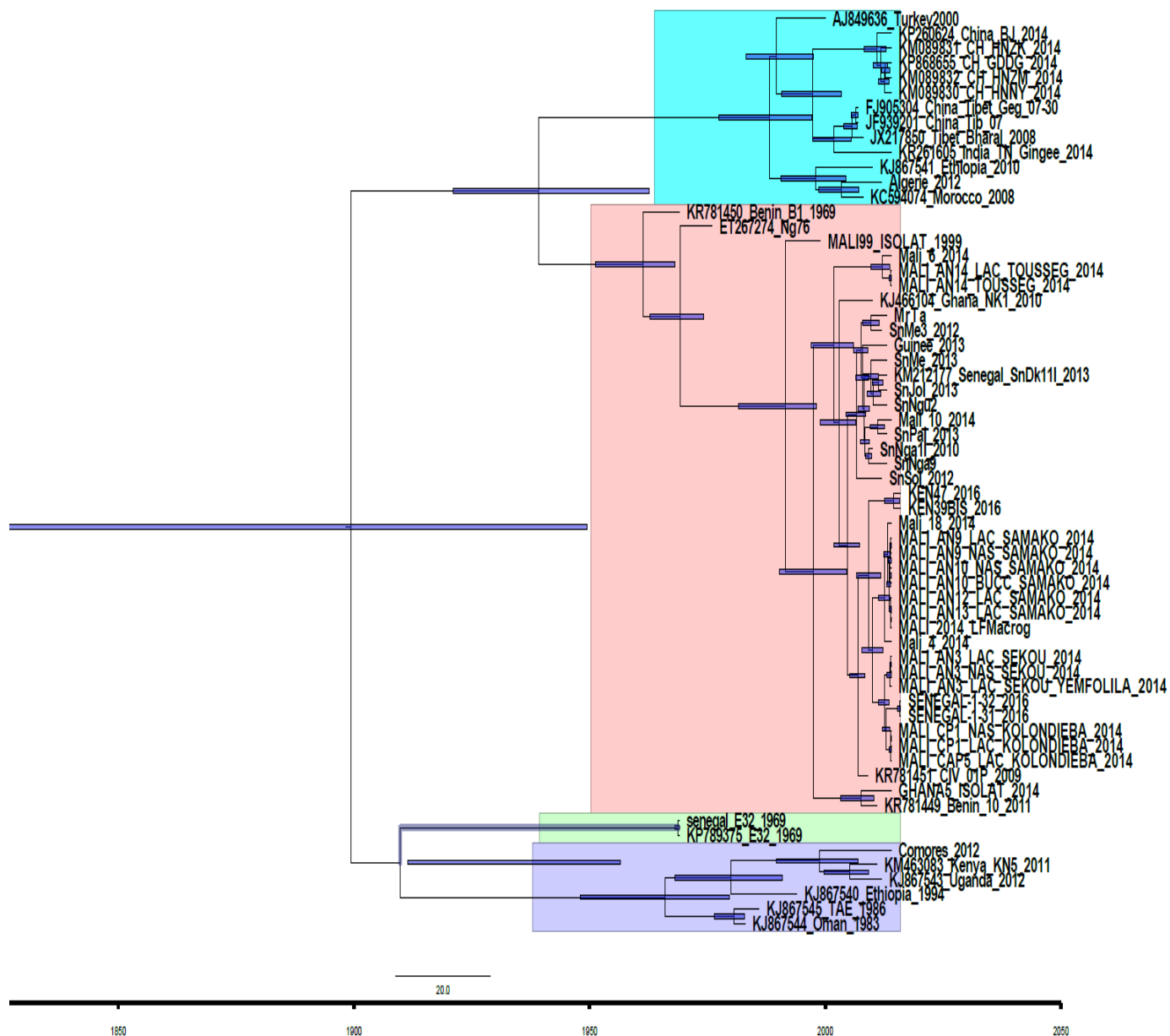


Figure 34 Arbre phylogénétique MCC basé sur le génome complet de 62 souches du PPRV. Les différentes couleurs représentent les différentes lignées : bleu pour lignée IV, rose pour lignée II, vert pour lignée I et violet pour lignée III. L'arbre a été construit en utilisant le modèle UCED et une croissance exponentielle. Les noms des souches comportant leur date de collecte et les longueurs de branches reflètent le temps écoulé. Les valeurs à 95% HPD de l'intervalle correspondant du TMRCA sont représentées par des barres bleues. L'axe horizontal indique la durée (dates) en années. Nos souches sont représentées en lettres capitales.

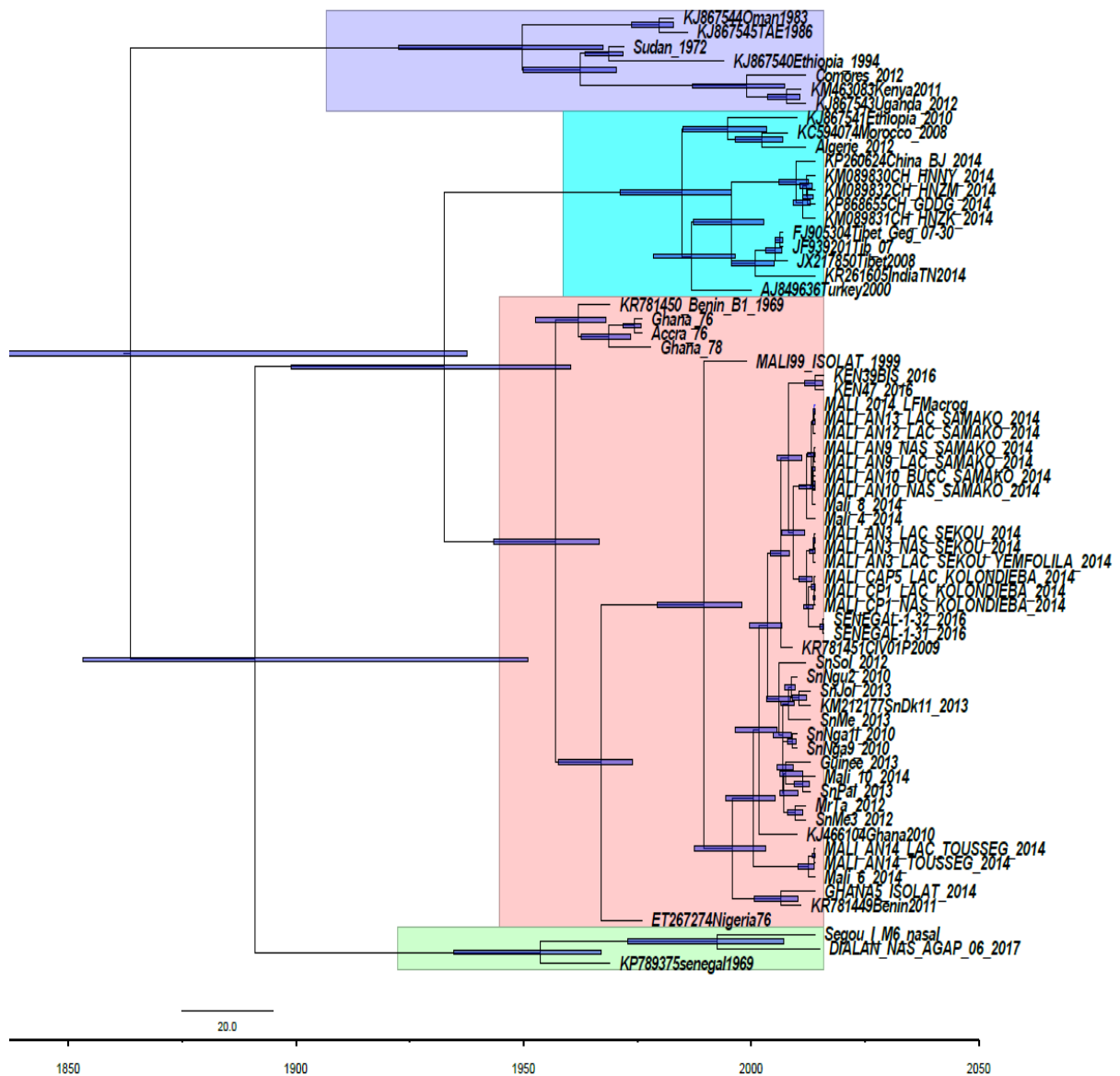


Figure 35 Arbre phylogénétique MCC basé sur le génome incomplet de 67 souches du PPRV. Les différentes couleurs représentent les différentes lignées : bleu pour lignée IV, rose pour lignée II, vert pour lignée I et violet pour lignée III. L'arbre a été construit en utilisant le modèle UCED et une croissance exponentielle. Les noms des souches comportant leur date de collecte et les longueurs de branches reflètent le temps écoulé. Les valeurs à 95% HPD de l'intervalle correspondant du TMRCA sont représentées par des barres bleues. L'axe horizontal indique la durée en années. Nos souches sont représentées en lettres capitales.

Tableau 23 Récapitulatif du TMRCA des 4 lignées du PPRV

Type de génome	TMRCA
Génome complet	1899 (95% HPD 1822-1950)
Génome incomplet	1863 (95% HPD 1754-1938)

Tableau 24 Récapitulatif du TMRCA de chaque lignée du PPRV

Type de génome	Lignée I		Lignée II		Lignée III		Lignée IV africaine		Lignée IV asiatique	
<b>Génome complet</b>	1968 (95% HPD 1968-1969)	1961 (95% HPD 1969)	1955 (95% HPD 1948-1980)	1988 (95% HPD 1978-1998)	1998 (95% HPD 2004)	1991 (95% HPD 1998)	1983-1998)			
<b>Génome incomplet</b>	1953 (95% HPD 1935-1968)	1956 (95% HPD 1944-1967)	1949 (95% HPD 1923-1968)	1984 (95% HPD 1972-1996)	1994 (95% HPD 2003)	1987 (95% HPD 1997)	1979-1997)			

## 6.4 Discussion

Notre étude a été mise en place avec l'objectif de fournir un aperçu de la dynamique de PPRV et de son contrôle possible dans le grand Ouest africain. Elle enrichit tout d'abord de façon importante le nombre de génomes complets connus pour le PPRV, grâce aux échantillons déjà disponibles au CIRAD et au large échantillonnage effectué pendant la thèse sur le Mali et des pays proches ou frontaliers. La PPR est enzootique au Mali, où l'élevage comprend un grand nombre d'animaux transhumants jusqu'au sud du pays (Koulikoro). La PPR est bien connue des services vétérinaires, avec une incidence qui a augmenté de façon importante dans les dernières décennies (B. Kamissoko et al., 2013; Tounkara K et al., 1996). Un réseau de surveillance épidémiologique permet une surveillance passive menée au niveau national, sur la base de cas suspects. La vaccination est théoriquement obligatoire, mais est très insuffisante pour la PPR (7%) ce qui motive la mise en place des projets d'envergure (par exemple projet PRAPS de la banque mondiale) sur le grand Ouest africain dont l'un des objectifs est d'augmenter la couverture vaccinale.

Notre étude a l'avantage de faire un point plus précis sur l'évolution du PPRV à partir de la séquence génomique complète de virus collectés en Afrique de l'Ouest sur une zone centrée sur le Mali sur plusieurs années et comprenant également des souches historiques. Elle complète les données déjà publiées de Muniraju (Muniraju et al., 2014a), dont l'analyse ne comporte que 10 génomes complets et celle de Clarke (Clarke et al., 2017) comportant 37 génomes complets dont l'intérêt réside dans l'analyse de souche toutes localisées dans une zone géographique restreinte (Israël).

Le séquençage du génome complet du PPRV a été réalisé à partir de deux méthodes que nous avons mises au point au CIRAD : La méthode de séquençage aléatoire ou SISPA et la technique d'amplification avec amorces spécifiques. Le séquençage a porté sur des échantillons du Mali et ceux de deux autres pays de l'Afrique de l'Ouest, le Sénégal et le Ghana.

Les résultats obtenus avec la méthode d'amplification aléatoire SISPA ont montré un faible taux de reads spécifiques du PPRV (0.38% à 4%). Ce faible taux de reads spécifiques PPR ne permet de pas de couvrir l'ensemble du génome du PPRV. Cela explique le fait que nous n'ayons obtenu qu'un seul génome complet et 4 génomes presque complets sur l'ensemble des 24 échantillons testés. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'amplification des souches est effectuée avec des amorces non spécifiques. Le point positif de cette technique est le temps nécessaire pour la préparation des échantillons. Il faut cependant noter que cette méthode est très couteuse.

Par contre, avec la technique d'amplification spécifique, le taux de reads spécifiques au génome du PPRV est très élevé, pouvant atteindre 98%. Nous avons obtenu le génome quasi complet de 21 échantillons sur l'ensemble des 24 échantillons testés. Ces résultats ont été possibles grâce à l'analyse préalable des séquences de génome connus (génomes de GenBank) pour le dessin d'amorces les plus

adéquates possibles. Les amorces sont dessinées préférentiellement au niveau des régions très conservées du PPRV. Cependant, il est plus difficile d'amplifier certains échantillons avec tous les couples d'amorces. Par exemple, nous avons rencontré des difficultés à amplifier les échantillons de la lignée IV du Mali provenant de Mopti et ceux de la lignée I provenant de Ségou et de Sikasso. Cela est probablement causé par la qualité des échantillons. La région de Mopti est à la frontière avec le Nord du Mali et donc une région très chaude, les températures peuvent atteindre 40°C. Les échantillons ont été conservés à +4°C pendant la durée des prélèvements. C'est seulement au retour des missions qu'ils ont été conservés à -80°C. La durée de la mission n'a pas permis une bonne conservation des échantillons, ce qui a probablement joué un rôle sur la qualité de l'ARN viral. Il faut également noter que le fait d'avoir congelé et décongelé plusieurs fois les échantillons lors des différents tests a aussi eu un effet sur la qualité de l'ARN viral.

Outre le besoin d'ARN de bonne qualité, l'inconvénient de cette technique est le temps nécessaire pour la préparation des échantillons. Il faut faire une amplification spécifique pour chacun des couples d'amorces dans des conditions particulières. Cependant, contrairement à la technique SISPA, elle est moins couteuse.

Au vu de ces résultats et du coût des analyses de chaque technique, il est plus intéressant de faire le séquençage avec la méthode d'amplification spécifique.

Les génomes complets et incomplets ont été utilisés pour une analyse phylogénétique par Maximum de Vraisemblance. Les arbres phylogénétiques ainsi obtenus sont comparés avec l'arbre phylogénétique obtenu lors de l'analyse phylogénétique à partir de courtes séquences de la nucléoprotéine du chapitre précédent.

Les résultats obtenus avec les génomes complets et incomplets reflètent la répartition phylogéographique des différentes souches de la PPR. La répartition des différentes lignées du PPRV est similaire quel que soit le type de génome: complet, incomplet ou la séquence courte de la nucléoprotéine.

Les souches de la lignée II circulant en Afrique de l'Ouest notamment au Mali (provenant de différentes régions), au Sénégal et au Bénin sont toutes proches entre elles, mais différents sous-groupes peuvent être observés. La séparation des souches historiques de lignée II par rapport aux souches récentes suggère une origine commune pour l'ensemble des souches de lignée II circulant ces 30 dernières années en Afrique de l'Ouest. La lignée a peut-être subi un goulet d'étranglement entre les années 70s et 90s. Plus de données historiques sont nécessaires pour tester cette hypothèse.

Les analyses phylogénétiques montrent la grande diversité de la lignée II de PPRV qui circule dans plusieurs régions du Mali. Elles montrent également la transmission transfrontalière du PPRV, plus que probablement associée à l'importance du grand flux de commerce entre les pays Ouest africain, notamment entre le Sénégal et le Mali.

Nos résultats permettent également de confirmer que la lignée I, supposée éteinte, circulait toujours en 2014 et 2015 au Mali. Des échantillonnages additionnels au Mali et dans d'autres régions d'Afrique de l'Ouest sont nécessaires pour déterminer la distribution actuelle de cette lignée dans la région.

Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus avec le gène N partiel (voir chapitre précédent). Les souches ont les mêmes positions phylogénétiques que celle obtenue avec le gène N. Les mêmes diversités sont obtenues au Mali ainsi qu'au sein de la lignée II. Cela suggère que les analyses phylogénétiques à partir d'une petite portion du gène N sont très informatives pour une première investigation de l'origine d'une souche.

Notre étude permet, de la même manière que celles de Clarke (2017) et Muniraju (2014) (Clarke et al., 2017; Muniraju et al., 2014a) et de la thèse de H. Salami d'estimer le taux de substitution nucléotidique par an (Tableau 25) et de restituer sur l'échelle de temps l'ancêtre commun le plus récent des lignées de PPRV circulant à travers le monde actuellement.

Les taux de substitution nucléotidique par an que nous avons obtenus corroborent les taux estimés lors d'études semblables (Tableau 25). Le taux de substitution de notre étude et de ceux des autres montrent une évolution moléculaire similaire comprise entre  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  substitution/site/an.

Le nombre de séquences disponibles pour la lignée II nous donne la possibilité d'évaluer le taux de substitution spécifique à cette lignée, ce qui peut servir de valeur de référence pour l'évolution de la PPRV dans un bassin de diffusion enzootique, à mettre en comparaison avec l'évolution de la lignée IV associée à une propagation épidémique. En effet, il a été démontré que les virus à ARN présentes dans les régions épidémiques ont généralement une tendance à avoir des taux de substitution plus élevés que ceux des régions endémiques, et que les souches transmises avec des taux de contacts élevés ont tendance à avoir des taux de substitutions plus élevés par rapport à celles ayant moins de contacts (Scholle et al., 2013).

Pour évaluer si ces tendances s'appliquent à la PPRV, nous avons réalisé les analyses de datation moléculaire uniquement sur les données de lignées II, puis sur celles de lignée IV (Tableau 25). Le taux d'évolution de la lignée II est similaire aux taux obtenus pour l'ensemble des lignées. Le taux moyen d'évolution de la lignée IV semble plus élevé, mais les marges de confiance sont très larges et il est impossible de déterminer si cette différence est significative. D'autres analyses avec un plus grand nombre de séquences de lignée IV permettraient peut-être de confirmer les tendances observées.

Tableau 25 Tableau de comparaison du taux d'évolution du PPRV

Etudes	Estimation du taux de substitution
<i>Notre étude avec les génomes complets</i>	$1,01 \times 10^{-3}$ substitution/site/an (95% HPD $6,76 \times 10^{-4}$ , $1,38 \times 10^{-3}$ )
<i>Notre étude avec les génomes incomplets</i>	$7,42 \times 10^{-4}$ substitution/site/an (95% HPD $4,91 \times 10^{-4}$ , $1,03 \times 10^{-3}$ )
<i>Etude de Clarke et al., (génomes complet)</i>	$9,22 \times 10^{-4}$ substitution/site/an (95% HPD $6,206 \times 10^{-4}$ , $1,26 \times 10^{-3}$ )
<i>Etude de Muniraju et al., (Génome complet)</i>	$9,09 \times 10^{-4}$ substitution/site/an (95% HPD $2,13 \times 10^{-4}$ , $1,64 \times 10^{-3}$ )
<i>Etude de la thèse H. Salami (gène H et N concaténés)</i>	$7,11 \times 10^{-4}$ substitution/site/an (95% HPD $4,18 \times 10^{-4}$ , $1,06 \times 10^{-3}$ )
<i>Notre étude avec les génomes complets Lignée II</i>	$8,27 \times 10^{-4}$ substitution/site/an (95% HPD $4,56 \times 10^{-4}$ , $1,24 \times 10^{-3}$ )
<i>Notre étude avec les génomes incomplets Lignée II</i>	$8,35 \times 10^{-4}$ substitution/site/an (95% HPD $4,84 \times 10^{-4}$ , $1,27 \times 10^{-3}$ )
<i>Notre étude avec les génomes complets Lignée IV</i>	$1,84 \times 10^{-3}$ substitution/site/an (95% HPD $5,56 \times 10^{-4}$ , $3,52 \times 10^{-3}$ )

Grâce aux génomes obtenus par le CIRAD et lors de cette thèse, nous pouvons analyser l'histoire de l'évolution du PPRV avec plus de précision que les recherches antérieures. Nos analyses, comme les études antérieures, estiment que l'ancêtre commun des 4 lignées est apparu aux alentours de la fin du XIX<sup>ème</sup> et début du XX<sup>ème</sup> siècle (Tableau 26). Ces estimations dépendent de la disponibilité des souches historiques qui sont très rares pour la PPR. Cependant, l'ajout de 3 souches historiques ne semble pas modifier les estimations actuelles. Le séquençage d'un plus grand nombre de souches historiques permettrait d'affiner ces estimations, mais ce genre de souches est rare pour la PPR.



Tableau 26 Tableau de comparaison des dates de TMRCA des 4 lignées de PPRV

Type de génome	TMRCA
<i>Notre étude avec les génomes complets</i>	<b>1899 (95% HPD 1822-1950)</b>
<i>Notre étude avec les génomes incomplets</i>	<b>1863 (95% HPD 1754-1938)</b>
<i>Etude de Clarke et al., (génomes complet)</i>	<b>1870 (95% HPD 1691-1945)</b>
<i>Etude de Muniraju et al., (Génome complet)</i>	<b>1898 (95% HPD 1730-1966)</b>
<i>Etude de la thèse H. Salami (gène H et N concaténés)</i>	<b>1898 (95% HPD 1847-1944)</b>

Le Tableau 27 nous montre la comparaison des dates des ancêtres communs (TMRCA) de chaque lignée du PPRV. Nous pouvons constater que les dates estimées du TMRCA pour chaque lignée sont similaires d'une étude à l'autre. La lignée III serait apparue en premier lieu, vers le milieu du XXème siècle, suivie rapidement de la lignée I, puis lignée II. L'étude de Clarke et al., effectuée avec un plus grand nombre de souches de lignées IV (certaines n'étant pas dans le domaine public), situe l'ancêtre commun de la lignée IV en 1968, alors que les autres études placent le TMRCA de la lignée IV dans les années 80. Selon nos analyses, la lignée IV serait arrivée en Afrique dans les années 90.

Les souches de la lignée II étant exclusivement présentes en Afrique de l'Ouest, nous pouvons donc estimer l'apparition de cette lignée II dans cette région vers le milieu du XXème siècle aux alentours de 1955.

Tableau 27 Tableau de comparaison des dates des ancêtres communs (TMRCA) de chaque lignée du PPRV

Type de génome	TMRCA							
	Lignée I		Lignée II		Lignée III		Lignée IV	
<i>Notre étude avec les génomes complets</i>	<b>1968</b>	<b>(95% HPD 1968-1969)</b>	<b>1961</b>	<b>(95% HPD 1952-1969)</b>	<b>1955</b>	<b>(95% HPD 1948-1980)</b>	<b>1988</b>	<b>(95% HPD 1978-1998)</b>
<i>Notre étude avec les génomes incomplets</i>	<b>1953</b>	<b>(95% HPD 1935-1968)</b>	<b>1956</b>	<b>(95% HPD 1944-1967)</b>	<b>1949</b>	<b>(95% HPD 1923-1968)</b>	<b>1984</b>	<b>(95% HPD 1972-1996)</b>
<i>Etude de Clarke et al., (génomes complet)</i>	<b>1956</b>	<b>(95% HPD 1940-1966)</b>	<b>1958</b>	<b>(95% HPD 1945-1966)</b>	<b>1958</b>	<b>(95% HPD 1936-1973)</b>	<b>1968</b>	<b>(95% HPD 1946-1980)</b>
<i>Etude de Muniraju et al., (Génome complet)</i>	NA		NA		<b>1956</b>	<b>(95% HPD not indicated)</b>	<b>1987</b>	<b>(95% HPD 1957-1998)</b>
<i>Etude de la thèse H. Salami (gène H et N concaténés)</i>	NA		<b>1962</b>	<b>(95% HPD 1951-1973)</b>	NA		<b>1984</b>	<b>(95% HPD 1973-1993)</b>

Durant ce projet, nous avons pu séquencer le génome complet ou partiel de 22 souches PPRV du Mali, du Sénégal et du Ghana, augmentant grandement le nombre de séquences disponibles pour l'Afrique de l'Ouest, et notre capacité à étudier l'histoire évolutive du virus dans cette région. Les efforts de



séquençage de la PPRV, notamment de souches historiques, doivent continuer pour mieux comprendre l'origine du PPRV, son évolution et la dynamique de sa propagation.

## 7 Discussion générale – Conclusion Perspective

La lutte contre les maladies animales transfrontalières est un énorme défi pour le développement des productions animales en Afrique. 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 comme le Mali où la surveillance épidémiologique est de type événementielle, les foyers sont largement sous-déclarés. En effet, en cas de fortes déclarations, les vétérinaires présents sur place ont peur d'être sanctionnés et jugés pour avoir mal travaillé. 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 et d'établir les hypothèses épidémiologiques de leur transmission et de leur circulation. Cependant dans les pays tropicaux d'élevage extensif, dans lesquels l'identification et la traçabilité animale sont inexistantes, il est extrêmement difficile d'établir les circuits de diffusion des animaux et des virus.

Au cours de cette thèse, nous avons commencé dans un premier temps à mettre au point une nouvelle technique qui permet de déterminer la lignée des échantillons de terrain par RT-PCR sans faire de séquençage. En effet, dans la plupart des pays en voie de développement, tel que le Mali, n'ont pas la possibilité de déterminer la lignée du PPRV de manière rapide et facile car ils n'ont pas les moyens d'accéder aux plateformes de séquençage. Cette technique va permettre de déterminer rapidement la ou les lignées qui circulent dans un pays et de mettre en place de manière rapide et efficace des moyens de contrôle.

Nous avons ensuite étudié la diversité génétique du virus de la PPR au Mali, au Niger et les autres pays de l'Afrique de l'Ouest à partir du gène partiel de la nucléoprotéine du PPRV. Notre étude sur le Niger fut la première à caractériser les lignées de PPRV à circuler dans ce pays. Nos analyses nous ont permis de déterminer que trois lignées ont circulé au Niger de 2001 à 2013 : les lignées I, II et IV. Au Mali, nous avons également trouvé trois lignées, I, II et IV entre 1999 et 2016. La détermination de la lignée IV dans ces deux pays de l'Afrique de l'Ouest a mis en évidence l'introduction et la progression de cette lignée d'origine asiatique dans les pays de l'Afrique de l'Ouest. Cependant, la lignée II reste prédominante dans tous les pays d'Afrique de l'Ouest. Au Mali, nos analyses nous ont montré qu'il existe une grande diversité de la lignée II du PPRV dans plusieurs régions. Cette diversité est certainement liée à la position centrale du Mali dans les mouvements commerciaux de bétails dans la sous-région. Ces flux de commerces non contrôlés ont un rôle très important dans la transmission transfrontalière du PPRV entre les pays de l'Ouest africain. Quant à la lignée I, décrite dans aucun pays depuis les années 1990, il est apparu qu'elle est toujours présente au Mali dans certaines régions. La persistance de cette lignée est certainement le résultat d'un isolement géographique l'excluant du commerce de bétails.

Nous avons mise au point au cours de cette thèse une technique de séquençage du génome complet du PPRV. Ceci permet d'obtenir un grand nombre de séquences moléculaire du PPRV, notamment des anciennes souches pour mieux comprendre leur origine.

En Afrique, toutes les lignées de PPRV sont présentes dont trois en Afrique de l'Ouest. Afin de mieux comprendre les mouvements d'animaux, nous avons étudié l'histoire évolutive des lignées de PPRV circulant sur le territoire Ouest africain à partir des séquences de génomes complets. Ces génomes sont obtenus à partir de souches de PPRV obtenus entre 1999 et 2016. Grâce à ces études, nous avons confirmé la présence des 3 lignées de PPRV dans la région et leur diversité phylogénétique. Nous avons également estimé la date d'apparition des différentes lignées en Afrique ainsi que le taux d'évolution général du PPRV ainsi que de différentes lignées représentant des situations d'enzootie (lignée II) et d'épizootie (lignée IV) de la maladie.

La prise en compte de ces informations constitue un outil de prise de décision pour les institutions régionales en charge de la surveillance et du contrôle de la peste des petits ruminants. Ils peuvent aider à la mise en place d'une stratégie efficace de lutte régionale voire mondiale à l'instar de celle qui fut menée pour l'éradication de la peste bovine. La campagne d'éradication de la PPR par l'OIE et la FAO est lancée et projette une éradication totale d'ici 2030. Le prélude obligatoire à cette éradication, est l'amélioration du contrôle de la maladie pour en diminuer l'incidence dans les zones atteintes. Le constat actuel est que les 4 lignées virales sont présentes en Afrique, avec une forte prédominance des lignées II et IV acquise à la faveur d'une conquête rapide des territoires. Un tel phénomène pourrait s'expliquer par une intensification des mouvements animaux en Afrique subsaharienne due à la demande toujours croissante de sources de protéines certainement associée à une virulence plus importante comparativement aux autres, des lignées II et IV, maintenant présentes dans de vastes zones.

L'observation dans l'Ouest africain d'une diversité génétique importante et transfrontalière de la lignée II, traduit une situation d'endémicité de la maladie où les troupeaux ne sont que faiblement impactés par les souches circulantes, les fermiers peu inquiétés par la maladie, et les mouvements transfrontaliers de bétail importants et difficilement contrôlables. Cette situation rend le contrôle de la PPR dans la région particulièrement compliqué. Pour impacter durablement la persistance du virus, une stratégie de lutte crédible doit être basée sur (1) un recensement animal exhaustif, accompagné d'un marquage des animaux, (2) une vaccination de masse du cheptel régional suivi de campagnes de vaccination ciblées et régulières, (3) du respect des closes sanitaires incluses dans les accords interétatiques de transhumance et de commerce d'animaux. De grands programmes internationaux sont annoncés pour le contrôle et l'éradication des maladies virales considérées comme priorités internationales (PPR, FMD, rage...). Il appartient donc aux responsables de la santé animale de (1) développer une approche intégrée et interdisciplinaire pour répondre aux questions d'épidémiologie classiques et moléculaires ; (2) faire évoluer le concept « One Health » pour conjuguer les compétences dans les domaines de santé humaine et animale ; (3) développer et utiliser de nouveaux outils pour des systèmes de surveillance et de contrôle innovants pour prévenir les foyers infectieux et aider à la prise de décision. Ce dernier point implique non seulement l'utilisation des biotechnologies pour la création vaccins innovant, thermostables et DIVA, mais aussi les approches de séquençage haut-débit, avec ou sans à priori, et la métagénomique.

Au Mali, une réunion s'est tenue en Avril 2018 pour mettre en place une stratégie de contrôle et d'éradication de la PPR. Il a été décidé de : (1) Mettre en place d'une campagne de vaccination ciblant les zones géographiques à risques ainsi que dans les zones transfrontalières, (2) une sensibilisation des chefs de villages, pour la mobilisation des éleveurs à soumettre leurs animaux à la vaccination et (3) une sensibilisation des exportateurs pour le respect des textes législatifs et réglementaires qui régissent l'exportation afin de minimiser les risques. Le choix d'une stratégie de vaccination ciblée au lieu d'une vaccination globale, coordonnée à un niveau régional, semble très risqué, au vu des résultats obtenus dans cette thèse.

## 8 Bibliographie

A. Diallo, T. Barrett, M. Barbron, Meyer, G., Lefèvre, P.C., 1995. Cloning of the nucleocapsid protein gene of peste-des-petits-ruminants virus: relationship to other morbilliviruses *Journal of General Virology* 75, 233-237.

Abegunde, A.A., Adu, F., 1977. Excretion of the virus of peste des petits ruminants by goats. . *Bull. Anim. Health. Prod. Afr* 25, 307.

Abraham G, Sintayehu A, Libeau G, Albina E, Roger F, Laekemariam Y, Abayneh D, KM., A., 2005. Antibody seroprevalences against peste des petits ruminants (PPR) virus in camels, cattle, goats and sheep in Ethiopia. *Prev Vet Med* 70, 51-57.

Abubakar M, Jamal SM, Arshed MJ, Hussain M, Q., A., 2009. Peste des petits ruminants virus (PPRV) infection: Its association with species, seasonal variations and geography. *Trop Anim Health Prod* 41, 1197-1202.

Adombi, C., M, Lelenta, M., Lamien, C.E., Shamaki, D., Koffi, Y.M., Traore, A., Silber, R., E. Couacy-Hymann, Bodjo, S.C., Djaman, J.A., Luckins, A.G., Diallo, A., 2011. Monkey CV1 cell line expressing the sheep-goat SLAM protein: a highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens. *J Virol Methods* 173 (2), 306-313.

Adombi CM, Waqas A, Dundon WG, Li S, Daojin Y, Kakpo L, Aplogan GL, Diop M, Lo MM, Silber R, Loitsch A, A., D., 2017 Peste Des Petits Ruminants in Benin: Persistence of a Single Virus Genotype in the Country for Over 42 Years. . *Transboundary and emerging diseases* 64, 1037-1044.

Al-Majali AM, Hussain NO, Amarin NM, AA., M., 2008. Seroprevalence of, and risk factors for, peste des petits ruminants in sheep and goats in Northern Jordan. *Prev Vet Med* 85, 1-8.

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.

Anene, B.M., Ugochukwu, E.I., Omegegbe, J.O., 1987. The appraisal of three different pharmaceutical regimes for the treatment of naturally occurring peste des petits ruminants (PPR) in goats. . *Bull. Anim. Health. Prod. Afr* 35, 1.

Apolloni A, Nicolas G, Coste C, El Mamy AB, Yahya B, El Arbi AS, Gueya MB, Baba D, Gilbert M, R., L., 2018. Towards the description of livestock mobility in Sahelian Africa: Some results from a survey in Mauritania. *PloS one* 13.

- Ayari-Fakhfakh E, Ghram A, Bouattour A, Larbi I, Gribâa-Dridi L, Kwiatek O, Bouloy M, Libeau G, Albina E, C., C.-S., 2011. First serological investigation of peste-des-petits-ruminants and Rift Valley fever in Tunisia. *Vet. J* 187, 402-404.
- B. Kamissoko, Sidibé, C.A.K., Niang, M., Samaké, K., Traoré, A., Diakité, A., Sangaré, O., A. Diallo, Libeau, G., 2013. Prévalence sérologique de la peste des petits ruminants des ovins et des caprins au Mali. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 66, 5-10.
- Baazizi, R., Mahapatra, M., Clarke, B.D., Ait-Oudhia, K., Khelef, D., Parida, S., 2017. Peste des petits ruminants (PPR): A neglected tropical disease in Maghreb region of North Africa and its threat to Europe. *PloS one* 12, e0175461.
- Bailey, D., Banyard, A., Dash, P., Ozkul, A., Barrett, T., 2005. Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus. *Virus research* 110, 119-124.
- 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.
- Balamurugan, V., Sen, A., Venkatesan, G., Yadav, V., Bhanot, V., Bhanuprakash, V., Singh, R.K., 2010. Application of Semi-quantitative M Gene-Based Hydrolysis Probe (TaqMan) Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Peste des petits ruminants Virus in the Clinical Samples for Investigation into Clinical Prevalence of Disease. *Transboundary and emerging diseases* 57, 383-395.
- Banyard, A.C., Parida, S., Batten, C., Oura, C., Kwiatek, O., Libeau, G., 2010. Global distribution of peste des petits ruminants virus and prospects for improved diagnosis and control. *Journal of General Virology* 91, 2885-2897.
- Bao J, Wang Z, Li L, Wu X, Sang P, Wu G, Ding G, Suo L, Liu C, Wang J, Zhao W, Li J, L., Q., 2011. Detection and genetic characterization of peste des petits ruminants virus in free-living bharals (Pseudois nayaur) in Tibet, China. *Res. vet. Sci* 90, 238-240.
- 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.D., Diallo, A., Lancelot, R., Libeau, G., 2016. peste des petits ruminants virus. *advances in virus research* 95, 1-42.
- Barrett, T., Banyard, A.C., Diallo, A., 2006. Molecular biology of the morbilliviruses In: Thomas, B., Paul-Pierre, P., and William, P.T. (eds.). *Rinderpest and Peste des Petits Ruminants*. Oxford, U.K.: Academic Press, 31.
- Barrett, T., Romero, C.H., Baron, M.D., Yamanouchii, K., Diallo, A., Bostoch, C.J., Black, D., 1993. *Biologie moléculaire de la peste bovine et de la peste des petits ruminants*. Annales de Médecine Vétérinaire (Belgium).
- Berhe G., Minet, C., Le Goff, C., Ngangnou, A., Grillet, C., Libeau, G., Black, D.N., Flemmig, M., Barrett, T., Diallo, A., 2003. Development of a dual recombinant vaccine to protect small ruminants against peste des petits ruminants and capripox infections. *J. Virol* 77, 1571-1577.
- Bloch, N., Diallo, I., 1991. Serological survey of small ruminants in 4 districts of Niger. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop* 44, 397-404.

Bourdin, P., Laurent-Vautier, A., 1967. Note sur la structure du virus de la peste des petits ruminants. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop* 20, 384.

Bourhis, J., Véronique Receveur-Bréchet, Michael Oglesbee, Xinsheng Zhang, Matthew Buccellato, Hervé Darbon, Bruno Canard, Stéphanie Finet, Longhi, S., 2005. The intrinsically disordered C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein interacts with the C-terminal domain of the phosphoprotein via two distinct sites and remains predominantly unfolded. *Protein Science* 14, 1975.

Boussini H, Chitsungo E, Bodjo SC, Diakite A, Nwankpa N, Elsalwahy A, Anderson JR, Diallo A, WG., D., 2016. First report and characterization of peste des petits ruminants virus in Liberia, West Africa.

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.

Chen W, Hu S, Qu L, Hu Q, Zhang Q, Zhi H, Huang K, Z., B., 2010. A goat poxvirus-vectored peste-des-petits-ruminants vaccine induces long-lasting neutralization antibody to high levels in goats and sheep. *vaccine* 28, 4742-4750.

Clarke, B., Mana Mahapatra, Orly Friedgut, Velizar Bumbarov, Satya, P., 2017. Persistence of Lineage IV Peste-des-petits ruminants virus within Israel since 1993: An evolutionary perspective. *PloS one* 12, e0177028.

Cosseddu, G.M., Pinoni, C., Polci, A., Sebhatu, T., Lelli, R., Monaco, F., 2013. Characterization of peste des petits ruminants virus, Eritrea, 2002-2011. *Emerging infectious diseases* 19, 160-161.

Cottam, E., Haydon DT, Paton DJ, Gloster J, Wilesmith JW, Ferris NP, Hutchings GH, King, D., 2006. Molecular epidemiology of the foot-and-mouth disease virus outbreak in the United Kingdom in 2001. *J Virol.* 80, 11274-11280.

Cottam, E., Thébaud G, Wadsworth J, Gloster J, Mansley L, Paton DJ, King DP, DT, H., 2008. Integrating genetic and epidemiological data to determine transmission pathways of foot-and-mouth disease virus. *Proc Biol Sci* 275, 887-895.

Couacy-Hymann E, Bodjo SC, Danho T, Koffi MY, Libeau G, A, D., 2007. Early detection of viral excretion from experimentally infected goats with peste-des-petits ruminants virus. *Prev Vet Med* 78, 85-88.

Couacy-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.

Couturier M, Buccellato M, Costanzo S, Bourhis JM, Shu Y, Nicaise M, Desmadril M, Flaudrops C, Longhi S, M., O., 2010. High affinity binding between Hsp70 and the C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein requires an Hsp40 co-chaperone. *J. Mol. Recognit* 23, 301.

Delil, F., Asfaw, Y., Gebreegziabher, B., 2012. Prevalence of antibodies to peste des petits ruminants virus before and during outbreaks of the disease in Awash Fentale district, Afar, Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 44, 1329.

Dhar P, Sreenivasa BP, Barrett T, Corteyn M, Singh RP, SK., B., 2002. Recent epidemiology of peste des petits ruminants virus (PPRV). *Vet. Microbiol* 88, 153-159.

- Diallo, A., 2006. Control of Peste des petits ruminants and poverty alleviation. *J. vet. Med.* 53, 11-13.
- Diallo A, Taylor WP, Lefèvre PC, A, P., 1989. Attenuation of a strain of rinderpest virus: potential homologous live vaccine. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop* 42, 311-319.
- Diallo, A., Barrett, T., Lefèvre, P., Taylor, W., 1987. Comparison of proteins induced in cells infected with rinderpest and peste des petits ruminants viruses. *J. Gen. Virol.* 68.
- Diallo, A., Minet, C., Le Goff, C., Berhe, G., Albina, E., Libeau, G., Barrett, T., 2007. The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control. *vaccine* 25, 5591-5597.
- Diop, M., Sarr, J., Libeau, G., 2005. Evaluation of novel diagnostic tools for peste des petits ruminants virus in naturally infected goat herds. *Epidemiol. Infect* 133, 711.
- Duffy, S., Shackelton LA, Holmes, E., 2008. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet* 9, 267-276.
- Dundon WG, Adombi C, Waqas A, Otsyina HR, Arthur CT, Silber R, Loitsch A, A, D., 2014. Full genome sequence of a peste des petits ruminants virus (PPRV) from Ghana. *Virus Genes* 49, 497-501.
- Dundon WG, Adombi CM, Kanu S, Loitsch A, Cattoli G, A., D., 2018. Complete Genome Sequence of a Lineage II Peste des Petits Ruminants Virus from Sierra Leone. *Genome announcements* 6.
- Durojaiye, O.A., Taylor, W.P., Smale, C., 1985. The ultrastructure of peste des petits ruminants virus. *Zentralbl. Veterinärmed* 32, 460.
- Ehrbar, D.J., Ngo, K.A., Campbell, S.R., Kramer, L.D., Ciota, A.T., 2017. High levels of local inter- and intra-host genetic variation of West Nile virus and evidence of fine-scale evolutionary pressures. *Infection, Genetics and Evolution* 51, 219-226.
- El Arbi AS, El Mamy AB, Salami H, Isselmou E, Kwiatek O, Libeau G, Kane Y, R, L., 2014. Peste des petits ruminants virus, Mauritania. *Emerging infectious diseases* 20, 333-336.
- Esayas, G., Charles Euloge Lamien, Roland Silber, Eeva S. M. Tuppurainen, Reingard Grabherr, Adama, D., 2013. Development of a Cost-Effective Method for Capripoxvirus Genotyping Using Snapback Primer and dsDNA Intercalating Dye. *PloS one* 8, e75971.
- Ezeibe, M.C.O., Wosu, L.O., Erumaka, I.G., 2004. Standardisation of the haemagglutination test for peste des petits ruminants (PPR). *Small ruminant research : the journal of the International Goat Association* 51, 269.
- Ezeokoli C.D, Umoh J.U, Chineme C.N, Isitor G.N, E.O., G., 1986. Clinical and epidemiological features of peste des petits ruminants in Sokoto Red goats. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop* 39, 269-273.
- Fakri, F., Asmaa, E., Zahra, B., Mohammed, J., Zineb, B., Khalid, T., Ouafaa, F.-F., Mehdi, E., 2017. Susceptibility of Moroccan sheep and goat breeds to peste des petits ruminants virus. *Acta Vet Scand* 59.
- Farougou, S., Gagara, M., Mensah, G.A., 2013. Prevalence of peste des petits ruminants in the arid zone in the Republic of Niger. *The Onderstepoort journal of veterinary research* 80, 544.
- 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.



- Furly, C., TAYLOR, W., Obi, T.U., 1987. An outbreak of peste des petits ruminants in a zoological collection. *The veterinary record* 121, 19, 443-447.
- Furuse, Y., Suzuki, A., Oshitani, H., 2010. Origin of measles virus : divergence from rinderpest virus between the 11th and 12th centuries. *Virol J* 7.
- Gargadennec, L., Lalanne, A., 1942. La pPeste des Petits Ruminants. *Bulletin AOF*.
- Gibbs, E.P.J., Talor, W.P., Lawman, M.P.J., Briant, J., 1979. Classification of the peste des petits ruminants virus as the fourth member of the genus Morbillivirus. *Intervirology* 11, 268-274.
- Gilbert, Y., Monnier, J., 1962. Adaptation du virus de la peste des petits ruminants aux cultures cellulaires. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 15, 321.
- Govindarajan R, Koteeswaran A, Venugopalan AT, Shyam G, Shaouna S, Shaila MS, S, R., 1997. Isolation of pestes des petits ruminants virus from an outbreak in Indian buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet. Rec* 141, 573-574.
- Guibert B, Banzhaf M, Soule, B., G, , Balami, D., H, , G., I., 2009. ETUDE REGIONALE SUR LES CONTEXTES DE LA COMMERCIALISATION DU BETAIL/ACCES AUX MARCHES ET DEFIS D'AMELIORATION DES CONDITIONS DE VIE DES COMMUNAUTES PASTORALES. Institut de Recherches et d'Applications des Méthodes de Développement.
- Habib Salami, Guillaume Croville, Olivier Kwiatek, Jérôme Mariette, Christophe Klopp, Sophie Valière, Jean-Luc Guérin, Moustapha Lo, Yaya Thiongane, Emmanuel Albina, Libeau, G., 2014. Complete Genome Sequence of a Field Strain of Peste des Petits Ruminants Virus Isolated during 2010-2014 Epidemics in Senegal. *Genome announcements* 2.
- Haffar A, Libeau G, Moussa A, Cécile M, A., D., 1999. The matrix protein gene sequence analysis reveals close relationship between peste des petits ruminants virus (PPRV) and dolphin morbillivirus. *Virus research* 64, 69-75.
- Hamdy F.M, Dardiri AH, Nduaka O, Breese SS Jr, EC., I., 1976. Etiology of the stomatitis pneumoenteritis complex in Nigerian dwarf goats. *Can. J. Comp. Med.* 40, 276-284.
- Hammouchi M, L.C., Sebbar G, , Touil N, Chaffai N, Batten C, Harif B, Oura C, M., E.H., Experimental infection of alpine goats with a Moroccan strain of peste des petits ruminants virus (PPRV). *Vet. microbiol.* 160, 240-244.
- Harrison, M.S., Sakaguchi, T., Schmitt, A.P., 2010. Paramyxovirus assembly and budding : Building particles that transmit infections. *Cell. Biol* 42, 1416-1429.
- Heaney, J., Barrett, T., Cosby, S.L., 2002. Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. *J. Virol.* 76, 3579.
- Jagtap SP, Rajak KK, Garg UK, Sen A, Bhanuprakash V, Sudhakar SB, Balamurugan V, Patel A, Ahuja A, Singh RK, Vanamayya PR, 2012. Effect of immunosuppression on pathogenesis of peste des petits ruminants (PPR) virus infection in goats. *Microb. Pathog.* 52, 217-226.
- Joseph G. Victoria, Amit Kapoor, Linlin Li, Olga Blinkova, Beth Slikas, Chunlin Wang, Asif Naeem, Sohail Zaidi, and Eric Delwart, 2009. Metagenomic Analyses of Viruses in Stool Samples from Children with Acute Flaccid Paralysis. *Journal of Virology* 83, 4642-4651.

- K. Senthil Kumar, A. Babu, G. Sundarapandian, P. Roy, A., Thangavelu, K., Siva Kumar, R. Arumugam, N.D. Chandran, M. Muniraju, M. Mahapatra, A.C. Banyard, B.M. Manohar, Parida, S., 2014. Molecular characterisation of lineage IV peste des petits ruminants virus using multi gene sequence data. *Vet. Microbiol* 174, 39-49.
- Kamuanga, M.J., Somda, J., Sanon, Y., Kagoné, H., 2008. Elevage et marché régional au sahel et en afrique de l'ouest: potentialités et défis. CSAO/OCDE, Paris.
- Kato, S., Nagata, K., Takeuchi, K., 2012 Cell tropism and pathogenesis of measles virus in monkeys. *Front. Microbiol* 3, 75.
- Kennedy, S., 1998. Morbillivirus infections in aquatic mammals. *J. Comp. Pathol.* 119.
- Kerdiles YM, Cherif B, Marie JC, Tremillon N, Blanquier B, Libeau G, Diallo A, Wild TF, Villiers MB, B., H., 2006a. Immunomodulatory properties of morbillivirus nucleoproteins. *Viral Immunol.* 19, 324-334.
- Kerdiles YM, Sellin CI, Druelle J, B., H., 2006b. Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins. *Rev. Med. Virol.* 16, 49-63.
- Khalafalla AI, Saeed IK, Ali YH, Abdurrahman MB, Kwiatek O, Libeau G, Obeida AA, Z., A., 2010. An outbreak of peste des petits ruminants (PPR) in camels in the Sudan. *Acta Trop* 116, 16-15.
- Khan H.A, Siddique M, Sajjad-ur-Rahman, Abubakar M, M., A., 2008. The detection of antibody against peste des petits ruminants virus in sheep, goats, cattle and buffaloes. . *Trop Anim Health Prod* 40, 521-527.
- Kinne J, Kreutzer R, Kreutzer M, Wernery U, P., W., 2010. Peste des petits ruminants in Arabian wildlife. *Epidemiol. Infect* 138, 1211-1214.
- Kumar, M., S., , Kashyap, S.K., Singh, S.V., Sharma, S., Chaubey, K.K., Ly, H., 2014. Peste des petits ruminants virus infection of small ruminants : A comprehensive review. *Viruses* 6, 2287-2327.
- 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, T., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. Mega6: moleculare volutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30 12, 2725–2729.
- 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.
- Kwiatek, O., Minet, C., Grillet, C., Hurard, C., Carlson, E., Karimov, B., Albina, E., Diallo, A., 2007. Peste des Petits Ruminants (PPR) Outbreak in Tajikistan. *J.Comp.Path.* 136, 111-119.
- Laine D, Bourhis JM, Longhi S, Flacher M, Cassard L, Canard B, Sautès-Fridman C, Rabourdin-Combe C, H., V., 2005. Measles virus nucleoprotein induces cell-proliferation arrest and apoptosis through NTAIL-NR and N CORE-FcγRIIB1 interactions, respectively. *J. Gen. Virol.* 86, 1771-1784.
- Lancelot, R., Lesnoff, M., McDermott, J.J., 2002. Use of Akaike information criteria for model selection and inference. An application to assess prevention of gastrointestinal parasitism and respiratory mortality of Guinean goats in Kolda, Senegal. *Prev Vet Med* 55, 217.

- Lee, J.K., Prussia, A., Snyder, J.P., Plemper, R.K., 2007. Reversible inhibition of the fusion activity of Measles virus F protein by an engineered intersubunit disulfide bridge. *J. Virol* 81, 8821-8826.
- Lefèvre, P.C., Diallo, A., 1990. Peste des petits ruminants. . *REv. Sci. Tech* 9, 935.
- Lequime, S., Fontaine, A., Ar Gouilh, M., Moltini-Conclois, I., Lambrechts, L., 2016. Genetic Drift, Purifying Selection and Vector Genotype Shape Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity in Mosquitoes. *PLoS Genet* 12, e1006111.
- LI, H., Bob, H., Alec, W., Tim, F., Jue, R., Nils, H., Gabor, M., Goncalo, A., Durbin, R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools *Bioinformatics* 25, 2078-2079.
- LI, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-1760.
- 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, Cetre-Sossah C, Caufour P, Minet C, Kwiatek O, Lancelot R, Servan de Almeida R, Albina E, T., L., 2015. Development of vaccines against peste des petits ruminants: CIRAD's achievements and future challenges. . *Bulletin - OIE (English ed.)*, 72-77.
- Libeau, G., Diallo, A., Parida, S., 2014. Evolutionary genetics underlying the spread of peste des petits ruminants virus. *Animal Frontiers* 4(1), 14-20.
- Libeau, G., Prehaud, C., Lancelot, R., Colas, F., Guerre, L., Bishop, D.H.L., Diallo, A., 1995. Development of a competitive ELISA for peste des petits ruminants virus antibody detection using a recombinant N protein. *Res. vet. Sci* 58, 50.
- Liljeroos L, Huiskonen JT, Ora A, Susi P, SJ., B., 2011. Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18085-18090.
- Liu., F., 2018. Letter to the editor concerning “First report of peste des petits ruminants virus lineage II in *Hydropotes inermis*, China” by Zhou et al. (*Transbound Emerg Dis*; 2017: <https://doi.org/10.1111/tbed.12683>). *Transboundary and emerging diseases*.
- M. Muniraju, M. Mahapatra, G. Ayelet, A. Babu, M. Munir, C., Batten, A.C., Banyard, S.P., 2014. Emergence of lineage IV peste des petits ruminants virus in Ethiopia: complete genome sequence of an Ethiopian isolate 2010. *Transboundary and emerging diseases* 63, 435-442.
- Maganga, G., Verrier, D., Zerbinati, R., Drosten, C., Drexler, J., Leroy, E., 2013. Molecular typing of PPRV strains detected during an outbreak in sheep and goats in southern eastern Gabon in 2011. *virol J* 10.
- Mantip, S., Quan, M., Shamaki, D., Van Vuuren, M., 2016. Comparison of nucleotide sequences of recent and previous lineages of peste-des-petits-ruminants viruses of sheep and goats in Nigeria. *The Onderstepoort journal of veterinary research* 83, e1-e10.
- Megersa B, Demelash Biffa, Fufa Abunna, Alemayehu Regassa, Jon Bohlin, Skjerve., E., 2012. Epidemic characterization and modeling within herd transmission dynamics of an “emerging trans-boundary” camel disease epidemic in Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 44, 1643-1651.
- Meng, X., Dou, Y., Zhai, J., Zhang, H., Yan, F., Shi, X., Luo, X., Li, H., Cai, X., 2011. Tissue distribution and expression of signaling lymphocyte activation molecule receptor to peste des petits ruminant virus in goats detected by real-time pcr. *Journal of Molecular Histology* 42, 467-472.

Mornet, P., Gilbert, Y., Orue, J., Thiery, G., 1956. La peste des petits ruminants en Afrique occidentale française, ses rapports avec la peste bovine. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 9, 4.

Mühlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prüfer S, Uhlig KM, Leonard VH, Navaratnarajah CK, Frenzke M, Wong XX, Sawatsky B, Ramachandran S, McCray PB Jr, Cichutek K, von Messling V, Lopez M, R., C., 2011. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 480, 530.

Muhlebach, M.D., Leonard, V.H., Cattaneo, R., 2008. The Measles virus fusion protein transmembrane region modulates availability of an active glycoprotein complex and fusion efficiency. *J. Virol* 82, 11437-11445.

Muniraju, M., Munir M, Parthiban AR, Banyard AC, Bao J, Wang Z, Ayebazibwe C, Ayelet G, El Harrak M, Mahapatra M, Libeau G, Batten C, Parida, S., 2014a. Molecular evolution of peste des petits ruminants virus. *Emerging infectious diseases* 20, 2023-2033.

Muniraju, M., Munir, M., Banyard, A.C., Ayebazibwe, C., Wensman, J., Zohari, S., Berg, M., Parthiban, A.R., Mahapatra, M., Libeau, G., Batten, C., Parida, S., 2014b. Complete Genome Sequences of Lineage III Peste des Petits Ruminants Viruses from the Middle East and East Africa. *Genome announcements* 2.

Muniraju, M., Munir, M., Banyard, A.C., Ayebazibwe, C., Wensman, J., Zohari, S., Berg, M., Parthiban, A.R., Mahapatra, M., Libeau, G., Batten, C., Parida, S., 2014c. Complete Genome Sequences of Lineage III Peste des Petits Ruminants Viruses from the Middle East and East Africa. *Genome announcements* 2, e01023-01014.

Nanda, S.K., Baron, M.D., 2006. Rinderpest virus blocks type I and type II interferon action: Role of structural and nonstructural proteins. *J. Virol* 80, 7555.

Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, Tsao MS, CD., R., 2011. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *pLoS Pathog* 7, e1002240.

Ohno S, Ono N, Takeda M, Takeuchi K, Y., Y., 2004. Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J. Gen. Virol.* 85, 2991-2999.

Ozkul A, Akca Y, Alkan F, Barrett T, Karaoglu T, Dagalp SB, Anderson J, Yesilbag K, Cokcaliskan C, Gencay A, I., B., 2002. Prevalence, distribution, and host range of Peste des petits ruminants virus, Turkey. *Emerging infectious diseases* 8, 708-712.

Pawar, R.M., Dhinakar Raj, G., Balachandran, C., 2008. Relationship between the level of signaling lymphocyte activation molecule mRNA and replication of peste-des-petitsruminants virus in peripheral blood mononuclear cells of host animals. *Acta Virol* 52, 231-236.

Pegram, R., Tereke, F., 1981. Observation on the health of afar livestock. *Ethiopian Vet J* 5, 11-14.

Pomeroy, L.W., Bjornstad, O.N., Holmes, E.C., 2008. The evolutionary and epidemiological dynamics of the paramyxoviridae. *J Mol Evol* 66, 98-106.

Pybus, O.G., Rambaut, A., 2009. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nat Rev Genet* 10, 540-550.

- Rajak KK, Sreenivasa BP, Hosamani M, Singh RP, Singh SK, Singh RK, SK., B., 2005. Effect of immunosuppression on pathogenesis of peste des petits ruminants (PPR) virus infection in goats. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis* 28, 287-296.
- Rajko-Nenow PZ, Cunliffe TG, Flannery JT, Ropiak HM, Avaliani L, Donduashvili M, Baron MD, CA., B., 2017. Complete Genome Sequence of Peste des Petits Ruminants Virus from Georgia, 2016. *Genome announcements* 5, e01091-01017.
- Rey Nores, J.E., McCullough, K.C., 1997. Rinderpest virus isolates of different virulence vary in their capacity to infect bovine monocytes and macrophages. *J. Gen. Virol.* 78, 1875.
- Robinson, J.T., Helga, T., Wendy, W., Mitchell, G., Eric, S.L., Gad, G., Mesirov, J.P., 2011. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29, 24-26.
- Roger, F., Yigezu, L.M., Hurard, C., Libeau, G., Mebratu, G.Y., Diallo, A., Faye, B., Investigation of a new pathological condition of camels in Ethiopia. *J. Camel. Pract. Res* 2, 163.
- Roman, B., J. Caroline Henderson, Lance A. Waller, E., C., Rupprecht, Leslie, A.R., 2007. A high-resolution genetic signature of demographic and spatial expansion in epizootic rabies virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 7993-7998.
- Rossiter, P., 1994. Rinderpest. *Infectious diseases of Livestock with special reference to Southern Africa* 2 735-757.
- Rossiter, P.B., Jessett, D.M., Taylor, W.P., 1985. Microneutralisation systems for use with different strains of peste des petits ruminants and rinderpest virus. *Trop Anim Health Prod* 17, 75.
- Rowland, A.C., Scott, G.R., Ramachandran, S., Hill, H.D.A., 1971. Comparative study of peste des petits ruminants and kata in West African dwarf goats. *Trop Anim Health Prod* 3, 241-247.
- Saliki JT, House JA, Mebus CA, EJ., D., 1994. Comparison of monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay and virus isolation for detection of peste des petits ruminants virus in goat tissues and secretions. *J. Clin. Microbiol* 32, 1349-1353.
- Satharasinghe, D.A., Murulitharan, K., Tan, S.W., Yeap, S.K., Munir, M., Ideris, A., Omar, A.R., 2016. Detection of Inter-Lineage Natural Recombination in Avian Paramyxovirus Serotype 1 Using Simplified Deep Sequencing Platform. *Front. Microbiol* 7, 1907.
- Sawatsky B, Wong XX, Hinkelmann S, Cattaneo R, V., v.M., 2012. Canine distemper virus epithelial cell infection is required for clinical disease but not for immunosuppression. *J. Virol.* 86, 3658-3666.
- Schlender J, Schnorr JJ, Spielhoffer P, Cathomen T, Cattaneo R, Billeter MA, ter Meulen V, S., S.-S., 1996. Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 12;93, 13194-13199.
- Schneider-Schaulies S, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J, V., t.M., 2001. Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr. Mol. Med.* 1, 163-181.
- Schobesberger M, Summerfield A, Doherr MG, Zurbriggen A, C., G., 2005. Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Vet. Immunol. Immunopathol* 104, 33-44.
- Scholle, S.O., Ypma, R.J., Lloyd, A.L., Koelle, K., 2013. Viral substitution rate variation can arise from the interplay between within-host and epidemiological dynamics. *The American naturalist* 182, 494-513.

SEN, A., SARAVANAN, P., BALAMURUGAN, V., RAJAK, K.K., SUDHAKAR, S.B., BHANUPRAKASH, V., PARIDA, S., SINGH, R.K., 2010. Vaccines against peste des petits ruminants virus. *Expert Rev vaccines* 9, 785-796.

Seth S, Shaila MS, 2001. The hemagglutinin–neuraminidase protein of peste des petits ruminants virus is biologically active when transiently expressed in mammalian cells. *Virus research* 75, 169-177.

Settypalli, T., Lamien CE, Sperser J, Lelenta M, Wade A, Gelaye E, Loitsch A, Minoungou G, Thiaucourt F, Diallo, A., 2016. One-Step Multiplex RT-qPCR Assay for the Detection of Peste des petits ruminants virus, Capripoxvirus, *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma capricolum* subspecies (ssp.) *capripneumoniae*. *PloS one* 11.

Shafer, J.A., Bellini, W.J., Rota, P.A., 2003. The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* 315, 389.

Shaila MS, Purushothaman V, Bhavasar D, Venugopal K, RA., V., 1989. Peste des petits ruminants of sheep in India. *Vet. Rec* 125, 602.

Shatar M, K.B., Purevtseren D, Khishgee B, Loitsch A, Unger H, Settypalli TBK, Cattoli G, Damdinjav B, WG, D., 2017. First genetic characterization of peste des petits ruminants virus from Mongolia. *Arch Virol* 162, 3157-3160.

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.

Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, AJ, D., A, R., 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 *Virus Evolution* 4, vey016.

Takayama I, Sato H, Watanabe A, Omi-Furutani M, Sugai A, Kanki K, Yoneda M, C., K., 2012. Takayama II, Sato H, Watanabe A, Omi-Furutani M, Sugai A, Kanki K, Yoneda M, Kai C. *Virology* 424, 45-55.

Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Y., Y., 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406, 893-897.

Toukara K, Traore A, Traore AP, Sidibe S, Samake K, Diallo BO, A., D., 1996. Epidemiology of rinderpest and cattle plague in Mali: serological surveys. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop* 49, 273-277.

Von Messling, V., Milosevic, D., Cattaneo, R., 2004. Tropism illuminated: Lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 14216.

Waku-Kouomou, D., Amal Alla, Bariza Blanquier, Damien Jeantet, Hayat Caidi, Ahmed Rguig, Freymuth, F., Wild, F.T., 2006. Genotyping Measles Virus by Real-Time Amplification Refractory Mutation System PCR Represents a Rapid Approach for Measles Outbreak Investigations. *J Clin. Microbiol* 44, 487-494.

Whitney, J.C., Scott, G.R., Hill, D.H., 1967. Preliminary observations on a stomatitis and enteritis of goats in Southern Nigeria. *Bull Epizoot Dis Afr* 15, 331-341.

Wohlsein, P., Wamwayi, H.M., Trautwein, G., Pohlenz, J., Liess, B., Barrett, T., 1995. Pathomorphological and immunohistological findings in cattle experimentally infected with rinderpest virus isolates of different pathogenicities. *Vet. Microbiol* 44, 141.

Woma, T.Y., Adombi, C.M., Yu, D., Qasim, A.M., Sabi, A.A., Maurice, N.A., Olaiya, O.D., Loitsch, A., Bailey, D., Shamaki, D., Dundon, W.G., Quan, M., 2016. Co-circulation of Peste-des-Petits-Ruminants Virus Asian lineage IV with Lineage II in Nigeria. *Transboundary and emerging diseases* 63, 235-242.

Woo, P.C., Lau, S.K., Wong, B.H., Fan, R.Y., Wong, A.Y., Zhang, A.J., Wu, Y., Choi, G.K., Li, K.S., Hui, J., Wang, M., Zheng, B.J., Chan, K.H., Yuen, K.Y., 2012. Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 109, 5435-5440.

Yanagi, Y., Takeda, M., Ohno, S., 2006. Measles virus: Cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* 87, 2767.

Yesilbağ K, Yilmaz Z, Gölcü E, A., O., 2005. Peste des petits ruminants outbreak in western Turkey. *Vet. Rec.* 157, 260-261.

Zhou, L., Errigo RJ, Lu H, Poritz MA, Seipp MT, CT., W., 2008. Snapback primer genotyping with saturating DNA dye and melting analysis. *Clin chem* 54, 1648-1656.