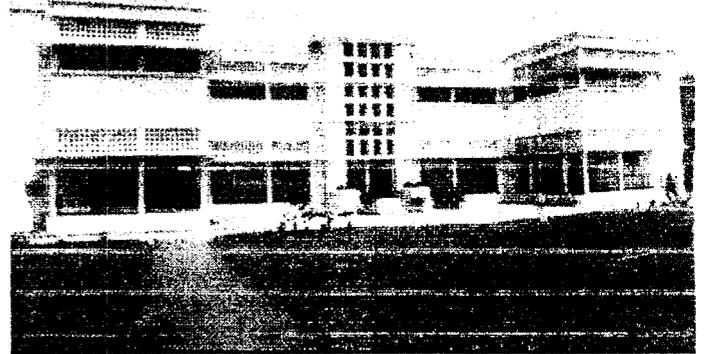


20004583

1583



Laboratoire National d'Elevage
et de Recherches Vétérinaires
BP : 2057 Dakar - Hann
Tél : 221 832 36 78 / 832 36 79
Fax : 221 832 21 18
Email : lnerv@sy.fed.refer.sn



Application de la Biotechnologie dans le Diagnostic des Maladies Animales d'origine virale au Sénégal

Thiongane Yaya

Séminaire National sur les Biotechnologies au Sénégal
Saly Portudal, 4, 5 et 6 octobre 1999.

*01/10/1999 - An
Octobre 1999*

L'APPLICATION DE LA BIOTECHNOLOGIE DANS LE DIAGNOSTIC DES MALADIES ANIMALES D'ORIGINE VIRALE AU SENEGAL.

I. INTRODUCTION

1 .1. Définition de Biotechnologies:

Les biotechnologies peuvent être définies comme un ensemble de techniques et de connaissances (en biologie, microbiologie ou biologie moléculaire) permettant d'exploiter les propriétés du vivant à des fins d'applications.

De cette définition, nous vouions souligner les faits suivants :

D'abord, les biotechnologies sont aussi vieilles que nos civilisations puisque l'homme s'est très tôt servi, bien sûr sans le savoir, de micro-organismes pour fabriquer des aliments tels que le pain, le fromage et les boissons fermentées (comme le dolo : bière à base de mil),

Ensuite, les biotechnologies sont rarement issues d'une seule discipline ou d'une seule découverte mais , au contraire de l'application simultanée de ces découvertes en vue de résoudre un problème précis,

Et enfin, ce sont les nouvelles avancées de la biologie moderne, notamment celle de la biologie moléculaire, qui élargissent considérablement (presque à l'infini) le champ d'application potentiel des biotechnologies.

En médecine vétérinaire, ces applications visent à l'accroissement des potentialités des animaux et l'accroissement de leur résistance aux agressions du milieu où ils vivent.

Parmi ces applications, on peut citer celles qui s'appliquent au diagnostic des maladies animales, à la prévention de ces maladies et leur traitement.

Nous nous proposons de vous présenter quelques aspects de l'utilisation de ces biotechnologies dans le diagnostic des maladies animales d'origine virale au Laboratoire National de l'Elevage et de Recherches Vétérinaires de Hann.

Nous allons essayer de répondre aux questions suivantes, qui sont au nombre de quatre :

Qu'est ce qu'un virus ?

Quelle est l'importance de maladies animales d'origine virale ?

Quelle est la place de la biotechnologie dans le processus de diagnostic de ces maladies virales ?

Quelles sont les biotechnologies utilisées au LNERV ?

1.2. Généralités des virus:

a) Structure des virus:

Les virus sont des micro-organismes de très petite taille (taille inférieure au micron) mais les caractères spécifiques des virus sont indiqués dans le tableau suivant (voir transparent).

La particule virale ou virion apparaît sous des formes variées (en hélice, en cube, ...) et est constituée d'un acide nucléique (simple ou fragmenté) entourée de protéines (interne et externe). Ils peuvent être classés en fonction de leur hôte mais cette spécificité d'hôte est toute relative car il existe des virus d'insectes qui infectent les animaux (ce sont les arbovirus) et des virus de plantes qui infectent les insectes et vice versa.

b) Importance des maladies virales:

Les maladies virales constituent un problème important dans le Monde, en Afrique et au Sénégal.

Au niveau mondial

Elles représentent l'essentiel des maladies de la liste A (dernière version de 1996) de l'office International des Epizooties (O.I.E) : sur 15 maladies figurant sur cette liste, les 14 sont d'origine virale. Cette liste renferme les maladies causant des pertes considérables du fait de la mortalité et de la morbidité qu'elles entraînent. Aux pertes directes, il faut ajouter les conséquences sur le commerce international des animaux et des denrées d'origine animale.

Elles sont d'actualité, en 1998, la grippe du poulet dans le sud est de l'Asie a retenu l'attention de l'opinion mondiale car c'est une zoonose, maladie animale transmissible à l'homme. Comme toute les maladies virales, elle est de diffusion rapide et les mesures de lutte, pour être efficaces, doivent être appliquées très tôt.

Au niveau africain (Projet PARC, PANVAC de l'OUA IBAR)

En Afrique aussi, les maladies animales d'origine virale occupent le devant de la scène pathologique.

La Campagne de lutte contre la Peste bovine rassemble tous les pays du continent sous l'égide de l'OUA/IBAR et vise à l'éradication de peste bovine en 2010 par la généralisation des campagnes de vaccination, la mise en place de réseaux nationaux de surveillance de la maladie s'appuyant sur des laboratoires de diagnostic et de vaccins vétérinaires fonctionnels.

D'autres maladies comme la Peste Porcine Afrique en Afrique de l'Ouest, la fièvre de la vallée du Rift en Afrique de l'Est et de l'Ouest se sont signalées en 1998.

II. LES MALADIES ANIMALES D'ORIGINE VIRALE, AU SENEGAL:

Au Sénégal, les maladies animales d'origine virale sont très présentes et concernent toutes les espèces animales domestiques.

2.1. Les principales maladies virales sont:

a. concernant les ruminants domestiques

La Peste bovine (PB), en cours d'éradication

La peste des petits ruminants (PPR)

La clavelée et la dermatose nodulaire contagieuse bovine (DNCB)

La fièvre aphteuse (FA)

La fièvre de la vallée du Rift (FVR)

b. concernant les équidés:

La peste équine (PE)

c. concernant les oiseaux:

La Maladie de Newcastle (NC)

La maladie de Gumboro (MG)

d. concernant les porcins:

La peste Porcine Africaine (PPA)

e. concernant les carnivores:

La rage

2.2. Le réseau National d'épidémiologie-surveillance :

Ce réseau est chargé de surveiller en continu la prévalence et l'incidence d'un certain nombre de maladies jugées prioritaires dans le but d'agir de manière appropriée. Cette surveillance associe la surveillance clinique (détection de animaux malades) au niveau de certains sites ou troupeaux sentinelles, le diagnostic de laboratoire (autopsie de cadavres, histologie, examen bactériologique, virologique), la collecte et l'analyse d'information concernant l'apparition et la fréquence des maladies et de l'utilisation des données par les décideurs et les divers acteurs.

Comme il n'est pas possible de surveiller toutes les maladies, celles, qui ont été retenues, sont les suivantes : la peste bovine, la Péripleurite contagieuse bovine, la fièvre de la vallée du Rift, la dermatose nodulaire contagieuse bovine, la peste des petits ruminants, la peste équine et la maladie de newcastle.

Toutes ces 7 maladies doivent être diagnostiquées rapidement et être combattues efficacement, ce qui nécessite des méthodes de diagnostic rapides, sensibles et spécifiques (si possible peu coûteuses).

III. APPLICATION DE LA BIOTECHNOLOGIE DANS LE DIAGNOSTIC DES MALADIES ANIMALES D'ORIGINE VIRALE.

Les méthodes biotechnologiques appliquées dans le diagnostic des maladies animales d'origine virale sont nombreuses:

3.1, Différentes étapes du diagnostic d'une maladie virale.

(voir transparent)

3.2. Différentes méthodes de diagnostic.

Chaque laboratoire choisit la méthode de diagnostic en fonction des renseignements cliniques.

A méthodes classiques :

▪ Observation au Microscope électronique :

Elle permet de visualiser directement la particule virale mais c'est une méthode peu sensible (concentration supérieure à 10^5 particules par ml). La concentration par ultracentrifugation permet d'augmenter la sensibilité de cette technique. L'application en diagnostic est limitée à certains virus (comme le poxvirus dont la morphologie est caractéristique du groupe viral).

▪ Isolement et identification sur des systèmes sensibles comme les animaux de laboratoire, les cultures de cellules et les œufs embryonnés :

Ce sont des systèmes dits sensibles car la réplication du virus sur ces différents systèmes entraîne respectivement la reproduction de la maladie, des modifications morphologiques des cellules en culture (effet cytopathogène) et la production dans les liquides biologiques infectés d'une agglutine active sur les hématies d'animaux convenablement choisis.

Le résultat peut être tardif en raison des passages nécessaires à l'apparition de l'effet cytopathogène. De plus, un effet cytopathogène n'est attribuable à un virus que lorsqu'il persiste lors des passages. Mais, une fois que le virus s'est répliqué, il est facile de procéder à son identification. Cette réaction d'identification (ou de typage) met en jeu le virus comme antigène et comme source d'anticorps un ou plusieurs sérums de référence. Les principales réactions d'identification de virus sont la réaction de neutralisation de l'effet cytopathogène, d'inhibition de l'hémagglutination et d'immunofluorescence.

B.méthodes nouvelles (de biologie moléculaire) :

Test immunoenzymatiques:

Ces tests permettent de visualiser les réactions antigènes-anticorps mieux que les techniques classiques (agglutination,). Le principe de ces tests repose sur la fixation (spontanée) de l'antigène sur support plastique solide, au déclenchement d'une réaction colorée suite à la dégradation d'un substrat par une enzyme couplée à l'anticorps et à la possibilité de quantifier cette réaction colorée par un spectrophotomètre, éventuellement couplé à un ordinateur.

Ce sont des méthodes qui connaissent un grand succès, notamment le test elisa qui présente plusieurs variantes : elisa direct, elisa indirect, elisa bloquant, elisa

sandwich. De plus, celle de l'immunocapture de l'antigène, qui permet la recherche du virus dans le prélèvement suspect, est d'une grande spécificité et d'une grande sensibilité : 1 ng d'antigène viral peut être détecté.

En somme, ces tests permettent de détecter les anticorps ou les antigènes spécifiques du virus en cause :

Test génétiques (ou nucléiques):

Technique d'hybridation (ou sonde nucléique) :

Cette technique, basée sur la reconnaissance par un acide nucléique connu ou sonde d'un acide nucléique complémentaire inconnu, permet de détecter la présence du génome du virus pathogène dans un prélèvement suspect.

Une variante possible est la digestion du génome viral par des enzymes et permet une identification plus précise (technique de southern blot) de l'agent pathogène.

Test d'amplification (la polymerase chain reaction) :

Cette technique permet d'amplifier (30 cycles) la réplication des parties caractéristiques du génome d'un agent pathogène grâce à l'emploi d'amorces choisies dans ces parties puis le repérage du génome ainsi amplifié à l'aide de sondes nucléiques.

Cette technique permet de détecter de souches virales (comme le virus de la diarrhée bovine type 2.2), de variants d'un virus (hantavirus).

IV. SITUATION DE L'APPLICATION DES BIOTECHNOLOGIES DANS LE DIAGNOSTIC DES MALADIES ANIMALES D'ORIGINE VIRALE AU SENEGAL

Le LNERV est le Centre de Référence de la FAO pour les maladies suivantes

4.1. P.B.

Isolement de virus sur Culture de cellules	5-7 jours
Immunofluorescence sur prélèvements suspects	1-2 heures
Test elisa immunocapture et de compétition (antigènes, anticorps)	24 heures
Test PCR	en cours

(NB : s'il n'y a pas de coupure de courant)

4.2. P.P.R.

Cultures de cellules :	5-7 jours
Immunofluorescence :	1-2 heures
Test elisa (antigène, anticorps)	24 heures

4.3. F.V.R.

Cultures de cellules:	5 jours
Souriceaux nouveaux nés:	7 jours
Séroneutralisation:	5 jours
Test elisa IgG et IgM:	24-48 heures(à partir d'octobre 1999)
Immunofluorescence:	quelques heures

4.4. P.P.A.

Culture de cellules :	1 semaine
Immunofluorescence	1-2 heures
Test elisa (antigène, anticorps)	24 heures

4.5. F.A.

Culture de cellules :	1 semaine
Test elisa (Ag) :	quelques heures

V. CONCLUSIONS.

L'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans le diagnostic de laboratoire présente des avantages évidents sur les techniques classiques ou traditionnelles :

- le temps nécessaire à la culture virale peut prendre des jours, ce qui retarde l'obtention des résultats,
- la capacité de répllication de certains virus sur culture de cellules est très difficile, voire impossible, et donc les moyens de diagnostiquer par visualisation directe, épreuves antigéniques et ou sérologiques seront inopérantes,

- l'utilisation de la technique de sondes nucléiques diminue considérablement le temps nécessaire à l'identification et au diagnostic de germes pathogènes. Un diagnostic rapide permet de diminuer le nombre de techniques utilisées, et surtout l'utilisation de techniques invasives comme les biopsies.

▪ la technique de PCR est applicable théoriquement à tous les micro-organismes. Il est particulièrement recommandé pour les germes difficiles à identifier avec les méthodes classiques. Il permet, à un seul laboratoire, d'augmenter le nombre de types de pathogènes qu'il peut identifier. L'obtention de grande quantité d'ADN à partir de l'amplification d'ADN ne se limite pas seulement à la reconnaissance du virus mais aussi à une caractérisation très précise, comme le polymorphisme de longueur des fragments restrictifs.

L'utilisation des techniques de biologie moléculaires dans le diagnostic de laboratoire présente des avantages évidents sur les techniques classiques. Compte tenu de leur efficacité et de la nécessité que représente le typage des agents pathogènes dans l'établissement de profil épidémiologique, de plan de contrôle des maladies, il est important, ou urgent, d'envisager une utilisation plus poussée de ces méthodes de diagnostic.

Toutefois, ces méthodes moléculaires, quoique révolutionnant le domaine du diagnostic, restent néanmoins une nouvelle technologie qui doit, comme toute nouveauté scientifique, encore être améliorée ou adaptée.

Dans notre contexte africain, les productions animales sont exclusivement de type extensif mais elles sont condamnées à une certaine intensification pour satisfaire les besoins d'une population en pleine croissance. Une des contraintes importantes de l'intensification est l'existence de maladies virales contre lesquelles on ne dispose pas d'armes efficaces ou qui comportent de nombreuses inconnues sur le plan épidémiologique.

La biologie moléculaire, en nous offrant d'excellents moyens de diagnostic rapide, d'investigations épidémiologiques approfondies et de mise au point de vaccins efficaces, fait de l'éradication de ces maladies virales un objectif raisonnable, sinon facile à atteindre. Les difficultés sont, dans ce cas, essentiellement de nature économique et politique: Des moyens dépassant le plus souvent les possibilités des collectivités nationales ou locales en Afrique sont nécessaires pour mettre en œuvre les actions indispensables. Ces moyens peuvent être obtenus avec la coopération sous régionale, internationale notamment, si les responsables politiques sont suffisamment sensibilisés et convaincus de la nécessité du développement de l'élevage.

L'OUA a un rôle important à jouer dans la sensibilisation des gouvernements africains, comme ce fut le cas avec la Campagne panafricaine de lutte contre la peste bovine dans les années 80.