ISRA **AIHES**

Année : 2014

MEMOIRE DE MASTER II

Option : Analyses Biologiques / Biosécurité

Présenté par

MOUSSA DIOUF

« ETUDE DE LA SEROPREVALENCE DE L'AGENT DE LA PLEUROPNEUMONIE CONTAGIEUSE CAPRINE AU SENEGAL »

Encadreurs : Dr Alpha A. DIALLO

DrMbaye MBENGUE

Table des matières

INTRODUCTION 7
A - Etude bibliographique 9
I- SITUATION DE L'ELEVAGE AU SENEGAL 9
1-1 Importance de l'élevage au Sénégal 9
1-2 Systèmes d'élevage 10
1.2.1. Le pastoralisme 10
1-2-2 Le Système agro pastoral 11
1-2-3 Le système intensif 11
II- Les infections à mycoplasma 11
2-1 Historique 11
2-2 Définition et morphologie 12
2-3. Culture des mycoplasmes 12
2-4. Identification des Mycoplasmes 13
2-5. Pouvoir pathogène des Mycoplasmes 14
III- DIAGNOSTIC 14
3-1 Diagnostic de terrain 14
3.1.1. Le diagnostic clinique 14
3.1.2. Le diagnostic lésionnel 15
3-2 Diagnostic de laboratoire 16
3-2-1 Diagnostic direct 17
3-2-3 Diagnostic indirect 17
B- Etude expérimentale 20
I . Matériel et Méthode 20
1-1 Matériel 20
1-1-1 Zone d'étude 20
1-1-2 Collection de sérums 21
1-1-3 Matériel de laboratoire 21
1-2 Méthode 21
1-2-1 Analyse des sérums 22
II- RESULTATS 24
2.1. Les sérums testés à Thilé Boubacar (N=160) 24
2.2. Les sérums testés à Ndioum (N=160) 25
2. 3. Les sérums testés à Bandafassi (N=80) 26
2.4. Validation du test 26

2-1 Prévalence globale de l'infection à Mccp 26
2-2 Résultats par localité 27
III- DISCUSSION 28
IV- CONCLUSION 30
BIBLIOGRAPHIE 31
ANNEXE I 33

LISTE DES FIGURE ET TABLEAUX

Figure 1. Répartition du cheptel 2011 (Direction de l'Elevage) ..**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 2. différentes classes d'Immunoglobulines....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 3. cinétique des anticorps.....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 4. Séropositivité .....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 5. carte du Sénégal montant les zones d'études..... **Erreur ! Signet non défini.**

Figure 6. Réaction ELISA de compétition.....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 7.Titrage du sérum pour la recherche d'anticorps par ELISA.....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 8. résultats globaux .....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 9. pourcentage de positivité par localités.....**Erreur ! Signet non défini.**

Figure 10.Prévalence entre le nord et le sud .....**Erreur ! Signet non défini.**

Tableau 1. prévalence par localité.....**Erreur ! Signet non défini.**

LISTE DES PHOTOS

Photo 1. Aspect « œuf sur le plat » de Mycoplasma mycoides Subsp mycoides spécifiques. .....**Erreur ! Signet non défini.**

Photo 2. Posture d'un chevreau atteint de PPCC ....**Erreur ! Signet non défini.**5

Photo 3.Lésions typiques de (PPCC) chez la chèvre aspect de la cavité thoracique à l'ouverture (Photo DR P.L. ROEDER)..... **Erreur ! Signet non défini.**15

Photo 4.Poumon recouvert de fibrine (photo F. Thiaucourt CIRAD).....**Erreur ! Signet non défini.**

Photo 5.Coupes pulmonaires montrant différentes stades d'hépatisation**Erreur ! Signet non défini.**16

LISTE DES SIGLES ET ABBREVIATIONS

AIHES	Académie Internationale des Hautes Etudes de la Sécurité
ANSD	Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie
DIREL	Direction de l'Elevage
cELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay competition
CIRAD	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
ISRA	Institut Sénégalais de Recherches Agricoles
FAO	Food and Agriculture Organization
Mab	Monoclonal Antibody
OIE	Organisation Internationale des Epizooties
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Pourcentage d'Inhibition
PIB	Pouvoir Intérieur Brut
PNDE	Plan National de Développement de l'Elevage
PROGEBE	Projet Régional de Gestion du Bétail ruminant en zone Endémique
PPCB	Péripneumonie Contagieuse Bovine
PPCC	Péripneumonie Contagieuse Caprine

INTRODUCTION

Les mycoplasmes sur le plan systématique, sont des microorganismes appartenant à la famille des Mycoplasmataceae, à l'ordre des Mycoplasmatales, à la division des Tenericutes, à la classe des mollicutes qui regroupe environ deux cent espèces dont cent deux du genre *Mycoplasma*(RAZIN et HAYFLICK, 2010). Dépourvus de paroi à l'encontre de la plupart des bactéries, ils font parti des plus petits organismes capables de se répliquer malgré leur génome de petite taille variant entre 580 kb pour *M. genitalium* et 1358 kb pour *M. penetrans* et développent des phénomènes d'échappements antigéniques complexes comme moyen de défense leur garantissant une pérennisation avérée.

Avec l'amélioration progressive des techniques de diagnostic, de nombreuses espèces de *Mycoplasma* avec un tropisme varié (poumon, mammite, articulation, appareil génital, etc. …) ont été découvertes. Le pouvoir pathogène de certaines espèces reste encore fortuit et leur prévalence sous estimée (Thèse Elodie B :*Le point sur les mycoplasmoses des ruminants*, 2012). Néanmoins ils sont considérés aujourd'hui comme des agents pathogènes d'importance majeure et mises en cause dans de grands syndromes affectant les ruminants, ou en favorisant les infections par d'autres germes.

L'étude des mycoplasmes des petits ruminants a été longtemps négligée de par les surinfections bactériennes récurrentes dues à des Pasteurelles(*P. haemolytica* et *P. multocida*) qui compliquent les tableaux clinique et lésionnel de même que les difficultés rencontrées aux laboratoires disposant des ressources limitées pour l'isolement et la multiplication (annuaire de la Santé Animale FAO/OMS/OIE, 1986). La Péripneumonie contagieuse caprine (PPCC) pouvant être confondue sur le terrain avec la Peste des Petits Ruminants (PPR), causant ainsi avec la pasteurellose le plus de problèmes à propos du diagnosticdifférentiel.

Au Sénégal, l'insuffisance de données épidémiologiques sur les mycoplasmes des petits ruminants responsables de la pleuropneumonie contagieuse caprine est un frein pour la mise en place d'une stratégie de lutte efficace. Les seules informationsdisponibles sur la PPCC au Sénégal remontent à 1986 (annuaire de la Santé Animale FAO/OMS/OIE, 1986). Cette

présente étude de séroprévalence a été menée afin de contribuer à une meilleure connaissance de l'épidémiologie de l'agent de la PPCC dans les troupeauxde petits ruminants au Sénégal. L'étude de la séroprévalence est primordiale pour savoir ou se trouve la PPCC au Sénégal car il sera difficile d'appliquer une stratégie optimale de lutte sans connaissances antérieures.

Ainsi, la présente étude est subdivisée en deux parties :

Une première partie desynthèse bibliographique sur :

- la situation de l'élevage au Sénégal,
- les connaissances sur les mycoplasmes,
- les techniques de diagnostics de la péripneumonie contagieuse caprine.

Une deuxième partie expérimentale comportant le matériel et les méthodes utilisées, la présentation des résultats, une discussion et une conclusion.

A - Etude bibliographique

I- SITUATION DE L'ELEVAGE AU SENEGAL

1-1 Importance de l'élevage au Sénégal

La voie de l'émergence des pays du sud passe inévitablement par le développement rural ou l'agriculture dans le sens large représente une activité clé, contribuant ainsi à lutter de manière significative contre la pauvreté.

Au Sénégal, le monde rural représente plus de 57% de la population. Les 70% des ménages agricoles sont pauvres c'est-à-dire vivant moins de 2400kcal /jour (Dorly, 2005). Selon l'Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie (ANSD) en 2010 le secteur de l'élevage englobe plus de 350 000 familles, représentant un effectif de trois millions d'individus issus des couches les plus vulnérables du monde rural. Ainsi, l'Etat du Sénégal parle PNDE (Plan National de Développement de l'Elevage) vise à faire de l'élevage un secteur performant, capable de satisfaire la demande nationale en produit animal afin d'assurer la promotion socio économique de ses acteurs, à l'horizon 2026.

De ce fait le rôle de l'élevage estmagistral dans la sécurité alimentaire du monde rural, en valorisant la plus grande partie des zones sahéliennes. La valeur ajoutée est évaluée à 287 milliards FCFA en 2011 contre 264 milliards FCFA en 2010(ANDS, 2011), soit une augmentation de 7,9% et sa contribution au PIB, 4,3% en 2011 contre 4,2% en 2010 (Direl, 2011)

De cette performance reflète les différentes politiques mises en œuvre par l'état du Sénégal avec l'appui des bailleurs de fonds pour développer le secteur qui regorge d'une grande diversité de ses produits.

Malgré cela, le manque à gagner demeure énorme et beaucoup d'efforts restent à faire pour propulser le secteur qui occupe une bonne partie du monde rural et la plus vulnérable aussi; essentiellement les femmes et les enfants dont les pratiques d'élevages sont dépendants du terroir.

1-2 Systèmes d'élevage

Selon l'ANSD, au Sénégal l'effectif total du cheptel est estimé à 15 354 685 têtes de ruminants en 2011, dominé essentiellement par les ovins 37,4%, les caprins 31,9% et les bovins 21,9%comme l'indique la figure ci-dessous (Direl, 2011).

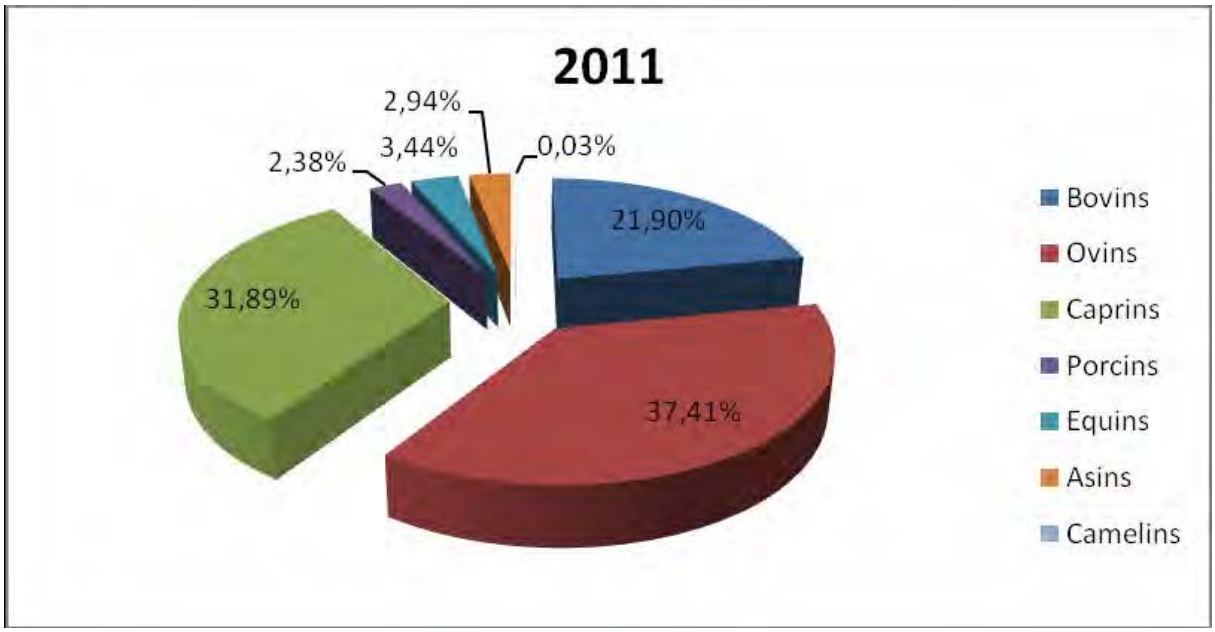

Figure 1. Répartition du cheptel 2011 (Direction de l'Elevage)

Au Sénégal, les ressources disponibles qui constituent la base de l'alimentation du bétail déterminent les différents systèmes de production. Ainsi, trois systèmes coexistent :

- ✓ Le pastoralisme
- ✓ L'agro-pastoralisme
- ✓ L'élevage intensif

1.2.1. Le pastoralisme

Ce système de production intéresse les zones sèches centre et nord du pays. Il est caractérisé par une mobilité des personnes et de surcroit du bétail sous les contraintes environnementales vers le sud du pays ou les animaux peuvent profiter des résidus de cultures ou des pâturages sous forêt. Dans ce système l'élevage est de type extensif ou toutes les activités productives reposent sur la sécurisation du cheptel, le pâturage reste la principale source d'alimentation et concerne pratiquement les petits ruminants.

1-2-2 Le Système agro pastoral

Cette pratique est caractéristique des climats soudanien et soudano-guinéen (bassin arachidier, la vallée du fleuve Sénégal et le sud du pays). C'est l'association du système pastoral le jour où les troupeaux sont conduits par des bergers, les enfants en général et au retour une complémentation d'aliments defanes de légumineuses et de céréales le soir. La plupart des animaux appartiennent aux femmes qui en assurent de concert avecles enfants les tâchesyafférentes. Ce système intéresse pratiquement les petits ruminants dominé par l'espèce caprine par rapport aux ovins qui forment le troupeau.

1-2-3 Le système intensif

Il est moins répandu que les deux types cités en amont, et concerne pratiquement les zones urbaines et péri urbaines, notamment les Niayes de Dakar. La taille du troupeau dépasse rarement dix animaux par troupeau dominé par les mâles.

Le secteur de l'élevage avec les initiatives prises depuis quelques années ont permis d'obtenir des résultats appréciables, force est de constater que les défis majeurs restent encore à être relevés en raison des contraintes liées à la dégradation des ressources naturelles, l'insuffisance des infrastructures et la vulnérabilité du cheptel face aux maladies.

On note ainsi la persistance de certaines maladies enzootiques (Pasteurellose, Peste des petits ruminants, Clavelée des petits ruminants, maladies telluriques (le charbon, le botulisme des bovins), la PPCB, et la PPCC) qui occasionnent des pertes considérables dans le secteur de l'élevage. Parmi ces maladies nous allons aborder les mycoplasmoses et plus particulièrement la PPCC.

II- Les infections à mycoplasma

2-1 Historique

Les premières descriptions cliniques des maladies caprines dues à des mycoplasmes remontent depuis 1816 pour l'agalaxie contagieuse et à 1873 pour la pleuropneumonie contagieuse (IEMVT, 1993). La recherche sur les mycoplasmes s'est avérée difficile en raison de leur très petite taille, cause pour laquelle ils n'étaient pas initialement considérés comme des bactéries mais identifiés en tant que virus pendant longtemps. Dans les années 1950 et 1960 les chercheurs ont commencé à isoler et cultiver les bactéries des genres *Mycoplasma et Uréaplasma* conduisant à leur reconnaissance comme un genre unique.

L'absence d'une paroi cellulaire fait attribuer certaines propriétés uniques aux mycoplasmes tels que la sensibilité au choc osmotique, aux détergents, la résistance à la pénicilline et d'autres antibiotiques tels que les bêta-lactamines, et la formation de biofilms. Des coupes de mycoplasmes révèlent que leurs cellules sont construites essentiellement de trois organites: la membrane cellulaire, des ribosomes, et un ADN à double brin circulaire

2-2 Définition et morphologie

Les mycoplasmes font partie de la classe des Mollicutes (*mollis*, mou; *cutis*: peau, en latin), qui s'oppose à celle des Schyzomycètes, ou bactéries à paroi rigide. Ils sont des bactéries de petites tailles (0,3 à 0,8µm de diamètre) dont la particularité essentielle est l'absence de paroi rigide qui peuvent donc revêtir des formes très variées selon les conditions du milieu, en leur permettant de se déformer et de traverser les filtres biologiques de porosité 0,2 à 0,4µm.

Pour la plupart des espèces, au microscope les colonies ont un aspect typique en «œufs sur le plat», comme l'atteste cette figure ci-dessous. Elles sont donc très reconnaissables sur milieu de culture lorsqu'on parvient à les isoler.

Photo 1. Aspect « œuf sur le plat » de Mycoplasma mycoides Subsp mycoides spécifiques. (Photo Dr Alpha A. Diallo)

2-3.Culture des mycoplasmes

C'est avec les travaux de Nocard et Roux en 1898 que l'agent causal de la péripneumonie contagieuse bovine a été signalé en culture pour la première fois (Nocard et Roux, 1898). Ils s'avèrent être des germes extrêmement difficiles à cultiver de par leur grande exigenceaccompagnée d'une croissance très lente et la simplicité de leur génome ne les permet pas de synthétiser tous les éléments indispensables à leur survie.

Les cultures sont incubées à 37° C et dans une atmosphère humide, enrichie par 5% de CO_2 ou sous cloche anaérobie comportant une source d'humidité (IEMVT, 1993).

Les cultures sont contrôlées chaque jour pour en déceler des signes de croissance tels que la turbidité, le changement de couleur (vers le jaune pour les mycoplasmes glycolytiques, ou le rouge pour ceux qui hydrolysent l'arginine) et la présence de substances floculées suite à la formation de bios films.

On fait filtrer les cultures ayant un aspect très trouble, signe de contamination bactérienne avec des membranes de porosité moyenne de 0,22µm ou 0,45µm avant tout repiquage.

Le repiquage des cultures en milieu liquide s'effectue en inoculant un dixième de leur volume (équivalent de quels que gouttes) dans des bouillons de culture frais ou en ensemençant des milieux solides.

La morphologie des colonies varie en fonction du milieu employé, de l'espèce de mycoplasme, du nombre de passages et de l'âge de la culture.

Les souches sauvages de micro-organismes de type F38 (agent de la PPCC) produisent aussi lors des premiers passages une proportion élevée de petites colonies dépourvues de centre, parmi lesquelles sont éparpillées des petites colonies de forme bizarre ayant un centre (IEMVT, 1993).

Les autres espèces de mycoplasmes classiquement identifiées chez les chèvres et les moutons présentent la morphologie bien connue en «œuf sur le plat» (Photo 1) de leurs colonies, mais toutes peuvent produire des colonies d'aspect bizarre lors des premiers niveaux de passage.

2-4.Identification des Mycoplasmes

Les réactions les plus couramment utilisées sont la fermentation du glucose,L'hydrolyse de l'arginine, la réduction du chlorure de tétrazolium (en aérobiose etEn anaérobiose), la formation de biofilms, l'activité de la phosphatase, la digestion du sérum et la sensibilité à la digitonine. Parmi celles-ci, la digestion du sérum est particulièrement utile pour identifier les quatre espèces les plus pathogènes, mais non pour les différencier entre elles. La sensibilité à la digitonine permet de distinguer les membres de la famille des ***Mycoplasmataceae*** de ceux de la famille des ***Acholeplasmataceae*** (Freundtet *al*., 1973).

Cette réaction est en général mise en œuvre en même temps que celle d'inhibition de la croissance (voir annexe I) qui récapitule les réponses à ces sept réactions des huit principales

espèces de mycoplasmes reconnues chez les caprins et les ovins (y compris ***M. putrefaciens,*** qui n'a pas été signalé à ce jour dans le tractus respiratoire).

2-5. Pouvoir pathogène des Mycoplasmes

Principalement localisée au niveau des muqueuses respiratoires et génitales des ruminants, la pathogénicité des mycoplasmes varie d'une espèce à l'autre et demeure encore mal éclairée. Pour le cas de l'agent de la PPCC, son pouvoir pathogène se caractérise généralement par une forte inflammationdu poumon, porte d'entrée du micro-organisme par l'action des sous produits métaboliques (l'urée et le peroxyde d'hydrogène).

De même que certaines études ont montré que les infections à mycoplasmes provoquent l'apoptose cellulaire sous l'effet des endonucléases catalysant la fragmentation de l'ADN (Paddenberg et *al*., 1996).

III- DIAGNOSTIC

Le diagnostic permet l'identification des sujets malades pour un traitement et/ou des porteurs sains afin de les mettre en quarantaine pour éviter la progression du pathogène au sein du troupeau. Il peut être divisé en deux étapes :

- ✓ le diagnostic de terrain
- ✓ le diagnostic de laboratoire

3-1 Diagnostic de terrain

Cette étape permet l'identification de la maladie à partir des données cliniques et lésionnelles observées sur l'animal malade ou le cadavre après l'autopsie. Le diagnostic de terrain doit être confirmé par les résultats des analyses de laboratoire.

3.1.1. Le diagnostic clinique

Un bon diagnostic de terrain repose sur une bonne observation des signes cliniques présentant de la fièvre comprise entre (40-42 ° C), la toux, une dyspnée, une morbidité élevée (environ 100%) et une mortalité élevée d'environ 70%(Manuel standard oie, 1992).

Photo 2. Posture d'un chevreau atteint de PPCC

3.1.2. Le diagnostic lésionnel

A l'examen post-mortem, les lésions pulmonaires sont plus diffuses avec une présence de liquide fibrineux dans la cavité thoracique. Des dépôts de fibrine couvrent les poumons et sont souvent attachés à la plèvre (voir photo 4), et concerne un seul poumon En cas de suspicion de PPCC dans les zones considérées à haut risque d'apparition de la PPR, il faut écarter la présence de cette dernière maladie par l'analyse de sérums des animaux présents dans les troupeaux convalescents (diagnostic différentiel oie)

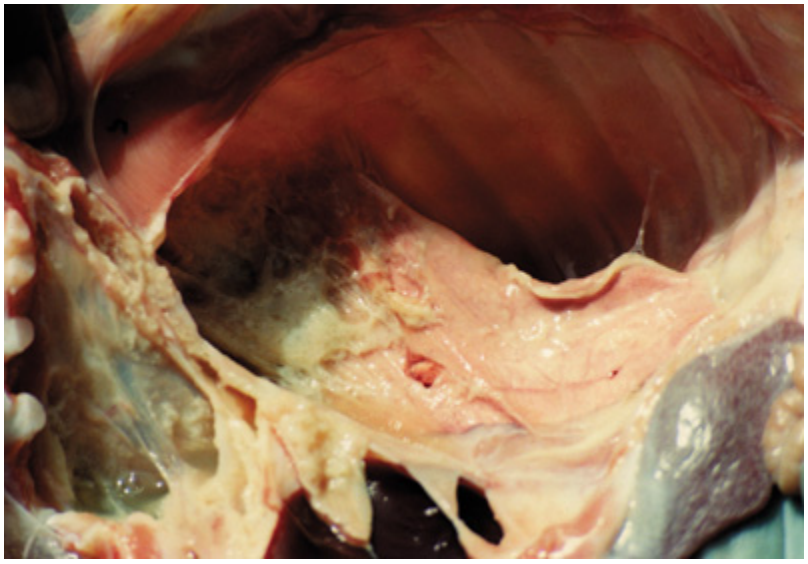

Photo 3.Lésions typiques de (PPCC) chez la chèvre aspect de la cavité thoracique à l'ouverture (Photo DR P.L. ROEDER)

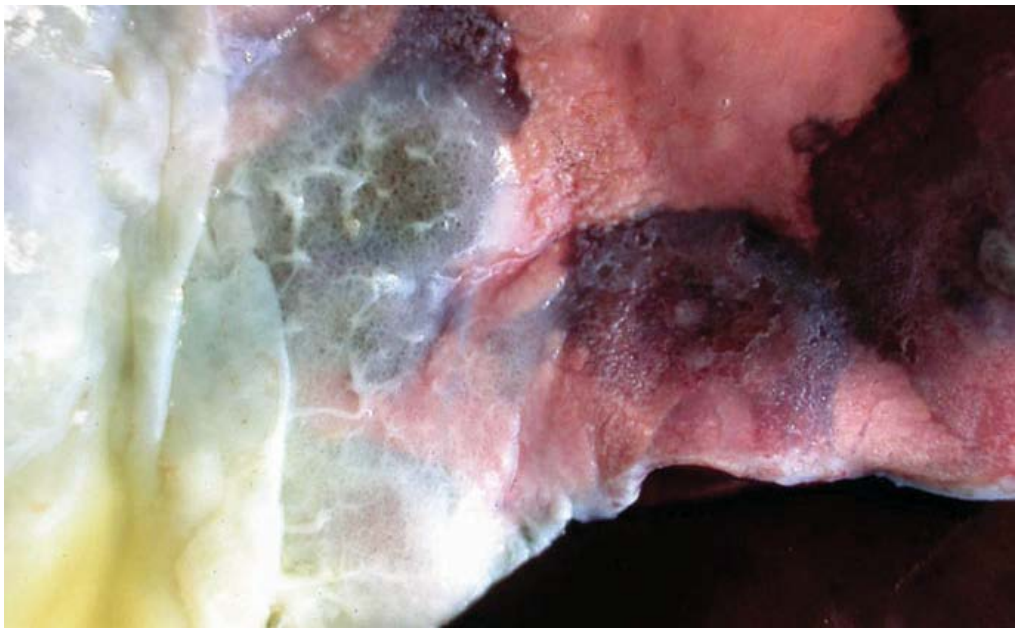

photo4.Poumon recouvert de fibrine (photo F. Thiaucourt CIRAD)

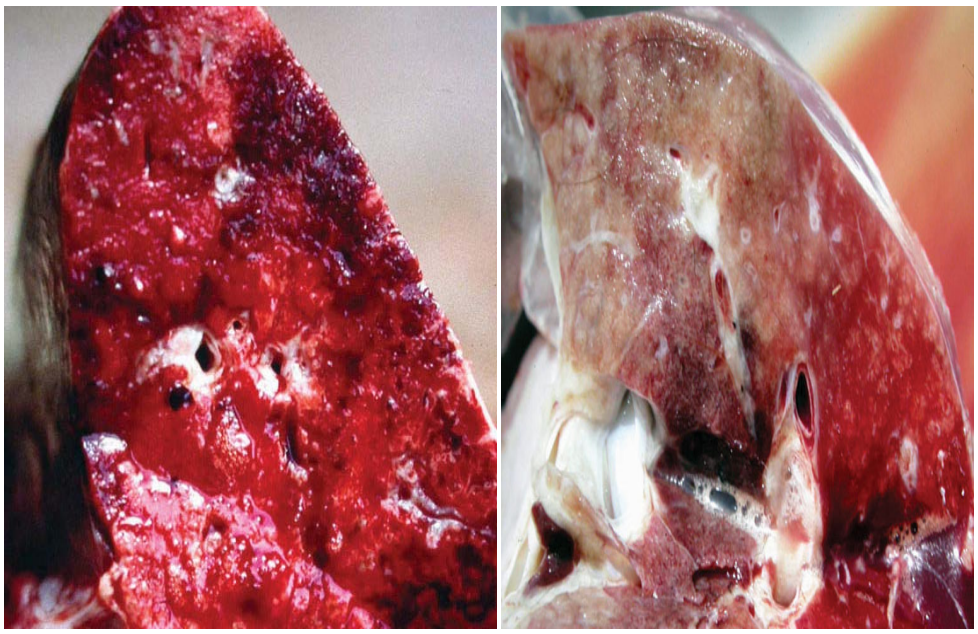

photo5.Coupes pulmonaires montrant différentes stades d'hépatisation

3-2 Diagnostic de laboratoire

Le diagnostic de laboratoire permet de confirmer ou d'infirmer une suspicion de maladie. Il peut être :

- ✓ Un diagnostic direct, recherche de l'agent pathogène directement sur le produit pathologique par culture et identification ou par amplification du génome de l'agent pathogène.
- ✓ Un diagnostic indirect, recherche d'anticorps spécifiques chez un malade, témoins de l'infection pour un agent pathogène donné.

3-2-1Diagnostic direct

Par l'isolement de l'agent incriminé à partir de prélèvements suspects, qui peuvent être soient des ganglions lymphatiques, du liquide pleural ou de morceau de poumon hépatisé.

Après l'isolement, l'identification des espèces cultivées peuvent être déterminées par des tests biochimiques ou par des outils moléculaires par amplification du génome.

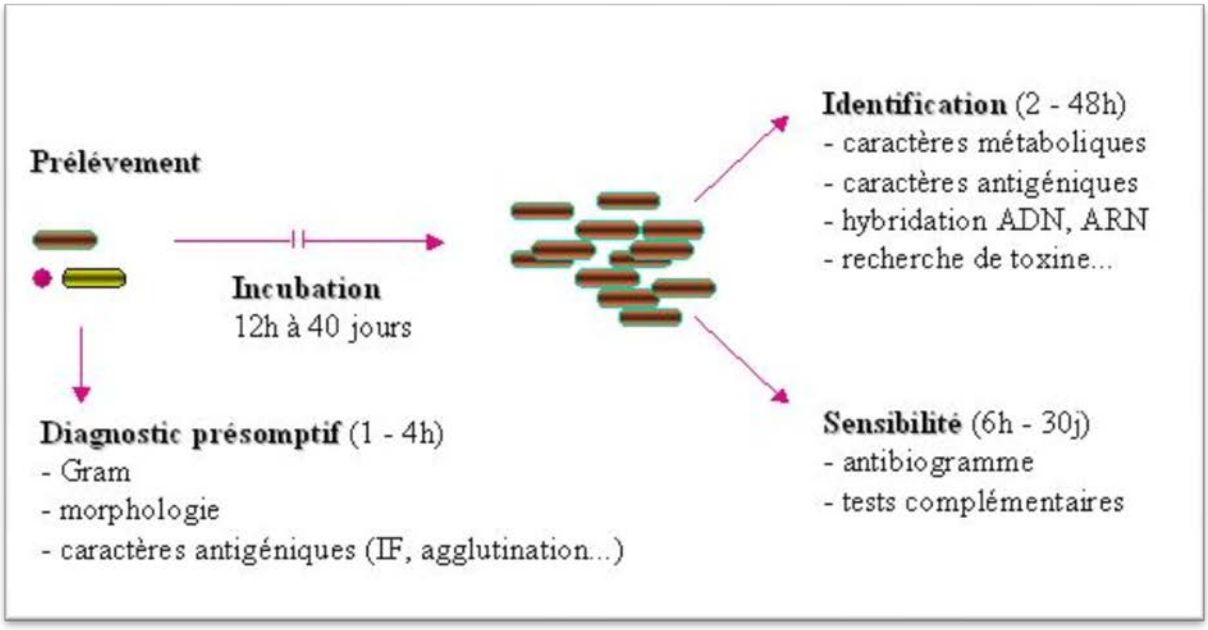

Figure 2. Schéma d'identification des agents pathogènes

3-2-3Diagnostic indirect

Le diagnostic indirect permet la détection des anticorps témoins de l'infection. Ainsi les anticorps sont produits par l'organisme vivant à la suite d'un contact avec un antigène étranger (infection ou vaccination).

Les anticorps sont des protéines nommées immunoglobulines ou gamma-globulines, divisées en différentes classes : les immunoglobulines (GADEM) A, D, E, G, M. Ce sont les IgG (monomères) et les IgM (pentamères) qui sont souvent recherchées dans le diagnostic de l'agent responsable de l'infection. On appelle séropositivité la présence d'anticorps

recherchés dans l'échantillon suspect, qui est le témoin du l'introduction de l'agent causal dans l'organisme.

Plusieurs tests sérologiques sont utilisés pour la détection des anticorps sériques Mccp (MacOwan et Minette 1976. Cependant, l'utilisation systématique de ces tests est limitée par le manque d'équipement et de personnels qualifiés dans les pays où sévit encore la maladie (Taylor *etal.*, 1992; Thiaucourt *etal.*,1992).

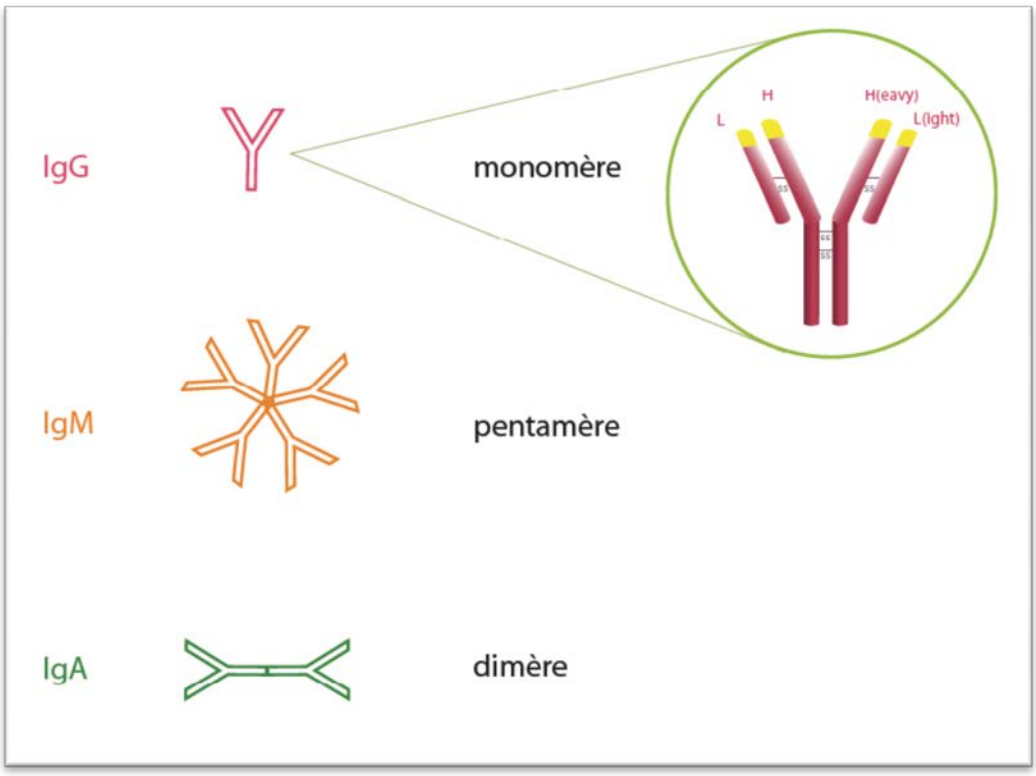

Figure 3. Différentes classes d'Immunoglobulines

Figure 4. Cinétique des anticorps

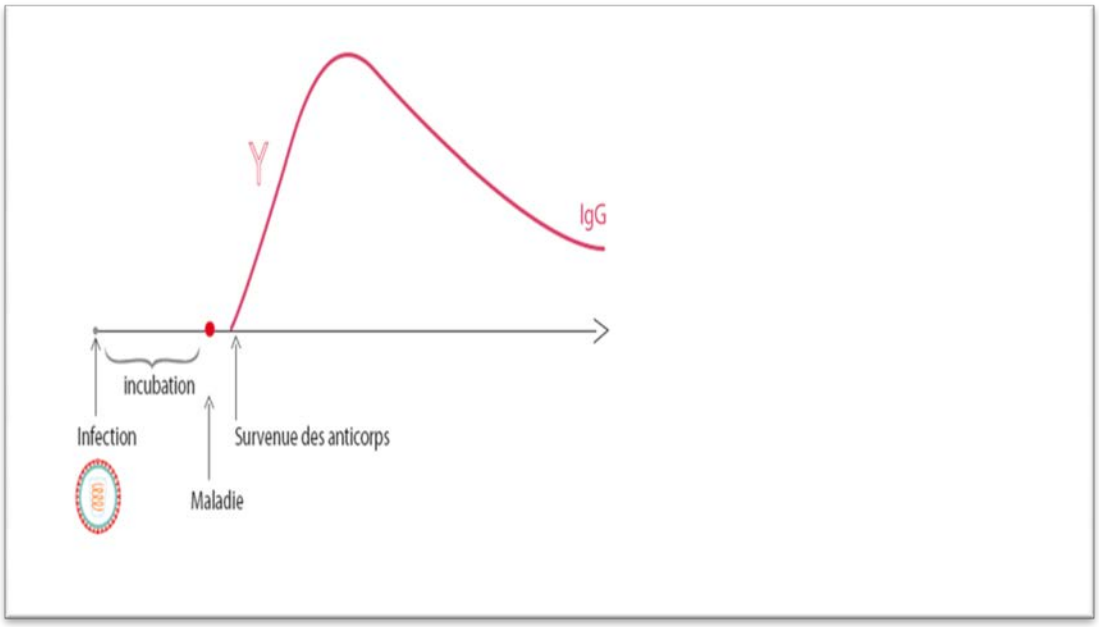

Figure 5. Séropositivité

Parmi ces méthodes nous avons utilisél'ELISA de compétition (cELISA) lors de cette présente étude de la sérosurveillencede la PPCC.

B- Etude expérimentale

I .Matériel et Méthode

1-1 Matériel

1-1-1Zone d'étude

L'étude a été réalisée dans deux zones agro-écologiques différentes ; au Nord dans la région de St Louis, dans le département de Podor sur deux sites, Thiléboubacar et Ndioum. Au Sud-dans la région de Kédougou sur le site de Bandafassi. Dans la partie Nord, la pluviométrie est comprise entre 300 mm et 500 mm par an, avec un climat de type sahélo-saharien. La végétation est arbustive et herbeuse. L'élevage pastoral est le système d'élevage dominant. Dans la partie Sud, le climat est de type soudano-guinéen. La pluviométrie est comprise entre 800 mm et 1200 mm La végétation est représentée par une forêt semi-sèche et un sous-bois dense constitué d'herbes, de lianes et d'arbrisseaux sarmenteux (Centre de suivi écologique, sn 2005). Le système d'élevage dominant est de type agro-pastoral...

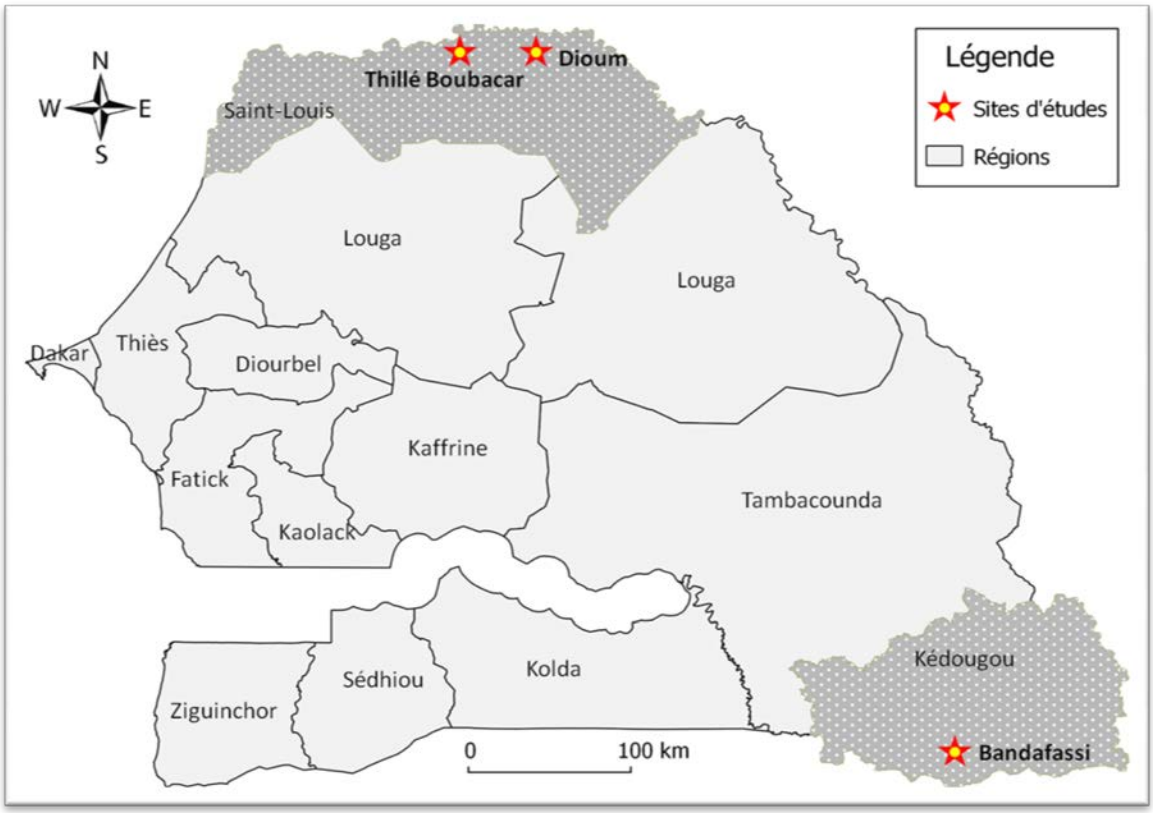

Figure 6. Carte du Sénégal montant les zones d'études

1-1-2Collection de sérums

L'étude a été réalisée sur les sérums de petits ruminantsdisponibles au Laboratoire National d'Elevage et de Recherches Vétérinaires (LNERV). Ces sérums ont été collectés dans le cadre du projet VACNADA dans les localités de Ndioumet Thilé Boubacaren 2011 et du projet PROGEBE dans la localité de Bandafassi en 2012. Nous avons travaillé sur 400 sérums au total.

1-1-3Matériel de laboratoire

La composition du matériel est la suivante :

- ✓ Un agitateur de plaques
- ✓ Pipettes et cônes stériles
- ✓ Poires à pipettes et pipette-man
- ✓ Un lecteur ELISA avec des longueurs d'ondes appropriées assisté par un ordinateur et une imprimante

Pour l'analyse des sérums, nous avons utilisé le Kits cELISA-CCPP (*Mycoplasma capricolum subsp.capripneumoniae*antibody test kit). Le kit est composé de :

- ✓ Microplaques sensibiliséesavec Mccppurifiedlysate monocupules ;
- ✓ Solution de lavage 20X ;
- ✓ Tampon de dilution ;
- ✓ Contrôles témoins ;
- ✓ Monoclonal anti ppccanticorps (Mab 4.52),
- ✓ flacon de conjugué spécifique anti-mousse IgG HRPO concentré
- ✓ Du TMB et solution d'arrêt un flacon de chaque prêt à l'emploi

1-2 Méthode

La méthode employée pour la recherche d'anticorps anti-PPCC est celle recommandée par le centre de référence de l'OIE pour la PPCC/PPCB, le CiradEmvt Montpellier ou lecELISA (Enzyme LinkedImmunoSorbentAssay compétition) qui repose sur le principe d'une compétition entre le complexe antigène-anticorps sérique et anticorps monoclonal-antigène révélable par une anti-globuline marquée à l'enzyme (peroxydase).Le tout se traduit par une coloration en présence d'un substrat spécifique(TMB).

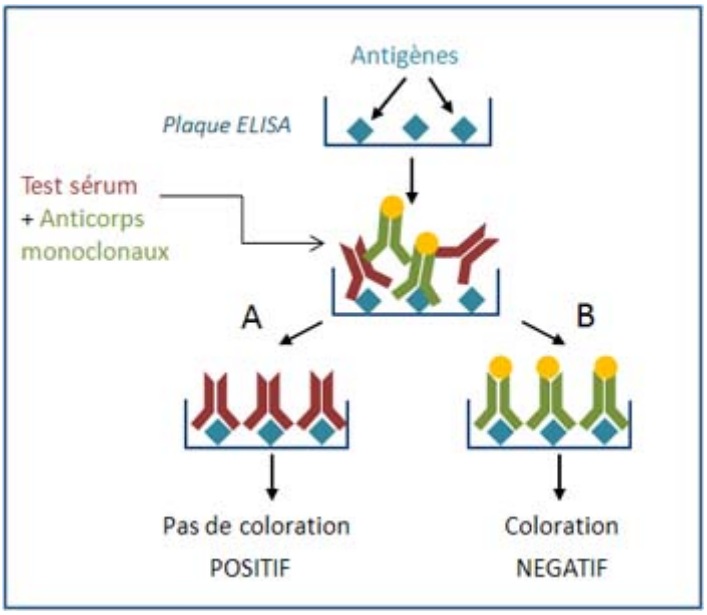

Figure 7. Réaction ELISA de compétition

1-2-1 Analyse des sérums

Les sérums à tester sont d'abord dilués au dixième avec le tampon de dilution 24 (100µl de T 24 +11µl de sérum) mis en présence de l'anticorps monoclonal Mab 4.52 dilué au 1/75 dans une plaque de pré-dilution à concentration égale. De ce mélange, nous avons transféré 100µl de chaque cupule dans la plaque test sensibilisée par le lysat purifié de *Mycoplasmacapricolumsubps.capripneumoniae* fourni par le kit (Figure Plan de plaque??) . La plaque test est portée à l'étuve à 37°C pendant une heure sous agitation douce.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CC	CC	S_1									S_{73}
B	C^{++}	C^{++}	S_2									S_{74}
C	C^{++}	C^{++}	S_3									S_{75}
D	C^{+}	C^{+}	S_4									S_{76}
E	C^{+}	C^{+}	S_5									S_{77}
F	Cm	Cm	S_6									S_{78}
G	Cm	Cm	S_7									S_{79}
H	C^{-}	C^{-}	S_8									S_{80}

Figure 8. Plan de plaque :Colonne 1 à 2 les contrôles : CC, contrôle conjugué ; C++, contrôle fortement positif ; C+, contrôle faiblement positif ; Cm, contrôle monoclonal et C-, contrôle négatif. Colonnes 3 à 12 les échantillons de sérums à tester.

Ce principe met en compétition l'anticorps sérique spécifique anti-Mccp qui s'il existe dans le sérum forme un complexe avec l'antigène spécifique déjà sensibilisé sur les sites masquésà l'anticorps monoclonal Mab 4.52 qui ne peut se fixer que sur l'épitope correspondant.

Après une heure d'incubation, nousavons procédé au premier lavage environ 300µl de tampon de la dite solution bien tapoter la plaque(deux fois).

Ensuite nous avons mis 100µl de tampon conjugué à la concentration indiquée anti-IgG de souris peroxydase. En présence d'anticorps spécifique anti-Mccp dans le sérum à tester, l'anticorps monoclonal n'est pas retenu dans l'espace réactionnelle d'où le conjugué ne peut être fixé dans les puits de la plaque, au cas contraire le conjugué peut se fixer sur l'anticorps monoclonal. Incuber une demi-heure à 37°C sous agitation douce.

Nous avons effectué encore trois lavages successifs trois fois de suite comme indiqué précédemment, le substrat N9 (TMB) de l'enzyme est mis en présence du complexe enzymatique qui assure sa transformation en un composé bleu après 20 mn d'incubation à 37°C sous l'obscurité devenant jaune après blocage à la solution stop 3 (Acide sulfurique).

L'intensité de la coloration est une mesure de l'inverse du taux en anticorps anti-Mccp dans le sérum à tester. Le pourcentage de positivité est déterminé en fonction des densités optiques du contrôle monoclonal et de celui du contrôle conjugué.

Enfin, nous avons dosé les anticorps spécifiques par un lecteur ELISA (LabsystemsMultiskan MS) à la longueur d'onde ƛ 450nm avec le logiciel EDI V2.3.1.Tout échantillon ayant un pourcentage d'inhibition supérieur ou égal à 55% seront considérés comme positif à MccpAntibodies.

Le pourcentage d'inhibition (PI) des échantillons par rapport aux densités optiques obtenues après lecture est déterminé par la relation suivante :

$$\mathbf{SPI = 100 \times (m.\ MabC - S) / (m.\ MabC - m.\ \ CC)}$$

SPI	Pourcentage d'inhibition du sérum à tester
mMab	moyenne contrôle Monoclonal (Mab 4. 52)
S	densité optique du sérum à tester
mCC	moyenne contrôle conjugué

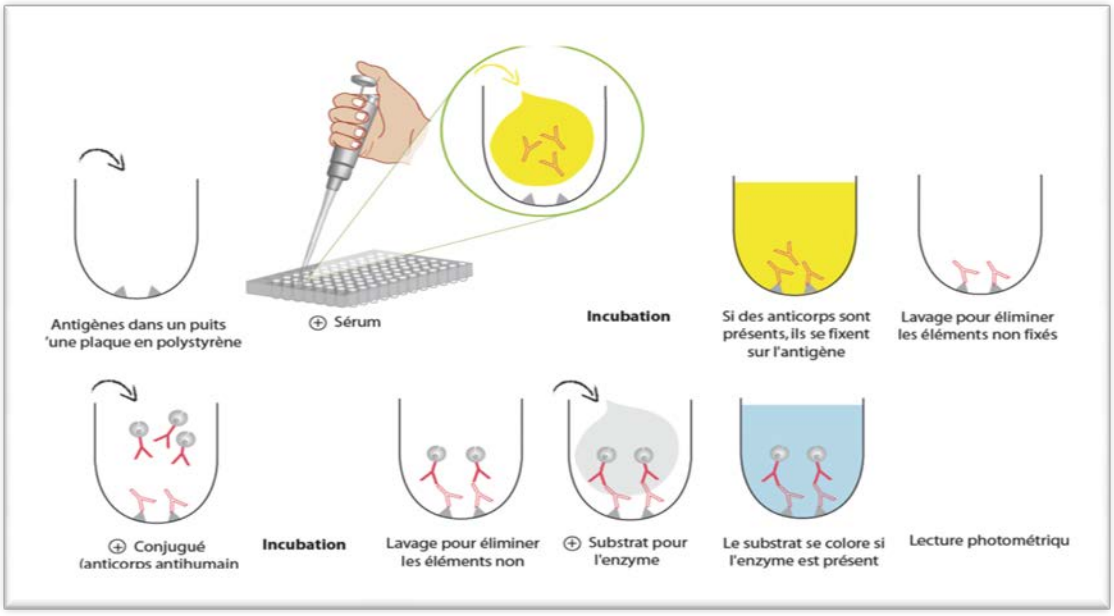

Figure 9.Titrage du sérum pour la recherche d'anticorps par ELISA

Après validation du test l'interprétation des résultats permet d'avoir une idée sur la prévalence de la maladie, les zones à risque et d'en définir des moyens de luttes pour ralentir voire stopper sa progression géographique sur le plan national après une étude à grande échelle au niveau de toutes les régions du pays.

II- RESULTATS

2.1. Les sérums testés à Thilé Boubacar (N=160)

Plaque 1.

	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	32,5	29,5	53,8	43,8	35,2	28,4	30,5	34,8	24,7	7,3
B	35,7	30,2	33,0	42,5	44,7	39,8	18,2	45,7	5,5	11,1
C	35,4	34,4	43,9	42,0	24,0	56,7	25,6	39,2	41,2	22,4
D	16,3	62,5	32,5	42,9	34,8	27,1	24,4	25,5	31,1	15,9
E	39,8	59,7	46,8	42,7	46,8	17,3	3,9	2,7	41,6	37,2
F	49,9	33,3	42,7	57,0	38,5	24,9	38,4	27,9	57,5	23,3
G	50,3	72,2	43,1	53,6	46,4	51,9	43,5	47,8	49,2	28,0
H	25,6	57,5	40,7	34,5	50,8	25,3	32,1	44,3	23,9	17,3

Plaque 2.

	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	41,7	39,7	39,8	44,7	43,3	27,6	40,5	41,4	34,9	22,8
B	43,2	59,1	51,4	53,0	58,3	45,8	56,5	48,7	42,8	38,4
C	44,2	42,3	51,9	48,8	54,0	46,6	52,7	49,9	51,7	46,4
D	36,5	45,9	41,5	52,4	49,4	60,9	42,8	42,3	70,5	38,9
E	40,6	44,2	49,0	57,3	53,2	41,5	46,2	47,8	61,4	43,0
F	43,5	50,4	53,6	58,2	53,0	60,8	55,6	47,7	45,6	44,7
G	54,7	54,3	72,3	52,0	52,1	69,8	51,9	54,2	52,3	40,2
H	30,9	41,2	2,7	43,1	40,0	36,6	44,1	39,7	29,2	32,6

2.2. Les sérums testés à Ndioum (N=160)

Plaque 3.

	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	49,7	48,1	41,6	38,6	47,2	37,4	65,9	13,2	37,4	39,7
B	41,8	23,8	23,9	38,7	38,0	38,0	29,6	30,5	45,4	20,8
C	21,8	13,9	12,5	8,3	15,5	30,9	44,3	42,3	44,3	35,7
D	21,3	14,3	12,4	29,1	7,6	23,2	24,5	34,0	43,7	31,9
E	25,2	21,5	17,5	20,0	30,0	47,7	33,8	28,4	54,9	8,6
F	28,4	19,1	27,8	50,3	34,3	36,4	63,3	43,9	44,6	30,4
G	33,0	41,7	30,0	40,5	35,0	32,6	45,1	40,7	29,3	34,7
H	21,6	16,2	23,5	10,1	24,8	30,5	-3,8	30,9	28,7	-6,4

Plaque 4.

	3	4	5	6	7	5	9	10	11	12
A	51,6	42,7	37,5	30,8	36,6	29,7	33,3	39,2	44,9	55,2
B	40,2	31,1	43,8	50,3	31,7	42,5	42,4	49,8	65,3	42,8
C	4,9	49,5	3,5	46,2	44,3	36,0	17,0	50,1	57,5	46,9
D	60,4	-2,0	14,6	53,1	23,4	51,9	-8,9	36,5	43,6	56,6
E	46,1	54,7	52,6	54,3	59,2	-1,3	24,4	47,9	5,0	40,5
F	44,7	51,2	48,4	44,3	47,7	54,6	24,4	49,2	50,3	41,4
G	49,3	44,3	44,0	44,7	49,5	47,6	40,6	50,6	54,1	41,3
H	44,1	56,7	51,5	36,7	37,3	37,8	44,2	49,4	35,5	37,8

2. 3. Les sérums testés à Bandafassi (N=80)

Plaque 5.

	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	41,3	51,2	37,8	42,2	69,2	35,7	38,6	42,4	33,9	24,0
B	-12,4	48,7	47,3	37,5	47,3	37,7	40,2	38,0	38,7	34,2
C	20,0	33,4	38,0	34,6	33,5	29,8	17,0	30,1	40,9	22,6
D	31,4	39,8	24,0	31,3	75,8	40,5	40,3	19,5	38,7	37,2
E	34,7	33,1	27,9	30,2	39,7	53,5	19,0	39,8	54,1	45,9
F	25,4	34,3	81,9	44,7	44,0	53,4	36,3	43,1	48,5	40,9
G	37,4	49,8	53,6	41,5	41,1	49,0	-10,0	42,0	25,7	27,2
H	46,0	22,8	29,5	36,4	66,8	1,5	39,2	29,6	12,8	23,6

2.4. Validation du test

	Densités optiques		**Pourcentages d'inhibition**		
	cc	**cm**	**c++**	**c+**	**c-**
Plaque 1	0,052	0,794	89,45	78,58	-2,49
Plaque 2	0,0535	1,03575	87,83	75,52	0,84
Plaque 3	0,056	0,9065	88,24	76,39	-8,23
Plaque 4	0,0775	1,2995	87,89	77,48	16,16
Plaque 5	0,1075	1,0735	85,40	77,43	0,72
Références	**<0,3**	**0,5<x<2**	**60-90%**	**50-80%**	**<35%**
Validation	**ok**	**ok**	**ok**	**ok**	**ok**

2-1 Prévalence globale de l'infection à Mccp

Le test cELISA s'est révélé positif pour 32 sérums parmi les 400 testés, ce qui correspond à un taux de séropositivité de 8% en moyenne (Tableau I)

Tableau 1. Prévalence globale et par localité

Localités	**Nombre d'échantillons testés**	**Nombre de positifs**	**Prévalences (%)**
Thilléboubacar	160	19	11,8
Ndioum	160	9	5,6
Bandafassi	80	4	5

Total	**400**	**32**	**8**

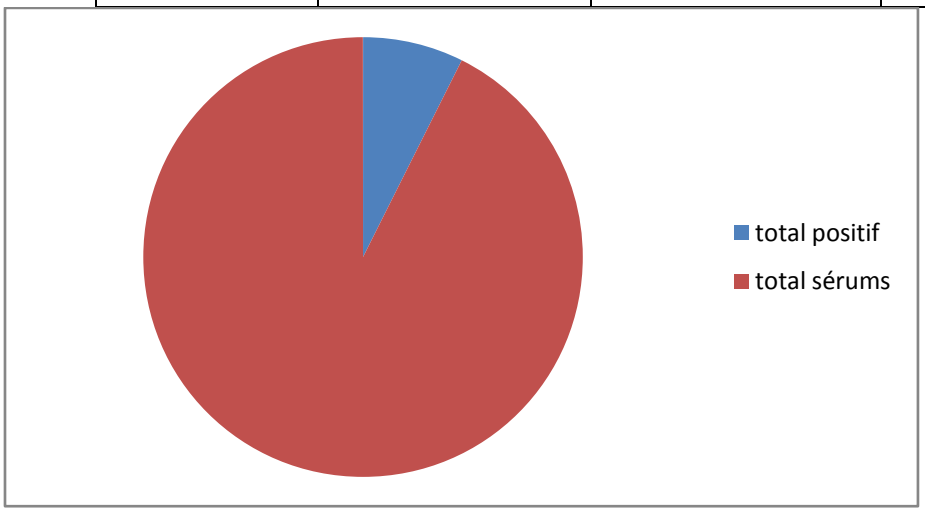

Figure 10. Prévalence globale

2-2 Résultats par localité

Les résultats par site montrent que les prévalences de la PPCC sont de 11,8% pour Thiléboubacar, 5,6% à Ndioum et 5% à Bandafassi. La prévalence est plus élevée au nord avec une prévalence 8,43% contre 5% au sudcomme le montre le tableau ci-dessus.

Les résultats par site sont représentés en pourcentage de positivité dans les figures8, 9 et 10 suivantes :

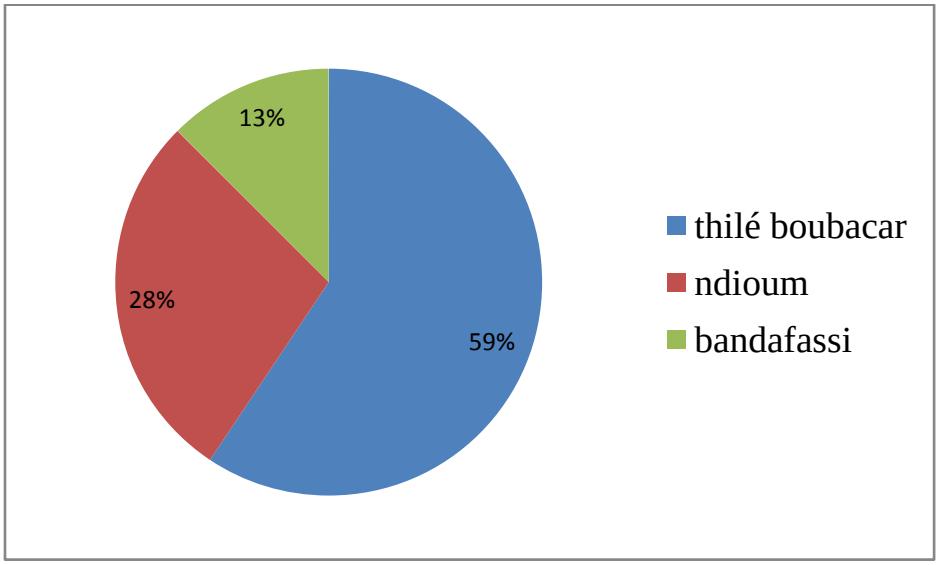

Figure 11. Pourcentage de positivité par localité

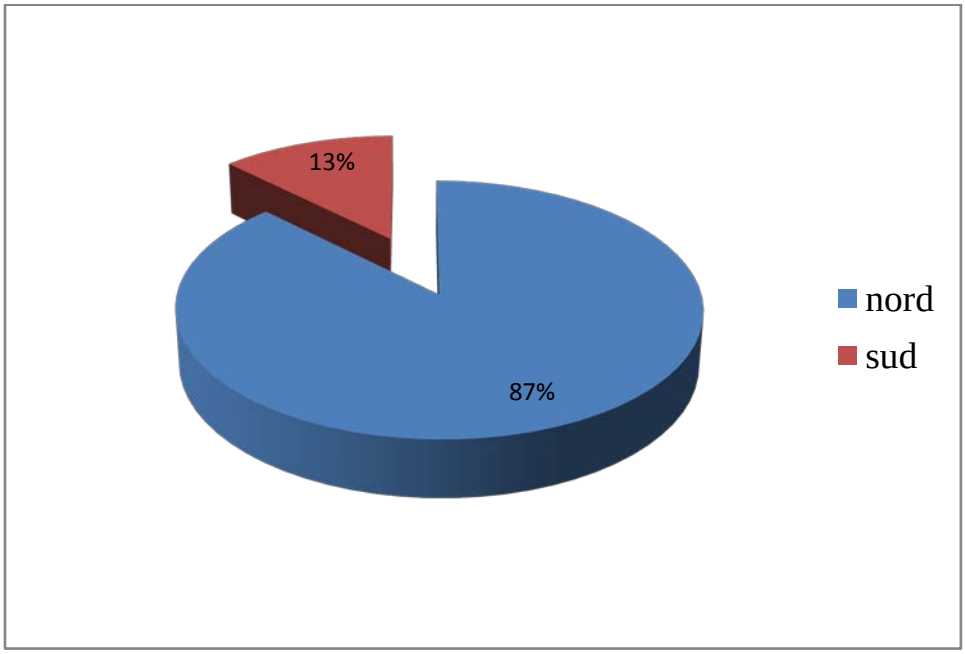

Figure 12.Prévalence entre le nord et le sud

III- DISCUSSION

La PPCC, de par son importance et sa répartition étaient mal connuejusqu'à présent en raison de la difficulté à isoler Mccp et de l'absence de techniquessérologiques spécifiques.Peu de tests sérologiques sont disponibles pour détecter les anticorps contre *Mycoplasmacapricolumsubsp. capripneumoniae*, l'agent causal de la péripneumonie contagieuse caprine (PPCC). Le test de fixation du complément, le test prescrit pour les échanges internationaux, utilise un antigène brut qui réagit de manière croisée avec tous les autres espèces de mycoplasmes du «cluster mycoides" infectant fréquemment les troupeaux de chèvres. L'absence d'un test plus spécifique a été un véritable obstacle à l'évaluation de la prévalence et l'impact économique de PPCC dans le monde entier. Un nouveau kit ELISA de compétition pour PPCC, a été mis au point par leCirad et est utilisé pour évaluer la prévalence de PPCC. Ce kit a été testé avec succès danscertaines régions du Kenya, Éthiopie, Maurice, le Tadjikistan et le Pakistan dans une étude collaborative internationale et présente une très grande spécificité et sensibilité vis-à-vis de l'agent de la PPCC (Peyraud et al., 2014). Cette technique a été utilisée dans notre étude pour l'étude da la prévalence de la PPCC dans les trois localités.

Mis à part les observations faites par Doutre*et al.,* sur une chèvre atteinte de polyarthrite dans la localité de Bandia 50 km de Dakar au Sénégal (Doutre, et *al*., 1981), aucun cas clinique n'a été jusque-là rapporté au Sénégal. Une enquête de niveau national sur l'ensemble des régions et surtout les zones frontalières s'avère nécessaire et utile pour la surveillance de la PPCC. Comme c'est le cas de la PPCB concernant la séro-surveillance, et en essayant de nous inspirer du modèle de la Grande Bretagne qui pour maintenir son statut de pays indemne des mycoplasmoses le seul d'ailleurs du continent européen, pratique annuellement une surveillance active par lasérologie sur plus de 60 000 ovins et caprins et ces efforts restent insuffisants selon les experts (Thèse Elodie sur les mycoplasmes, 2012).

Les résultats obtenus montrent une différence de prévalence entre les trois localités et également entre le nord du pays caractérisé par une prévalence plus élevée 8, 43% contre 5% au sud du pays. Mais ces différences ne sont pas statistiquement significatives. Cette différence peut être expliquée par la transhumance des petits ruminants entre les pays limitrophes (Mauritanie et Mali) qui d'après les données antérieures auraient été des zones endémiques à l'agalaxie contagieuse, de même que pour la PPCB et corroborent les observations de Perreau *et al.,* sur une étude menée dans ces deux pays frontaliers au Sénégal (Perreau. Giauffret*et al.,* 1975). D'après les observations faites par Mbengue*et al.,* (Présentation CST ISRA. 2011) au Mali, en Guinée, où la morbidité était de 4 à 10% avec une mortalité de 3,8% et avec plus de 25% du cheptel demeurant porteurs chroniques après traitement en zone d'enzootie et qu'au même titre les porteurs sains constituant ainsi de véritables sources de contamination dans le temps par le fait du caractère extensif de l'élevage, de la transhumance du bétail et de l'abus d'antibiotiques qui favorise la dissémination des pathogènes (Diallo et *al*.,1999).

Ainsi on note une présence avérée de la PPCC dans 13 pays africains selon (Nicholas, .2002) auxquels vient s'ajouter le Sénégal suite aux résultats obtenus durant cette étude.

L'élevage des petits ruminants au Sénégal tel pratiqué est mixte c'est à dire ovins et caprins sont mélangés au pâturage, et sur les résultats obtenus des cas positifs sur des ovins sont décelés (12,5%) ceci va laisser croire à un éventuel réservoir naturel, car la PPCC est une maladie qui atteint majoritairement les caprins quel que soit leur âge et sexe, avec une forte contagion ou la transmission est assurée par les produits de l'excrétion (toux, jetage) avec un haut risque de morbidité et de mortalité au sein du troupeau.

Il est à remarquer jusqu'à ce jour aucun foyer de PPCC n'a été déclaré ni au Sénégal, ni dans les pays limitrophes, peut être aussi par méconnaissance de la situation sanitaire de cette dernière dans la région.

Ces cas positifs au cELISA peuvent être considérés comme marquant une infection naturelle récente ou ancienne par prudence, car avec la méthode ELISA, les anticorps révélés peuvent persister un an voire plus (Manuel Standard., OIE, 1992).

IV- CONCLUSION

Afin de mieux lutter contre la pauvreté, l'état du Sénégal a mis en place différents programmes de développement agricoles, parmi lesquels le sous secteur de l'élevage occupant plus de 70% de la population rurale essentiellement composée de femmes et enfants en font une activité dominante surtout l'exploitation des espèces à cycles court ou les petits ruminants occupent une place de choix tant pour son impact économique ou socioculturel.

Sur le plan économique, les petits ruminants représentent une source de revenue avérée permettant de subvenir à certains besoins récurrents de la famille en plus la rente qu'ils procurent dans l'exécution des cérémonies rituelles, traditionnelles et religieuses (tabaski).

Malgré la place qu'occupe cet élevage, beaucoup d'efforts restent à ménager pour booster ce secteur surtout en matière de santé, ou beaucoup de choses demeurent insuffisantes ainsi qu'à l'amélioration des techniques d'exploitation.

Comme la PPCB, la PPCC demeure une maladie extrêmement contagieuse où les animaux cliniquement sains après traitement et les porteurs asymptomatiques tels que les ovins constituent les véritables sources de réinfection.

A la vue des ces résultats, il serait intéressent de bien mener des études plus approfondies sur la PPCC, pour cartographier les différentes zones à risque au niveau national et d'en définir les stratégies meilleures pour endiguer sa progression.

Comme la PPCB, la PPCC demeure une maladie extrêmement contagieuse ou les animaux cliniquement sains après traitement et les porteurs asymptomatiques tels que les ovins constituent les véritables sources de réinfection.

BIBLIOGRAPHIE

1-Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie : Situation Economique et Sociale du Sénégal Ed **2011** / ELEVAGE

2-Annuaire de la Santé Animale FAO/OMS/OIE, 1986.

3-ASKAA G and HENNING E (1976). NOTE: Elevation of Mycoplasma agalactiae subsp. bovis to Species Rank: Mycoplasma bovis (Hale et al.) comb. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **26**, 323-325.

4- Diallo.SK., CONDE. MC, Yattara F (1999) – Surveillance of rinderpest and Contagious bovine pleuropneumoniaeinGuinea. The seroonitoring and surveillance of rinderpestthroughoutAfrica. Phase III : Results for 1998, FAO, AIEA – OAU – IBAR – PARC, Machakos, Ke.nya.

5– Dorly et *al*., (2005) Les organisations d'éleveurs et de pasteurs au Sénégal, Approche socio politique

6 - DOUTRE M.P, PERREAU P & NDIAYE A. M (1981). Foyer d'agalaxie contagieuse de la chèvre à Mycoplasmaagalactiae au Sénégal. *Ref. 25 fevrier 1981*.

7 – Ed. 2011/ élevage. Rapport annuel

8 – MACOWAN et MUETTE (1976). Tests sérologiques de detection d'anticorps

9 - MACOWAN K. J & MINETTE J.E (1978). The effect of high passage mycoplasma strain F38 on the course of contagious caprinepleuropneumonia (CCPP). *Trop. Anim. HealthProd*., **10**, 31-35.

10 –MANUEL STANDARD OIE, 1992

11 - MBENGUE*et al.*, (2011) – Etude de l'évolution de la prevalence de la PPCB au Sénégal de 2007 à 2011.

12-MCAULIFFE L, ELLIS RJ, MILES K, AYLING RD and NICHOLAS RAJ (2006).Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology*, **152**, 913-922.

13 - MUTHONIE et RURANGI, 1972

14 - NOCARD et ROUX, 1898

15 - Stages FAO, IEMVT,Avril 1993

16 - Thèse ELODIE B. Le point sur les mycoplasmoses des ruminants (2012).

17-OZDEMIR U, OZDEMIR S, MARCH J, CHURCHWOOD C. & NICHOLAS RAJ (2005).Outbreaks of CCPP in the Thrace region of Turkey.*Vet. Rec*., **156**, 286-287.

18-PADDENBERG R, WULF S, WEBER A, HEIMANN P, BECK L and MANNHERZ H (1996).Internucleosomal DNA fragmentation in cultured cells under conditions reported to induce apoptosis may be caused by mycoplasma endonucléases. *European Journal of CellBiology*, **69**, 105-109.

19-PERREAU P, LE GOFF C & GIAUFFREA A. (1976). Le diagnostic sérologique de l'agalaxie contagieuse des petits ruminants : un test de fixation du complément. *Bull. Acad. Vet. Fr*., **49**, 185-192.

20 -Peyraud A, Poumarat F, Tardy F, Manso-Silvan L, Hamroev K, Tilloev T, Amirbekov M, Tounkara K, Bodjo C, Wesonga H, Nkando I, Jenberie S, Yami M, Cardinale E, Meenowa D, Jaumally M, Yaqub T, Shabbir M, Mukhtar N, Halimi M, Ziay G, Schauwers W, Noori H, Rajabi A, Ostrowski S, Thiaucourt F. 2014. An international collaborative study to determine theprevalence of contagious caprinepleuropneumonia by monoclonal antibody-based cELISA.BMC VeterinaryResearch 10:48.

21 Centre de suivi écologique, Rapport sur l'état de l'environnement au Sénégal (2005)

22 -THIAUCOURT F, GUERIN C, MADY V. & LEFEVRE P-C (1992). Diagnostic de la pleuropneumonie contagieuse caprine : améliorations récentes. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz*., **11**, 859-865.

ANNEXE I

Réaction biochimique des mycoplasmes caprins et ovins

Réactions	**Mmm(LC)**	**Mmc**	**Mc-c**	**F38**	**M. ovi**	**M.arg**	**M. agal**	**M. conj**	**M. putr**
Fermentation du glucose	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Hydrolyse de l'arginine	+	-	-	+	-	-	-		
Réduction du tétrazolium									
- En aérobiose	+	+	+	-/+	**f**	-	+	-	**f**
- En anaérobiose	+	+	+	**f**/+	+	+	+	+	**f**
Formation de 'film and spot '	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Activité de la phosphatase	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Digestion du sérum	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Sensibilité à la digitonine	+	+	+	+	+	+	+	+	+