

## THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention de grade de Docteur en Sciences et Techniques

Formation Doctorale: Biologie Santé Environnement

Spécialité: Virologie-Biologie Moléculaire-Biotechnologies

Sous le thème

# Caractérisation Moléculaire des Souches Marocaines des Capripoxvirus et développement d'un Vaccin Inactivé Adjuvé contre la Clavelée Ovine au Maroc

Présentée par :

**Saida HAJJOU**

Soutenu le: 7 Novembre 2020

A la Faculté des Sciences et Techniques de Settat devant le jury composé de :

<b>Pr. Bouchaib BENCHARKI</b>	<b>PES</b>	<b>Faculté des Sciences et Techniques, Settat</b>	<b>Président/Rapporteur</b>
<b>Pr. My Mustapha ENNAJI</b>	<b>PES</b>	<b>Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Jaouad BERRADA</b>	<b>PES</b>	<b>Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Pr. Sanah ESSAYAGH</b>	<b>PES</b>	<b>Faculté des Sciences et Techniques, Settat</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Dr. Chafiq LOUTFI</b>	<b>Responsable de l'Unité de Virologie à Biopharma, Rabat</b>		<b>Co-Directrice de thèse</b>
<b>Pr. Malika FAKIRI</b>	<b>PES</b>	<b>Faculté des Sciences et Techniques, Settat</b>	<b>Directrice de thèse</b>

Année Universitaire: 2020/2021

### Résumé

La clavelée ou la variole ovine (SP) est une maladie qui affecte les moutons, entraînant des pertes économiques très considérables. L'agent causal est un virus à ADN, double brin de taille 150 kpb, appartenant à la famille des poxvirus (*Poxvirinae*). La Maladie est présente au Maroc sous forme enzootique. Cette thèse décrit des études expérimentales sur différents volets de classification phylogénétique, pathogénicité, immunogénicité et vaccination contre le virus du SP au Maroc.

L'étude moléculaire et phylogénétique (Chapitre I partie 2) du virus de la clavelée (SPV) au Maroc a été réalisée sur un échantillonnage de 35 échantillons dont 29 sont des souches virales et 6 sont des souches de références et vaccinales. Les isolats utilisés dans cette étude s'étalent sur différentes années (de 1981 à 2010) et régions du royaume. Les résultats de l'analyse moléculaire réalisée par le séquençage de deux gènes différents, a montré qu'en se basant sur le gène *P32* tous les isolats Marocains sont étroitement liés, ramifiés et groupés avec les autres souches de références du SPV. Quant au gène codant pour la *RPO30*, seulement 21 isolats ont été amplifiés et séquencés en utilisant les amorces spécifiques de ce gène, mais 20 d'entre eux ont été groupés avec les souches de référence SPV et la souche de la région d'Azilal a été groupée avec les souches de référence de la maladie de la dermatose nodulaire contagieuse (LSDV). L'analyse des séquences obtenues pour le gène qui code pour la *P32* a montré une hyperconservation chez tous les isolats marocains et les souches de référence. Concernant l'analyse de séquence du gène qui code pour la *RPO30* les 20 isolats marocains sont identiques, par contre pour la souche vaccinale utilisée au Maroc, une mutation a été détectée.

L'évaluation du pouvoir pathogène (Partie 2 Chapitre II) a été réalisée sur six souches Marocaines du SPV, isolées entre les années 1993 et 1994, durant la période épizootique de la maladie au Maroc. Les isolats sélectionnés ont montré des ECP caractéristiques, avec des titres infectieux différents, les souches de Berkane, Oujda ont présenté des titres importants sur cellules. L'expérimentation a été réalisée sur des moutons jeunes et séronégatifs à la SP. Les moutons infectés ont présenté des signes cliniques contribuant à la SP avec des degrés de gravité différents. La souche de Berkane a présenté des signes cliniques aigus en comparaison avec les autres souches, surtout celle d'Azilal qui n'a montré aucun signe de pathogénicité chez l'animal infecté. Le titre infectieux le plus élevé sur mouton a été obtenu par la souche de Berkane.

Le 3ème chapitre de la partie expérimentale consiste à réaliser une comparaison des deux structures 3D des protéines P32 et RPO30 de la souche Berkane la plus pathogène et la souche vaccinale atténuée Roumanie, par la voie de la modélisation moléculaire, afin de déterminer s'il y a des modifications qui peuvent altérer la pathogénicité, et ce, par la prédiction des épitopes neutralisants des deux souches et la détermination de leur mécanisme d'action. Les résultats obtenus ont montré que, pour la P32, elle n'a pas montré de modification à cause de la conservation totale de la séquence protéique, d'autre part, la RPO30 a montré des mutations au niveau de la région C-terminal, ce qui diminue le score prédictif des épitopes chez la souche vaccinale.

Le 4ème chapitre de la 2ème partie contribue à la production d'un nouveau vaccin inactivé à partir d'une souche Marocaine pure adapté à la pathologie locale. Le vaccin produit a conféré une très bonne protection chez les moutons vaccinés avec des indices de protection élevés et sans signes cliniques liés à la clavelée ovine.

Ce travail a permis de bien identifier les souches virales du SPV qui ont déjà circulées au Maroc entre les années 1981 et 2010, ainsi que le développement d'un nouveau vaccin, à partir d'une souche locale, afin de contribuer à la résolution de la problématique liée à la maladie du SP au Maroc.

Mots clés : Poxvirus, SP, SPV, variole ovine, clavelée, P32, RPO30, phylogénie, pathogénicité, immunogénicité, vaccin inactivé.

### Abstract

Sheep pox (SP) is a disease that affects sheep, causing considerable economic losses. The causative agent is a 150 kbp double-stranded DNA virus belonging to the poxvirus family (*Poxvirinae*). The disease is present in Morocco in enzootic form. This thesis describes experimental studies on different aspects of phylogenetic classification, pathogenicity, immunogenicity and vaccination against the SP virus in Morocco.

The molecular and phylogenetic study (Chapter I part 2) of sheep pox virus (SPV) in Morocco was performed on 35 samples which 29 are viral isolates and 6 are reference and vaccine strains. The isolates used in this study are spread over different years (from 1981 to 2010) and different regions of the kingdom. The results of the molecular analysis carried out by the sequencing of two different genes, showed that, based on the *P32* gene, all the Moroccan isolates are closely related, branched and grouped with the other reference strains of the SPV. For the gene *RPO30* only 21 isolates were amplified and sequenced using the specific primers for this gene, but 20 of them were pooled with the SPV reference strains and a strain of the Azilal region was clustered with the reference strains of Lumpy Skin Disease (LSDV). The analysis of the sequences obtained for the *P32* gene showed a hyperconservation of this gene in all the Moroccan isolates and the reference strains. Regarding the sequence analysis of the *RPO30* gene, the 20 Moroccan isolates are identical; however, for the vaccine strain used in Morocco, a mutation was detected.

The pathogenicity assessment (Part 2, Chapter II) of six Moroccan strains of SPV, isolated between 1993 and 1994, during the epizootic period of the disease in Morocco. The selected isolates showed characteristic CPE, with different infectious titres, Berkane strains, and Oujda represented important cell titres. The experiment was carried out on young and seronegative to SP. Infected sheep showed SP clinical signs with different degrees of severity, the Berkane strain showed remarkable clinical signs compared to other strains, especially that of Azilal which showed no signs of pathogenicity in the infected animal. The highest infectious titer on sheep was obtained by the Berkane strain.

The third chapter of part2 consists in comparing the two 3D structures of the P32 and RPO30 proteins of the most pathogenic Berkane strain and the attenuated vaccine strain Roumania, through molecular modeling, in order to determine if there is changes that may alter pathogenicity by predicting the neutralizing epitopes of both strains and determining their mechanism of action. The results obtained showed that, for P32, it did not show any modification because of the total conservation of the protein sequence, on the other hand, RPO30 showed mutations at the level of the C-terminal region, which decreases the predictive score of epitopes in the vaccine strain.

The fourth chapter of Part 2 contributes to the production of a new inactivated vaccine from a local strain. The vaccine provided very good protection in vaccinated sheep with high protection indices.

This work allowed the isolation of pathogenic strains, which were circulating in Morocco from 1981 to 2010, to help developing a vaccine from local strain in order to contribute to the resolution of the SP disease problem in Morocco.

Key words: Poxvirus, SP, SPV, P32, RPO30, Phylogeny, Pathogenicity, Immunogenicity, Inactivated vaccine.

# Dédicaces

## *A Mes Parents*

*Tellement vous avez fait beaucoup de choses pour moi, que je ne sais même pas  
par où commencer,*

*Il serait bien long de tout citer:*

*Merci pour les encouragements et l'éducation que vous m'aviez donné depuis  
toute petite.*

*Merci d'être à mes côtés quand j'avais besoin de réconfort.*

*Merci de me guider dans les moments difficiles.*

*Merci pour tout le reste...ce reste ou ce tout, comme on veut, si difficile pour moi  
à définir, ça doit s'appeler l'amour.*

*Alors, tout simplement Merci.*

*Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai  
toujours de mon mieux pour rester votre fierté et ne jamais vous décevoir.*

*Que Dieu le tout puissant vous préserve, vous accorde santé, bonheur, quiétude de  
l'esprit et vous protège de tout mal.*

## *A mon cher mari Mohamed*

*Ton encouragement et ton soutien étaient la bouffée d'oxygène qui me ressourçait  
dans les moments difficiles, de solitude et de souffrance.*

*Merci d'être toujours à mes côtés, par ta présence, par ton amour dévoué et ta  
tendresse, pour donner du goût et du sens à notre vie de famille.*

*Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.*

*Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour.*

***A ma chère fille Rita***

*Qui a illuminé ma vie et m'a donné plus de courage et d'espoir.*

***A Mes chers Frères et mes belles sœurs***

*Ahmed et Fatma, Mohammed et Khadija, Abderrahmane, Abdelhak, Abdelhay, et Abdelkarim : je vous aime*

***A ma belle famille***

*Mes beaux parents, ma très chère belle sœur Asmaa, son mari Youssef et ses princesses ainsi que mon beau frère Amine.*

***A mes petits neveux et mes petites nièces.***

***A mes amies***

*Zineb Lmrabih, Rachida Haloua, Samira Hentour, Samira Natoubi, Khadija Khataby et Fatima ezzahra Bennani.*

***A tous mes professeurs de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat.***

*Cette thèse vous est dédiée en l'expression de toute mon affection et ma reconnaissance.*

***Saida HAJJOU***

# Remerciements

*Au terme de ma dernière année de thèse, Je tiens vivement à adresser mes sincères et chaleureux remerciements à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin théoriquement ou pratiquement à la réalisation de ce travail.*

*Monsieur le **Pr. Jamal NAJA, Doyen** de la Faculté des Sciences et Techniques-Settat (FSTS), relevant de l'Université Hassan-1<sup>er</sup> de Settat(UH1), pour l'effort et le soutien qu'il accorde à la recherche Scientifique. Veuillez trouver ici mes respects les plus dévoués.*

*Monsieur le **Dr Jamal MALEK, Directeur** de la Société de Production Biologiques et Pharmaceutiques Vétérinaires-Rabat (Biopharma) pour m'avoir accueillie au sein de cette Société pour compléter ma formation. Veuillez trouver ma gratitude et mon profond respect.*

*Je tiens à exprimer par le présent travail ma profonde gratitude et ma reconnaissance à **Pr. BENCHARKI BOUCHAIB**, Responsable du Laboratoire d'Agro-Alimentaire et Santé. Mes remerciements vont aussi à tous les honorables professeurs de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat.*

*Je tiens vivement à remercier Mon encadrante **Pr. Malika FAKIRI**, responsable du laboratoire de Génétique et Biotechnologie pour m'avoir fait l'honneur d'encadrer ce travail. Son orientation, ses directives, ainsi que ses conseils et critiques étaient essentielles pour la conception et l'élaboration de ce travail. Veuillez trouvez ici, l'assurance de mon grand respect et sincère gratitude.*

*Mes sincères remerciements, ma grande considération et mon respect infini vont vers **Dr. Chafiq LOUTFI**, pour la qualité de son encadrement, ses*

*conseils judicieux et riches et pour le temps qu'elle m'a consacré afin de mieux cerner le sujet, qu'elle veuille bien trouver à travers ce travail l'expression de mes sincères gratitude.*

*Je tiens aussi à remercier :*

***Dr. Bachir HARIF**, pour son encadrement, dans la réalisation de la partie expérimentale de ce travail.*

***Dr. Mehdi EL HARRAK**, de m'avoir aidé à initier mon travail sur le virus de la clavelée au Maroc,*

*Mme. Malika, Zhor et Amina du service de contrôle de qualité, de m'avoir aidé à faire l'inventaire des échantillons utilisés dans cette étude, ainsi que Mlle. Ghizlane SEBBAR.*

*Ma grande reconnaissance et mes vifs remerciements vont également à tout le personnel du laboratoire BIOPHARMA, qui n'ont pas épargné d'effort pour m'informer et éclaircir toutes les étapes nécessaires à parcourir le long de mon stage pour arriver à bien maîtriser mon travail.*

*Mes remerciements vont aussi à tous les honorables membres de jury d'avoir accepter de juger ce travail.*

*Mon plus grand remerciement est adressé au Professeur de l'enseignement supérieur **Bouchaib BENCHARKI**, de m'avoir honoré par sa présence en acceptant d'être président de jury et rapporteur de cette thèse.*

*Mes sincères remerciements sont adressés aux professeurs de l'enseignement supérieur, **My Mustapha ENNAJI**, **Jaouad BERRADA** qui m'ont honorés en acceptant d'être des rapporteurs de ce travail et de faire partie du jury de cette thèse, ainsi que pour le temps qu'ils ont consacré pour évaluer ce travail.*

*J'adresse mes remerciements au professeur de l'enseignement supérieur, **Sanah ESSAYAGH** pour m'avoir honoré de sa présence en acceptant d'être examinatrice de cette thèse et de juger ce travail.*

*Dans cette partie, je souhaite remercier toute l'équipe du laboratoire de Génétique et Biotechnologie à la FST de Settat. Ainsi que l'équipe de recherche du laboratoire de virologie de la Société Biopharma - Rabat.*

*Je tiens à remercier également le Ministère de l'Enseignement Supérieur, Formations des Cadres et de la Recherche Scientifique au Maroc et le Centre National de Recherche Scientifique et Techniques(CNRST), en personne de **Dr. Mostafa ELFAHIME** et **Mlle. Sanaa A. ALAOUI**, pour la réalisation d'une partie de mon travail au sein du laboratoire de Biologie Moléculaire de l'UATRS.*

*Tout simplement **Merci.***

# **Avant-propos**

Le présent travail réalisé par Mme Saida HAJJOU, est effectué dans le cadre de la préparation du Doctorat National en Sciences et Techniques, promotion 2012-2017, sous la direction de thèse et l'encadrement du Pr. Malika FAKIRI, responsable d'équipe du laboratoire Génétique et Biotechnologies issu du Laboratoire Agro-Alimentaire et Santé A la Faculté des Sciences et Techniques de Settat-Université Hassan 1<sup>er</sup>, et le co-encadrement de Dr. Chafiq LOUTFI, responsable du service de Virologie à la société de Production Biologique et Vétérinaire Biopharma Rabat. Le stage de recherche a été réalisé au sein du laboratoire National BIOPHARMA, dénommé Société des Productions Biologiques et Pharmaceutiques Vétérinaires à Rabat dans le cadre d'une collaboration scientifique à travers la signature d'une convention cadre entre la Faculté des Sciences et Techniques de Settat et le laboratoire de Virologie de Biopharma à Rabat. Une partie de ce travail a été réalisée au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire de l'unité de recherche UATRS au CNRST-Rabat.

Le Laboratoire National BIOPHARMA, dénommé Société des Productions Biologiques et Pharmaceutiques Vétérinaires est une société anonyme d'Etat, à capital social de 23.45MDH, à Directoire et conseil de surveillance, régie par la loi n° 17.95. Il a été créé en octobre 1984 à l'initiative du Ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et des Eaux et Forêts (Direction d'Elevage) comme outil scientifique stratégique de lutte contre les maladies contagieuses animales, et afin de subvenir aux besoins de l'état en matière de production des vaccins à usage vétérinaire, afin d'assurer l'approvisionnement en vaccin pour les campagnes prophylactiques.

Le laboratoire est implanté sur une superficie de 1.64 Ha, il est constitué de plusieurs locaux de haute sécurité biologiques à savoir : un Laboratoire de production de vaccins sur cultures cellulaires conventionnelles, Laboratoire de production de vaccins sur cultures cellulaires en bioréacteurs, Laboratoire de production de vaccins par fermentation bactérienne, Laboratoire de production de vaccins sur œufs embryonnés, Laboratoire de contrôle de la qualité, Animalerie de contrôle, Laboratoire de Biologie moléculaire, Laboratoire de diagnostic virologique et une Unité de sérologie.

Ce stage de recherche a pour objectifs :

- Comprendre les techniques Virologiques utilisées dans le laboratoire de virologie ;
- Caractériser le profil épidémio-moléculaire des isolats Marocains du virus de la clavelée, ayant émergé au Maroc entre les années 1982-2010, par la technique de Biologie Moléculaire, notamment la PCR en temps réel et le séquençage des gènes cibles ; et la comparaison des structures 3D des protéines en utilisant les techniques de modélisation moléculaire.
- Etudier le pouvoir pathogène de ces isolats *in Vitro* et *in Vivo* ;
- Développer un vaccin inactivé issu d'une souche de terrain locale isolée lors de l'expérimentation réalisée dans ce travail.

## ***Production Scientifique***

### **A. Publications scientifiques dans des revues ineternationales à comité de lecture**

#### **1- Articles publiés :**

**Saida Hajjou**, Khadija Khataby, Souad Amghar, Mustapha El Fahime , Mehdi El Harrak, Malika Fakiri, Chafiqa Loutfi. Assessment and comparison of the pathogenicity of Sheeppox Virus Strains isolated in Morocco. IranianJournal of Microbiology.

**Saida HAJJOU**, Hassan BOULAHYAOU, Khadija KHATABY, Chafiqa LOUTFI, Malika FAKIRI. Phylogenetic analysis of Moroccan sheeppox virus isolates based on *P32* gene. Revue Marocaine des sciences agronomiques et vétérinaires.

#### **2- Articles en cours de rédaction:**

**Saida Hajjou**, Hassan Boulahyaoui, Khadija Khataby, Mehdi El Harrak, Malika Fakiri, Chafiqa Loutfi. Phylogenetic analysis of sheepox virus isolates based on *RPO30* gene in Morocco

**Saida Hajjou**, Hassan Boulahyaoui, Khadija Khataby, Malika Fakiri, Chafiqa Loutfi. Prediction of 3D structure of *P32* and *RPO30* of sheep pox virus.

**Saida Hajjou**, Yassine Kasmi, Fatima Ezzahra Bennani, Khadija Khataby, Malika Fakiri, Chafiqa Loutfi. Prediction of 3D structure of *P32* protein of sheep pox virus.

**Saida Hajjou**, Yassine Kasmi, Fatima Ezzahra Bennani, Khadija Khataby, Malika Fakiri, Chafiqa Loutfi. Prediction of 3D structure of *RPO30* proteine of sheep pox virus.

#### **3- Publication de 52 séquences dans la banque génomique "NCBI Genbank"**

➤ MOLECULAR STUDY OF MOROCCAN SHEEP POX STRAINS, (2017).

Auteurs: **Saida Hajjou**, Malika FAKIRI, Chafiqa LOUTFI, Mostafa ELFAHIME, Sanaa A. ALAOUI, Mehdi ELHARRAK.

➤ Numéro d'accès:

KY769277 ; KY769278 ; KY769279 ; KY769280 ; KY769281 ; KY769282,  
MG201788 ; MG201789 ; MG201790 ; MG201791 ; MG201792 ; MG201793 ; MG201794 ;  
MG201795 ; MG201796 ; MG201797 ; MG201798 ; MG201799 ; MG201800 ; MG201801 ;  
MG201802 ; MG201803 ; MG201804 ; MG201805 ; MG201806 ; MG201807 ; MG201808 ;  
MG201809 ; MG201810 ; MG201811 ; MG201812 ; MG201813 ; MG201814 ; MG201815,  
MG201816 ; MG201817 ; MG201818 ; MG201819 ; MG201820 ; MG201821 ; MG201822 ;  
MG201823 ; MG201824 ; MG201825 ; MG201826 ; MG201827 ; MG201828 ; MG201829 ;  
MG201830 ; MG201831 ; MG201832 ; MG201833.

## **B- Communications Scientifiques**

### **1- Présentations Scientifiques orales :**

#### ➤ **Présentations scientifiques internationales :**

- **Saida HAJJOU**, Souad AMGHAR, Malika FAKIRI, Mehdi ELHARRAK. Chafiq LOUTFI. Etude comparative de la pathogénicité des souches Marocaines du virus de la clavelée. The third International conference « MICROBIOD 3 Congress » October, 24-26<sup>th</sup> 2016, in Mohammedia, Morocco.
- **Saida HAJJOU**, Khadija Khataby, Chafiq Loutfi, Malika FAKIRI (2017). Study and evaluation of the pathogenicity of Moroccan strains of sheep pox. "16th Euro Global Summit and Expo on "Vaccines & Vaccination". June 19-21, 2017, in Paris, France
- **Saida HAJJOU**, AMGHAR, Malika FAKIRI, Mehdi ELHARRAK. Chafiq LOUTFI. Etude clinique et phylogénétique de quelques souches Marocaines du virus de la clavelée. 2<sup>èmes</sup> journées franco-maghrébine de Virologie, sous le thème « Infections virales : approches préventives », du 18 au 20 octobre 2017, à Marrakech, Maroc.

### **2- Communications scientifiques affichées :**

- **Saida HAJJOU**, Souad AMGHAR, Malika FAKIRI, Mehdi ELHARRAK, Chafiq LOUTFI. Etude du pouvoir pathogène de quelques souches Marocaines du virus de la clavelée. 2<sup>ème</sup> édition de la journée doctorants, le 12 Février 2014 à Settat, Maroc.
- **Saida HAJJOU**, Souad AMGHAR, Malika FAKIRI, Mehdi ELHARRAK, Chafiq LOUTFI. Détermination d'une souche d'épreuve Marocaine pour le contrôle de la qualité des vaccins anti-clavelée. Journée scientifique Nationale sous le thème « Adaptation neurobiologique du dromadaire, élevage camelin et intérêt des dosages immunologiques », Faculté des sciences Ben M'sik, Casablanca, Maroc.

**Table des matières**

Avant-propos .....	6
Production Scientifique .....	8
Résumé .....	16
Abstract .....	18
ملخص .....	20
Liste des abréviations .....	22
Liste des tableaux .....	24
Liste des figures.....	25
Liste des annexes.....	28
Problématique.....	29
Hypothèses de travail .....	30
Introduction générale.....	31
Objectifs du travail .....	33
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....	34
CHAPITRE I : MALADIE DE LA CLAVELEE OU LA VARIOLE OVINE .....	35
I- DEFINITION .....	35
II- Historique .....	35
III- Epidémiologie et répartition géographique .....	36
1- Epidémiologie.....	36
2- Répartition géographique : .....	36
a- Au niveau mondial : .....	36
b- Au Maroc .....	37
IV- Impact économique .....	38
V- Contrôle de la Maladie .....	39
1- Prophylaxie sanitaire .....	39
2- Prophylaxie médicale .....	39
3- Profil d'un vaccin idéal .....	41
VI- Modalités de contrôle de la clavelée au Maroc .....	41
CHAPITRE II : LE VIRUS DE LA CLAVELEE.....	44
I- Etiologie .....	44

1- Classification .....	44
a- Les poxvirus .....	44
b- Les Capripoxvirus .....	45
2- Morphologie et structure .....	45
3- Génome .....	46
4- Cycle de réplication .....	48
5- Diversité antigénique .....	50
II- Pathogénicité du SPV .....	51
1- Interaction hôte-virus .....	51
a- Tropisme tissulaire .....	51
b- Réponse immunitaire .....	52
2- Caractères cultureux et effet cytopathogène .....	55
3- Mode de transmission .....	56
4- Spécificité de l'hôte .....	56
5- Pouvoir pathogène .....	57
a- Pouvoir pathogène naturel .....	57
b- Pouvoir pathogène expérimental .....	57
6- Signes cliniques .....	57
7- Caractéristiques physico-chimiques du virus .....	60
CHAPITRE III : CARACTERISATION VIROLOGIQUE ET MOLECULAIRE D'UNE INFECTION .....	61
I- Les techniques de diagnostic .....	61
1- Diagnostic clinique et différentiel .....	61
2- Diagnostic au laboratoire .....	61
a- Echantillonnage .....	61
b- La microscopie électronique .....	62
c- Méthodes de détection des acides nucléiques .....	62
d- Méthodes sérologiques .....	64
e- Titrage de l'infection virale .....	66
II- Etude moléculaire et phylogénétique du SPV .....	67
CHAPITRE IV : PRINCIPES DE PRODUCTION ET DE CONTRÔLE DES VACCINS ANTI-CaPVs.....	71
I- INTRODUCTION .....	71
II- PRODUCTION .....	71
1- Caractéristiques .....	71

2- Production.....	72
3- Contrôle de la qualité et exigences réglementaires .....	73
4- Principes de contrôle des vaccins .....	73
□ Tests de stérilité.....	73
□ Test d'activité.....	74
□ Test de terrain (Innocuité et efficacité).....	74
□ Test de stabilité.....	75
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE .....	76
CHAPITRE I : ETUDE MOLECULAIRE DES ISOLATS MAROCAINS DU VIRUS DE LA CLAVELEE .....	78
I- INTRODUCTION .....	78
II- MATERIEL & METHODES .....	78
1- Matériel d'étude .....	78
a- Souches virales .....	78
2- Méthodes d'étude .....	80
a- Identification par PCR en temps réel .....	81
b- Production du virus sur culture cellulaire .....	83
c- Etude moléculaire et phylogénétique .....	86
III- RESULTATS .....	91
1- Identification des souches virale par PCR en temps réel .....	91
2- Production du virus sur culture cellulaire.....	92
3- Génotypage.....	93
a- Amplification des isolats du SPV par PCR classique.....	93
b- Révélation des produits PCR par électrophorèse .....	94
4- Analyses des séquences .....	95
a- Gène qui code pour la protéine P32 .....	95
b- Gène de la protéine RPO30 .....	97
IV- DISCUSSION.....	101
CHAPITRE II : EVALUATION DU POUVOIR PATHOGENE DE QUELQUES SOUCHES DU VIRUS DE LA CLAVELEE.....	106
I- INTRODUCTION .....	106
II- MATERIEL & METHODES .....	106
1- Matériel d'étude .....	106
a- Souches Virales .....	106
b- Animaux .....	106

2-	Méthodes d'étude .....	107
a-	Production du virus sur culture cellulaire et détermination du titre infectieux .....	107
b-	Préparation et inoculation des cellules .....	107
c-	Titration du virus de la clavelée sur cellules .....	107
d-	Titration par PCR en temps réel .....	108
3-	Infection expérimentale .....	109
a-	Contrôle du statut immunitaire du mouton .....	109
b-	Préparation des moutons à l'inoculation .....	109
c-	Inoculation de la suspension virale et production de la pustule géante .....	109
4-	Suivi clinique des animaux .....	110
a-	Suivi sérologique et virologique.....	110
5-	Titration <i>in vivo</i> .....	110
III-	RESULTATS .....	111
1-	Production et titration des souches virales sur cellules de cœur d'agneau (ICO1) .....	111
a-	Passages de Rafrâichissement .....	111
b-	Détermination du titre infectieux des souches produites .....	112
c-	Titration des suspensions virales par PCR en temps réel .....	113
2-	Résultats de l'infection expérimentale .....	113
a-	Suivi clinique .....	113
b-	Manifestation générale de la maladie .....	115
3-	Suivi virologique et sérologique .....	117
a-	Suivi virologique et ré-isolément viral .....	117
b-	Suivi sérologique .....	117
4-	Titration In-Vivo .....	118
IV-	DISCUSSION .....	119
CHAPITRE III : ETUDE DE LA STRUCTURE DE LA PROTEINE D'ENVELOPPE <i>P32</i> et la		
RPO30 EN TRI-DIMENSION (3D) PAR LA MODELISATION MOLECULAIRE.....		124
I-	INTRODUCTION.....	124
II-	MATERIEL & METHODES .....	124
1-	Modélisation des structures protéiques.....	124
a-	Modélisations des protéines <i>P32</i> et <i>RPO30</i> .....	125
2-	Evaluation de la qualité de la modélisation 3D de la protéine <i>P32</i> et <i>RPO30</i> .....	126
3-	Prédiction des épitopes des Cellules B et T .....	127
III-	RESULTATS ET DISCUSSION .....	128
1-	Modélisations de la protéine <i>P32</i> et <i>RPO30</i> .....	128

a-	Conformation spatiale de la structure <i>P32</i> et <i>RPO30</i> en 3D .....	128
b-	Stabilité de la structure des protéines <i>P32</i> et <i>RPO30</i> en 3D.....	129
2-	Prédiction des épitopes .....	130
a-	Épitopes des lymphocytes B.....	130
b-	Épitopes reconnus par les lymphocytes T .....	130
IV-	Conclusion.....	132
<b>CHAPITRE IV: PRODUCTION ET CONTRÔLES D'UN NOUVEAU VACCIN INACTIVÉ</b>		
<b>CONTRE LA CLAVELEE .....</b>		
<b>134</b>		
I-	INTRODUCTION .....	134
II-	MATERIEL ET METHODES .....	134
1-	Vaccin .....	134
2-	Souche d'épreuve .....	134
3-	Animaux .....	135
4-	Préparation de la culture virale.....	135
5-	Vaccination des moutons.....	135
6-	Suivi clinique.....	135
a-	Contrôle d'innocuité .....	135
b-	Contrôle d'activité.....	135
c-	Contrôle d'efficacité par épreuve virulente .....	135
III-	RESULTATS .....	136
1-	Contrôle d'innocuité .....	136
a-	Température rectale .....	136
b-	Réactions locales et générales .....	136
2-	Contrôle d'activité via la recherche d'anticorps neutralisants.....	137
3-	Contrôle d'efficacité par épreuve virulente : évaluation du pouvoir protecteur du vaccin .	138
a-	Suivi de l'hyperthermie .....	138
b-	Cinétique d'anticorps avant et après l'épreuve virulente .....	138
c-	Réactions locales, titre infectieux et indice de protection .....	139
IV-	DISCUSSION .....	143
<b>PARTIE III : DISCUSSION GENERALE .....</b>		
<b>147</b>		
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>		
<b>148</b>		
<b>PARTIE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>		
<b>156</b>		
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>		
<b>157</b>		
A.	Conclusion.....	157
B.	Perspectives .....	158

PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	159
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	160
PARTIE VI : ANNEXES .....	176

## Résumé

La clavelée ou la variole ovine (SP) est une maladie qui affecte les moutons, entraînant des pertes économiques très considérables. L'agent causal est un virus à ADN, double brin de taille 150 kpb, appartenant à la famille des poxvirus (*Poxvirinae*). La Maladie est présente au Maroc sous forme enzootique. Cette thèse décrit des études expérimentales sur différents volets de classification phylogénétique, pathogénicité, immunogénicité et vaccination contre le virus du SP au Maroc.

L'étude moléculaire et phylogénétique (Chapitre I partie 2) du virus de la clavelée (SPV) au Maroc a été réalisée sur un échantillonnage de 35 échantillons dont 29 sont des souches virales et 6 sont des souches de références et vaccinales. Les isolats utilisés dans cette étude s'étalent sur différentes années (de 1981 à 2010) et régions du royaume. Les résultats de l'analyse moléculaire réalisée par le séquençage de deux gènes différents, a montré qu'en se basant sur le gène *P32* tous les isolats Marocains sont étroitement liés, ramifiés et groupés avec les autres souches de références du SPV. Quant au gène codant pour la *RPO30*, seulement 21 isolats ont été amplifiés et séquencés en utilisant les amorces spécifiques de ce gène, mais 20 d'entre eux ont été groupés avec les souches de référence SPV et la souche de la région d'Azilal a été groupée avec les souches de référence de la maladie de la dermatose nodulaire contagieuse (LSDV). L'analyse des séquences obtenues pour le gène qui code pour la *P32* a montré une hyperconservation chez tous les isolats marocains et les souches de référence. Concernant l'analyse de séquence du gène qui code pour la *RPO30* les 20 isolats marocains sont identiques, par contre pour la souche vaccinale utilisée au Maroc, une mutation a été détectée.

L'évaluation du pouvoir pathogène (Partie 2 Chapitre II) a été réalisée sur six souches Marocaines du SPV, isolées entre les années 1993 et 1994, durant la période épizootique de la maladie au Maroc. Les isolats sélectionnés ont montré des ECP caractéristiques, avec des titres infectieux différents, les souches de Berkane, Oujda ont présenté des titres importants sur cellules. L'expérimentation a été réalisée sur des moutons jeunes et séronégatifs à la SP. Les moutons infectés ont présenté des signes cliniques contribuant à la SP avec des degrés de gravité différents. La souche de Berkane a présenté des signes cliniques aigus en comparaison avec les autres souches, surtout celle d'Azilal qui n'a montré aucun signe de pathogénicité chez l'animal infecté. Le titre infectieux le plus élevé sur mouton a été obtenu par la souche de Berkane.

Le 3<sup>ème</sup> chapitre de la partie expérimentale consiste à réaliser une comparaison des deux structures 3D des protéines *P32* et *RPO30* de la souche Berkane la plus pathogène et la souche vaccinale atténuée Romania, par la voie de la modélisation moléculaire, afin de déterminer s'il y'a des modifications qui peuvent altérer la pathogénicité, et ce, par la prédiction des épitopes neutralisants des deux souches et la détermination de leur mécanisme d'action. Les résultats obtenus ont montré que, pour la *P32*, elle n'a pas montré de modification à cause de la conservation totale de la séquence protéique, d'autre part, la *RPO30* a montré des mutations au niveau de la région C-terminal, ce qui diminue le score prédictif des épitopes chez la souche vaccinale.

Le 4<sup>ème</sup> chapitre de la 2<sup>ème</sup> partie contribue à la production d'un nouveau vaccin inactivé à partir d'une souche Marocaine pure adapté à la pathologie locale. Le vaccin produit a conféré une très bonne protection chez les moutons vaccinés avec des indices de protection élevés et sans signes cliniques liés à la clavelée ovine.

Ce travail a permis de bien identifier les souches virales du SPV qui ont déjà circulées au Maroc entre les années 1981 et 2010, ainsi que le développement d'un nouveau vaccin, à partir d'une souche locale, afin de contribuer à la résolution de la problématique liée à la maladie du SP au Maroc.

**Mots clés :** *Poxvirus*, *SP*, *SPV*, *variole ovine*, *clavelée*, *P32*, *RPO30*, *phylogénie*, *pathogénicité*, *immunogénicité*, *vaccin* *inactivé*.

## ***Abstract***

Sheep pox (SP) is a disease that affects sheep, causing considerable economic losses. The causative agent is a 150 kbp double-stranded DNA virus belonging to the poxvirus family (Poxvirinae). The disease is present in Morocco in enzootic form. This thesis describes experimental studies on different aspects of phylogenetic classification, pathogenicity, immunogenicity and vaccination against the SP virus in Morocco.

The molecular and phylogenetic study (Chapter I part 2) of sheep pox virus (SPV) in Morocco was performed on 35 samples which 29 are viral isolates and 6 are reference and vaccine strains. The isolates used in this study are spread over different years (from 1981 to 2010) and different regions of the kingdom. The results of the molecular analysis carried out by the sequencing of two different genes, showed that based on the *P32* gene, all the Moroccan isolates are closely related, branched and grouped with the other reference strains of the SPV, for the gene *RPO30* only 21 isolates were amplified and sequenced using the specific primers for this gene, but 20 of them were pooled with the SPV reference strains and a strain of the Azilal region was clustered with the reference strains of Lumpy Skin Disease (LSDV). The analysis of the sequences obtained for the *P32* gene showed a hyperconservation of this gene in all the Moroccan isolates and the reference strains. Regarding the sequence analysis of the *RPO30* gene, the 20 Moroccan isolates are identical; however, for the vaccine strain used in Morocco, a mutation was detected.

The pathogenicity assessment (Part 2, Chapter II) of six Moroccan strains of SPV, isolated between 1993 and 1994, during the epizootic period of the disease in Morocco. The selected isolates showed characteristic CPE, with different infectious titres, Berkane strains, and Oujda represented important cell titles. The experiment was carried out on young and seronegative to SP. Infected sheep showed SP clinical signs with different degrees of severity, the Berkane strain showed remarkable clinical signs compared to other strains, especially that of Azilal which showed no signs of pathogenicity in the infected animal. The highest infectious titer on sheep was obtained by the Berkane strain.

The third chapter of part2 consists in comparing the two 3D structures of the *P32* and *RPO30* proteins of the most pathogenic Berkane strain and the attenuated vaccine strain Romania, through molecular modeling, in order to determine if there is changes that may alter pathogenicity by predicting the neutralizing epitopes of both strains and determining their mechanism of action. The results obtained showed that, for *P32*, it did not show any modification because of the total conservation of the protein sequence, on the other hand,

*RPO30* showed mutations at the level of the C-terminal region, which decreases the predictive score of epitopes in the vaccine strain.

The fourth chapter of Part 2 contributes to the production of a new inactivated vaccine from a local strain. The vaccine provided very good protection in vaccinated sheep with high protection indices.

This work allowed the isolation of pathogenic strains, which were circulating in Morocco from 1981 to 2010, to help developing a vaccine from local strain in order to contribute to the resolution of the SP disease problem in Morocco.

**Key words:** *Poxvirus, SP, SPV, P32, RPO30, Phylogeny, Pathogenicity, Immunogenicity, Inactivated vaccine.*

## ملخص

يعتبر جدري الأغنام من الأمراض الفيروسية التي تهدد الأغنام، مما يتسبب في خسائر اقتصادية كبيرة. ان العامل المسبب لهذا المرض هو فيروس ADN مزدوج يبلغ حجمه  $kb150$  وينتمي إلى عائلة فيروس الجدري (بوكسفيريناوي). يتواجد هذا المرض في المغرب متفرقا على عدة مناطق. هذه الأطروحة تقدم الدراسات التجريبية على مختلف الجوانب المتعلقة بالانتماء السلالي والقدرات المرضية والمناعية والتلقيح ضد فيروس جدري الأغنام.

أجريت الدراسة الجزيئية و الانتماء السلالي (الفصل الأول جزء 2) لفيروس جدري الأغنام في المغرب على 35 عينة منها 29 سلالة فيروسية و 6 سلالات مرجعية و تلاقيح. اخذت العينات المستعملة في هذه الدراسة على مدى سنوات مختلفة (من 1981 إلى 2010) ومن مختلف مناطق المملكة. أظهرت نتائج التحليل الجزيئي الذي قمنا به على جينتين مختلفتين، أنه اعتمادا على الجين P32، فإن كل العزلات المغربية ترتبط ارتباطا وثيقا وتتفرع وتجمع مع السلالات المرجعية الأخرى المسؤولة على هذا المرض، اما بالنسبة للجين RPO30، 20 عينة مغربية منها تم تجميعها مع سلالات مرجعية لمرض الجدري على عكس عينة منطقة أزيلال فانها ظهرت في نفس المجموعة مع سلالات مرجعية لمرض LSDV.

وأظهر تحليل الجينات التي تم الحصول عليها للجين P32 ان هذه المنطقة متشابهة لدى جميع العينات المغربية والمرجعية. وفيما يتعلق بتحليل تسلسل الجين RPO30، فإن 20 عينة مغربية متطابقة، على عكس عينة اللقاح المستخدمة في المغرب، فقد تم الكشف عن وجود طفرة.

تقييم الأمراض (الجزء الثاني، الفصل الثاني) من ستة عينات مغربية من SPV، المأخوذة بين سنتي 1993 و 1994، خلال الفترة المستعصية للمرض في المغرب. أظهرت العينات المختارة تأثيرا مميزا على الخلايا المخبرية، حيث مثلت عيارات معدية مختلفة، سلالتيبركان، ووجدة عيارات خلوية مهمة. أجريت التجربة على الأغنام الشابة وغير الممتعة ضد مرض الجدري. أظهرت الأغنام المصابة علامات سريرية مرتبطة بالمرض مع درجات مختلفة من الشدة، وأظهرت سلالة بركان علامات سريرية حادة مقارنة مع سلالات أخرى، وخاصة أنازيلال التي لم تظهر أي علامات على الحيوان المصاب. تم الحصول على أعلى معدل عدوى على الأغنام بواسطة سلالة بركان.

يحتوي الفصل الثالث على مقارنة بين التركيبين ثلاثي الأبعاد لبروتين P32 و RPO30 من سلالة بركان الأكثر أمراضا وسلالة اللقاح الموهن رومانيا، من خلال النمذجة الجزيئية، من أجل تحديد ما إذا كانت هناك تغييرات تؤثر على القدرة المرضية من خلال التنبؤ بالحواتم العصبية لكلتا السلالتين وتحديد آلية عملها. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أنه بالنسبة لـ P32، لم يظهر أي تعديل بسبب الحفاظ الكلي على تسلسل البروتين، من جهة أخرى، أظهر RPO30 طفرات على مستوى C-terminal region، مما يقلل من درجة التنبؤ من الحواتم في سلالة اللقاح.

يساهم الفصل الرابع من الجزء الثاني في إنتاج لقاح جديد معطل من سلالة مغربية تتكيف مع نوعية المرض المحلي. أتاح هذا العمل عزل السلالات المسببة للأمراض لتحديد السلالات الفيروسية التي انتشرت بالفعل في المغرب بين عامي 1981 و 2010، فضلاً عن تطوير لقاح جديد، من سلالة محلية، من أجل المساهمة في حل المشكلة المتعلقة

بمرض جذري الأغنام في المغرب. أعطى اللقاح المنتج حماية جيدة للغاية في الأغنام المحصنة مع مؤشرات حماية عالية، دون أعراض سريرية مرتبطة بالمرض.

**كلمات البحث:** بوكسفيرينا، SP، SPV، جذري الأغنام، RPO30، P32، الانتماء السلالي، لقاح معطل.

## *Liste des abréviations*

AA	: Acide Aminé
ABI	: Applied Biosystem
ADN	: Acide Désoxyribo-Nucléique.
ADNc	: ADN complémentaire
ARN	: Acide Ribo-Nucléique
ARNm	: Acide Ribo-Nucléique Messenger
AW1	: Wash buffer 1
AW2	: Wash buffer 2
Bpl	: Beta PropioLactone
CaPV (s)	: Capri-Pox Virus (es)
ChPV	: Chordopoxvirus
CEV	: Cellular Envelopped Virion
C <sub>t</sub>	: Cycle Threshold
DIVA	: Differentiation of Infected from Vaccinated Animals.
ECP	: Effet Cyto-Pathogène
EEV	: Extracellular Envelopped Virion
ELISA	: Enzyme Linked Immuno-Sorbant Assay
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
FRET	: Fluorescence Resonance Energy Transfer
FT	: Facteurs de Transcription
GPCR	: G-Protein Coupled Receptor
GPV	: Goat Pox Virus
LSD	: Lumpy Skin Disease
LSDV	: Lumpy Skin Disease Virus
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
Kb	: Kilobase
ITR	: Inverted Terminal Repetition (Répétitions Terminales Inversées)
KDa	: KiloDalton

IDG	: Immunodiffusion sur Gélose
IEF	: Immuno-Electro-Focalisation
IEV	: Intracellular Envelopped Virion
IFN	: Interferon
IL	: InteLeukine
IMV	: Intracellular Mature Virion
KS	: Kenya Sheep pox
LAMP	: Loop mediated isothermal AMPLification
LUX	: Light-Upon-eXtension
OIE	: Office International des Epizooties
ONSSA	: Office Nationale de la Sécurité Sanitaire des produits Alimentaires
PA	: Principe actif
PBS	:Eau physiologique stérile phosphaté
PCR	: Polymerase Chain Reaction
SAP	: Single Amino-acid Polymorphism
SDS-PAGE	: Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en présence de Dodécyl Sulfate de Sodium
SN	: Séro-Neutralisation
SP	: Sheep Pox
SPV	: Sheep Pox Virus
TA	: Cellules Testiculaire d'Agneau
TK	: tymidine Kinase
TNF	: Facteur de Nécrose Tumorale
UE	: Union Européenne
URSS	: Union des Républiques Socialistes Soviétiques

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I :</b> Classification de la sous-famille des Chordopoxvirinae [Van Regenmortel, et al., 2000 ; Knipe et Howley, 2007.] .....	44
<b>Tableau II:</b> Fréquences des lésions internes lors d’une infection par le virus de la clavelée [Murty et Singh, 1971]. .....	52
<b>Tableau III:</b> Informations des isolats à étudier .....	78
<b>Tableau IV :</b> Mélange réactionnel de la PCR en temps réel. ....	83
<b>Tableau V :</b> Programme d’amplification SPV.....	83
<b>Tableau VI:</b> Mélange de la réaction de séquençage :.....	89
<b>Tableau VII :</b> Programme de la réaction de séquençage.....	90
<b>Tableau VIII :</b> Résultats de la PCR en temps réel .....	91
<b>Tableau IX :</b> Informations des isolats à étudier.....	106
<b>Tableau X :</b> Résultats du titrage infectieux sur culture cellulaire. ....	112
<b>Tableau XI :</b> Titres infectieux obtenus.....	113
<b>Tableau XII :</b> Valeurs de Ct obtenus après le titrage par PCR en temps réel. ....	113
<b>Tableau XIII :</b> Résultats de la PCR en temps réel réalisée sur les prélèvements de sang total et les prélèvements de biopsie (tissu inflammatoire et lymphé) des moutons inoculés.....	117
<b>Tableau XIV:</b> Titres des anticorps neutralisants chez les 4 ovins inoculés. ....	118
<b>Tableau XV :</b> Résultats de la lecture des titrages in vivo.....	119
<b>Tableau XVI:</b> Titres infectieux des 3 souches virales in vivo.....	119
<b>Tableau XVII:</b> liste des outils web disponibles pour la prédiction continue des épitopes des cellules B et T. ....	127
<b>Tableau XVIII:</b> liste des outils web disponibles pour la prédiction discontinue et conformationnelle des épitopes des cellules B et T. ....	127
<b>Tableau XIX :</b> Epitopes prédits au niveau des cellules B. ....	130
<b>TableauXX :</b> Epitopes prédits au niveau des cellules T. ....	131
<b>Tableau XXI :</b> Cinétique d’apparition des anticorps neutralisants chez les moutons vaccinés : Le chiffre mentionne le titre d’anticorps. ....	137
<b>Tableau XXII :</b> Titres infectieux des ovins vaccinés par les deux lots A01 et A02 et l’ovin témoin non vacciné.....	140

## Liste des figures

<b>Figure1</b> : Répartition géographique de la clavelée. ....	37
<b>Figure 2</b> : Répartition des foyers du virus de la clavelée au Maroc en Janvier 2021 .....	38
<b>Figure 3</b> : Structure d'un Poxvirus .....	46
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique du génome viral de Poxviridae (modèle : VACV).....	47
<b>Figure 5</b> : Diagramme du génome du virus de la Variole (VACV Copenhague) .....	47
<b>Figure 6</b> : Classement des génomes complets des Poxvirus selon le pourcentage A+T% .....	48
<b>Figure 7</b> : Représentation schématique du cycle de réplication des Poxvirus.....	50
<b>Figure 8 a</b> : Inhibition et induction des mécanismes IFN par les poxvirus. ....	52
<b>Figure 8b</b> : Représentation schématique d'immunomodulateurs de poxvirus.. .....	53
<b>Figure 9</b> : Papules observées sur flanc rasé .....	58
<b>Figure 10</b> : Lésion croûteuse sur la paupière.....	58
<b>Figure 11</b> : Décharges et Sécrétions Nasales.....	58
<b>Figure 12</b> : Lésions papulo-vésiculeuses sur la tête.....	59
<b>Figure 13</b> : Papules sur la gencive et l'encolure au stade de la dessiccation .....	59
<b>Figure 14</b> : Nodules pulmonaires.....	60
<b>Figure 15</b> : Face interne de la peau : Traces hémorragique des lésions cutanées.....	60
<b>Figure 16</b> : Examen au microscope électronique des CaPVs .....	62
<b>Figure 17</b> : Arbre phylogénétique du gène P32 des CAPVs .....	68
<b>Figure 18</b> : Arbre phylogénétique du gène RPO30 des CAPVs .....	68
<b>Figure 19</b> : Flacons en polystyrène de surfaces variables. ....	85
<b>Figure 20</b> : Etapes de la subculture cellulaire : trypsination des cellules. ....	85
<b>Figure 21</b> : Position du gène P32 qui code pour la protéine d'enveloppe sur le génome du SPV .....	86
<b>Figure 22</b> :Position du gène RPO30 codant pour la sous unité d'ARN polymérase ADN dépendant sur le génome du SPV .....	87
<b>Figure 23</b> : Résultats de dosage de l'ADN purifié par Nanodrop 8000.....	93
<b>Figure 24</b> : Visualisation des produits PCR sur Gel virtuel par le bio-analyseur Qiaxcel.....	94

<b>Figure25</b> : Prototypage d'électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits PCR du Gène qui code pour la protéine RPO30 .....	94
<b>Figure 26</b> : Arbre phylogénétique du gène de la protéine P32 des isolats du SPV isolés de différentes régions du Maroc entre les années 1982-2010. ....	96
<b>Figure 27</b> : Arbre phylogénétique basé sur le gène de la protéine P32 des isolats SPV au Maroc et à travers le monde. ....	97
<b>Figure 28</b> : Arbre phylogénétique du gène codant pour la RPO30 des différents isolats marocains du SPV .....	99
<b>Figure 29</b> : Arbre phylogénétique basé sur le gène codant pour la RPO30 des isolats SPV au Maroc et à travers le monde. ....	100
<b>Figure 30</b> : Préparation des dilutions du virus. ....	107
<b>Figure 31</b> : Plaque de titrage in Vitro .....	108
<b>Figure 32</b> : Mouton à flanc rasé. ....	109
<b>Figure33</b> : Titrage In-Vivo. ....	111
<b>Figure 34</b> : Foyers de multiplication du virus de la clavelée, observés au microscope inversé. ....	112
<b>Figure35</b> : Plages de lyse observées au microscope inversé. ....	112
<b>Figure 36</b> : Destruction de l'assise cellulaire observée au microscope inversé.....	112
<b>Figure37</b> : Nécrose et Destruction totale du tapis cellulaire observées au microscope inversé. ....	112
<b>Figure 38</b> : Réaction locale de la souche de Berkane. ....	114
<b>Figure 39</b> : réaction locale de la souche d'Oujda N°1 .....	114
<b>Figure 40</b> : Réaction locale de la souche Oujda N°2.....	114
<b>Figure 41</b> : Réaction locale de la souche Azilal .....	114
<b>Figure 42</b> : Valeurs du diamètre de la réaction locale produite pour les 4 moutons infectés .....	115
<b>Figure 43</b> : Valeurs de la température rectale des moutons infectés par les 4 souches virales de la clavelée. ....	115
<b>Figure 44</b> : Papules au niveau des oreilles et œdème facial.....	116
<b>Figure 45</b> : Croûtes au niveau de la tête. ....	116
<b>Figure 46</b> : Décharges nasales et oculaires.....	116
<b>Figure 48</b> : Réactions locales aux points d'injection de la souche de Berkane. ....	118
<b>Figure 49</b> : Réactions locales aux points d'injection de la souche d'Oujda N°1.....	118

<b>Figure 50</b> : Réactions locales aux points d’injection de la souche d’Oujda N°2.....	119
<b>Figure 51</b> : Structure en 3D de la RPO30 sous forme Helice prédite par I-Tasser de la souche pathogène et vaccinale.....	129
<b>Figure 52</b> : Structure en 3D de la RPO30 avec les régions différentes entre les deux souches en rouges selon TM-align.....	129
<b>Figure 53</b> : Diagramme de RAMACHANDRAN.....	130
<b>Figure 54</b> : Températures rectales des 4 ovins inoculés pas les deux lots de vaccins.....	136
<b>Figure55</b> : Titre moyen des anticorps neutralisants pour chacun des lots testés (A01 et A02).....	137
<b>Figure 56</b> : Suivi de la température corporelle après l’épreuve virulente.....	138
<b>Figure 57</b> : Cinétique d’anticorps neutralisants par ovin.....	139
<b>Figure 58</b> : Cinétique d’anticorps neutralisants par lot.....	139
<b>Figure 59</b> : Nodules apparaissent chez l’ovin 3 vaccinés par le « lot A02 ».....	140
<b>Figure 60</b> : Nodules chez l’ovin 1 vacciné par le lot A01.....	141
<b>Figure 61</b> : Lectures des nodules apparaissant chez l’ovin témoin non vacciné.....	141
<b>Figure 62</b> : Généralisation des nodules chez l’ovin témoin non vacciné.....	142
<b>Figure 63</b> : Papules dans les zones de laine de l’ovin non vacciné lors de l’épreuve virulente et début de généralisation.....	142
<b>Figure 64</b> : L’ovin témoin présentant des signes cliniques dus à la généralisation de la maladie.....	143
<b>Figure 65</b> : Procédure de purification des Acides Nucléiques.....	186
<b>Figure 66</b> : Distribution des sérums.....	187
<b>Figure 67</b> : Organisation dela plaquede contrôle SN.....	189

## *Liste des annexes*

Annexe 1 : Appareillage, réactifs et produits utilisés dans ce travail.....	177
Annexe 2 : Préparation du gel d'agarose à 1.5 %.....	178
Annexe 3 : Préparation du tampon TAE 50X.....	178
Annexe 4: Préparation du Tampon de charge .....	178
Annexe 5 : La PCR en temps réel .....	179
Annexe 6 : Rôle des constituants du mélange réactionnel .....	181
Annexe 7 : Numération des cellules.....	181
Annexe 8 : Composition du milieu de croissance cellulaire et du milieu d'iconulation virale .....	182
Annexe 9 : Extraction de l'ADN viral par le Kit « Purelink viral DNA/RNA kit d'INVITROGEN »..	183
Annexe 10 : Séroneutralisation sur cultures cellulaires.....	186
Annexe 11 : Résultats du dosage par Nanodrop et de l'électrophorèse .....	190

## ***Problématique***

La clavelée (SP) est une maladie très contagieuse, elle est parmi les pathologies majeures rencontrées chez les ovins depuis des siècles. Cette maladie se produit régulièrement en Afrique du Nord et centrale, et elle est présente dans la plupart des pays à travers le monde selon l'Organisation Mondiale de la santé animale. Au Maroc, le SP est connu depuis longtemps et ne cesse pas de causer des pertes au niveau des élevages ovins. Malgré les programmes de lutte et de vaccination utilisés depuis plusieurs années, on assiste toujours à la déclaration de nouveaux foyers de la maladie.

La souche vaccinale atténuée Romania est utilisée au Maroc, dans les campagnes de vaccination des élevages ovins depuis plusieurs années. Ce vaccin, et malgré ses propriétés protectrices, il peut causer des effets secondaires chez les moutons vaccinés qui peuvent être graves, vu qu'il garde toujours son pouvoir de multiplication.

Ainsi, le présent travail est primordial pour répondre à la problématique évoquée de cette pathologie dans le secteur de la santé ovine, notamment pour la caractérisation moléculaire des souches de SPV qui ont circulé au Maroc, afin d'élaborer une stratégie vaccinale efficace, en produisant un vaccin à partir d'une souche virale locale de ce virus, adapté au contexte marocain.

## ***Hypothèses de travail***

Afin de répondre à la problématique évoquée, plusieurs hypothèses sont émises en questions:

1. Est-ce que de nouveaux variants du SPV apparaissent au Maroc ?
2. Quelle est le degré de pathogénicité de ces souches virales ?
3. Quels sont les épitopes neutralisants communs entre ces souches virales et la souche vaccinale ?
4. Est-ce que la production d'un nouveau vaccin protecteur est nécessaire pour cerner la présence de cette maladie au Maroc ?

## Introduction générale

L'élevage occupe une place de plus en plus importante dans le secteur agricole. L'élevage ovin est l'une des activités ancestrales et traditionnelles au Maroc. Il représente une activité importante pour les éleveurs marocains. Le cheptel national est caractérisé par la biodiversité de ses races (Race D'man, Race Boujaad, Race Beni Guil, Race Sardi, Race Timhdite) d'une part et sa flexibilité en tant qu'unité de production par rapport au contexte socio-économique et foncier du Maroc d'autre part [<http://www.agriculture.gov.ma> ; FAO., 2015].

L'espèce ovine constitue l'une des principales composante du cheptel au Maroc, mais elle peut-être touchée par la maladie de la clavelée, ou variole ovine, qui est une maladie infectieuse causée par un virus appartenant à la famille des Poxvirus et au genre des Capripoxvirus qui comprend, en plus du virus claveleux, le virus de la variole de la chèvre et le virus de la maladie de la dermatose nodulaire contagieuse (Lumpy skin disease) [Matthews, 1982]. Cette classification était pour longtemps basée sur l'espèce à partir de laquelle le virus est prélevé, mais après les résultats de Lamien et *al.*, en 2011, et d'autres chercheurs [Le Goff et *al.*, 2009 ; Zhou et *al.*, 2012], qui ont changé cette théorie de classification vers une autre plus appropriée basée sur le séquençage de certains gènes spécifiques, qui permettent la distinction entre ces virus quelque soit l'espèce d'origine.

Cette maladie sévit sous forme enzootique dans la plupart des pays d'Afrique, au Moyen-Orient et dans une grande partie d'Asie. Elle représente, pour ces pays, un véritable fléau économique en raison des forts taux de mortalité, surtout enregistrés chez les jeunes animaux [OIE, 2017], elle revêt une importance économique notamment en Afrique et dans les pays du Moyen Orient et du Maghreb à l'égard des pertes qu'elle peut causer sous forme de **Pertes directes** caractérisées par l'avortement, une mortalité relativement élevée chez les jeunes et la dépréciation de la valeur économique des peaux et de la laine ; et de **Pertes indirectes** qui sont liées au coût de la prophylaxie, à la diminution des capacités de production et aux entraves à la commercialisation et l'exportation des animaux [ONSSA, 2017; Limon et *al.*, 2020].

Par sa fréquence, sa diffusion et sa gravité, la clavelée constitue au Maroc comme dans plusieurs pays d'Afrique et du pourtour méditerranéen, une des principales maladies légalement contagieuses du cheptel ovin. Selon un communiqué du ministère, la réapparition récente de 16

foyers contenant 71 cas de la clavelée ovine en Janvier 2021, dans des provinces distinctes du Royaume, affirme que le cheptel national est toujours menacé par cette maladie malgré les programmes prophylactiques adoptés par les services de santé animale au Maroc [ONSSA, 2021], chose qui remet en question le choix du vaccin utilisé et l'engagement des éleveurs dans les campagnes de vaccination.

Dans les pays affectés, et vu qu'il n'existe pas de traitement de cette maladie, la lutte contre la clavelée repose essentiellement sur la prophylaxie médicale, la vaccination demeure le seul moyen connu et efficace capable de conduire à l'éradication, ou tout au moins d'atténuer les conséquences néfastes de la maladie.

La vaccination à elle seule, laisse espérer une possible réduction des pertes occasionnées par la clavelée mais les stratégies adoptées depuis plus d'une vingtaine d'années méritent d'être évaluées et réajustées [FAO, 2015]. Au Maroc, le Laboratoire National BIOPHARMA (Société des Productions Biologiques et Pharmaceutiques Vétérinaires) assure la production des vaccins anti-clavelée pour les campagnes prophylactiques.

Dans le but de remédier à ce problème, le sujet de ma thèse consiste à réaliser, d'une part, une étude moléculaire et phylogénétique d'une sélection de souches virales de la clavelée qui ont affecté le cheptel National entre les années 1981 et 2010 dans le but d'actualiser leur profil épidémio-moléculaire, et d'autre part, leur caractérisation virologique et immunologique en utilisant des techniques *in vitro*, *in vivo* et des méthodes bio-informatiques, afin de produire un vaccin inactivé adjuvé, issu d'une souche locale purecaractérisée par le pouvoir le plus pathogène au cours de l'infection expérimentale ainsi que les meilleurs résultats d'innocuité et d'efficacité. Le vaccin produit sera proposé comme candidat du vaccin vivant atténué utilisé au Maroc pour la lutte contre la clavelée.

---

## Objectifs du travail

### Objectif général

Le principal objectif de ma thèse est donc la caractérisation moléculaire du virus de la clavelée (SPV), l'évaluation du pouvoir pathogène et immunogène des souches locales de la SP qui ont émergé au Maroc et qui sont isolées entre les années 1981 et 2010 à partir des prélèvements de moutons malades, afin de mettre au point un vaccin inactivé issu d'une souche de terrain Marocaine.

### Objectifs spécifiques

Dans un premier temps, le contexte et les objectifs de cette étude sont présentés, ainsi qu'une revue bibliographique succincte, qui décrit la maladie de la clavelée ovine à travers le monde et au Maroc, sa pathogénicité et sa prophylaxie sanitaire et médicale. Par la suite, sera détaillée l'importance de la vaccination pour avoir une meilleure protection contre les souches virales du virus de la clavelée qui ont émergé au Maroc.

Dans le cadre du travail expérimental, deux grandes études ont été réalisées :

- La première étude a été réalisée en deux volets :

\* Le volet 1 comprenait l'identification et la caractérisation des isolats Marocains du SPV en se basant sur le séquençage du gène *P32*.

\* Le volet 2 comprenait l'identification et la caractérisation moléculaire des isolats Marocains du SPV en se basant sur le séquençage du gène *RPO30*.

- La deuxième étude a été réalisée en 1 volet

\* Il consistait à évaluer le pouvoir pathogène de quelques isolats Marocains du SPV, isolés pendant des flambées épizootiques de la maladie au royaume.

- La troisième partie a été consacrée à étudier par voie de la modélisation moléculaire, la structure des deux protéines séquencées, de la souche la plus pathogène isolée lors de l'expérimentation et la souche vaccinale utilisée au Maroc contre le SPV.

- La quatrième partie de ce travail consistait à produire et contrôler le vaccin inactivé produit pour lutter contre la SP.



***PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE***

# CHAPITRE I : MALADIE DE LA CLAVELEE OU LA VARIOLE OVINE

## I- DEFINITION :

La clavelée ou la variole ovine est une maladie virale infectieuse, hautement contagieuse, virulente, inoculable et spécifique du mouton, elle est classée, par l'organisation mondiale de la santé animale, dans la liste des maladies à déclaration obligatoire, [Diallo et *al.*, 2010, site web OIE 2017]. Elle est causée par un virus de la famille des Poxviridae. Cliniquement, la clavelée se caractérise par l'augmentation de la température de l'animal infecté ou l'hyperthermie et l'apparition des lésions cutanées. Par sa gravité, elle est considérée la variole animale la plus meurtrière, Elle évolue soit sous une forme classique (vésiculeuse ou nodulaire), soit sous une forme compliquée. Une forme suraiguë ou septicémique existe mais est rarement observée [Diallo et *al.*, 2010 ; Zro et *al.*, 2014].

Bien que la clavelée soit connue par les éleveurs depuis longtemps, ce n'est que depuis environ une quarantaine d'années que des moyens de lutte efficaces, contre cette maladie, ont été mis au point.

La clavelée ou variole ovine est également connue sous plusieurs appellations à savoir : Jedri (en arabe *الاجنام*), Sheep pox (en anglais), Viruela ovine (en espagnol) et Vaiolo ovino (en italien) [FAO., 2000].

Au Maroc, et sur le plan légal, elle est réputée légalement contagieuse depuis le décret du 13 juillet 1914 et en vertu du Dahir portant loi n°1-75-292 du 5 chaoual 1397 (19 septembre 1977) et l'arrêté du Ministre de l'Agriculture, du Développement Rural et des Eaux et Forêts n° 2019-01 du 19 chaabane 1422 (5 novembre 2001) relatif aux mesures complémentaires et spéciales pour la lutte contre la clavelée ovine [<http://www.onssa.gov.ma> ; <https://fr.scribd.com/document/312289893/Clavelee-dahir>].

## II- Historique :

La clavelée ou la variole ovine (Sheeppox) est une maladie très ancienne avec de nombreux cas signalés au premier siècle après Jésus Christ. Depuis là, plusieurs épizooties ont été rapportées en Europe et dans le bassin de la méditerranée. La clavelée ne fut vraiment reconnue comme une affection microbienne qu'au début du XXe siècle. Auparavant, la maladie avait été attribuée à des causes très variées. Ce n'est qu'en 1902 que Borrel a identifié l'agent causal

comme un virus, qui a d'abord été cultivé *in vitro* en 1933 par Bridre [Blancou, 1999 ; Diallo et Viljoen, 2007].

### **III- Epidémiologie et répartition géographique**

#### **1- Epidémiologie**

Dans la plupart des pays infectés, la clavelée évolue sous forme enzootique avec des poussées épizootiques. Au Maghreb, elle se caractérise par un rythme saisonnier (recrudescence à la fin de l'été et pic en hiver).

Dans le cas où un troupeau n'a jamais été en contact avec le virus, la clavelée évolue sous forme d'épizootie, elle touche tous les moutons mais elle est considérée particulièrement meurtrière pour les agneaux. Après l'apparition des premiers cas, elle gagne l'ensemble du troupeau par des vagues successives espacées de trois semaines à un mois. Ces vagues s'expliquent par le fait que les animaux infectés ne sont contagieux que pendant la phase éruptive [Diallo et Viljoen, 2007].

#### **2- Répartition géographique :**

##### **a- Au niveau mondial :**

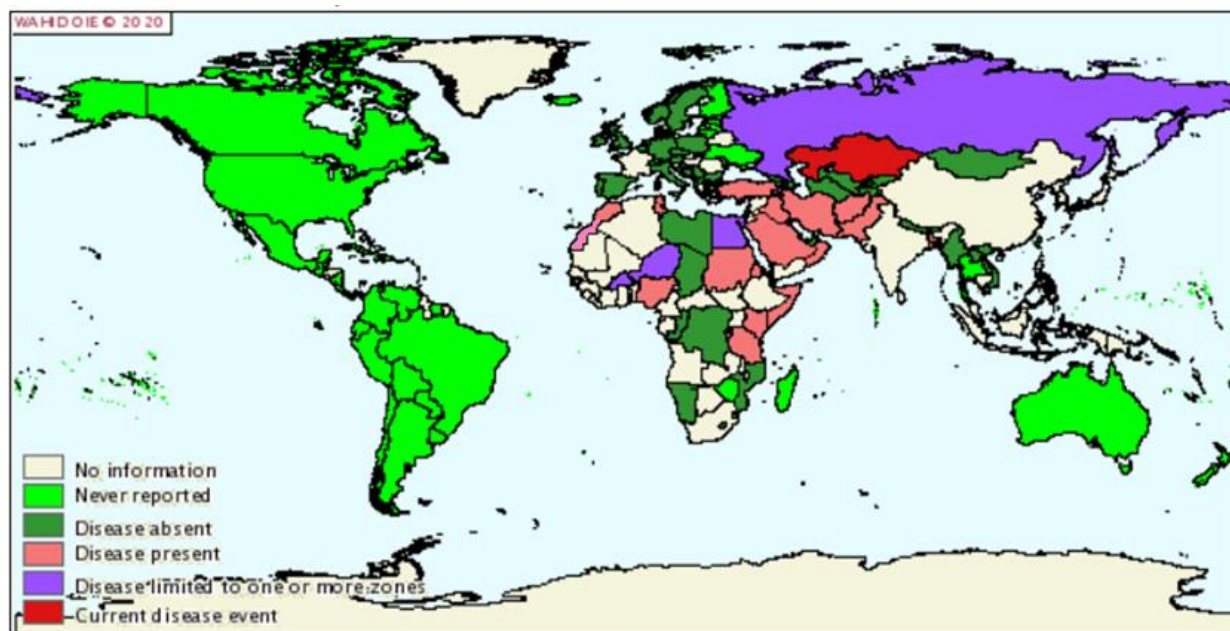
La distribution globale de la clavelée a été plus large que les autres pathologies causées par les Capripoxvirus. En effet, des cas se produisent régulièrement en Afrique du Nord et centrale et en Asie (en allant de l'Asie centrale vers la Chine) [Asagba and Nawathe, 1981; Le Jan et *al.*, 1987 ; Kitching et *al.*, 1989; Mariner et *al.*, 1991; Achour et Bouguedour, 1999 ; Limon et *al.*, 2020], au Moyen-Orient [Daoud, 1997, Al-Shabebi et *al.*, 2014], en Inde [Mondal et *al.*, 2004; Bhanuprakash et *al.*, 2005 ; Bhanuprakash et *al.*, 2010 ; Chopade et *al.*, 2013], en Iran [Mirzaie et *al.*, 2015], en Irak, en Russie [Orlova et *al.*, 2006 ; Maksyutov et *al.*, 2013], au Kazakhstan, au Kirghizistan, au Pakistan, et au Népal et en Chine [Zheng et *al.*, 2007, Xin-Min Yan et *al.*, 2011].

Elle est aussi étendue sur le Bangladesh, Vietnam (2005 et 2008) et la Mongolie (2006 et 2007). Des incursions sporadiques ont été également signalées en Grèce (2007) (Base de données mondiale sur l'information sur la santé animale, OIE).

La maladie a été également endémique en Turquie [Oğuzoğlu et *al.*, 2006] et entre 2013 et 2015, quatre épidémies se sont produites en Bulgarie et plusieurs éclosions ont été signalées en Grèce (OIE WAHID). Selon la base de données WAHID de l'OIE, l'incidence du SP en Grèce en 2015 était grave malgré la mise en œuvre d'une vaste politique d'abattage sanitaire [Tuppurainen et *al.*, 2015].

La clavelée n'a jamais été signalée dans les Amériques, en Océanie (Australie, Fidji, Polynésie française, Nouvelle-Calédonie, Nouvelle Zélande, Philippines, Vanuatu) et en Afrique australe (Angola, Botswana, Lesotho, Madagascar, Malawi, île de la Réunion (France), Afrique du Sud, le Swaziland et le Zimbabwe [OIE WAHID].

La répartition géographique actuelle de la clavelée est représentée sur la figure 1 :



**Figure1** : Répartition géographique de la clavelée.

[[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation)]

#### **b- Au Maroc :**

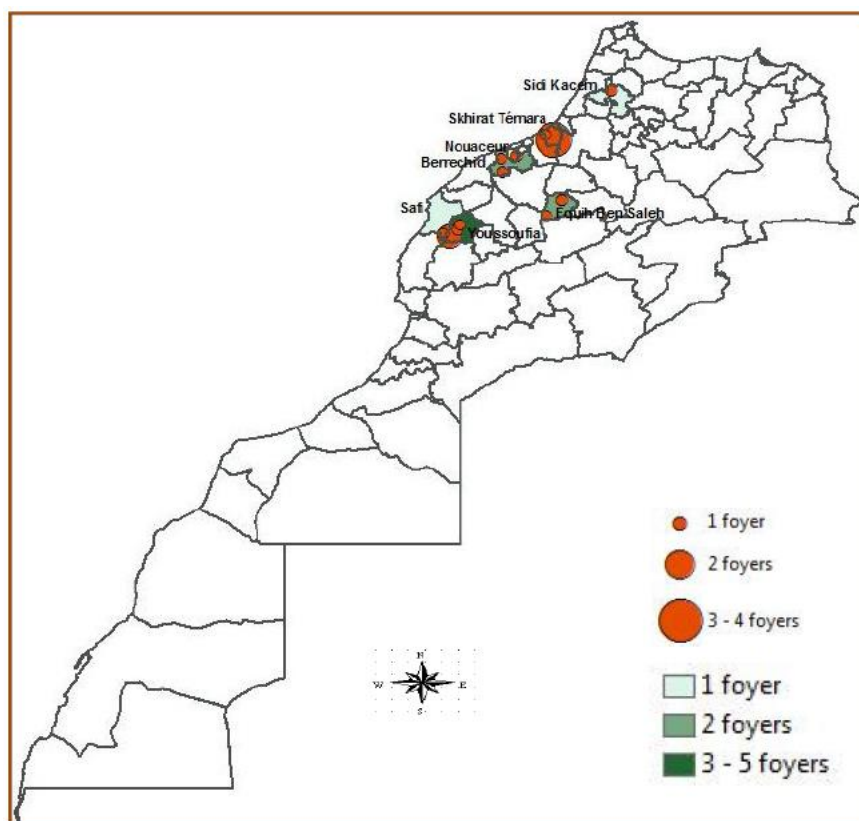
Au Maroc, la clavelée sévit sous forme enzootique depuis des décennies. Dans nos jours, et grâce aux programmes de lutte entrepris par le Département de l'Agriculture, l'incidence de la maladie a nettement régressé.

En effet, durant les années 1970-80, la clavelée ovine occupait presque la totalité du territoire national et le nombre de cas déclarés annuellement se chiffrait à des milliers d'ovins atteints.

En 2010, des épidémies épizootiques ont été enregistrées dans la région EST du royaume, il a été noté pour la première fois l'apparition d'une nouvelle forme, appelée forme nodulaire, qualifiée de sévère dans certains cas. Cette forme clinique a été rapportée en Mauritanie et reproduite suite à une inoculation expérimentale d'animaux par des souches du virus de la clavelée, isolées dans certains pays d'Afrique de l'Ouest [Zro et *al.*, 2014].

Actuellement et selon les informations zoosanitaires publiées par l'office national de sécurité sanitaire des produits alimentaires (ONSSA), en Janvier 2021, 16 foyers (71 cas) ont été déclarés dans les régions Rabat-Salé-Kénitra (6 foyers, 30 cas, 14 morts), Casablanca-Settat (3

foyers, 12, cas, 2 morts), Marrakech-Safi (5 foyers, 8 cas, 8 morts) et la région Béni Mellal-Khenifra (2 foyers, 21 cas, 5 morts) (Figure 2) [ONSSA, 2021].



**Figure 2 : Répartition des foyers du virus de la clavelée au Maroc en Janvier 2021**

[ONSSA, 2021].

#### IV- Impact économique

La clavelée, est l’une des maladies à déclaration obligatoire immédiate selon l’Organisation mondiale de la santé animale (OIE). De plus, elle est considérée parmi les maladies les plus meurtrières dans le monde, elle est transfrontalière, ce qui constitue un obstacle important au commerce du bétail et des produits d’élevage, chose qui affecte particulièrement le bien-être économique des agriculteurs dans les pays en développement et qui aurait des répercussions économiques importantes sur les pays industrialisés si la maladie leur était introduite. Par exemple, aux états unis, les Capripoxvirus sont listés en tant qu’agents potentiels de bioterrorisme économique sur le registre « National Select Agent Registry » [Babiuk, 2008]. La clavelée, dans les zones endémiques, est associée à des pertes de production importantes en raison de la réduction du rendement du lait, la diminution de la production de la viande, la laine et les peaux, et de l’augmentation des taux d’avortement [Yeruham et al., 2007, Tuppurainen et al., 2015].

Lors de flambées épizootiques, les taux de morbidité et de mortalité peuvent être très élevés, atteignant 100% [Bhanuprakash et *al.*, 2006]. Par exemple, en Inde, ça a duré 6 ans, le temps pour qu'un troupeau se remette d'une épidémie au cours de laquelle le taux de mortalité était de 49,5% [Garner et *al.*, 2000].

## **V- Contrôle de la Maladie :**

La prophylaxie sanitaire et médicale (vaccination) sont les deux principales actions de lutte contre les infections virales.

### **1- Prophylaxie sanitaire**

Elle constitue, en principe, le fondement de la lutte contre la clavelée comme pour la plupart des maladies contagieuses. Elle est axée à la fois sur des mesures défensives et des mesures offensives selon deux principes, le premier est de protéger les effectifs indemnes, et la deuxième repose sur l'assainissement des effectifs infectés [FAO., 2000].

Le succès du contrôle et de l'éradication de la clavelée repose largement sur la détection précoce du « cas index », la mise en œuvre rapide de l'éradication de tous les animaux infectés et en contact, le contrôle strict des mouvements, la quarantaine et la désinfection.

Dans les zones où la maladie a été récemment introduite, la détection précoce nécessite une sensibilisation vis-à-vis de la gravité de la maladie pour les vétérinaires de terrain, les agriculteurs et le personnel de soin des animaux, ainsi que la capacité de diagnostic des laboratoires locaux [Tuppurainen et *al.*, 2015].

Selon les mesures sanitaires recommandées par l'organisation mondiale de la santé animale, il faut abattre le troupeau infecté si possible, si l'abattage est impossible, il faut isoler les troupeaux infectés et les animaux malades pendant au moins 45 jours après la détection de la maladie ; Eliminer les cadavres et les produits soit les brûler ou les enterrer ; Nettoyer et désinfecter rigoureusement les fermes et les équipements ; Mettre en Quarantaine les nouveaux animaux avant leur introduction dans les troupeaux et Contrôler le mouvement des animaux et des véhicules dans les zones contaminées.

La vaccination peut être envisagée dans le cas où la maladie s'est propagée plus largement [[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Disease\\_cards/SHEEP\\_GOAT\\_POX.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/SHEEP_GOAT_POX.pdf)]

### **2- Prophylaxie médicale :**

La prophylaxie médicale de la clavelée, dans les nombreux pays où cette maladie existe, repose sur l'utilisation de vaccins, elle est fondée essentiellement sur l'existence d'une immunité

post-vaccinale chez les animaux réceptifs. Les vaccins utilisés peuvent être de différents types, chacun présentant des avantages et des inconvénients.

Plusieurs types de vaccins ont été préparés et utilisés sur le terrain. On peut citer :

□ **Les vaccins sensibilisés (type Bridré et boquet):** ces vaccins étaient produits pour longtemps par les instituts Pasteur des pays du Maghreb à partir de la lymphé et de tissu d'agneaux infectés artificiellement par la souche Borrel. Ils entraînent une réaction locale importante et une légère hyperthermie. La durée d'immunité est de 6 mois. Enfin sa qualité est inconstante d'un lot à l'autre.

□ **Les vaccins inactivés :** Adsorbés type Rafyi et Mirchamsy : mis au point en Iran ; ils ont été produits, avec quelques modifications, en Egypte, en Inde, en Hongrie et en URSS. Utilisés en intradermique, ces vaccins provoquent une légère réaction locale et induisent une immunité de 10 à 12 mois.

□ **Les vaccins vivants atténués :** le vaccin type qui a été largement utilisé est la souche virale de la clavelée « Roumania ou Roumania », qui a été atténué par des passages en série sur culture cellulaire de rein d'agneau [Ramyar et Hessami, 1967, Ramyar 1965 et Sabban, 1957, Précausta et al., 1979]. Présenté sous forme lyophilisée, ce vaccin est utilisé en sous cutané. Il provoque une faible réaction locale, mais l'absence de cette réaction ne signifie guère que la vaccination a échoué. L'immunité s'installe en 14 jours et dure 1 an [FAO., 2000]. Ces vaccins sont actuellement disponibles contre le LSDV, le SPV et le GPV et sont peu coûteux (1,5-2,0 € par dose actuellement) et offrent une bonne protection si une immunité suffisante (plus de 80%) est maintenue en effectuant des vaccinations annuelles [Tuppurainen et al., 2015]

Davies (1976) a décrit l'isolement de la souche 0240 du Capripoxvirus à partir d'un mouton. Il a été prouvé que ce virus, également appelé KS1 pour Kenya Sheep-1, est en fait un virus de la dermatose nodulaire contagieuse (LSDV : Lumpy Skin Disease Virus) [Black et al., 1986, Tulman et al., 2002]. L'atténuation de cet isolat a donné naissance à un vaccin qui contrôle la maladie chez les ovins et les caprins [Kitching et al., 1987] et qui assure une protection qui peut dépasser un an. Ce vaccin est recommandé pour le contrôle du Capripox chez les ovins et les caprins, mais pas chez les bovins car il semble avoir une pathogénicité résiduelle pour certaines races de cette espèce [Manuel OIE, 2005, Yeruham et al., 1995].

Au Maroc, où la variole ovine sévit sous forme enzootique, la souche Roumania est utilisée pour l'immunisation du cheptel national [Zro et al., 2014].

□ **Vaccins recombinants :** Une nouvelle génération de vaccins à virus capripox est en cours d'élaboration. Elle utilise le génome du capripoxvirus en tant que vecteur d'autres agents pathogènes des ruminants, par exemple les gènes du virus de la peste bovine ou ceux de la peste

des petits ruminants (PPR). Une vaccination avec ce type de vaccin assure donc à l'animal une protection à la fois contre l'infection à capripoxvirus, la peste bovine et la PPR [Manuel OIE, 2017].

### **3- Profil d'un vaccin idéal**

Un vaccin idéal permettrait l'apparition rapide d'une immunité humorale et cellulaire à vie dans les 14 jours suivant une administration unique. Le vaccin ne doit pas provoquer de maladie clinique ni se propager chez les animaux non vaccinés. De plus, le vaccin devrait être peu coûteux et thermostable. Un seul vaccin contre la SP, la GTP et la LSD serait idéal [Kitching, 2003] et est techniquement réalisable. Les vaccins recombinants, qui utilisent le SPV, le GPV ou le LSDV en tant que vecteur de vaccin, peuvent toutefois faire face à des problèmes de réglementation dans les pays où les trois maladies ne sont pas présentes. Par exemple, un vaccin dérivé du SPV ou du GPV ne serait pas utilisé en Afrique du Sud et un vaccin dérivé du LSDV ne serait pas utilisé dans les pays asiatiques. Au sein de l'Union européenne (UE), l'éradication du CaPV est en général basée sur l'abattage total de tous les animaux infectés et en contact avec les animaux, les restrictions de déplacement des animaux et d'autres mesures d'éradication. Toutefois, l'utilisation de vaccins d'urgence peut être autorisée si ça n'affecte pas les intérêts des autres États membres de l'UE (92/119 / CEE du 17 décembre 1992) [Tuppurainen et *al.*, 2015].

Pour les pays non endémiques, un vaccin DIVA doit être développé. Ce vaccin serait également un outil utile pour les pays d'endémie qui finiront par acquérir un statut indemne de maladie après la mise en œuvre d'une campagne d'éradication efficace [Tuppurainen et *al.*, 2015].

Les vaccins anti-CaPV tués ou inactivés peuvent être utilisés en toute sécurité dans les pays non endémiques dans des situations d'urgence, bien que plus d'une administration soit nécessaire. Actuellement, l'efficacité des vaccins tués contre les LSDV, SPV et GTPV est en cours de réévaluation. A ce jour, aucun vaccin à vecteur viral commercialement disponible utilisant des antigènes CaPV n'a été développé [Tuppurainen et *al.*, 2015].

### **VI- Modalités de contrôle de la clavelée au Maroc :**

Le manque de stratégies de vaccination obligatoires et cohérentes ainsi que le contrôle inefficace des déplacements des animaux sont les causes les plus fréquentes de la propagation incontrôlable des CaPVs. La transhumance et les pratiques agricoles nomades, communes dans les régions endémiques du CaPV compliquent le contrôle des maladies, et la vaccination des animaux se déplaçant sur de longues distances devrait être une priorité [Tuppurainen et *al.*, 2015].

A partir de 1999, la diminution importante du nombre de foyers de la clavelée enregistré et du nombre de cas par foyer a favorisé le changement de la situation épidémiologique de la maladie, chose qui a permis d'adopter le programme de la vaccination régionalisée dans les zones à haut risque (Zone orientale du royaume).

Toutefois, à partir de 2001, sept foyers de la clavelée ont été réapparu dans certaines provinces du pays, ce qui a imposé de nouveau le retour à la vaccination généralisée du cheptel ovin à partir de 2002 pour limiter leur extension. Cette campagne de vaccination s'est poursuivie dans la région de l'Oriental (Oujda, Figuig, Nador, Boulemane, Errachidia et Ouarzazate). Au total, 3 470 500 ovins ont été vaccinés dans cette région, soit un taux de couverture de 93 % des effectifs concernés.

Par ailleurs, dans le cadre de l'épidémiologie-surveillance de la maladie, des prospections ont été menées à l'échelle nationale ; elles ont concerné 307 476 ovins (1,9 % du cheptel) en moyenne par mois au niveau des marchés, des exploitations, des abattoirs, des principaux lieux de rassemblement et des cabinets vétérinaires [[ftp://ftp.oie.int/SAM/2001/MAR\\_F.pdf](ftp://ftp.oie.int/SAM/2001/MAR_F.pdf)].

Depuis 2004, la vaccination contre la clavelée, tout en restant généralisée, devint biennale suite à la réapparition de quelques foyers épars de la maladie (le vaccin utilisé confère une immunité qui peut atteindre plus de 24 mois chez les animaux vaccinés).

Suite à l'apparition de la peste des petits ruminants au Maroc, en 2008, la lutte contre la maladie a été focalisée sur le renforcement de l'application des mesures de polices sanitaire et médicale en vigueur, à savoir, la vaccination autour des foyers, les restrictions des mouvements des animaux, l'abattage des animaux atteints, la désinfection des élevages atteints et l'indemnisation des éleveurs concernés, en plus d'une surveillance continue de la maladie au niveau national [<http://www.onssa.gov.ma>].

En 2011, le renforcement de l'immunité acquise chez les ovins était l'objectif de la généralisation de la vaccination contre la clavelée, et pour le même objectif, une nouvelle campagne de vaccination généralisée a été lancée en 2013, et ce, en collaboration avec les vétérinaires sanitaires mandatés [<http://www.onssa.gov.ma>].

Parallèlement au programme de lutte suivi par les autorités vétérinaires au Maroc, une vaccination préventive va être adoptée, dont les démarches sont rapportées dans le code de procédure mis en place par l'ONSSA le 24 Avril 2017, et qui définit les modalités de sa mise en évidence, afin d'améliorer la situation sanitaire du cheptel ovin national vis-à-vis de la maladie de la clavelée [<http://www.onssa.gov.ma>].

Ce code est basé sur une démarche volontaire qui permettra de répondre à la demande des éleveurs qui désirent mettre en place un programme préventif volontaire de lutte contre cette

maladie. Ainsi, sans préjudice aux textes réglementaires en vigueur, notamment les mesures de lutte mises en œuvre lors de la déclaration des foyers de cette maladie, le code de procédure a pour objectifs de donner la possibilité aux éleveurs intéressés de faire vacciner, volontairement, leurs troupeaux, à titre préventif, dans un cadre contractuel avec un vétérinaire sanitaire mandaté et dans les conditions précisées dans le code, et ce afin de renforcer l'immunité des ovins et d'éviter les pertes économiques engendrées par la maladie ;fFixer les conditions d'acquisition du vaccin et de vaccination des animaux et préciser les modalités pratiques de la mise en œuvre du programme de vaccination [<http://www.onssa.gov.ma>].

## CHAPITRE II : LE VIRUS DE LA CLAVELEE

### I- Etiologie

#### 1- Classification

Le virus de la clavelée appartient à la famille des Poxviridae, sous-famille des Chordopoxvirinae (ChPV) et au genre Capripoxvirus. Ce genre comprend, en plus du virus claveleux, le virus de la variole de la chèvre et le virus de la dermatose nodulaire contagieuse des bovins (Lumpy skin disease) [Matthews, 1982].

#### a- Les poxvirus :

Les Poxvirus sont des virus à appartenant la famille Poxviridae. Ils sont des agents pathogènes importants de l'homme et de nombreuses espèces d'animaux domestiques et sauvages. Les infections aux poxvirus des espèces croisées (y compris zoonotiques) peuvent avoir des conséquences drastiques pour l'hôte qui les reçoit. [Hughes et Friedman, 2005, Baker et Murcia, 2014].

Les poxvirus sont regroupés en 2 sous-familles, selon leur spécificité de l'hôte : les *Chordopoxvirinae*, qui infectent les vertébrés et les *Entomopoxvirinae*, qui infectent les invertébrés. Parmi les *Chordopoxvirinae*, 10 genres sont actuellement reconnus (Tableau 1), et qui contiennent un nombre important d'agents infectieux qui affectent les animaux et les humains : orthopoxvirus, yatapoxvirus, leporipoxvirus, capripoxvirus, cervidpoxvirus, suipoxviruses, avipoxvirus, parapoxvirus, molluscipoxvirus, crocodylipoxvirus [Sherry et al., 2014].

**Tableau I : Classification de la sous-famille des Chordopoxvirinae [Van Regenmortel, et al., 2000 ; Knipe et Howley, 2007.]**

Genre	Espèce type	Principales autres espèces virale
Orthopoxvirus	Virus de la vaccine	Mousepox virus Cowpox virus Camelpox virus Monkeypox virus Virus de la variole humaine Raccoonpox virus Taterapox virus Volepox virus Uasin Gihu Smallpox Shunkpox

Parapoxvirus	Orf virus	Virus de la somatite papuleuse des bovins Pseudocowpox virus Squirrel parapoxvirus Parapoxvirus du cerf commun Ecthyma contagieux du chamois Maladie d'Auzduk
Avipoxvirus	Virus de la variole aviaire	Virus de la variole du canari Virus de la variole du dindon Virus de la variole du pigeon Virus de la variole de la caille + virus spécifiques d'autres espèces d'oiseaux
Capripoxvirus	Sheeppox virus ou virus de la clavelée	Virus de la variole caprine Lumpy skin disease virus
Leporipoxvirus	Virus de la myxomatose	Virus du fibrome de Shope Virus du fibrome malin du lapin Virus du fibrome du lièvre Virus du fibrome de l'écureuil
Suipoxvirus	Swinepox virus ou Virus de la variole porcine	
Molluscipoxvirus	Virus du Molluscum contagiosum	
Yatapoxvirus	Tanapox virus	Virus Yaba de la tumeur du singe
Cervidpoxviruses Crocodylipoxviruses	Deerpox virus Crocodilepox virus	

**b- Les Capripoxvirus :**

Le genre CaPV est l'un des membres de la sous-famille Chordopoxvirinae, il est composé de trois agents pathogènes importants, étroitement apparentés et qui n'infectent que les ongulés : le virus de la clavelée ou variole ovine (SheepPox Virus ou SPV), le virus de la variole caprine (Goat Pox Virus ou GPV) et le virus de la dermatose nodulaire contagieuse (Lumpy Skin Disease Virus ou LSDV), isolés des moutons, des chèvres et des bovins, respectivement [Diallo et Viljoen, 2007].

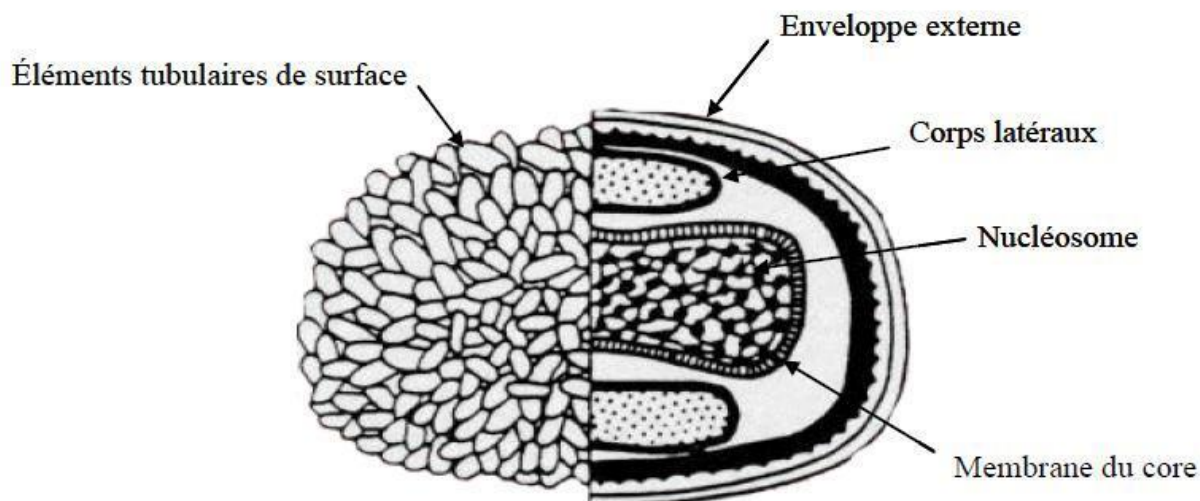
**2- Morphologie et structure :**

Les membres de la famille des Poxviridae sont des gros virus dont les dimensions varient de 200×100×100 nm à 270 ×300 ×200nm. Le virus de la clavelée est de taille intermédiaire entre celles du virus de la variole caprine et de la maladie nodulaire cutanée des bovins [Bhanuprakash V. et al., 2006].

Au niveau structural, les poxvirus sont constitués de différentes entités : le core viral, la capsid et l'enveloppe (**Figure 3**) : [Joklik, 1968 ; Griffiths et al., 2001 a ; Griffiths et al., 2001 b ; Moss, 2001 ; Condit et al., 2006].

Le "core" dont la paroi externe possède une structure striée, et se compose de deux couches, une couche externe, qui est plus épaisse (17 nm d'épaisseur), de structure striée en palissade, d'où son nom couche palissadique, et une couche interne, lisse, (de 8 nm d'épaisseur) [Easterbrook, 1966 ; Dubochet et *al.*, 1994 ; Wilton et *al.*, 1995 ; Condit et *al.*, 2006].

La capsid qui enveloppe le core, est constituée de phospholipides et de protéines dont certaines sont la cible d'anticorps produits au cours de l'infection virale [da Fonseca et *al.*, 2000 ; da Fonseca et *al.*, 2004 ; Condit et *al.*, 2006].



**Figure 3 :** Structure d'un Poxvirus [Bertagnoli, 2003].

### 3- Génome:

Les poxvirus sont classés parmi les virus les plus complexes connus. Leur génome est constitué d'un ADN double brin linéaire, dont la taille varie de 130 à 360 kb, de même que celles d'autres familles de grands virus à ADN [Moss et Ward, 2001 ; Tarbouriech et *al.*, 2012]. Plus de 50 séquences génomiques complètes représentant plusieurs genres, espèces et isolats de poxvirus sont accessibles au public. En outre, le séquençage du virus de la variole ou de la vaccine a permis de dénombrer environ 200 gènes [Goebel et *al.*, 1990].

Puisque la taille moyenne d'une protéine codée par un poxvirus est de l'ordre de 30 kDa, similaire à celle de leurs hôtes eucaryotes, et puisque ces virus se reproduisent dans le cytoplasme (pas d'ARNm épissés), on peut estimer approximativement le nombre de gènes viraux comme 1 gène par 1 kpb de génome [Tarbouriech et *al.*, 2012].

La particularité du génome de ces virus, c'est qu'il est formé d'une chaîne polynucléotidique unique contenant des répétitions terminales inversées (ITR) de taille variable (<0.1-15 kpb) (**Figure 4**). Les extrémités du génome contiennent plusieurs bases extra-

hélicoïdales aboutissant à deux isoformes et les deux brins d'ADN sont liés de manière covalente formant une structure en épingle à cheveux [Baroudy et *al.*, 1982.]. Les ITR contiennent souvent des séries de répétitions directes de l'ADN; les mécanismes, par lesquels les ITR sont générés et maintenus ne sont pas encore connus. Cependant, certains poxvirus ont montré qu'ils stimulent des niveaux significatifs de recombinaison parmi les plasmides transfectés dans les cellules infectées [Yao et Evans, 2003].

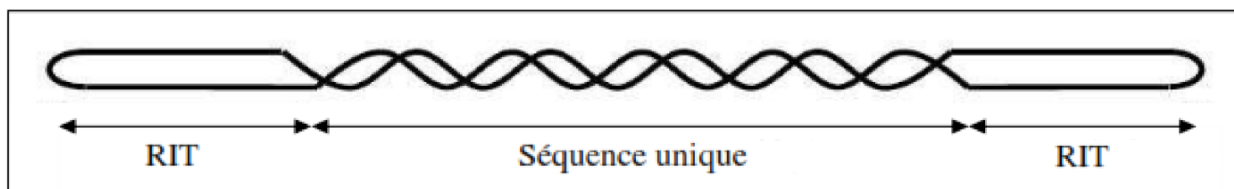


Figure 4 : Représentation schématique du génome viral de Poxviridae (modèle : VACV).

TIR : répétitions terminales inversées [Lefkowitz et *al.*, 2006].

Bien que ces virus contiennent généralement plus de 150 gènes, seulement 49 d'entre eux sont présents dans tous les poxvirus complètement séquencés. Cependant, il existe environ 90 gènes communs entre tous les Chordopoxvirus (ChPV); Ces gènes, qui sont impliqués dans des fonctions clés telles que la réplication, la transcription et l'assemblage des virions, se regroupent dans la région centrale du génome et les gènes qui sont spécifiques à l'espèce ou à l'hôte sont habituellement distribués vers les deux extrémités du génome (Figure 5) [Gubser et *al.*, 2004 ; Upton et *al.*, 2003]. Beaucoup de ces gènes terminaux codent pour des protéines qui fonctionnent pour réduire les processus antiviraux de l'hôte qui comprennent l'apoptose, la présentation et la reconnaissance de l'antigène, les fonctions d'interféron et les processus de signalisation immunitaire ont été appelés gènes de virulence [Barry et *al.*, 2004 ; Moss et Shisler, 2001 ; Seet et *al.*, 2003].

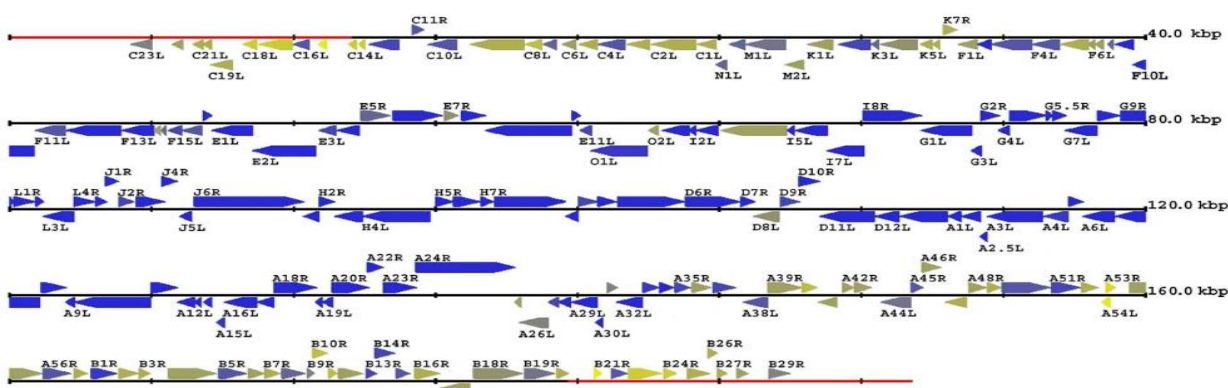


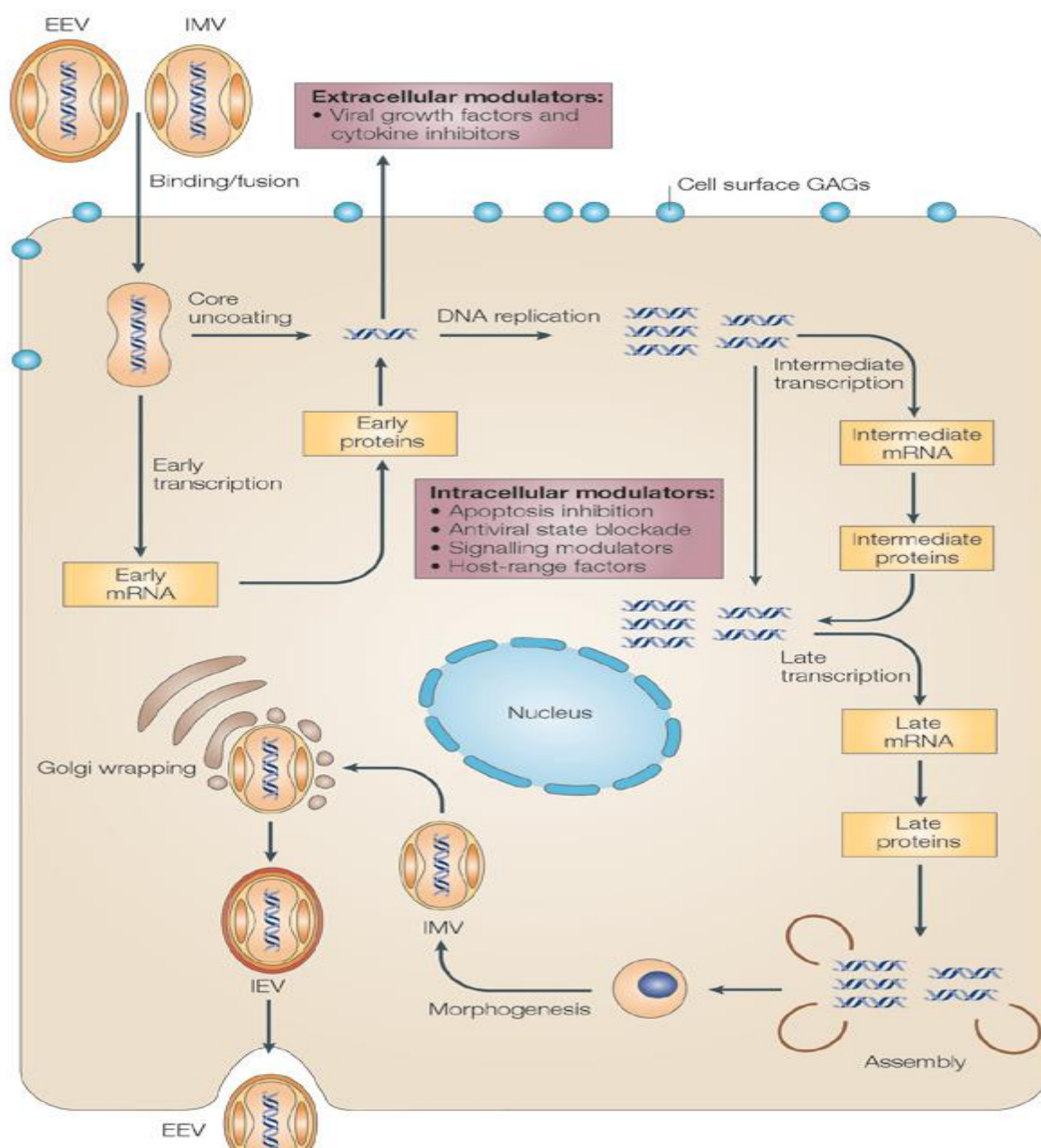
Figure 5 : Diagramme du génome du virus de la Variole (VACV Copenhagen), les gènes colorés en bleu représentent les gènes présents dans tous les Poxvirus, et ceux colorés en jaune sont présents dans 1-3 Poxvirus [Lefkowitz et *al.*, 2006]



emballées dans des particules de virus naissants [Broyles, 2003]. Sur culture cellulaire, la longueur du cycle de réplication dépend du virus, du type de cellules et de la multiplicité des infections [Moss, 2001].

Les particules virales matures intracellulaires (IMV) sont des particules délimitées par une membrane et représentent la majorité des agents infectieux ; Les IMV sont libérés de la cellule pendant la lyse cellulaire et sont importants pour la transmission virale d'un hôte à l'autre [Moss, 2001]. Certains IMV sont enveloppés par une double couche de membrane intracellulaire pour former un virus enveloppé intracellulaire (IEV) [Hiller et Weber, 1985]. Cette membrane contient au moins sept polypeptides codés par poxvirus [Roper et *al.*, 1996 ; Lorenzo et *al.*, 1998; Mathew et *al.*, 2001 ; Husain et Moss, 2005]. Via l'association avec les microtubules [Carter et *al.*, 2003], les IEV se déplacent vers la périphérie de la cellule où la membrane externe se fond avec la membrane plasmique.

Cette fusion expose un virus cellulaire enveloppé (CEV) à la surface, qui est alors poussé vers l'extérieur en augmentant les effets de l'actine. Les CEV jouent un rôle déterminant dans la propagation intercellulaire du virus, et ils sont également libérés de la surface cellulaire en tant que virus extracellulaire enveloppé (EEV). Bien qu'il soit moins abondant que l'IMV ou CEV, l'EEV joue un rôle important dans la diffusion du virus au sein de la culture cellulaire et dans l'hôte [Payne, 1980] et il a été rapporté qu'il jouait un rôle important dans la virulence. Les CEV et les EEV sont physiquement indiscernables et contiennent une membrane de moins par rapport aux IEV et une membrane de plus par rapport aux IMV, respectivement [Smith et *al.*, 2002].



**Figure 7 :** Représentation schématique du cycle de réplication des Poxvirus [Grant McFadden, 2005].

**5- Diversité antigénique :**

Les capripoxvirus sont antigéniquement apparentés, le SPV et le GPV partagent une ou plusieurs bandes de précipitine en fonction de l'antisérum utilisé [Sharma et Dhanda, 1969, Subbarao et al., 1984]. Les virus réagissent de manière croisée au test de fixation du complément [Sharma et Dhanda, 1971]. Le partage d'antigènes entre les virus peut être davantage démontré par ELISA, l'électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium-polyacrylamide, le test d'inhibition de la migration des leucocytes, l'immunoélectrofocalisation (IEF).

Les techniques d'IEF, de transfert IEF-gel et d'immuno-binding par points sont utiles dans le diagnostic différentiel de la clavelée et de la variole caprine [Datta et Soman, 1990]. Bien que la majeure partie des antigènes du SPV et du GPV soit similaire, il peut y avoir des composants antigéniques qui différencient chaque virus de l'autre [Rao et *al.*, 1996].

De plus, dans les isolats ou les souches de SPV (et éventuellement de GPV), la composition antigénique est largement similaire [Bhat, 1993] mais peut ne pas être identique [Puranchand et *al.*, 1987]. Des études ont montré que le SPV et le GPV ne sont pas liés sérologiquement au virus de la dermatose contagieuse qui est un parapoxvirus [Rao et *al.*, 1996; Ngichabe et *al.*, 1999]; cependant, les résultats des réactions croisées varient souvent, ce qui est probablement dû aux différentes méthodes utilisées par différents chercheurs employant différents isolats de capripoxvirus [Sharma et Dhanda, 1971, Subbarao et *al.*, 1984, Kitching et *al.*, 1986b].

## **II- Pathogénicité du SPV :**

En règle générale, la plupart des souches sauvages ont un pouvoir pathogène élevé mais des souches ayant naturellement un faible pouvoir pathogène ont été isolées.

### **1- Interaction hôte-virus :**

#### **a- Tropisme tissulaire :**

La manifestation des lésions de la variole sur la peau, a été longtemps reconnue comme une caractéristique clé de la maladie chez les moutons et les chèvres affectés par les CaPVs. Néanmoins, des études approfondies examinant la pathogenèse sous-jacente de ces maladies n'ont pas été rapportées précédemment. Pour mieux comprendre quels tissus facilitent la réplication et la dissémination du virus *in vivo*, la PCR en temps réel était la technique la plus utilisée pour identifier les sites de production du virus chez les moutons et les chèvres infectés par les CaPVs, après 4 à 15 jours après l'inoculation intradermique. Les concentrations de l'ADN extrait étaient variables d'un tissu à l'autre, avec des concentrations élevées au point d'inoculation, ces résultats ont montré que les CaPVs n'ont pas de préférence tissulaire, ils sont donc capables d'infecter un large spectre de cellules car ils peuvent toucher tous les organes [Johnston et *al.*, 2003 ; Bowden et *al.*, 2008].

Selon une étude réalisée par Murty et Singh en 1971, ils ont réussi à déterminer les fréquences des lésions internes lors d'une atteinte par le virus de la clavelée, ces fréquences sont résumées dans le Tableau II, ce qui est en accord avec les conclusions de l'expérimentation réalisée par Bowden et *al.*, (2008).

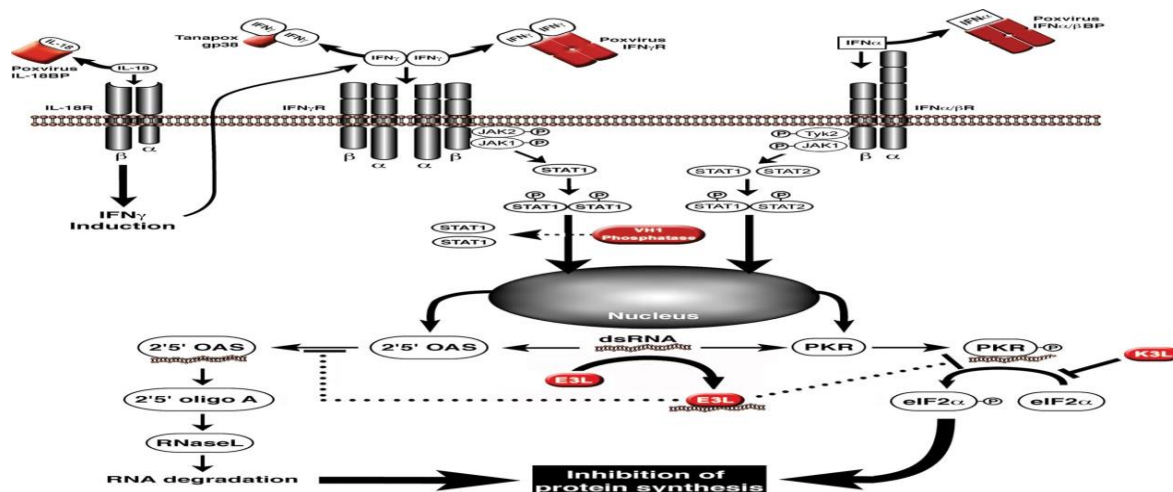
**Tableau II: Fréquences des lésions internes lors d'une infection par le virus de la clavelée**

[Murty et Singh, 1971].

Organes												
Peau	Poumons	Larynx- Pharynx	Trachée	Langue	Caillette	Reins	Rumen	Réseau	Œsophage	Foie	Feuillet	Utérus
100	91	91	79	71	31.5	26	25	17	9	6.6	1	1
<b>Pourcentages %</b>												

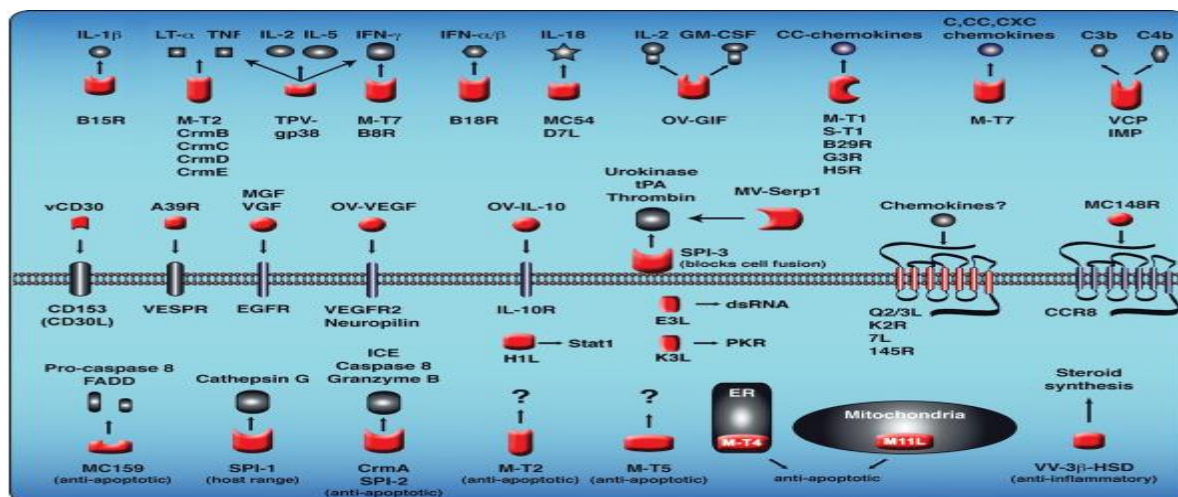
**b- Réponse immunitaire :**

En général, les poxvirus ont de fortes propriétés immunogènes. Ils modulent la réponse immunitaire chez les hôtes infectés en inhibant la synthèse et la libération d'IL-1 par les cellules infectées; encoder des récepteurs de cytokines solubles pour le TNF $\alpha$ , le TNF- $\beta$ , l'IL-1 et, de façon importante, l'IFN- $\gamma$  (Figure 8 a et b); la synthèse de cytokines codées par un virus, telles que le facteur de croissance épidermique et le facteur de croissance transformant, qui antagonisent les effets des cytokines hôtes intervenant dans le processus antiviral [Pickup, 1994 ; Haig, 1998]. En plus, ils sont capables d'induire l'apoptose dans un nombre significatif de cellules présentatrices d'antigènes [Kruse et Weber, 2001], ainsi que la libération d'IL-10 qui a la capacité d'empêcher l'initiation d'une réponse immunitaire acquise [Haig, 1998; Lateef et *al.*, 2003]. Le SPV a montré des preuves d'un mécanisme d'échappement immunitaire qui atténue la réponse immunitaire de l'hôte aux protéines virales et génère donc la possibilité de se répliquer chez l'hôte malgré la vaccination. Une telle suggestion d'amélioration de la stratégie de réplication semble être essentielle pour la survie du SPV [Abdel-Aziz et Ahmed, 2005].



**Figure 8 a: Inhibition et induction des mécanismes IFN par les poxvirus.** La liaison de l'IFN $\gamma$  et de l'IFN $\alpha/\beta$  aux récepteurs cellulaires est inhibée par des homologues du récepteur de l'IFN $\gamma$  du poxvirus ou des protéines de liaison IFN $\alpha/\beta$ , respectivement. L'IL-18BP provenant de plusieurs poxvirus peut séquestrer l'IL-18 et inhiber l'induction de l'IFN $\gamma$  par l'IL-18. L'inhibition

intracellulaire de la signalisation de l'IFN est obtenue par le virus de la vaccine VH1 (H1L) phosphatase (déphosphorylée induite par l'IFN ° STAT1), E3L [se lie à l'ARN double brin (ARNdb) et empêche l'activation de la protéine kinase dépendante de l'ARN (PKR) et/ou l'activation 2', 5' de l'oligoadénylate synthase], et K3L (inhibe l'activation de la PKR). Les protéines montrées en rouge représentent des protéines du poxvirus; les protéines de l'hôte sont représentées en noir et en gris [Seet et al., 2003].



**Figure 8b:** Représentation schématique d'immunomodulateurs de poxvirus. Les protéines virales sécrétées sont montrées au-dessus de la membrane tandis que les protéines intracellulaires sont montrées au-dessous de la membrane. Les virocepteurs du poxvirus agissent comme récepteurs solubles sur la surface cellulaire qui se lie aux cytokines ou chimiokines de l'hôte. Les virokines de poxvirus sont également sécrétées mais fonctionnent comme des ligands agonistes ou antagonistes pour les récepteurs cellulaires de l'hôte. Un certain nombre de protéines de poxvirus intracellulaires agissent pour moduler l'apoptose, le traitement des cytokines et la gamme d'hôtes. Les protéines montrées en rouge représentent des protéines de poxvirus; les protéines de l'hôte sont représentées en noir et en gris [Seet et al., 2003].

Sur le plan antigénique, le virus de la variole ovine est remarquablement stable et il ne représente qu'un seul type antigénique. Il induit la synthèse d'anticorps qui fixent le complément, le précipitent et le neutralisent (dirigés contre l'antigène protéique de surface). Ces anticorps neutralisants n'expliquent pas à eux seuls l'immunité : une protection solide peut s'accompagner d'un faible taux d'anticorps neutralisants. En effet, le virus de la clavelée induit aussi chez les animaux hyperimmunisés une réaction d'hypersensibilité retardée, qui traduit une immunité à médiation cellulaire. Les animaux qui survivent à la maladie présentent une immunité solide et durable. Les agneaux nés de mères immunisées bénéficient de l'immunité passive colostrale pendant quatre à six semaines. Ce virus entraîne des réactions sérologiques croisées fortes avec ceux de la variole caprine et de la dermatose nodulaire contagieuse bovine (souche Neethling), ainsi qu'avec le virus de l'ecthyma mais à un moindre degré [Diallo et al., 2010].

L'immunité contre les CaPVs implique à la fois des facteurs humoraux et cellulaires [Kitching et *al.*, 1987, Amitha et *al.*, 2010]. En général, il a été admis qu'un agent de réplication génèrait une immunité protectrice plus large qu'un non-répliquant. Cependant, des études ont montré que les vaccins SPV inactivés peuvent également conférer une immunité protectrice chez les moutons, comparable à celle fournie par un vaccin SPV vivant [Tuppurainen et *al.*, 2015].

La plupart des virus synthétisés restent à l'intérieur des cellules infectées, à l'exception des virions extracellulaires enveloppés (EEV), qui sont libérés par bourgeonnement des cellules infectées. Ceux-ci peuvent infecter des cellules voisines ou s'échapper dans le sang et être disséminés dans tout le corps. En se propageant localement et directement d'une cellule à l'autre, le virus est hors d'atteinte des anticorps circulants, capables de limiter la propagation du virus, mais n'empêchent pas la réplication du virus au site d'inoculation [Boulter et Appleyard, 1973]. De plus, il a été rapporté qu'après une inoculation intradermique expérimentale, le SPV et le GPV pouvaient infecter des cellules monocytes / macrophages, suggérant que ces cellules pourraient contribuer à la propagation systémique du virus [Embury-Hyatt et *al.*, 2012].

Ainsi, tous les CaPVs partagent un antigène majeur commun pour les anticorps neutralisants et les animaux qui se rétablissent d'une infection naturelle sont résistants à la réinfection et ne deviennent pas porteurs. [Kitching, 1986a].

Le rôle des anticorps dans la protection contre le CaPV a été démontré par le transfert passif de sérums provenant de moutons infectés, protégeant le mouton receveur contre l'infection [Kitching, 1986b], suggérant que les anticorps seuls suffisent à assurer la protection. Cependant, le statut immunitaire d'un animal préalablement infecté ou vacciné ne peut pas être directement lié aux taux sériques d'anticorps neutralisants [Weiss, 1968, Kitching, 1986a]. Après la vaccination, les anticorps apparaissent généralement dans les 15 jours et atteignent le niveau le plus élevé 30 jours après l'inoculation, les animaux vaccinés ou présentant une maladie bénigne, peuvent développer seulement de faibles niveaux d'anticorps neutralisants qui sont souvent en dessous des limites de détection des tests sérologiques actuellement disponibles, même si ces animaux résistent à l'infection. Il est intéressant de noter que les SPV ou GPV virulents provoquent des réponses anticorps, mais le vaccin KS-1 atténué ne provoque pas toujours des anticorps neutralisants détectables chez les ovins, caprins et bovins [Bowden et *al.*, 2009], malgré que les animaux vaccinés soient toujours protégés contre les CaPVs.

Chez les animaux naturellement infectés, les anticorps contre le CaPV peuvent habituellement être détectés pendant 3 à 6 mois après l'infection, mais d'autres études sont

nécessaires pour étudier la persistance à long terme des anticorps anti-CaPV après l'infection [Tuppurainen et *al.*, 2015].

## **2- Caractères cultureux et effet cytopathogène :**

Le mouton est la seule espèce chez qui la culture du virus claveleux est possible *in vivo*. En effet elle a été réalisée avec succès depuis les travaux de Borrel en 1903 qui, en inoculant le mouton, réussit à obtenir “La pustule géante de Borrel” riche en virus [FAO., 2000]. La culture du virus *in vitro* est possible sur cellules homologues de testicules, reins, thyroïdes, poumons, cœur, peau, muscle, ainsi que sur cellules hétérologues de caprins, bovins et volailles [FAO., 2000].

Des études effectuées par les chercheurs [Achour et *al.*, 2000] ont montré que le rendement viral sur support cellulaire varie beaucoup en fonction du type de cellules et de la multiplicité d'infection utilisés, ainsi que de la période de récolte. Sur cellules d'embryon total de mouton, les meilleurs rendements avec différentes souches de la clavelée sont obtenus avec une multiplicité d'infection d'une particule virale pour deux cent cellules et une récolte virale quand 70 % du tapis cellulaire est détruit.

Selon Fakhfakh et *al.* (2005), le système de répllication de choix des poxvirus est représenté par les cellules primaires de testicules et de rein d'agneau et les cellules d'embryon total de mouton.

Plusieurs essais de culture du virus claveleux ont été réalisés sur des œufs embryonnés, mais ils ont abouti à des résultats négatifs, malgré l'observation de quelques inclusions cytoplasmiques et de quelques cellules inflammatoires et des points de nécrose dans la membrane chorio-allantoïque infectée par le virus. De plus, la culture du virus chez les lapins, hamsters, souris et les rats, n'a pas donné de résultats ce qui confirme qu'il ne peut pas se développer chez les animaux de laboratoire [Bhanuprakash et *al.*, 2006].

L'effet cytopathogène (ECP) du virus de la clavelée est similaire à celui décrit pour les autres poxvirus. Ces virus causent en général un arrondissement des cellules, une augmentation de la granulation du cytoplasme, une fragmentation nucléaire et éventuellement une destruction du tapis cellulaire [El Harrak, 1987].

L'infection du virus claveleux des cellules testiculaires et rénales d'agneau s'accompagne d'un ECP qui se manifeste après 2 à 4 jours d'incubation, pour évoluer ensuite rapidement. Cet effet se traduit par l'apparition de foyers dont le nombre et le diamètre augmentent progressivement. Ces foyers sont constitués de cellules arrondies, très réfringentes, bien visibles et individualisées [El Harrak, 1987 ; Hosamani et *al.*, 2008 ; OIE., 2010 ; Sadri et Fallahi, 2010].

Sur culture primaire des testicules d'agneau, les cellules infectées présentent une forme arrondie avec un aspect interne granuleux, témoin de la présence de particules virales dans le cytoplasme cellulaire [Fakhfakh E. et *al.*, 2005].

Quelques souches du virus de la clavelée ont été adaptées à la culture cellulaire de rein de singe vervet d'Afrique (VERO), mais elles ne sont pas conseillées pour un premier isolement [OIE., 2008 (1) ; Sadri et Fallahi, 2010].

### **3- Mode de transmission :**

Les moutons peuvent être infectés expérimentalement par inoculation intra-dermique, administration orale ou intra-nasale par les SPV [Bowden et *al.*, 2008]. Ils excrètent le virus dans les sécrétions buccales, nasales et oculaires et la transmission se produit par des aérosols et des contacts directs entre eux [Kitching et Mellor, 1986, Bowden et *al.*, 2008, Tuppurainen et *al.*, 2015]. En raison de la stabilité du virus, SPV peut persister dans l'environnement pendant de longues périodes, ce qui augmente le taux d'infection. Les concentrations élevées de virus dans la peau des moutons infectés, peuvent également contribuer à la propagation de la maladie mécaniquement par l'intermédiaire des insectes (vecteurs). Ces virus peuvent rester contagieux jusqu'à six mois dans les zones ombragées d'élevage. Ils peuvent également être trouvés sur la laine aussi longtemps que trois mois après l'infection, [Bowden et *al.*, 2008].

### **4- Spécificité de l'hôte :**

Les CaPVs n'infectent que certaines espèces de ruminants et ont un tropisme pour certains types de cellules [McFadden, 2005]; ils ne sont pas infectieux pour les humains [Regnery, 2007]. Le SPV et le GPV causent une maladie clinique chez les moutons et les chèvres, respectivement ; cependant, il existe un large éventail de maladies cliniques observées avec différents isolats de terrain [Babiuk, 2008].

Certains isolats sont uniformément pathogènes chez les moutons et les chèvres, comme certaines souches de Capripoxvirus du Kenya [Davies, 1976] et du Moyen-Orient [Kitching et *al.*, 1986]. La plupart des isolats, cependant, causent une maladie plus sévère chez les moutons ou les chèvres et seulement une infection légère ou sub-clinique chez les autres espèces [Babiuk, 2008].

Ceci est en accord avec des études antérieures démontrant que différents isolats de SPV ou de GPV peuvent être transférés entre ovins et caprins, provoquant une maladie clinique grave chez une espèce et une maladie moins grave chez l'autre [Kitching et Carn, 2004].

Au Maroc, la maladie de la clavelée n'apparaît que chez les moutons, aucun cas affectant les chèvres n'a été déclaré, ce qui reflète que les souches du SPV qui ont circulé dans le royaume lors des flambées épizootiques et jusqu'à présent, sont spécifiques du mouton [Zro et *al.*, 2014].

## **5- Pouvoir pathogène :**

### **a- Pouvoir pathogène naturel :**

Dans les conditions naturelles, l'action pathogène du virus claveleux s'exerce à l'égard de l'espèce ovine.

Le virus pénètre généralement par voie respiratoire et colonise les éléments cellulaires de la muqueuse en déterminant une inflammation locale spécifique. Par la suite, lors d'une phase de virémie, il provoque une hyperthermie de 41 à 42°C [El Harrak, 1987].

### **b- Pouvoir pathogène expérimental :**

L'inoculation intradermique du mouton amène un titre très élevé dans la peau dès le 7<sup>ème</sup>-8<sup>ème</sup> jour, ce titre reste constant jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour puis diminue par la suite [Afshar et *al.*, 1986 ; Balisky et *al.*, 2008 ; Bowden et *al.*, 2008].

Sur le plan général, tous les animaux inoculés manifestent une hyperthermie qui dure du 5<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> jour. La généralisation se déclare, en principe, le 7<sup>ème</sup> ou le 8<sup>ème</sup> jour juste après l'hyperthermie [El Harrak, 1987 ; Balisky et *al.*, 2008 ; Bowden et *al.*, 2008].

## **6- Signes cliniques :**

Cliniquement, il est impossible de distinguer les maladies causées par le SPV et le GPV. Ils sont donc décrits comme une entité. Les signes cliniques observés sont très variables, en fonction non seulement de la susceptibilité individuelle de l'hôte, mais aussi de la souche du virus. Comme indiqué précédemment, le même virus peut avoir des pathogénies différentes chez les chèvres et les moutons [Diallo et *al.*, 2010].

La clavelée évolue soit sous une forme classique (vésiculeuse ou nodulaire), soit sous une forme compliquée. De plus, une forme suraiguë ou septicémique existe mais elle est rarement observée (symptômes généraux et mortalité élevée avant apparition des lésions cutanées) [Diallo et *al.*, 2010].

La période d'incubation est d'environ 6 à 13 jours, mais peut durer jusqu'à 3 semaines ou moins de 4 jours dans des conditions expérimentales. Le premier signe clinique est l'augmentation de la température rectale qui peut atteindre 40 ° C et même plus [Babiuk, 2008, Wolff et *al.*, 2020]. Dans les cas les plus graves, la mort peut se produire avant même de développer des lésions cutanées, c'est le cas de certaines races européennes de moutons, comme celle de Soay [OIE, 2017]. Dans les cas les plus fréquemment observés, les lésions cutanées

apparaissent entre 2-5 jours après le début de la maladie. Elles sont constituées de macules ou de petites zones hyperémiques circonscrites qui ne sont visibles que sur les régions non pigmentées de la peau. Un jour plus tard, ils se transforment en papules ou gonflements durs de 0,5-1 cm ou même 3 cm de diamètre (Figure 9).

Ces lésions peuvent recouvrir tout le corps ou être limitées à des zones sans laine telles que le visage, l'aisselle et le ventre. Ces lésions peuvent également être observées dans les naseaux, les yeux (Figure 10), les glandes mammaires, les organes reproducteurs et la bouche, ce qui rend l'alimentation douloureuse [Wolff et al., 2020].

Pendant cette phase d'éruption de la papule, des décharges oculaires et nasales se produisent [Wolff et al., 2020] (Figure 11). Ils sont initialement séreux mais deviennent muco-purulents et peuvent rendre la respiration difficile. La température rectale de l'animal affecté, élevée au début de la maladie, diminue progressivement jusqu'à atteindre la valeur normale.



**Figure 9 : Papules observées sur flanc rasé**  
[Diallo et al., 2010]



**Figure 10: Lésion croûteuse sur la paupière**  
[Diallo et al., 2010]



**Figure 11 : Décharges et Sécrétions Nasales** [Mirzaie et al., 2015]

Les ganglions lymphatiques superficiels sont élargis. Si la mort ne se produit pas à ce stade, les papules évoluent pour former des pustules et des croûtes (Figure 12 et 13) après la nécrose des tissus en une dizaine de jours. Les croûtes persistent pendant environ 6 semaines et finissent par se détacher de la peau.

Dans certains cas, les papules évoluent rapidement en nodules fermes et circonscrits, connus sous le nom de « stonepox », chacun ayant des diamètres variables pouvant atteindre 5 cm. Après la nécrose, les nodules se détachent et laissent des lésions ulcéreuses formant des cicatrices dans environ 3 semaines. Les nodules peuvent également réapparaître et former des croûtes puis des cicatrices [Bowden *et al.*, 2008].



**Figure 12** : Lésions papulo-vésiculeuses sur la tête [Diallo *et al.*, 2010]



**Figure 13** : Papules sur la gencive et l'encolure au stade de la dessiccation [Diallo *et al.*, 2010]

Les organes internes tels que les poumons (Figure 14) et l'estomac développent également des lésions typiques. Les ganglions lymphatiques drainants sont souvent élargis suite à l'infection; cependant, la lymphadénopathie n'est pas associée à une forte répllication ou charge virale dans les ganglions [Bowden *et al.*, 2008]. Les lésions cutanées causées par la maladie sont caractérisées par l'apparition de traces hémorragiques sur la face interne de la peau (Figure 15).

Chez les animaux gravement atteints, une détresse respiratoire se produit, suivie de la mort. Le pouvoir pathogène d'un SPV dépend à la fois des facteurs viraux et de l'hôte [Stanford *et al.*, 2007].



**Figure 14 : Nodules pulmonaires** [Diallo et al., 2010]



**Figure 15: Face interne de la peau : Traces hémorragique des lésions cutanées** [Diallo et al., 2010]

### 7- Caractéristiques physico-chimiques du virus :

L'inactivation de la lymphé claveuse est réalisée en 5 min dans le phénol à 2%, le formol entre 0.5 et 1%, l'hypochlorite entre 0.1 et 1%, l'acide chlorhydrique 2% et la teinture d'iode 1%. Le chloroforme et l'éther inactivent aussi le virus claveux. De même, l'inactivation est complète en 10 min à la  $\beta$ -propiolactone à la concentration de 0.05 à 0.1% et en deux heures à la trypsine à 0.25% [<http://www.oie.int>].

Le virus se conserve bien aux pH alcalins, il peut survivre plus de 25 mois à un pH situé entre 5 et 7.

La sensibilité du virus claveux se manifeste aussi vis-à-vis de certains agents physiques tels que les ultrasons et les ultraviolets. Par contre, il se montre très résistant à la dessiccation ; son pouvoir de conservation dans les croûtes varioliques desséchées est de plusieurs mois [<http://www.oie.int>].

#### - Action de la température :

En général, le virus de la clavelée montre une résistance à 56°C pendant de 2 heures, à 65°C pendant 30 min mais s'inactive rapidement à des températures supérieures et aussi selon le temps d'exposition à ces températures. Il garde par contre son pouvoir infectieux 2 à 3 ans à -15°C et 2 à 3 semaines à 25-37°C [<http://www.oie.int>]. En résumé, le virus claveux se comporte comme un virus relativement thermolabile, sensible aux divers désinfectants, aux solvants des lipides, aux radiations et aux pH acides. Il se conserve par contre longtemps à des températures basses et dans les croûtes desséchées [<http://www.oie.int>].

## CHAPITRE III : CARACTERISATION VIROLOGIQUE ET MOLECULAIRE D'UNE INFECTION

### I- Les techniques de diagnostic :

Le diagnostic est facile et peut être précoce dans les régions classiquement infectées, où la maladie sévit sous forme enzootique. Il peut être délicat dans les régions indemnes au moment de l'apparition des premiers cas.

Il existe plusieurs techniques de diagnostic qui sont rapportées dans le manuel terrestre de l'organisation mondiale de la santé animale (OIE).

#### 1- Diagnostic clinique et différentiel :

Malgré la facilité du diagnostic clinique, la clavelée peut être confondue à certains stades de la maladie avec :

- L'ecthyma contagieux du mouton ou ORF : lésions exsudatives ou croûteuses localisées sur les lèvres et les gencives (agneau) ou sur la mamelle (mère) ;
- La peste des petits ruminants ou PPR: érosions et ulcérations sur la langue et dans la cavité buccale associées à une pneumonie et à une entérite (syndrome pneumo-entéritique) ;
- La fièvre catarrhale du mouton : œdème de la face et cyanose de la langue, associé à une myosite et à une atteinte podale ;
- La dermatophilose ou lumpy wool, la lymphadénite caséuse, les gales [Diallo, 2010].

#### 2- Diagnostic au laboratoire :

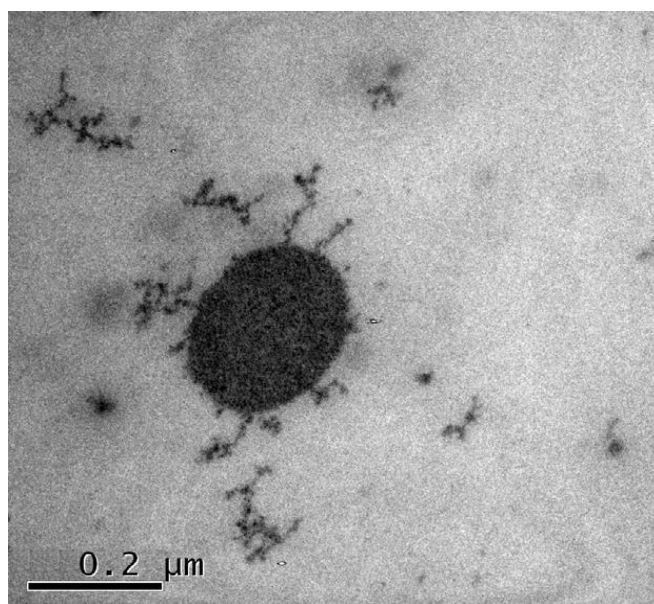
Diverses techniques d'analyses quantitatives et qualitatives sont destinées au diagnostic de la clavelée, parmi lesquelles : la microscopie électronique, l'isolement du virus, la PCR en temps réel, la séroneutralisation, le titrage de l'infection virale, l'ELISA, l'immunodiffusion sur gélose, le Western blot...etc.

##### a- Echantillonnage :

Les prélèvements peuvent se réaliser sur un animal vivant, par la biopsie des papules cutanées ou nodules, ou par la prise de sang sur anticoagulant au début de la maladie, ou après la mort de l'animal, par le prélèvement des nodules apparaissant sur les organes internes, de la lymphe et du tissu inflammatoire [OIE, 2010].

**b- La microscopie électronique :**

Elle est considérée la technique la plus rapide pour confirmer une infection à SPV, elle consiste à détecter les virions caractéristiques de l'infection à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Figure 16). Le diagnostic de l'infection à SPV prend également en compte les commémoratifs d'infection généralisée par un SPV. Cependant, la microscopie électronique ne peut pas distinguer entre les SPV, GPV et LSDV [Kitching et Smale, 1986 ; Zhou et *al.*, 2012]. Elle ne permet pas non plus de distinguer les capripoxvirus des orthopoxvirus, sauf par l'application d'une coloration immunologique spécifique. Les infections à orthopoxvirus sont documentées chez les buffles et les bovins en Inde [Singh et *al.*, 2007] et chez les bovins au Brésil [Damaso et *al.*, 2000]. Aucun orthopoxvirus n'entraîne de lésions chez les ovins ni chez les caprins. Les virions du parapoxvirus, responsable de l'ecthyma contagieux, sont plus petits, ovales, et couverts d'un élément tubulaire unique et continu, qui donne un aspect strié à chaque virion [Afshar A., 1986 ; OIE., 2010].



***Figure 16 : Examen au microscope électronique des CaPVs [Zhou et al., 2012].***

**c- Méthodes de détection des acides nucléiques :**

Les méthodes d'amplification pour la détection du génome de l'ADN viral sont spécifiques au genre Capripoxvirus et sensibles pour la détection tout au long de la maladie, y compris avant et après l'émergence des réponses d'anticorps. Ces méthodes comprennent la PCR conventionnelle, la PCR en temps réel et, plus récemment, l'amplification isotherme (loop-mediated isothermal amplification) ou LAMP. Des méthodes de reconnaissance d'acide nucléique peuvent être utilisées pour détecter le génome du capripoxvirus dans des échantillons de biopsie ou de culture tissulaire.

**✓ La PCR conventionnelle**

Plusieurs méthodes de PCR conventionnelles ont été rapportées avec une spécificité variable pour les Capripoxvirus, en général, la clavelée ou la variole Caprine [Heine et *al.*, 1999, Ireland & Binopal, 1998, Zro et *al.*, 2014a]. Les méthodes de PCR classiques sont particulièrement utiles pour obtenir suffisamment de matériel génétique nécessaire pour l'identification des espèces par séquençage ultérieur et analyse phylogénétique [Le Goff et *al.*, 2009].

**✓ La PCR en temps réel**

Plusieurs méthodes de PCR en temps réel basées sur la détection fluorescente hautement sensibles et spécifiques ont été développées et validées [Balinsky et *al.*, 2008, Bowden et *al.*, 2008, Das et *al.*, 2012, Stubs et *al.*, 2012]. Chaque test détecte un petit locus génétique conservé dans le génome du capripoxvirus, mais ces méthodes ne font pas de distinction entre le virus de la clavelée, le virus la variole caprine ou le virus de la dermatose nodulaire contagieuse. Des méthodes de PCR en temps réel pour le génotypage direct de capripoxvirus sans nécessité de séquençage génétique ont été décrites [Gelaye et *al.*, 2013, Lamien et *al.*, 2011a].

La PCR en temps réel diffère de la PCR classique car les produits amplifiés de PCR sont détectés directement pendant les cycles d'amplification en utilisant des sondes d'hybridation qui augmentent la spécificité de l'épreuve [OIE., 2008 (2)].

Des méthodes variées en temps réel, telles que TaqMan, les amorces Scorpions, le transfert d'énergie résonant (FRET pour Fluorescence Resonance Energy Transfer), le transfert d'énergie avec sonde-amorce (PriProET pour Primer-Probe Energy Transfer), SybrGreen, Light-Up-on-eXtension (LUX) ou les techniques Molecular Beacon sont devenues des outils utilisés en routine pour la détection d'agents infectieux [OIE., 2005 (2) ; OIE., 2008 (2)].

La quantification par PCR en temps réel est développée en utilisant différentes technologies, le principe de la PCR en temps réel repose sur la détermination du nombre de cycles de PCR nécessaires ( $C_t$ ) pour détecter le produit amplifié. Plus la quantité de l'ADN initial est élevée, plus la détection du produit amplifié est précoce [Ameziane N. et *al.*, 2006].

Plusieurs chercheurs ont utilisé la technique de la PCR en temps réel, d'une part pour la différenciation du virus de la clavelée par rapport à d'autres virus, qui donnent presque les mêmes symptômes, en se basant sur des sites de restrictions et sur des séquences spécifiques et bien déterminées dans le génome du virus de la clavelée [Mangana et *al.*, 1999 ; Hosamani et *al.*, 2004; Fakhfakh et *al.*, 2005 ; Lamien et *al.*, 2011, Mahmoud and Khafagi, 2016], ou pour déterminer sa virémie dans le sang [Balisky et *al.* 2008 ; Bowden et *al.*, 2008 ; Wolff et *al.*, 2020 ; Zeedan et *al.*, 2020] ou dans d'autres tissus ou échantillons de biopsie (tissu

inflammatoire, la lymphe, sécrétions nasales) ou aussi dans des cultures cellulaires infectées [Ireland, Binopal, 1998; Heine, et al., 1999; Mangana-Vougiouka et al., 1999 ; Balisky et al., 2008 ].

Selon Balisky et al. (2008), Bowden et al. (2008) et Zro et al. (2014), le virus de la clavelée n'a pas été détecté dans les prélèvements du sang total, ce qui reflète la présence d'inhibiteurs dans le sang ou une basse virémie associée aux infections par le virus de la clavelée.

✓ **Amplification isotherme du génome :**

Des tests moléculaires utilisant l'amplification isotherme (LAMP) pour détecter les génomes des capripoxvirus confèrent une sensibilité et une spécificité similaires à la PCR en temps réel avec une méthode plus simple et à moindre coût (moins cher) [Das et al., 2012; Murray et al., 2013]. [Omoga et al., 2016] ont également rapporté la validation sur le terrain de la méthode LAMP de Das et al., 2012. Une combinaison de ce test universel des capripoxvirus avec deux tests LAMP supplémentaires a démontré son utilité pour distinguer les virus de la clavelée et de la variole caprine [Zhao et al., 2017 ; OIE, 2017].

✓ **Test de fusion à haute résolution (HRM) :**

Le test HRM produit quatre pics de fusion distincts, permettant la différenciation entre les vaccins SPV, les isolats de terrain SPV, GTPV et LSDV. Ce test est sensible, spécifique et permet la détection et la classification des CaPV et la différenciation des vaccins SPV à partir des isolats de terrain SPV [Chibssa et al., 2019].

**d- Méthodes sérologiques :**

✓ **Séroneutralisation sur culture cellulaire :**

Les propriétés antigéniques du virus claveléux ont été étudiées surtout en diagnostic et pour déterminer les parentés des souches entre elles, ou avec les autres poxvirus. Ces propriétés se révèlent par l'apparition, dans le sérum d'animaux infectés, d'anticorps qu'on peut évaluer par plusieurs méthodes, parmi lesquelles la Séroneutralisation (SN).

Bien que la neutralisation soit très spécifique pour presque tous les virus, le test n'est pas considéré très efficace dans le diagnostic de la clavelée, principalement en raison de la neutralisation partielle. Les faibles indices de la séroneutralisation (SN) et la détection virale sont dus à la sensibilité des cultures cellulaires aux virus [Plowright et Ferris, 1958].

La séroneutralisation a été considérée comme une technique non précise dans la détermination du statut immunitaire d'un animal [Ramyar et Hessami. 1970]. Pour avoir des résultats cohérents, il a été annoncé d'utiliser les cellules Vero dans la neutralisation. La méthode de séroneutralisation à virus constant-sérum variable utilisant des dilutions de sérum

dans la gamme de 1/50-1/500 et des cellules de muscle de veau fœtal peut surmonter la détection virale, puisque ces cellules sont moins sensibles que les cellules testiculaires d'agneau [OIE., 2005 (1)]. Cette méthode a été utilisée par Amitha et *al.* (2010) pour l'estimation du taux d'anticorps neutralisant dans des échantillons de sérum.

La méthode du sérum constant-virus variable a été développée, en utilisant le sérum de porc, pour améliorer la neutralisation du virus de la clavelée par des anticorps de sérum du mouton immunisé [Martin et *al.*, 1975].

Malgré ses inconvénients, beaucoup de chercheurs ont utilisé la SN pour étudier la relation antigénique entre SPV, GPV et LSDV [Davies et Otema, 1981], confirmer la maladie ou évaluer le statut immunitaire post-vaccinal [Fassi-Fehri et *al.*, 1984 ; Amitha et *al.*, 2010, Boumart et *al.*, 2016]. L'immunité se traduit par une augmentation du taux d'anticorps sériques neutralisants et une protection contre le virus pathogène. Cette immunité fléchit au cours de la 2<sup>ème</sup> année après la primo-vaccination [Précausta et *al.*, 2002].

Selon Balinsky et *al.*, 2008, les anticorps neutralisants apparaissent le 14<sup>ème</sup> jour après l'inoculation des moutons par le virus.

#### ✓ **Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) :**

Après le clonage de la protéine de structure P32 de SPV fortement antigénique [Carn, 1994 ; Heine et *al.*, 1999], il est possible de produire des réactifs diagnostiques à partir de l'antigène recombinant exprimé, qu'il s'agisse d'obtenir de l'antisérum polyclonal monospécifique P32 ou des anticorps monoclonaux. Ces réactifs ont facilité l'élaboration d'un ELISA de haute spécificité. A l'aide d'antisérum hyper-immun de lapin, obtenu par inoculation du virus purifié à des lapins, il est possible de piéger, sur une plaque ELISA, l'antigène SPV à partir d'une biopsie ou du surnageant d'une culture tissulaire. La présence de l'antigène peut être mise en évidence, à l'aide de sérum de cobaye dirigé contre la protéine de structure P32 spécifique du groupe, de peroxydase de raifort conjuguée à de l'immunoglobuline de lapin anti-cobaye, et d'une solution chromogène/substrat [OIE., 2017].

L'ELISA est basée sur des antigènes recombinants de poxvirus [Bowden, et *al.*, 2009] et sur des antigènes inactivés et purifiés à partir du virus de la clavelée [Babiuk et *al.*, 2009].

#### ✓ **Immunodiffusion sur Gélose (IDG):**

L'épreuve d'IDG, ne peut être recommandée en tant qu'épreuve sérologique, que pour le diagnostic de l'infection à SPV, du fait des réactions croisées existant avec l'anticorps de l'ecthyma contagieux, dont le diagnostic différentiel est le plus important. Ces réactions entraînent de faux résultats positifs [OIE., 2017].

**✓ Epreuve d'immunofluorescence indirecte :**

L'épreuve d'immunofluorescence indirecte s'effectue en culture tissulaire infectée par le virus, soit sur des lamelles couvre-objet, soit sur lame porte-objet. Cette épreuve met également en jeu une culture tissulaire témoin non-infectée, et des sérums témoins positifs et négatifs. La culture infectée et la culture témoin, sont fixées dans de l'acétone à + 20 °C pendant 10 min, puis conservées à 4 °C. Les dilutions de sérums à analyser sont effectuées dans du PBS, avec une première dilution de 1/5. Les dilutions positives sont identifiées à l'aide d'un gamma globuline anti-bovin, conjuguée à de l'isothiocyanate de fluorescéine.

Des réactions croisées peuvent survenir avec l'ecthyma contagieux, la stomatite papuleuse bovine et probablement d'autres infections à poxvirus [OIE., 2017].

**✓ Analyse par Western Blot :**

L'analyse par Western blot d'un sérum contre un lysat cellulaire infecté par le virus constitue un moyen sensible et spécifique de déceler la présence d'anticorps contre les protéines de structure du virus de la clavelée, même si cette épreuve reste coûteuse et difficile à mettre en œuvre. Les cellules testiculaires d'agneau (TA) infectées par le virus doivent être récoltées lorsque l'ECP atteint 90 %. Elles sont ensuite congelées-décongelées 3 fois, les débris cellulaires sont centrifugés et se rassemblent en culot. Le surnageant est décanté et les protéines sont alors séparées par SDS-PAGE (Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en présence de Dodécyl Sulfate de Sodium) [OIE., 2010 ; Sadri et Fallahi, 2010, Chervyakova et *al.*, 2016].

**e- Titrage de l'infection virale :**

La virulence du virus claveléux est évaluée par une réponse de l'hôte du type "tout ou rien". Cette dernière consiste à apprécier l'effet de dilutions croissantes du virus, sur des lots homogènes d'animaux (titrage *in vivo*) ou de tubes de culture cellulaires (titrage *in vitro*) [El Harrak, 1987].

- **Le titrage *in vivo*** permet d'une part d'évaluer l'immunité acquise après vaccination des animaux et d'autre part de mettre en évidence la virulence des souches virales sur le mouton. Il est réalisé sur le flanc de l'animal, en injectant par voie intradermique des dilutions croissantes du virus. On note, à partir du 5<sup>ème</sup> jour, la présence ou l'absence de lésions cutanée aux points d'inoculation [Achour et *al.*, 2000].
- **Le titrage *in vitro*** peut être réalisé sur plusieurs types de cellules, notamment sur les cellules thyroïdiennes et testiculaires d'agneau. Le titre obtenu sur cultures cellulaires est relativement faible et oscille entre 10<sup>3</sup> et 10<sup>5</sup> DICT 50 [Achour et *al.*, 2000], et entre 10<sup>6,5</sup> et 10<sup>-6,7</sup> [Sadri et Fallahi, 2010].

Les titres obtenus *in vivo*, sont toujours supérieurs à ceux déterminés en culture cellulaire pour un même virus [El Harrak, 1987].

## II- Etude moléculaire et phylogénétique du SPV :

Le critère actuel utilisé pour la classification des CaPVs dans le même genre est basé sur les espèces animales à partir desquelles les virus ont été isolés, à savoir SPV des moutons, GPV des chèvres et LSDV des bovins [Babiuk et *al.*, 2008]. Cela tend à suggérer que les CaPVs sont strictement spécifiques de l'hôte. Cependant, plusieurs rapports indiquent l'implication simultanée des moutons et des chèvres dans certaines flambées de CaPVs, et il y a de plus en plus de preuves suggérant que diverses espèces pourraient jouer un rôle important dans la maintenance du CaPV [Greth et *al.* 1992, Le Goff et *al.*, 2009]. Par conséquent, cette méthode de classification est inexacte [Diallo et Viljoen, 2007, Babiuk et *al.*, 2008]. En outre, le fait que les infections par le CaPV ne puissent être distinguées cliniquement ou sérologiquement met l'accent sur la nécessité d'établir des tests plus fiables pour l'identification des virus, tels que ceux basés sur une méthode moléculaire. Le développement d'un test moléculaire approprié nécessite l'identification d'une cible de diagnostic dans le génome du CaPV qui contient des signatures spécifiques d'espèces.

Jusqu'à présent, plusieurs études ont été réalisées sur l'ensemble du génome des CaPVs, allant de l'analyse du génome complet à celle de gènes spécifiques, en utilisant des outils de biologie moléculaire et de Bio-informatique, afin de mieux comprendre le mécanisme d'infection par ces virus et le degré de stabilité de leur génome, aussi bien pour mieux comprendre les liens de parenté avec les autres virus et pour évaluer l'effet des mutations et des délétions sur la structure secondaire des protéines.

L'analyse phylogénétique des données des séquences nucléotidiques du gène qui code pour la protéine d'enveloppe mature (*P32*) du virion des Capripoxvirus a révélé que le SPV, le GPV et le LSDV sont regroupés en groupes spécifiques dépendants de l'espèce hôte [Hosamani et *al.*, 2004 ; Zhou et *al.*, 2012]. La même chose a été prouvée par plusieurs analyses de séquences de différents gènes à savoir le *RPO30* (gène qui code pour la sous-unité de l'ARN polymérase dépendant de l'ADN (30 kilodaltons)), *GPCR* (gène codant une protéine liée à la sous-famille du récepteur couplé aux protéines G), *TK* (gène de la thymidine kinase), *IL8* (gène de l'interleukine 8) [Lamien et *al.*, 2011; Zhou et *al.*, 2012 ; Zro et *al.*, 2014].

Tous les arbres phylogénétiques construits jusqu'à présent, ont montré que les CaPV sont divisés en 3 groupes distincts de virus : Groupe des SPV, GPV, et LSDV, à titre d'exemple (Figure 17 et Figure 18).

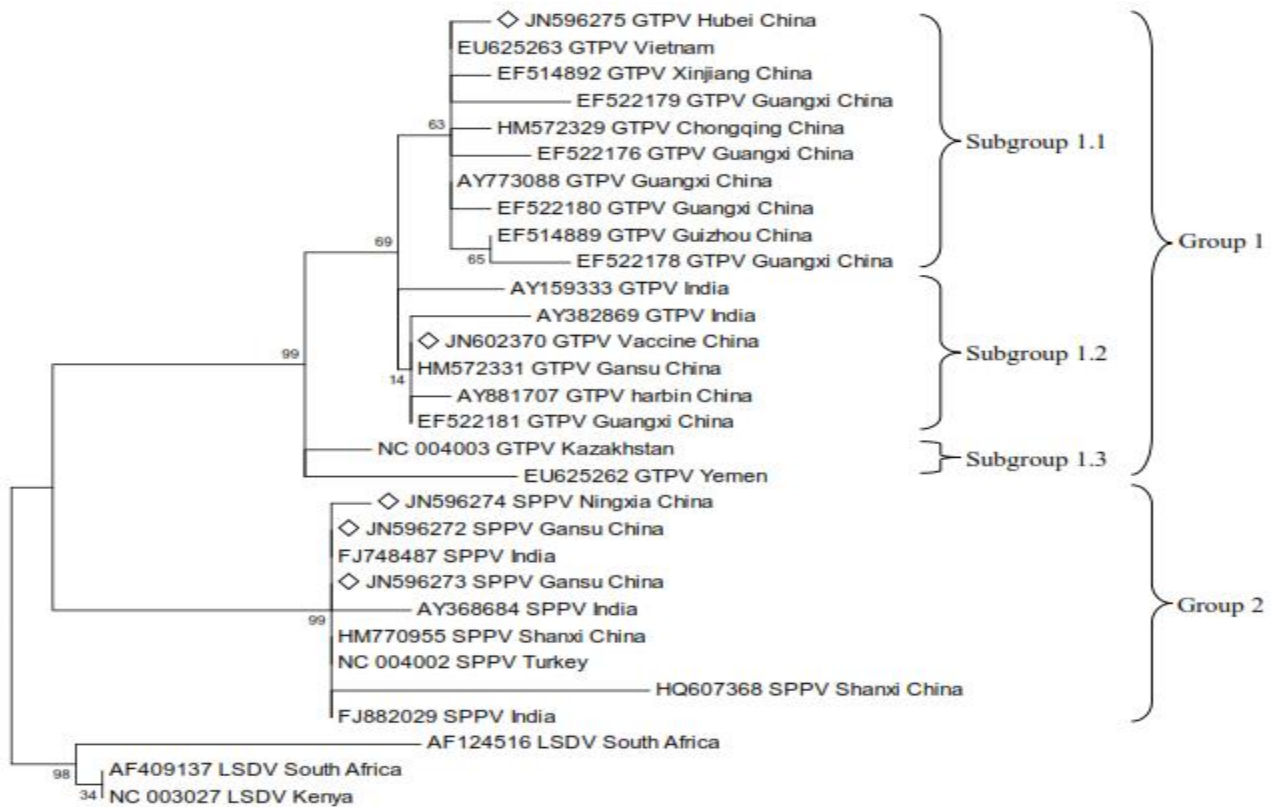


Figure 17: Arbre phylogénétique du gène P32 des CAPVs [Zhou et al., 2012]

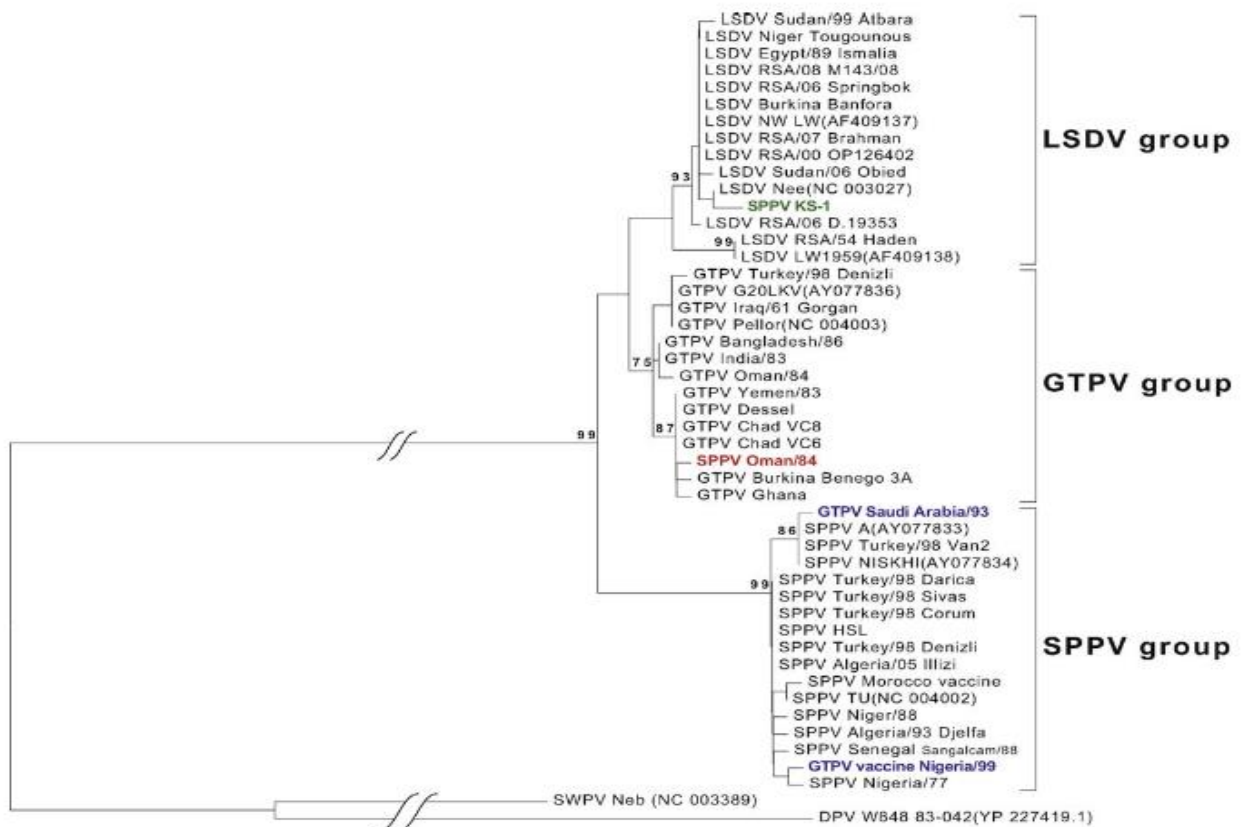


Figure 18 : Arbre phylogénétique du gène RPO30 des CAPVs [Lamien et al., 2011]

Selon l'étude réalisée par Zro et *al.*, (2014) sur une nouvelle forme clinique du virus de la clavelée (forme nodulaire) qui a circulé pour la première fois au Maroc en 2010, La détection du gène de la Thymidine Kinase (TK) et du récepteur analogue de la Chimiokine du gène de l'Interleukine (IL8) a été observée sur le terrain et chez les souches vaccinales et leur profil génétique étaient hautement identiques. Ces résultats ont mis en évidence la conservation des gènes étudiés.

D'après les résultats obtenus selon l'étude réalisée sur le gène GPCR, il s'est avéré qu'il existe quelques divergences avec la nomenclature classique d'origine virus-hôte: un virus isolé chez le mouton est regroupé dans le clade du GPV et vice versa. La diversité intra-groupe a également été observée pour les isolats du virus de la variole caprine et de la dermatose nodulaire [Le Goff et *al.*, 2009].

Pour les SPV, l'addition ou la délétion de 21 acides nucléiques (7 aa) a été observée de façon constante dans la partie terminale du gène. Des signatures spécifiques pour chaque groupe ont également été identifiées. La prédiction de la topologie GPCR du CaPV, et sa comparaison avec d'autres GPCR de mammifères et homologues viraux, a révélé non seulement un profil GPCR classique dans les trois quarts de la protéine, mais aussi des caractéristiques uniques comme une extrémité N-terminale plus longue avec une hélice  $\alpha$  proximale hydrophobe et une queue C plus riche en sérine [Le Goff et *al.*, 2009].

L'alignement et la comparaison des séquences d'acides aminés du gène qui code pour la *P32*, homologue du gène *H3L* du virus de la vaccine, ont rapporté que ce gène est conservé chez les différents groupes des CaPV. La différence à noter au niveau de gène, c'est la présence d'un acide aspartique supplémentaire dans la 55<sup>ème</sup> position chez les SPV et son absence chez les GPV et LSDV. Chez les GPV, ce gène présente 6 substitutions uniques en position 77, 275, 403, 552, 867, 964 [Hosamani et *al.*, 2004].

L'alignement et la comparaison des séquences d'acides aminés (aa) du gène qui code pour la *RPO30*, homologue du gène *H4L* du virus de la vaccine, ont montré qu'il est bien conservé chez et entre les différents groupes des CaPV. La seule variation observée exclusivement chez les SPV, comprenaient un polymorphisme d'un seul acide aminé (ou SAP : Single Amino-acid Polymorphism) dans la position 5-11, la région représente une délétion de 7 acides aminés qui correspond à la délétion de 21 nucléotides. Chez les GPVs, deux insertions ont été notées dans la région C-terminal [Lamien et *al.*, 2011].

Les comparaisons des pourcentages de similarité des nucléotides et des acides aminés au niveau des gènes *P32* et *RPO30*, montre que les souches du SPV partagent des relations très

étroites avec les autres CaPV avec des pourcentages élevés variant entre 97% et 100% d'homologie.

Afin de bien comprendre la virulence des CaPVs, leur spécificité de l'hôte et leur répartition géographique, il est indispensable de réaliser plusieurs études génomiques comparatives de différents gènes. Aussi bien, le séquençage de plusieurs virus provenant de diverses régions géographiques permettrait potentiellement de tracer les origines des épidémies et l'évolution des CaPVs dans le temps et dans l'espace [Babiuk, 2008].

## **CHAPITRE IV : PRINCIPES DE PRODUCTION ET DE CONTRÔLE DES VACCINS ANTI-CaPVs.**

### **I- INTRODUCTION :**

Un approvisionnement fiable de vaccins purs, sûrs, puissants et efficaces est essentiel pour le maintien de la santé animale et le bon fonctionnement des programmes prophylactiques. La vaccination des animaux par des vaccins de haute qualité est le principal moyen de lutte contre de nombreuses maladies animales. Dans d'autres cas, les vaccins sont utilisés pour renforcer les programmes nationaux de lutte ou d'éradication des maladies [OIE, 2008].

### **II- PRODUCTION :**

Le processus de fabrication des vaccins vétérinaires est basé sur la production cohérente de vaccins purs, sûrs, actifs et efficaces qui requiert des procédures d'assurance qualité afin d'assurer un procédé de fabrication uniforme et constant. Comme les procédés de production de vaccins génèrent un grand risque de variabilité, une attention particulière doit être prise pour contrôler l'évolution de cette variabilité, en utilisant de préférence des procédures validées. De même, le produit devra être protégé de toute contamination pendant tous les stades de la production. D'autre part, Les installations utilisées pour la production des vaccins doivent être prévues pour maintenir la pureté du produit tout au long de la chaîne de production et pour préserver la santé du personnel [OIE, 2008].

#### **1- Caractéristiques**

Les souches de virus utilisées pour la production doivent être caractérisées de manière adéquate quant à leur pathogénicité, leur immunogénicité et l'absence d'autres agents contaminants. Leur pathogénicité doit être testée de manière adéquate sur des espèces d'animaux à vacciner. On peut trouver une bonne partie de la variation de la susceptibilité des différentes races aux mêmes souches de virus. L'identification du virus est réalisée par l'inoculation des cultures et leur examen [OIE, 2008].

#### **a- Cultures**

Les cultures cellulaires de tissus ovins ou bovins utilisés pour l'isolement du virus conviendront à la production de vaccins. Leur sensibilité au virus de la semence doit être établie à partir d'études antérieures [OIE, 2008].

## **b- Méthodes de contrôle**

Les cultures cellulaires doivent être soigneusement examinées avant utilisation. Les cultures témoins non inoculées doivent être maintenues et examinées pour les agents viraux non cytopathogènes tels que les Pestivirus, la maladie Border et la diarrhée virale bovine. Des tests d'hémadsorption et d'immunofluorescence doivent être effectués. Seuls les troupeaux exempts de tremblante doivent être utilisés pour la préparation des cultures cellulaires primaires [OIE, 2008].

## **2- Production**

Des monocouches préparées dans des bouteilles fixes ou roulantes devraient être utilisées à environ 6 à 8 tours par heure. Une grande multiplicité d'intrants donne un bon rendement de virus avec un ECP rapide. Ce qui est bénéfique pour la production. Les cultures doivent être récoltées lorsque l'ECP atteint 50 à 70% des monocouches. L'ultrasonication, ou la congélation et décongélation, est nécessaire pour libérer le virus associé aux cellules. Une clarification par centrifugation à 600 g pendant 10 minutes est recommandée. Les récoltes sont regroupées pour former un seul lot. Un stabilisateur de sucre et de protéines peut être incorporé pendant la lyophilisation, pour lequel le saccharose, le lactose, la peptone et la lactalbumine se sont tous révélés satisfaisants [OIE, 2008].

Les vaccins inactivés sont préparés à partir de cultures cellulaires infectées par une souche de virus pathogène ayant subi un faible nombre de passage. Celles-ci sont récoltées quand 40 à 60% d'ECP sont observés, congelés et décongelés trois fois et clarifiés par centrifugation. Le surnageant résultant est titré et ajusté en volume avec une solution saline tamponnée au phosphate pour donner 1000-2000 DICT50 / ml. Un volume égal d'alhydrogel est ajouté au mélange virus-solution saline et agité pendant 48 heures à 4 ° C. Du merthiolate à 1/10 000 et de la formaline à 0,03% sont ensuite ajoutés et le mélange est poursuivi pendant encore 48 heures à 4 ° C. Le vaccin est ensuite distribué et stocké à 4 ° C [OIE, 1992].

Les vaccins inactivés peuvent être formulés avec des adjuvants destinés à augmenter leur efficacité. Les adjuvants fréquemment utilisés sont typiquement des émulsions « eau dans huile » (soit simples ou doubles), préparées avec de l'huile végétale ou minérale et un agent émulsifiant. D'autres adjuvants tels que le gel d'hydroxyde d'aluminium et la saponine sont également utilisés. En plus de ces adjuvants traditionnels, des vaccins sont mis au point actuellement avec des ingrédients supplémentaires ayant des effets immunomodulateurs chez l'animal-hôte et qui servent à augmenter l'efficacité du vaccin. Ces ingrédients peuvent être soit des composants immunogéniques dérivés de bactéries tuées, qui stimulent la réponse

immunitaire vis-à-vis d'autres fractions contenues dans le vaccin, soit des cytokines, utilisées pour réguler des aspects spécifiques du système immunitaire et qui sont incluses dans des produits obtenus par génie génétique [OIE, 2008].

### **3- Contrôle de la qualité et exigences réglementaires**

La pureté, l'efficacité, l'activité et l'innocuité vaccinale doivent être vérifiées au cours du procédé de fabrication. Une qualité de produit cohérente (uniformité et constance des lots) doit être construite à chaque étape. Les tests sur le produit fini sont utilisés afin de vérifier que les contrôles pendant les procédés de fabrication ont bien été effectués et que le produit commercialisé satisfait le cahier des charges convenu avec l'autorité délivrant la licence du produit [OIE, 2008].

Les autorités réglementaires de différents pays ont développé différentes approches pour garantir la qualité des vaccins. En dehors de leurs objectifs ultimes communs, ces systèmes varient, certains insistant plus sur les procédés de fabrication (normes de fabrication) et d'autres plus sur les contrôles des produits finis (normes de performances). Les procédures de contrôle sélectionnées seront celles qui s'adaptent le mieux aux conditions de fabrication du vaccin et doivent, lorsque cela est possible, respecter les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) [OIE, 2008].

### **4- Principes de contrôle des vaccins**

#### **a- Contrôle en cours de fabrication**

Les vaisseaux de culture tissulaire inoculés et non inoculés doivent être observés pour tout signe de dégénérescence non spécifique de la monocouche cellulaire. Le pH doit être maintenu entre 7,2 et 7,4. Les bouteilles présentant une dégénérescence ou un changement de pH rapide sont éliminées. La mise en commun des récoltes individuelles peut être retardée jusqu'à ce que tous se révèlent exempts de contamination bactérienne par incubation pendant une nuit dans une culture de bouillon appropriée.

#### **b- Contrôle de lot**

##### **✓ Tests de stérilité**

Les tests de stérilité sont indispensables pour confirmer l'absence de contamination du matériel biologique qui se traduit par l'absence d'organismes vivants spécifiques ou de groupes d'organismes. La stérilité est obtenue par chauffage, par filtration, par traitement avec de l'oxyde d'éthylène, ou par irradiation ionisante, et en effectuant tout traitement ultérieur de manière aseptique [OIE, 2008].

Une assurance adéquate de la stérilité et de l'absence de contamination ne peut être obtenue que par un contrôle approprié des matières premières utilisées dans la fabrication et du procédé de fabrication [OIE, 2008].

✓ **Test d'activité**

Pour les produits viraux inactivés, les tests d'activité peuvent être réalisés au laboratoire ou chez l'animal hôte ou encore à l'aide de méthodes quantitatives *in vitro* validées pour leur corrélation avec les tests d'activité *in vivo* [OIE, 2008].

✓ **Test de terrain (Innocuité et efficacité)**

Tous les produits biologiques vétérinaires administrés aux animaux doivent être testés pour leur innocuité et leur efficacité sur le terrain, en utilisant les Bonnes Pratiques Cliniques (BPC), avant leur autorisation à être utilisés à grande échelle. Les études de terrain servent à démontrer l'efficacité dans des conditions habituelles et à détecter toute réaction inattendue, y compris la mortalité, qui n'aurait pas été observée au cours du développement du produit. Il existe de multiples variables incontrôlables dans les conditions de terrain qui rendent difficile la collecte de données correctes, mais la démonstration de l'innocuité est plus fiable. Les tests doivent être réalisés sur l'animal hôte, de divers lieux géographiques, à l'aide d'un nombre approprié d'animaux sensibles. Les animaux testés doivent représenter tous les âges et les différentes pratiques d'élevage pour lesquels le produit est indiqué ; des témoins non vaccinés doivent être inclus [OIE, 2008].

- **Innocuité**

L'innocuité peut être évaluée en mesurant les réponses locales et systémiques après vaccination et avant épreuve virulente des tests d'activité [OIE, 2008]. Le vaccin est inoculé par voie sous-cutanée à 4 moutons. Les animaux reçoivent une dose de vaccin sur le terrain et ils sont examinés quotidiennement pour toute réaction fébrile, signe clinique ou autre réaction indésirable [OIE, 1992 ; OIE, 2008 ; Boumart et *al.*, 2016].

- **Efficacité**

L'efficacité des vaccins vétérinaires doit être établie à l'aide d'essais de vaccination-épreuve validés par une analyse statistique chez l'animal hôte en utilisant les animaux les plus sensibles, en général les plus jeunes, pour lesquels le produit est recommandé.

Les tests doivent être réalisés dans des conditions contrôlées en utilisant des animaux séronégatifs au début de l'expérimentation. L'application de procédures pour remplacer, réduire et affiner les tests sur animaux (la « loi des 3 R » : Replace, Reduce, Refine) doit être encouragée lorsque cela est possible. Les études d'efficacité doivent être réalisées avec un

produit vaccinal fini, obtenu à partir du niveau de passage le plus élevé du lot de semence primaire, comme cela est mentionné dans le Protocole de Production ou d'autres documentations du procédé de fabrication [OIE, 2008].

Le titre protecteur minimum doit être établi pour le virus de semence utilisé pour fabriquer le vaccin. Alternativement, un test de protection des animaux hôtes peut être utilisé. Le titrage du virus dans des cultures cellulaires ou l'inoculation intradermique de moutons est utilisé pour déterminer la puissance du vaccin [OIE, 2008].

La comparaison de la réduction du titre viral intradermique chez les animaux vaccinés et non vaccinés est la plus utilisée pour évaluer l'efficacité des vaccins ovin et caprin. Le test lui-même est effectué en rasant étroitement les moutons témoins vaccinés et non vaccinés au niveau du flanc. La souche de virus d'épreuve est ensuite inoculée par voie intradermique ; 4 inoculations séparées sont réalisées en ligne verticale pour chaque dilution allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  [OIE, 2008].

Chez les animaux non vaccinés, des lésions nécrotiques avec œdème et gonflement apparaissent au niveau de tous les sites d'inoculation jusqu'aux dilutions de  $10^{-5}$  ou  $10^{-6}$ . Chez les animaux vaccinés, des réactions d'hypersensibilité initiale avec érythème et léger œdème peuvent survenir au niveau de certains sites d'inoculation, mais cela disparaît rapidement. Des zones limitées de nécrose peuvent aussi se développer aux sites d'inoculation de  $10^{-1}$  ou  $10^{-2}$  [OIE, 1992 ; OIE, 2008 ; Boumart et *al.*, 2016].

#### ✓ Test de stabilité

La plupart des vaccins lyophilisés sont stables pendant 2 à 4 ans lorsqu'ils sont conservés à  $4^{\circ}\text{C}$  ou plus longtemps s'ils sont conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les vaccins adsorbés sur gel d'hydroxyde d'aluminium peuvent subir une perte de puissance s'ils sont exposés à des changements répétés de température. S'ils sont maintenus à  $4^{\circ}\text{C}$ , leur durée de conservation est d'environ un an. Il est important de ne pas congeler de tels vaccins [OIE, 1992].



***PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE***

## **CHAPITRE I**

## Deuxième partie

### CHAPITRE I : ETUDE MOLECULAIRE DES ISOLATS MAROCAINS DU VIRUS DE LA CLAVELEE

#### I- INTRODUCTION :

La clavelée est une maladie émergente, qui se présente au Maroc sous forme enzootique. Malgré les programmes de vaccination adoptés depuis plusieurs années par les autorités vétérinaires au Maroc, on assiste toujours à l'émergence de nouvelles souches de ce virus dans nos élevages marocains et la protection contre cette maladie n'est que partielle.

Le but de ce chapitre est de réaliser une étude épidémio-moléculaire des souches marocaines du virus de la clavelée, qui ont affecté le cheptel national entre les années 1982 et 2010, afin de les identifier et de bien comprendre le développement de ce virus au fil du temps et dans l'espace. Aussi nous allons voir s'il existe des modifications génétiques au niveau de l'ADN viral de ces souches, favorisant la réapparition et l'existence de la maladie dans notre pays jusqu'à nos jours ou bien s'agit-il d'un problème prophylactique ce qui limiterait son éradication.

#### II- MATERIEL & METHODES

##### 1- Matériel d'étude :

##### a- Souches virales :

35 échantillons ont été choisis pour la réalisation de cette étude, il s'agit de souches prélevées de différentes régions du Maroc et isolées au sein du laboratoire Biopharma lors des flambées épizootiques qu'a connu le royaume ou lors des contrôles de routine, en plus des souches vaccinales et des souches de références.

**Tableau III:** Informations des isolats à étudier

Numéro	ID d'échantillon	Nature du prélèvement	Date de réception	Régions
1	RM3 TA	Surnageant culture cellulaire	05/81	ND non déterminée, isolement réalisé à l'IAV
2	TA H3	Surnageant culture cellulaire	18/06/82	ND non déterminée, isolement réalisé à l'IAV
3	SPLT2	Surnageant culture cellulaire	21/04/1982	ND non déterminée,

				isolement réalisé à l'IAV
4	Alg	Surnageant culture cellulaire	24/11/1989	Poste frontalier maroco-algérien
5	CFES88	Filtrat de croûtes	15/03/1989	Fès
6	CRM59P2	Croûtes ovines	07/01/1992	Région Marrakech
7	CRM71P2	Croûtes ovines	07/01/1992	Région Marrakech
8	BLMP	Broyat Lambeau d'agneau	22/01/1992	INAV (Rabat)
9	CHEFV	Chefchaouen	20/11/92	Chefchaouen
10	Croute ovins N°4 P1	Croûtes ovines	24/09/1993	TiteMellil
11	OJ1	Croûtes ovines	20/10/1993	Oujda
12	Croute ORMVAM	Croûtes ovines	24/10/93	Berkane(Beni Chiker)
13	OJ2	Croûtes ovines	15/11/1993	Oujda
14	Croute Err	Croûtes ovines	31/10/1994	Errachidia
15	CROUTE N°1 P1	Croûtes ovines	25/11/94	Haouz (Sraghna)
16	Croute N°2	Croûtes ovines	30/12/1994	Azilal
17	CR93I	Croûtes prélevées à partir des lésions	25/01/1995	Ifrane
18	CR95I	Croûtes prélevées à partir des lésions	25/01/1995	Ifrane
19	BRCRL	Croûtes ovines	26/11/1999	Larache
20	CBK1 P1	Croûtes brebis	04/07/2000	El Kelaâ
21	SP K5 P1	Croûtes	20/12/2000	El Kelaâ
22	NP1	Croûtes	12/01/01	Nador
23	P3S	Croûtes	11/02/2002	Settat
24	SP1C	Croûtes	04/04/2002	Chichaoua
25	MP3S	Croûtes	18/03/2002	Marrakech
26	CRT4G	Croûtes	08/12/2006	Guelmim
27	CR3S	Croûtes	15/02/2007	Sefrou
28	CRH1	Croûtes	04/11/2010	Haouz
29	CRH2	Croûtes	04/11/2010	Haouz
30	Souche Bertville	Souche de référence	18/04/1978	Mérial
31	Souche Perego	Souche vaccinale	1986	Mérial
32	Souche RM65	Souche de référence	1986	Mérial

33	KEN/ 2014	Souche de référence	1976	Kenya
34	GPV N 35 NIGER	Souche vaccinale GPV	1988	CIRAD
35	Held	Souche de référence	25/4/07	

Les isolats qui datent avant l'année 1984, ont été isolées par Dr. ELharrak à l'institut agronomique et vétérinaire Hassan II de Rabat.

Les croûtes, après leur réception au laboratoire de Biopharma, sont broyées dans une solution saline tamponnée, (PBS) additionné d'antibiotiques. Le broyât clarifié par centrifugation est répartis dans des ampoules stériles, puis stocké à -80°C pour utilisation ultérieure. Ces échantillons subissent différents tests d'analyse afin de bien diagnostiquer la maladie suspecte, selon les recommandations rapportées sur le manuel de diagnostic de l'organisation mondiale de la santé animale.

Les souches virales reçues entre 1993 et 1994 ont été isolées au cours de la période qui coïncide avec les flambées épizootiques de la clavelée qu'a connu le Maroc.

**Note :** P<sub>N</sub> (Exemple :P1, P2...) signifie le nombre de passages sur cellules réalisés sur les échantillons après leur réception au laboratoire.

**Les souches de références :**

**Souche Perego :** Souche d'origine algérienne,

**Souche RM65 :** Souche d'origine Yougoslave, a été atténuée en 31 passages sur cellule rénales de mouton à l'institut Razi d'Iran [Raymar et Hessami, 1968].

**Souche vaccinale Romania :** Vaccin commercial préparé sur cellules rénales d'agneau avec une souche d'origine roumaine, il est utilisé au Maroc dans les campagnes de prophylaxie (vaccination) depuis 1978), sa séquence a été retiré de la base de données de Genbank.

**Souche Niger :** Souche vaccinale GPV.

**Souche Bertville :** Souche de référence SPV.

**KEN/ 2014 :** Souche de référence Kenya Sheeppox ou KS1.

**La souche d'épreuve Held :** Souche d'origine turque, utilisée pour le contrôle de la qualité des vaccins produits contre la clavelée au Maroc.

**2- Méthodes d'étude :**

Après la sélection des souches virales qui feront l'objet de notre étude, elles vont subir des tests, quantitatifs et qualitatifs, de biologie moléculaire, des passages de rafraichissement sur culture cellulaire...

Toutes les manipulations réalisées dans ce travail ont été effectuées stérilement au niveau d'un poste de sécurité Microbiologique (Faster Ultrasaf classe II) à Biopharma.

#### **a- Identification par PCR en temps réel :**

L'identification et la différenciation des souches virales sont réalisées, dans un premier temps, par PCR en temps réel. Cette dernière est effectuée sur les prélèvements de croûtes broyées dans le tampon PBS additionné d'antibiotiques puis clarifiés par centrifugation à 2500 rpm pendant 25 min, sur le surnageant de la culture cellulaire (ICO1) inoculée par le broyat de croûte après passage sur cellules, ou sur le sang total.

Les échantillons sont gardés à +4°C pour une utilisation immédiate (durant les 24 h) ou à -20°C pour une conservation prolongée. Durant la manipulation, il faut éviter toutes contaminations inter-échantillons lors de la préparation et changer de matériel pour chaque prélèvement.

#### **✓ Extraction de l'ADN virale**

L'extraction de l'ADN virale comprend quatre étapes :

Qui commencent par la lyse de l'échantillon en utilisant un tampon de lyse qui permet de rompre et dénaturer tous les constituants cellulaires à savoir les membranes, en libérant l'ADN, les protéines et les lipides. La deuxième étape consiste à la précipitation qui se fait par biais de l'isopropanol ou l'éthanol utilisés pour concentrer les acides nucléiques et les séparer des protéines et lipides. La troisième étape se base sur le lavage qui aide à purifier l'acide nucléique viral, suivie d'un séchage qui élimine les traces d'alcool. Finalement, la dernière étape est la récupération de l'acide nucléique à l'aide de l'élution buffer.

Dans notre étude l'extraction de l'ADN virale a été réalisée par le kit Qiagen Dneasy Tissue, dont le protocole est bien détaillé en Annexes. Des témoins positif et négatif d'extraction sont traités dans les mêmes conditions que les souches à analyser.

#### **✓ Amplification de l'ADN extrait :**

La PCR (Polymérase Chain Réaction) est une réaction d'amplification de l'ADN *in vitro*, elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie, au sein d'un échantillon. La matrice à amplifier peut-être de l'ADN directement extrait (ADN génomique) d'un échantillon biologique ou de l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu par une réaction de rétro-transcription depuis un ARN extrait.

Chaque cycle d'amplification est divisé en trois étapes, dont la première est la **Dénaturation** de l'ADN par chauffage afin de séparer les deux brins qui le composent. La deuxième étape est l'**Hybridation** des amorces aux extrémités de la séquence cible et à la fin

l'**Elongation** assurée par une ADN polymérase. Le cycle se reproduit plusieurs fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible.

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre en temps réel, le processus d'amplification à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre le seuil qui représente le point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond et qui est défini comme le Ct et apparaît en début de la phase exponentielle.

Dans notre étude l'amplification de la séquence cible du virus de la clavelée est effectuée avec le kit invitrogen superscript III platinum Taq one step (Protocole détaillé en Annexe). Des témoins positif et négatif d'amplification sont traités dans les mêmes conditions que les souches à analyser.

Si on suit la fluorescence d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes :

- **Phase de bruit de fond** : La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.
- **Phase exponentielle** : La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifiés augmente à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.
- **Phase de plateau (ou de saturation)** : le signal émis et la concentration d'amplicons restent constants et épuisement des réactifs.

✓ **Amorces et sondes utilisées :**

Un couple d'amorces et sonde utilisés pour la détection et l'amplification du gène le plus conservé chez les différents virus du genre Capripoxvirus en temps réel, ce gène code pour la protéine d'enveloppe P32 [Balinsky et al. 2008]:

-Amorce F : 5'GGCGATGTCCATTCCTG3'

-Amorce R : 5'AGCATTTTCATTTCCGTGAGGA3'

-Sonde: Fluorogenic minor groove-binding TaqManprobe:

5'CAATGGGTAAGATTTCTA3'

✓ **Protocole de la PCR en temps réel :**

➤ **Préparation du Mix ou le Mélange réactionnel**

Afin d'effectuer une amplification par PCR en temps réel, un mélange réactionnel est préparé pour toutes les réactions d'amplification pour un volume total de 20µl par réaction, selon le tableau suivant :

**Tableau IV : Mélange réactionnel de la PCR en temps réel.**

Réactifs	Volume par réaction
Buffer 10X	2,5 µl
Mg Cl <sub>2</sub> 5Mm	2µl
dNTP 10mM	0,25µl
Taq polymérase	1,25 U (0,25 µl si 5unités / µl)
Primer 1 (200nM)	1µl
Primer 2 (500 nM)	1µl
H <sub>2</sub> O DEPC	12 µl

La réaction de la PCR en temps réel, est accomplie dans un volume réactionnel de 25µl : dans un premier temps, on répartit 20µl du mix dans chaque tube de smart cycler, puis on ajoute 5µl d'ADN extrait pour chaque échantillon, et au final nous centrifugeons le tout pour faire descendre le contenu de chacun à l'aide d'une micro centrifugeuse.

➤ **Programmation du Thermocycleur en temps réel :**

La programmation se fait de préférence avant de préparer le mélange réactionnel, ensuite les tubes sont mis en place dans le Thermocycleur, et le programme SPV (16-17-18 et 19) est démarré (TableauV).

**Tableau V : Programme d'amplification SPV**

Programmes	Temps	Température °C	Nombres de cycle
<b>Programme 16</b>	5 minutes	94°C	1 cycle
<b>Programme 17</b>	10 secondes	94°C	40 cycles
	10 secondes	55°C	
	10 secondes	72°C	
<b>Programme 18</b>	10 minutes	72°C	1cycle
<b>Programme 19</b>	--	4°C	--

L'amplification se fait par un système ouvert Smart-cycler qui permet la réalisation ultra-rapide de la PCR en temps réel : amplification, détection, quantification et discrimination d'acide nucléique (ADN ou ARN) avec production des résultats en temps réel.

**b- Production du virus sur culture cellulaire :**

A cause de la longue période de conservation des souches virales à -80, et selon les résultats obtenus par PCR en temps réel, on a procédé à réaliser des passages de rafraichissement des virus sur culture cellulaire de cellules diploïdes de cœur d'agneau (ICO1), avant de passer à l'étude phylogénétique.

**a- Préparation des cellules :****❖ Identité des cellules :**

Les cellules utilisées pour la propagation des isolats clavelée, sont les cellules ICO (cellules diploïdes de cœur d'agneau). Ces cellules sont aliquotées dans des cryotubes et conservées dans de l'azote liquide.

**❖ Décongélation des cellules :**

Une ampoule de cellules ICO1 est décongelée à température ambiante et la suspension cellulaire est récupérée à l'aide d'une pipette stérile, les cellules sont ensemencées dans des flacons de 80 cm<sup>2</sup> en polystyrène stérile (figure19), traités pour adhérence et contenant le milieu de croissance D-MEM supplémenté avec le sérum de veau fœtal à 10% (Composition en Annexe) (les cellules adhèrent rapidement au support de verre ou plastique grâce aux ions Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>). Les flacons ensemencés sont ensuite incubés dans l'étuve à 37°C.

Après 24h d'incubation, un changement de milieu est réalisé pour éliminer les traces de DMSO (diméthylsulfoxyde) utilisé comme cryoprotecteur.

**❖ Subculture cellulaire : Trypsination des cellules :**

Dans un environnement de culture cellulaire bien déterminé, la trypsination repose sur plusieurs étapes préliminaires.

Après 3 à 4 jours de confluence, l'état des cellules est examiné au microscope inversé, lorsque le tapis cellulaire est complet, les cellules sont trypsinées pour être ensemencées dans d'autres flacons (Figure 20).

Cette étape consiste à éliminer le milieu usé, et à ajouter la solution de trypsine-EDTA (0.25% trypsine-0.1 %EDTA) en quantité suffisante pour couvrir tout le tapis cellulaire.

Après détachement des cellules de leur support, l'action de la trypsine est stoppée par l'ajout de 8 à 10 ml du milieu de croissance (Figure 20-5).

Les amas cellulaires sont ensuite séparés par des séries d'aspiration et de refoulement (Figure). Un échantillon de cette suspension cellulaire est prélevé pour effectuer la numération, après coloration des cellules par le bleu trypan. Le comptage des cellules est réalisé avec la cellule de numération Neubeaur (Annexe).

La suspension cellulaire ainsi préparée est utilisée pour la réalisation des titrages (avec une concentration de 80000 cellules par millilitre) et de séroneutralisation (avec une concentration de 100000 cellules par millilitre) comme elle peut aussi servir pour réaliser une autre culture cellulaire.



**Figure 19:** Flacons en polystyrène de surfaces variables.

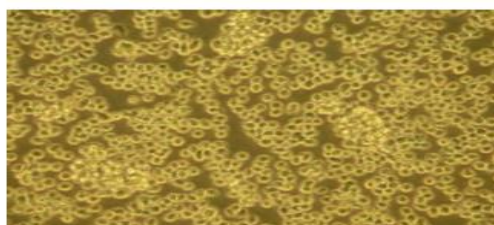


1- Élimination du milieu Mec

2- Ajout de trypsine

3- Laisser 2 à 3 minutes :

Action de la trypsine



4- Aspect des cellules après l'action de la trypsine (vue au microscope inversé, Gr×100).



5- Inactivation enzymatique de la trypsine par l'ajout de milieu de croissance, séparation des cellules par une série d'aspirations refoulement prolongé.

**Figure 20 :** Etapes de la subculture cellulaire : trypsination des cellules.

❖ **Observation des cellules au microscope inversé :**

Le microscope inversé, et contrairement au microscope optique classique, possède une source de lumière au dessus de l'échantillon à observer, et les objectifs en dessous. Il permet d'examiner toute sorte de préparation dans les récipients usuels.

Il est utilisé pour l'observation des cellules afin de distinguer les cellules mortes de celles vivantes, et aussi pour la vérification de la confluence du tapis cellulaire qui est déterminé par la couleur du milieu.

❖ **Inoculation et récolte virale :**

L'inoculation est réalisée sur un tapis cellulaire jeune (48h) de 80 à 100% de confluence. La suspension virale à inoculer est mise en contact avec les cellules en utilisant une multiplicité d'infection d'une dose pour 50 cellules, un volume de 500µl dans un flacon de 25cm<sup>2</sup>.

Le virus est ensuite adsorbé à 37°C pendant une heure avec agitation toutes les dix minutes, et le milieu d'inoculation virale est ensuite ajouté en raison de 8ml par flacon de 25cm<sup>2</sup>.

Les cellules inoculées sont incubées à 37°C, avec observation quotidienne jusqu'à généralisation de l'Effet Cyto-Pathogène (ECP) et destruction de plus de 50% du tapis cellulaire. Un témoin de cellules inoculé avec le milieu d'entretien est traité dans les mêmes conditions.

Les flacons présentant un ECP généralisé et une destruction de l'assise cellulaire sont congelés et décongelés une fois et la suspension virale est répartie dans des flacons type pénicilline, puis congelées à -80°C jusqu'à utilisation ultérieure.

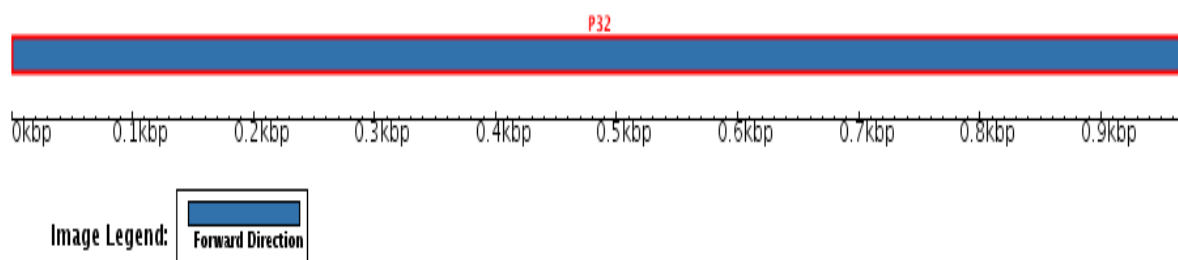
**c- Etude moléculaire et phylogénétique :**

Après la production de virus sur culture cellulaire, les échantillons ont été envoyés au laboratoire de Biologie moléculaire de l'UATRS au sein du centre National de la recherche scientifique et technique de Rabat, pour le séquençage.

➤ **Gènes cibles :**

- **Gène codant pour la P32**

Laprotéine d'enveloppe P32 du capripoxvirus est homologue à la protéine P35 codée par le gène H3L du virus de la vaccine [Johnson et al., 1993; Heine et al., 1999]. En raison de la différence de taille de P32 entre SPV et GTPV, ils peuvent être distingués par comparaison de séquences [Tian et al., 2010].



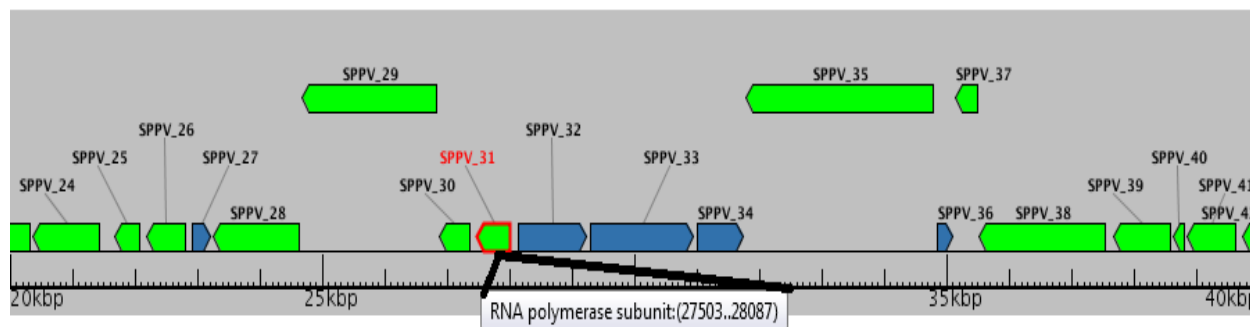
**Figure 21 :** Position du gène P32 qui code pour la protéine d'enveloppe sur le génome du SPV

[Zhou et al., 2012 ; <https://www.viprbrc.org>]

- **Gène codant pour la RPO30**

Le gène de la RPO30, homologue du gène E4L du virus de la vaccine, code pour la sous-unité d'ARN polymérase dépendante de l'ADN de 30 kDa [Ahn et al., 1990, Tulman et al., 2002].

Bien que le gène RPO30 soit conservé chez les capripoxvirus, il est encore utilisé pour distinguer SPV, GTPV et LSDV [Lamien et al., 2011, Zhou et al., 2012].



**Figure 22:** Position du gène RPO30 codant pour la sous unité d'ARN polymérase ADN dépendant sur le génome du SPV [Zhou et al., 2012 ; <https://www.viprbrc.org>]

➤ **Extraction des ADN viraux :**

L'extraction d'ADN viral est réalisée à partir des échantillons, à l'aide du kit: « Purelink viral DNA/RNA kit d'INVITROGEN », et selon les instructions du fournisseur [Annexes].

➤ **Dosage :**

La quantité et la qualité de l'ADN extrait (1,5 µl) sont estimées par dosage au spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop™8000), et la pureté de l'extrait est évaluée par le calcul du rapport des absorbances à 260nm et à 280nm. Ces ratios donnent une indication de la présence des protéines, des polyphénols et des glucides dans l'échantillon.

➤ **Réaction d'amplification : PCR conventionnelle**

Les ADN purifiés ont été soumis à une PCR, pour amplifier les séquences des deux gènes cibles :

Le premier ensemble d'amorces:

- P32-1 (5'-ATG GCA GAT ATC CCA TT-3 ')
- P32-2 (5'-TTA CCA CAG GCT ATT AGA AG-3') qui couvre le fragment de 1181 bp contenant l'ORF du P32 qui code pour la protéine d'enveloppe [Zhou et al., 2012].

Le deuxième ensemble d'amorces :

- RPO30-1 (5'- ATTCGTTTATCGCAGAACAAGG -3')

- *RPO30-2* (5'- CACCAACCATAGAATAGTATTGAGAC -3') qui couvrent tout le gène qui code pour la protéine RPO30 [Lamien et *al.*, 2011].

L'amplification des séquences spécifiques des ADN purifiés est effectuée par le kit « MyTaq DNA polymerase kit de Bioline » et par le thermocycleur « Verity » d'ABI. Des témoins positif et négatif d'extraction et d'amplification sont traités dans les mêmes conditions que les souches à analyser.

➤ **Révélation des produits PCR par Electrophorèse sur gel d'agarose et par le bio-analyseur Qiaxcel :**

Les amplicons sont des fragments d'ADN double brin de tailles différentes : 1181 pb pour la *P32* et de 1385 pb pour la *RPO30*.

Pour le gène qui code pour la *RPO30*, une analyse de PCR positive produit un fragment d'ADN spécifique au gène ciblé et apparaît comme une bande sur le gel d'agarose à 1,5% révélé par le bromure d'éthidium sous la lumière Ultra-Violet. La taille moléculaire de la bande est évaluée en comparant sa migration avec celle d'un marqueur de taille moléculaire d'ADN (marqueur de taille des fragments d'ADN en incréments de 100 pb ou 1 kb) analysé sur le même gel.

Concernant le gène qui code pour la *P32*, la vérification des tailles des produits PCR a été effectuée par le bio-analyseur Qiaxcel qui génère des gels virtuels sur le logiciel de l'appareil.

➤ **Séquençage :**

Le séquençage est la technique clé qui permet de connaître la succession de ces Nucléotides. La méthode utilisée, dans notre travail, est celle de Sanger [Sanger et *al.*, 1977]. Le principe de cette méthode consiste au recopiage d'un brin matrice par une ADN polymérase ADN dépendante qui est initiée par la fixation d'un oligonucléotide spécifique (amorce), complémentaire du brin matrice. Cette ADN polymérase va assurer l'élongation d'un nouveau brin complémentaire du brin matrice dans le sens 5'- 3'. L'ADN polymérase permet l'incorporation de nucléotides (dNTP: désoxyribonucléotides) libres présents dans le milieu réactionnel par la formation d'un pont phosphodiester entre le 3'OH de la chaîne et le 5' phosphate du dNTP suivant. La réaction de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire par cette ADN polymérase des didésoxyribonucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) qui sont aussi présents dans le milieu réactionnel (Tableau VI).

Le séquençage a été effectué au sein du laboratoire de Biologie Moléculaire de l'UATRS à Rabat. Il a été réalisé dans les deux sens, avec les mêmes amorces utilisées dans le procédé d'amplification. Le séquenceur utilisé est le « ABI 3130xl Genetic analyzer »

(Séquenceur 16 Capillaire) de la société Applied Biosystems. La réaction de séquençage a été effectuée dans des plaques PCR de 96 puits en utilisant le Kit de séquençage (BigDye Terminator version 3.1 Applied Biosystems).

✓ **Purification des produits PCR :**

La purification des produits PCR est une étape très importante avant de passer à la réaction de séquençage. Elle consiste à enlever les amorces et les nucléotides (dNTPs) non utilisés durant la réaction de PCR, et qui sont susceptibles d’inhiber le séquençage.

Les produits PCR sont purifiés en utilisant le kit ExoSAP-IT, contenant une exonucléase I et une Phosphatase, dont le rôle est d’hydrolyser les amorces et les dNTPs non incorporées.

L’enzyme est activée à 37°C et inactivée à 80°C. On mélange 2µl d’ExoSAP pour 5µl du produit PCR à purifier. Le programme d’incubation au Thermocycleur est le suivant :

- Activation à 37°C pendant 15 min.
- Inactivation à 80°C pendant 15 min

Et finalement le produit PCR sera prêt pour la réaction de séquençage.

✓ **Réaction de séquençage :**

La réaction de séquence utilisée, repose sur la chimie de « Big Dye Terminator v3.1» (Applied Biosystems) en utilisant les amorces spécifique à chaque amplicon.

La réaction est basée sur l’interruption de la synthèse enzymatique du brin complémentaire (Arrêt d’élargissement), par l’incorporation de manière aléatoire d’un didésoxyribonucléotide (ddNTP) marqué par un fluorophore spécifique.

L’élargissement est faite grâce à la Taq polymérase FS (Fluorescent Séquençage). Le Master Mix contient le BigDyeTerminator, le buffer et l’Ampli Tac. Le volume final du mélange réactionnel était de 10µl (Tableau VI)

**Tableau VI: Mélange de la réaction de séquençage :**

Mélange réactionnel pour une réaction de séquence	Quantité en µl
BigDye	1 µl
5X sequencing buffer	3 µl
Primers (3.2 – 5pmol/µl)	2 µl
ADN	0.75 - 1.5 µl
H2O (MiliQ)	2.5 - 3.25 µl
Volume final	10 µl

La réaction était réalisée dans un Thermocycleur selon le programme suivant :

**Tableau VII : Programme de la réaction de séquençage**

Cycle	Temps	Température °C	
Dénaturation initiale	1 minute	96°C	
Dénaturation	10 secondes	96°C	x 25 cycles
Hybridation	5 secondes	50°C	
Elongation	4 minutes	60°C	

✓ **Purification des produits de la réaction de séquençage :**

La purification de la réaction de séquence est effectuée par le « BigDye X Terminator purification kit » afin d’éliminer les sels, les ddNTPs, et les dNTPs non incorporés pour éviter leurs injections dans les capillaires de l’analyseur d’ADN.

✓ **Détection automatique des séquences :**

Le produit de la réaction de séquençage de chaque échantillon, est soumis à l’analyse par le séquenceur de 16 capillaire « ABI 3130xl Genetic Analyzer » (Applied Biosystems), couplé au logiciel « Sequencing Analysis v 5.3.1 » (Applied biosystems), pour la visualisation et la vérification des séquences obtenues, sous une tension constante de 12kV. L’électrophorégramme est obtenu en deux formats : Fichier ABI et Fichier texte FASTA.

❖ **Analyse des séquences :**

La qualité des séquences nucléotidiques a été vérifiée par le logiciel Sequence-Scanner2 (Applied Biosystems), ce logiciel permet la visualisation des chromatogrammes, l’édition et la correction des séquences obtenues.

Selon le logiciel, les nucléotides qui sont corrects et lus avec certitude sont colorés en bleu, tandis que ceux qui sont douteux sont représentés en jaune ou rouge. Ensuite, le calcul du pourcentage d’homologie a été réalisé par l’alignement des paires de séquences, via le programme EMBOSS-Needle (Alignement Global Needleman-Wunsch), disponible sur le site [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) .

Les séquences ont été alignées en utilisant la méthode ClustalW, disponible dans le logiciel MEGA version 7.0 [Kumar et al., 2016], elles seront par la suite comparées à des séquences de référence, disponible dans la base de données du site NCBI (National Center for Biotechnology Information, URL : [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) à l’aide du programme [BLAST+ 2.7.1 released](#).

❖ **Elaboration de l’arbre phylogénétique :**

Les arbres phylogénétiques ont été réalisés par le logiciel « MEGA v 7.0 » (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 7) [Kumar et al., 2016] en utilisant la méthode des distances « Neighbor-Joining » avec une valeur « Bootstrap » de 1000 répliques.

➤ **Numéro d’accession à la Genbank :**

Les séquences nucléotidiques ont été soumises à la Genbank, sous les numéros d’accession suivants :

De KY769277 à KY769282, de MG201788 à MG201815, et de MG201816 à MG201833

**III- RESULTATS :**

**1- Identification des souches virale par PCR en temps réel :**

Avant l’installation et la mise au point de la technique de la PCR en temps réel en 2004 à Biopharma, destinée à l’identification et la détection des ADN viraux des Capripoxvirus, l’identification des échantillons reçus au laboratoire, était basée sur la caractérisation du virus par son isolement sur culture cellulaire, ce qui explique la nature de quelques échantillons inclus dans cette étude (surnageant de culture cellulaire). D’autres échantillons étaient sous forme de broyat de croûtes.

Les résultats de l’identification par PCR en temps réel des 35 échantillons choisis pour la réalisation de cette étude sont rapportés dans le tableau VIII :

**Tableau VIII : Résultats de la PCR en temps réel**

Numéro	ID d’échantillon	Nature du prélèvement	Date de réception	Régions	Résultat PCR (C <sub>t</sub> )
1	RM3 TA	Surnageant culture cellulaire	05/81	ND non déterminée, isolement réalisé à l’IAV	32.54
2	TA H3	Surnageant culture cellulaire	18/06/82	ND non déterminée, isolement réalisé à l’IAV	22,10
3	SPLT2	Surnageant culture cellulaire	21/04/1982	ND non déterminée, isolement réalisé à l’IAV	17.16
4	Alg	Surnageant culture cellulaire	24/11/1989	Poste frontalier maroco-algérien	22.24
5	CFES88	Filtrat de croûtes	15/03/1989	Fès	34.16
6	CRM59P2	Croûtes ovines	07/01/1992	Région Marrakech)	-
7	CRM71P2	Croûtes ovines	07/01/1992	Région Marrakech	38.22
8	BLMP	Broyat Lambeau	22/01/1992	INAV (Rabat)	-

d'agneau					
9	CHEFV	Chefchaouen	20/11/92	Chefchaouen	-
10	Croute ovins N°4 P1	Croûtes ovines	24/09/1993	TiteMellil	-
11	OJ1	Croûtes ovines	20/10/1993	Oujda	21.85
12	Croute ORMVAM	Croûtes ovines	24/10/93	Berkane(Beni Chiker)	22.69
13	OJ2	Croûtes ovines	15/11/1993	Oujda	22.39
14	Croute Err	Croûtes ovines	31/10/1994	Errachidia	24.44
15	CROUTE N°1 P1	Croûtes ovines	25/11/94	Haouz (Sraghna)	36.70
16	Croute N°2	Croûtes ovines	30/12/1994	Azilal	28.58
17	CR93I	Croûtes prélevées à partir des lésions	25/01/1995	Ifrane	23.92
18	CR95I	Croûtes prélevées à partir des lésions	25/01/1995	Ifrane	20.73
19	BRCRL	Croûtes ovines	26/11/1999	Larache	-
20	CBK1 P1	Croûtes brebis	04/07/2000	El Kelaâ	18.50
21	SP K5 P1	Croûtes	20/12/2000	El Kelaâ	-
22	NP1	Croûtes	12/01/01	Nador	-
23	P3S	Croûtes	11/02/2002	Settat	35.67
24	SP1C	Croûtes	04/04/2002	Chichaoua	-
25	MP3S	Croûtes	18/03/2002	Marrakech	-
26	CRT4G	Croûtes	08/12/2006	Guelmim	-
27	CR3S	Croûtes	15/02/2007	Sefrou	-
28	CRH1	Croûtes	04/11/2010	Haouz	-
29	CRH2	Croûtes	04/11/2010	Haouz	-

Il faut rappeler que les Ct sont inversement proportionnels à la charge virale de l'échantillon analysé, c'est-à-dire, plus le Ct est petit, plus la charge virale de l'échantillon en SPV est importante.

- Les échantillons qui ont montré des Ct tardifs ont été destinés à être rafraîchis sur culture cellulaire, avec observation quotidienne jusqu'à généralisation de l'effet Cyto-Pathogène.
- Les échantillons qui n'ont pas présenté de Ct sont considérés négatifs.

## 2- Production du virus sur culture cellulaire

Après la production des souches virales sur culture cellulaire, la suspension virale est ensuite répartie dans des flacons type pénicilline, puis envoyée au laboratoire pour effectuer le séquençage.

### 3- Génotypage

#### a- Amplification des isolats du SPV par PCR classique

##### ➤ Dosage des échantillons d'ADN par le Nanodrop 8000

En biologie moléculaire, il est important de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques après leur purification. La méthode la plus répandue pour le dosage d'acides nucléiques est la spectrophotométrie qui mesure l'absorbance (ou densité optique) des acides nucléiques à 260 nm (absorbent dans l'ultraviolet). Parallèlement, on détermine leur pureté en mesurant l'absorbance à 280 nm, 230 nm et 320 nm.

Le spectrophotomètre NanoDrop® inclut le mode de mesure « Microarray » qui permet de mesurer simultanément les absorbances des acides nucléiques et des fluorochromes et de calculer la concentration de l'acide nucléique. Les limites de détection des ADN double brins pour les NanoDrop® et plus précisément le NanoDrop 8000 : de 2,5 à 3750 ng/µl

Le ratio 260/280 est utilisé pour évaluer la pureté de l'ADN, généralement un ADN avec un ratio 1.8 est admis comme pure, par contre si le ratio est faible, cela peut indiquer la présence de contaminants : protéines, phénol ou autres qui absorbent à 280 nm.

Le rapport de l'absorbance de l'échantillon à 260 nm et à 230 nm est une mesure secondaire de la pureté de l'acide nucléique. Les valeurs 260/230 pour l'acide nucléique "pur" sont souvent plus élevées que les valeurs 260/280 respectives. Ils sont généralement dans un intervalle de 1,8 à 2,2. Si le rapport est sensiblement inférieur, cela peut indiquer la présence de contaminants co-purifiés.

La concentration d'ADN double brin qui pourra être prise en considération doit dépasser 33ng/µl (Figure 23 et Annexes).

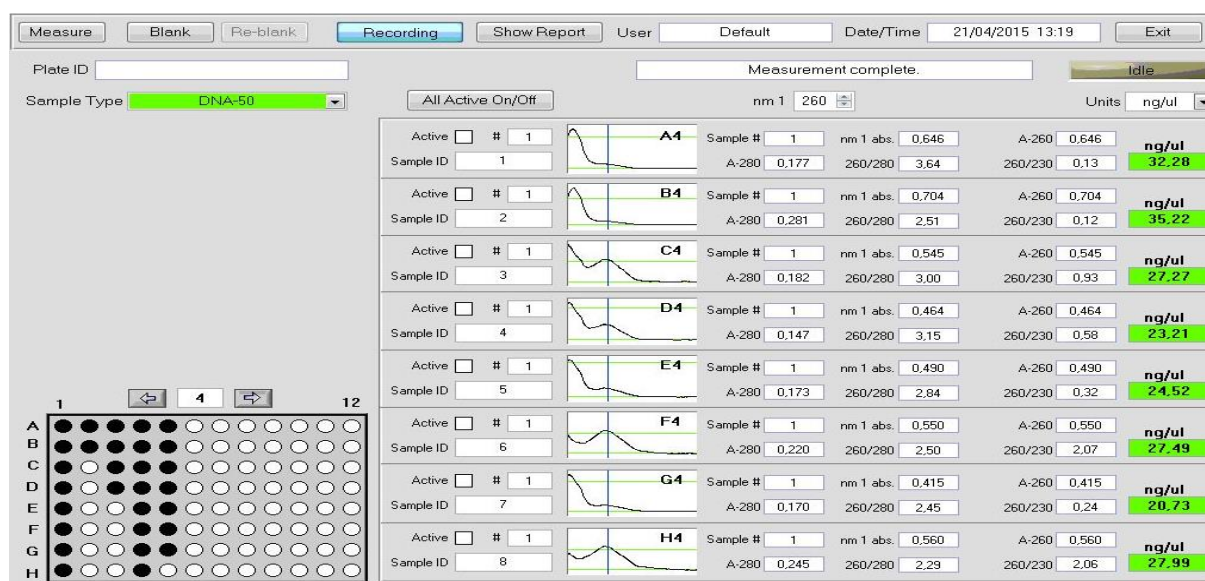


Figure 23 : Résultats de dosage de l'ADN purifié par Nanodrop 8000

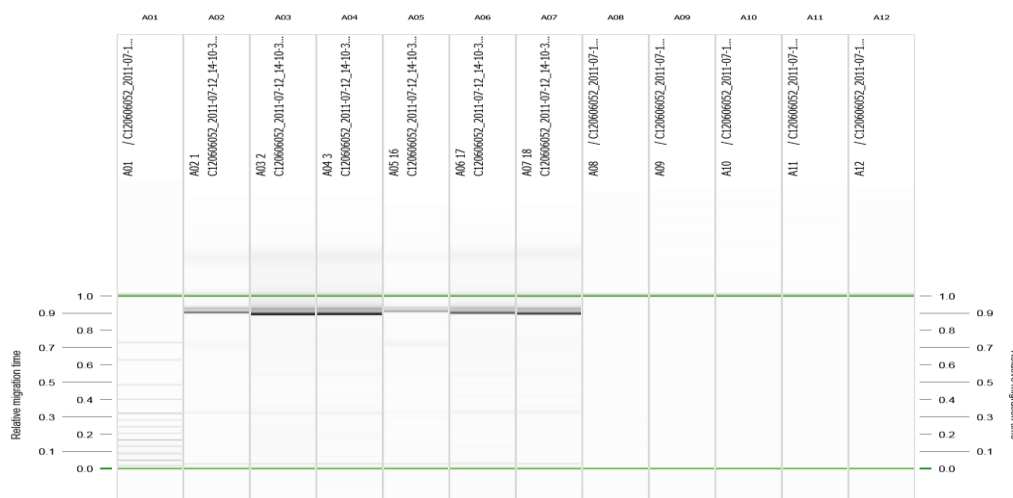
**b- Révélation des produits PCR par électrophorèse:**

✓ **Pour le gène de la P32 :**

La vérification des tailles des produits PCR a été effectuée par le bio-analyseur Qiaxcel qui génère des gels virtuels sur le logiciel de l'appareil (Figure 24 et annexes).

L'amplicon des isolats marocains du SPV, est de taille d'environ 900 à 1500 pb

- ✓ Les puits 1,3, ...etc correspondent aux isolats du SPV du terrain.
- ✓ Le puits A04 correspond au témoin positif (Souche HELD)
- ✓ Le puits A08 correspond au témoin négatif
- ✓ Le marqueur de taille ADN de 100 pb (promega).



**Figure 24 :** Visualisation des produits PCR sur Gel virtuel par le bio-analyseur Qiaxcel

✓ **Pour le gène qui code pour la protéine RPO30 :**

La migration a été effectuée sur gel d'agarose à 1,5% en présence d'un marqueur de poids moléculaire de 100bp ou 1kb (Figure 25 et annexes).

Les photos de gel ont été visualisées par le système de photo documentation « G Box ».



**Figure25 :** Prototype d'électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% des produits PCR du Gène qui code pour la protéine RPO30

#### 4- Analyses des séquences :

##### a- Gène qui code pour la protéine P32 :

Les fragments du gène qui code pour la protéine P32 ont été séquencés. Les séquences nucléotidiques et les séquences d'acides aminés ont été comparées entre elles et par la suite aux séquences de différentes souches de référence extraites à partir de la base de données de la Genbank, et provenant de différentes régions à travers le monde.

##### - Alignement et calcul du pourcentage d'homologie entre les séquences :

L'alignement multiple des séquences nucléotidiques et d'acides aminés est réalisé par le logiciel MEGA version 7.0 en utilisant la méthode ClustalW, qui est largement utilisé pour aligner n'importe quel nombre de séquences nucléotidiques ou protéiques homologues. Pour les alignements multi-séquences, ClustalW utilise des méthodes d'alignement progressif. Dans ceux-ci, les séquences les plus similaires, c'est-à-dire celles qui ont le meilleur score d'alignement, sont alignées en premier. Ensuite, des groupes de séquences progressivement plus éloignés sont alignés jusqu'à l'obtention d'un alignement global.

Le calcul du pourcentage d'homologie réalisé par l'alignement des séquences nucléotidiques et d'acides aminés selon le programme EMBOSS-Needle (Alignement Global Needleman-Wunsch), disponible sur le site [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk).

Les pourcentages d'homologie des nucléotides varient de 90% à 100% entre les souches marocaines. En comparaison avec les souches de référence séquencées, les isolats marocains montrent une homologie de 98.4% à 99% avec les souches de références du SPV, de 96% à 97% avec la souche de référence du GPV (Niger), et de 98% avec la souche KEN2014.

Le pourcentage d'homologie d'acides aminés qui composent la séquence protéique, varient de 91.5 à 100% entre les souches marocaines, de 98% à 100% en comparaison avec les souches de référence SPV, et de 94% à 98% en comparaison avec la souche de Référence GTPV (Niger).

##### - Arbre phylogénétique :

L'analyse de l'arbre est basée sur la comparaison de la séquence nucléotidique partielle du gène qui code pour la protéine P32 contenant la région la plus conservée chez les CaPVs, montrant la relation phylogénétique entre les isolats marocains étudiés et les souches de référence. L'analyse de l'arbre phylogénétique a été réalisée par la méthode de Tamura à trois paramètres et la distribution Gamma, avec 1 000 répétitions bootstrap. Les nombres le long des branches se réfèrent aux valeurs bootstrap.

L'étude phylogénétique basée sur le gène qui code pour la protéine d'enveloppe P32, montre que l'arbre se divise en trois groupes : SPV, GPV et LSDV. Les isolats marocains présentaient

des séquences homologues en les comparants avec les souches de références, chose qui confirme que le gène de la protéine P32 séquencé est conservé chez tous les CPVs.

Il est évident qu'il existe une relation étroite entre les SPV Marocains car ils sont regroupés sur le même clade, malgré la différence des années d'isolement ainsi que leurs origines. Par exemple, l'isolat de l'année 1982 est étroitement lié avec la souche isolée de la région sud précisément de Guelmim en 2006.



**Figure 26:** Arbre phylogénétique du gène de la protéine P32 des isolats du SPV isolés de différentes régions du Maroc entre les années 1982-2010.

En comparant nos isolats Marocains avec d'autres souches de références extraites à partir de la Genbank, de différentes régions du monde : la Chine, l'Arabie Saoudite, et l'Inde, on remarque qu'en se basant sur le gène de la prtéine P32, les souches marocaines sont groupées sur le même clade avec ces souches de référence, ce qui signifie qu'elles sont étroitement liées



**Figure 27 :** *Arbre phylogénétique basé sur le gène de la protéine P32 des isolats SPV au Maroc et à travers le monde.*

**b- Gène de la protéine RPO30 :**

Contrairement au gène de la protéine P32, le gène de la protéine RPO30 n'a pas été détecté chez tous les isolats Marocains, qui ont été pour longtemps considérés comme SPV.

**- Alignement et calcul du Pourcentage d'homologie entre les séquences :**

L'alignement et le calcul du pourcentage d'homologie des séquences nucléotidiques et d'acides aminés sont réalisés par les mêmes méthodes utilisées pour le gène codant pour la *P32*.

Pour la séquence nucléotidique du gène qui code pour la sous-unité d'ARN polymérase ADN dépendante, les pourcentages d'homologie des nucléotides varient de 98% à 99.8% entre les souches marocaines. En comparaison avec les souches de référence séquencées, les isolats marocains montrent une homologie de 98.4% à 99.8% avec les souches de références du SPV, et de 93.5 à 95% avec la souche KEN2014.

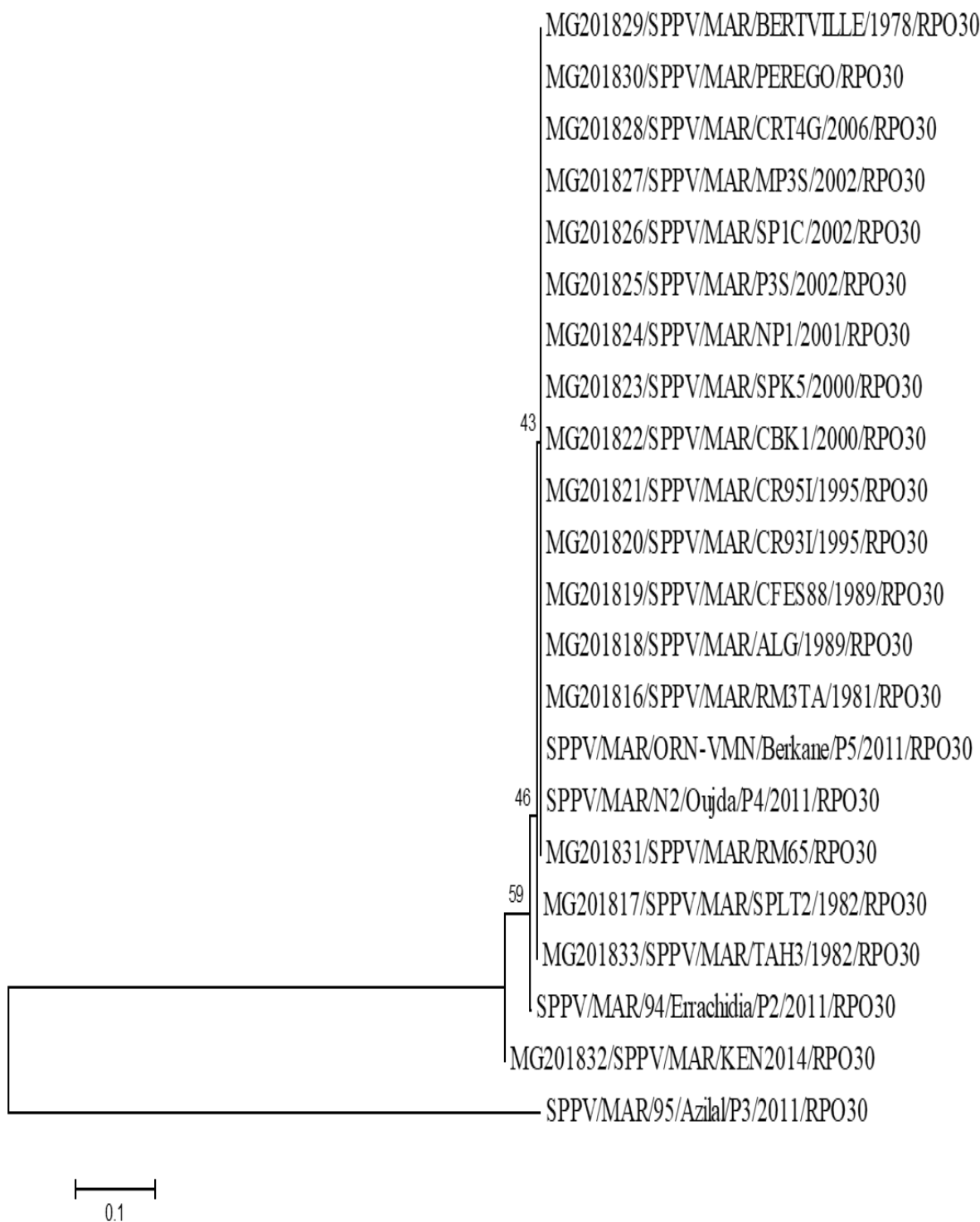
Le pourcentage d'homologie d'acides aminés, varie de 99 à 100% entre les souches marocaines, de 99.8% à 100% en comparaison avec les souches de référence SPV, et de 95% à 96% en comparaison avec la souche de référence KEN2014.

En comparant les séquences nucléotidiques et d'acides aminés du gène codant pour la RPO30 des isolats Marocains avec la souche Vaccinale utilisée au Maroc, on a remarqué une mutation au niveau de la position 584 caractérisée par la présence d'un A au lieu d'un T (Séquence nucléotidique) et au niveau de la position 156 la présence d'un D au lieu de N (Séquence d'acide aminé).

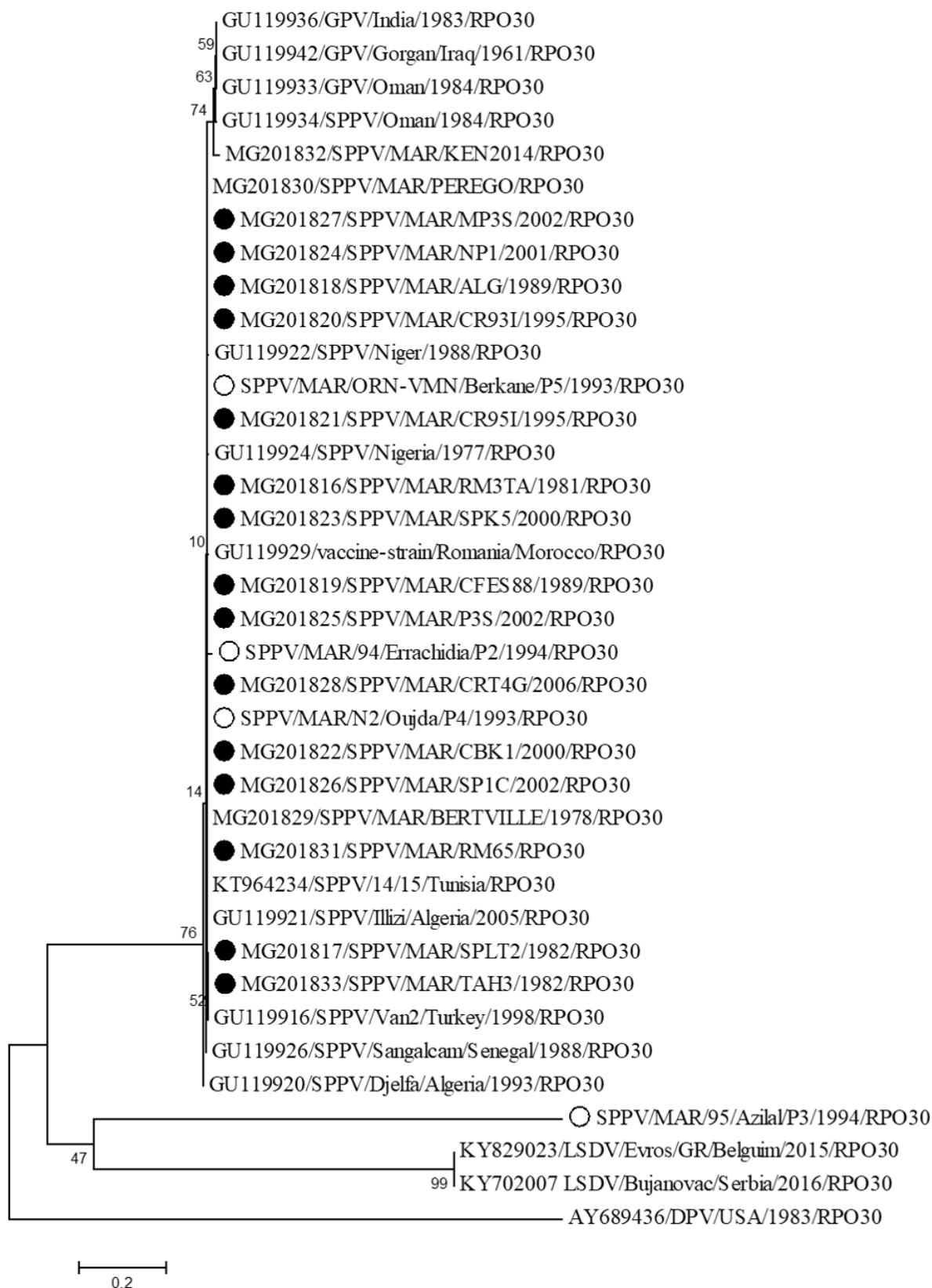
**- Arbre phylogénétique :**

L'étude phylogénétique basée sur le gène qui code pour la sous unité de l'ARN polymérase ADN dépendante RPO30, montre que l'arbre se divise en trois groupes : SPV, GPV et LSDV, en indiquant aussi la présence de sous groupes au sein d'eux.

Les isolats marocains sont groupés sur le même clade, chose qui confirme les résultats obtenus pour le gène codant pour la *P32*. Les isolats des années 80 sont étroitement liés à ceux des années 90 et 2000, ce qui montre que le génome du SPV est très conservé et ne subit pas de mutation au fil de temps et dans l'espace car les isolats Marocains ont aussi une liaison étroite avec les souches du même virus dans les pays voisins tels que l'Algérie, la Tunisie, certains pays sub-sahariens, la Turquie et Oman. Par contre la souche d'Azilal est groupée avec le LSDV, dans une branche indépendante des SPV marocains (Figure 28 et 29).



**Figure 28:** *Arbre phylogénétique du gène codant pour la RPO30 des différents isolats marocains du SPV*



**Figure 29 :** *Arbre phylogénétique basé sur le gène codant pour la RPO30 des isolats SPV au Maroc et à travers le monde.*

#### IV- DISCUSSION

Dans le présent chapitre, 29 isolats Marocains ont fait l'objet de notre étude, afin d'actualiser, d'une part, le profil épidémio-moléculaire du virus de la clavelée au Maroc et d'autre part, d'essayer de bien comprendre pourquoi cette maladie est toujours présente dans notre royaume.

L'étude moléculaire effectuée pour la première fois au Maroc sur des isolats Marocains, considérés pour longtemps comme agents causaux de la clavelée, nous a révélé plusieurs informations importantes.

Le séquençage du gène qui code pour la protéine d'enveloppe *P32* ; qui est une protéine structurale portant les déterminants antigéniques les plus importants et qui sont présents chez toutes les espèces du genre CaPVs [Heine et *al.*, 1999; Tian et *al.*, 2010] ; a montré, après l'analyse des séquences nucléotidiques et protéiques, que les isolats marocains sont groupés dans le même clade sur les deux arbres phylogénétiques réalisés, avec des pourcentages d'homologie qui varient entre 91% à 100% [Sumana et *al.*, 2020]. Par ailleurs, l'arbre phylogénétique a confirmé que les SPV sont plus liés aux GPV qu'aux LSDV [Tulman et *al.*, 2002 ; El-Kenawy et El-Tholoth, 2010 ; Zhou et *al.*, 2012 ; Hasoksuz et *al.*, 2014].

Cependant, les résultats du BLAST sur la base de données NCBI ont montré que tous les isolats locaux de la clavelée avaient une identité élevée (99-100%) mais l'homologie avec le virus GTPV et le LSDV était de 98%, ce qui confirme l'hypothèse qui dit que le GTPV et le LSDV ont le même ancêtre en commun qui est proche du SPV. Nos résultats sont en accord avec les études réalisées par Hosamani et *al.*, 2004 et Stram et *al.*, 2008 qui ont mené leurs études phylogénétiques sur différents segments du génome, mais leur hypothèse était en contradiction avec une autre étude, qui a conclu que les CaPVs peuvent être issus d'un ancêtre semblable au LSDV [Tulman et *al.*, 2002].

En général, le gène qui code pour la *P32* est considéré le plus approprié pour la recherche épidémiologique des isolats CaPVs en raison du nombre considérable d'informations disponibles sur ce gène [Sumana et *al.*, 2020]. Néanmoins, l'analyse d'un seul gène n'est pas suffisante pour décrire les liens de parenté génétique entre les CaPVs à cause de la taille énorme de leurs génomes. Il est absolument indispensable de faire une étude sur différents gènes et même sur tout le génome pour avoir plus de précision afin de contribuer à une étude épidémiologique fiable sur les CaPVs [Zhou et *al.*, 2012].

Pour étudier la relation phylogénétique et identifier une nouvelle cible de diagnostic pour le génotypage du CaPV, nous avons opté pour l'étude de l'homologue du gène *E4L* du virus de la vaccine [Rosales et *al.*, 1994]. Dans le virus de la vaccine, ce gène code une protéine

multifonctionnelle de 30 kDa servant de sous-unité intégrale de l'ARN polymérase ADN-dépendante [Ahn et al., 1990, Broyles et Pennington, 1990, Zeedan et al., 2020], et aussi un facteur de transcription intermédiaire (VITF1) avec une homologie avec le facteur d'élongation de la transcription eucaryote, SII (TFIIS) [Rosales et al., 1994]. Le gène E4L est l'un des 90 gènes présents chez tous les Chordopoxvirus, et est donc sujet à moins de variabilité au niveau du genre et de l'espèce [Upton et al., 2003; Lefkowitz et al., 2006].

Le séquençage du gène qui code pour la *RPO30* a permis de différencier les SPV des autres espèces des CaPVs, en se basant sur la délétion de 21 nucléotides qui correspond à la délétion de 7 acides aminés et qui est caractéristique du virus de la clavelée [Lamien et al., 2011].

Parmi tous les isolats Marocains considérés depuis leur isolement comme SPV vu qu'ils ont montré des symptômes caractéristiques de la maladie, seulement quelques uns ont été séquencés en utilisant des amorces qui sont spécifiques pour le virus de la clavelée.

Le résultat du BLAST sur la base de données NCBI, a montré que nos isolats ont un pourcentage d'homologie qui varie entre 99-100% en les comparant avec les souches de référence du SPV y compris la souche vaccinale Marocaine, de 98% avec les souches de référence du GPV et de 97% avec celles du LSDV, ce qui est en accord avec nos résultats obtenus pour le gène codant pour la *P32* et les résultats obtenus par Lamien et al., 2011 et Zhou et al., 2012 en étudiant le gène codant pour la *RPO30*.

L'arbre phylogénétique confirme la division des CaPVs en trois groupes différents, à savoir, SPV, GPV et LSDV, ainsi que des subdivisions ont été identifiées dans les trois groupes, comme rapporté par plusieurs chercheurs [Tulman et al., 2002; Hosamani et al., 2004; Le Goff et al., 2009, Zhou et al., 2012]. De plus, les isolats marocains sont étroitement liés, ils apparaissent groupés sur le même clade avec les autres souches de références SPV, et sont plus liés aux GPV qu'aux LSDV.

D'autre part, la souche d'Azilal, isolée en 1994, est groupée dans le même clade avec les souches de référence du LSDV, chose qui impose de réaliser d'autres études approfondies sur d'autres gènes ou sur son génome complet pour avoir plus de visibilité sur sa classification et sur sa nature.

Parmi les isolats Marocains étudiés, on remarque l'absence de la souche de Haouz qui a été isolé en 2010 à partir de croûtes d'un mouton malade, dont le génome n'a pas été amplifié en utilisant les amorces spécifiques du SPV. Au cours de la même année, une nouvelle forme dite nodulaire a été isolée par Zro et al., 2014, et a été rapportés pour la première fois au Maroc. Pour cette raison, il faut bien identifier les souches qui ont émergé en 2010 au Maroc et voir s'il

s'agit vraiment du SPV ou c'est un autre agent qui a affecté les moutons, vu que l'identification a été basée sur des gènes qui sont conservés chez les CaPVs.

La classification au sein du genre CaPVs est basée sur l'hôte à partir duquel le virus est isolé car les CaPVs ont été toujours considérés strictement spécifique de l'hôte. Chose qui pourrait soutenir cette hypothèse est le fait qu'aucune maladie de type CaPV n'a jamais été rapportée chez les moutons ou les chèvres en Afrique du sud, où la LSD chez les bovins est endémique. De même, la LSD n'a jamais été signalé dans les pays asiatiques, où la clavelée et la variole caprine sont endémiques. De plus, dans les troupeaux mixtes comprenant des moutons et des chèvres, les foyers de clavelée ou de variole caprine sont souvent confinés uniquement aux moutons et aux chèvres, respectivement. C'est le cas en Afrique du Nord où seules les épidémies de variole sont signalées [Lamien et *al.*, 2011].

Cependant, il existe un isolement confirmé d'un LSDV à partir du mouton, il s'agit de l'isolat Kenyan O-240 qui a été considéré pour longtemps comme SPV [Davies, 1982, Kitching et *al.*, 1987]. En outre, il y a eu des cas de manifestation de maladies dues au Capripox impliquant des moutons et des chèvres [Diallo et Viljoen, 2007]. Dans de tels cas, il est très important d'identifier clairement le virus causal.

Il est intéressant de noter que les isolats des groupes LSDV et GPV sont groupés comme ceux précédemment identifiés en se basant sur l'Orthologue du gène codant pour la *GPCR* du CaPV [Le Goff et *al.*, 2009]. Ces observations simultanées dans l'analyse indépendante de deux gènes non apparentés renforcent la possibilité que des sous-lignées de Capripoxvirus existent [Lamien et *al.*, 2011].

Comme dans l'analyse des données de séquence du gène qui code pour la *GPCR* [Le Goff et *al.*, 2009], cette étude a identifié des isolats CaPV qui se re-classifient en dehors du groupe représentant l'hôte à partir duquel ils ont été isolés. En effet, à titre d'exemple: SPV KS-1 appartient au groupe LSDV, SPV Oman / 84 dans le groupe GPV, GPV Arabie Saoudite / 93 et GPV Nigeria / 99 dans le groupe SPV. De plus, les résultats obtenus par Lamien et *al.*, (2011) confirment ceux de SPV KS-1 et SPV Oman / 84.

Bien que ces différences apparentes entre les données génétiques et l'origine hôte de ces isolats doivent être étudiées plus en détails, il est possible que certaines souches infectent naturellement et causent des maladies chez plus d'une espèce animale, principalement les moutons et les chèvres. Dans le cas du SPV Oman / 84, la reproduction expérimentale de la maladie a montré qu'elle peut induire des symptômes d'égale sévérité chez les ovins et les caprins [Kitching et *al.*, 1986].

En se basant sur les résultats obtenus par l'étude moléculaire des isolats Marocains, on peut conclure que l'identification des CaPVs basée sur le gène codant pour la *P32* est fiable pour la détection de leurs génomes, mais pour plus de précision, et surtout pour identifier l'agent causal de la clavelée, il est indispensable de se baser sur le gène codant pour la *RPO30* qui contient une délétion de 21 nucléotides qui correspond à la délétion de 7 acides aminés, cette dernière est considérée comme signature spécifique des SPV, confirmée par Lamien et *al.* en 2011.

## V- CONCLUSION

A partir de l'étude phylogénétique réalisée, on peut constater que la présence jusqu'à présent de la maladie de la clavelée au sein de notre pays n'est pas due à l'émergence de nouvelles souches virales. En effet, le génome de ce virus est stable au fil de temps et dans l'espace, c'est-à-dire qu'il ne subit pas de modifications génétiques responsables de nouveaux génotypes. Elle pourrait être liée cependant, aux mouvements non contrôlés des moutons entre le Maroc et les pays voisins ainsi qu'au programme prophylactique adopté par l'état. D'autre part, il est temps de revoir la classification basée sur l'hôte à partir duquel le virus a été isolé, ainsi que les techniques de diagnostics de cette maladie. De même, et afin de concrétiser ces données, des études expérimentales déterminant le pouvoir pathogène de quelques souches du SPV sont nécessaires.

## **CHAPITRE II**

## CHAPITRE II : EVALUATION DU POUVOIR PATHOGENE DE QUELQUES SOUCHES DU VIRUS DE LA CLAVELEE

### I- INTRODUCTION :

En l'absence d'une souche d'épreuve et vaccinale locale, le Maroc utilise pour la protection des ovins contre la clavelée, la souche vaccinale Romania. Pour cette raison, nous avons opté pour l'étude de la pathogénicité de quelques souches Marocaines du virus de la clavelée ainsi que la souche d'Azilal qui a montré des divergences lors de l'étude moléculaire du gène qui code pour la *RPO30*. Cette souche a été prise comme témoin dans l'expérimentation, afin de caractériser le pouvoir pathogène et immunogène, en se basant sur des tests réalisés *in vitro* et *in vivo*.

### II- MATERIEL & METHODES:

#### 1- Matériel d'étude :

##### a- Souches Virales :

Six souches ont été choisies pour la réalisation de ce travail. Elles ont été isolées au laboratoire Biopharma entre les années 1993 et 1994 (Tableau IX) à partir de croûtes de moutons malades de différentes régions du Royaume. Cette période coïncide avec les flambées épidémiologiques de la clavelée qu'a connu le Maroc, ce qui a causé des pertes importantes au niveau du cheptel ovin national.

Tableau IX : Informations des isolats à étudier

ID d'échantillon	Origine	Ct	Date de réception	Région
CROUTE N°1	Croûtes ovines	21.85	20/10/1993	Oujda
CROUTE ORMVAM	Croûtes ovines	22.69	24/10/1993	Berkane (Beni Chiker)
CROUTE N°2	Croûtes ovines	22.39	15/11/1993	Oujda
CROUTE Err	Croûtes ovines	24.44	31/10/1994	Errachidia
CROUTE N°1 P1	Croûtes ovines	36.70	25/11/1994	Haouz (Sraghna)
CROUTE N°2	Croûtes ovines	28.58	30/12/1994	Azilal

##### b- Animaux :

Afin d'évaluer la pathogénicité des souches virales, 10 moutons ont été recueillis selon les critères suivants : bonne santé, jeunes, non vaccinés et issus de mères non vaccinées et

séronégatifs à la clavelée ovine. Ces moutons ont été maintenus dans des locaux confinés au niveau de l'animalerie de Biopharma, dont l'entrée et la sortie sont contrôlées.

Les essais de l'infection expérimentale ont été approuvés par le comité d'éthique local et ont été menés conformément aux directives strictes en matière de bien-être animal de BIOPHARMA.

**2- Méthodes d'étude :**

**a- Production du virus sur culture cellulaire et détermination du titre infectieux :**

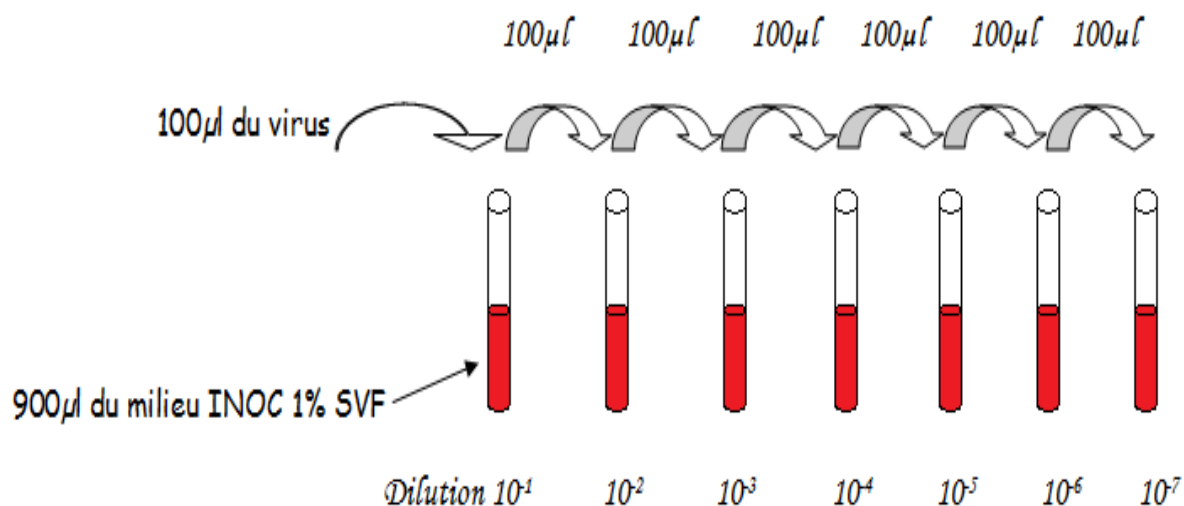
Selon les résultats obtenus après l'identification des souches sélectionnées par PCR en temps réel (Chapitre I, Partie II), les isolats choisis ont montré une charge virale significative d'après leurs Ct. Ces souches vont subir des passages de rafraîchissement sur culture cellulaire.

**b- Préparation et inoculation des cellules : (Voir Partie 2, Chapitre I)**

**c- Titrage du virus de la clavelée sur cellules :**

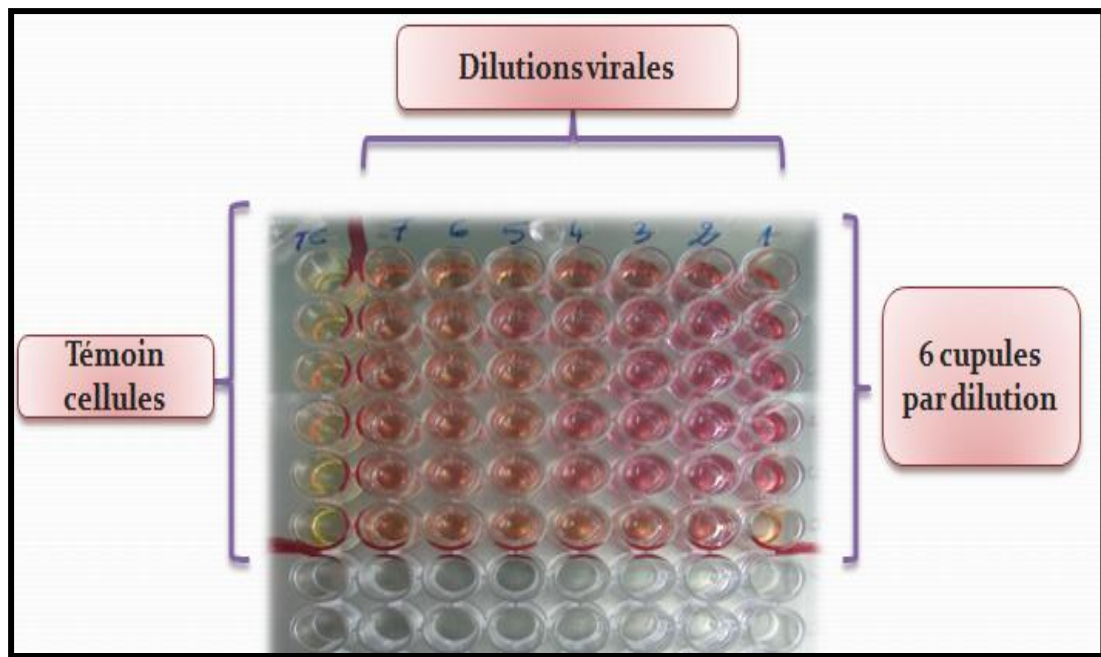
Le titrage est une méthode quantitative utilisée pour l'évaluation de la quantité des particules virales dans une suspension. Le titre représente l'inverse de la dilution la plus élevée, qui donne un ECP chez 50% des unités inoculées.

Avant de procéder au titrage d'un virus, il est indispensable de passer par l'étape de la préparation des dilutions, la dilution la plus forte est au minimum  $10^{-6}$  et au maximum  $10^{-7}$  (Figure30).



**Figure 30 : Préparation des dilutions du virus.**

Une suspension des cellules ICO1 à 80000 cellules/ml est ajoutée, dans toutes les cupules, à raison de 150µl par cupule, en présence de cellules témoins ne contenant que le milieu d'entretien comme indiqué sur la figure 31.



**Figure 31 : Plaque de titrage in Vitro**

Les plaques sont incubées dans une étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> (Etuve Shellab induction du CO<sub>2</sub> par infra rouge), et la lecture du titrage est réalisée à partir du 7<sup>ème</sup> et jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour après inoculation virale.

Le titre infectieux est calculé selon la méthode de Spearman Karber [Achour H.A., et al., 2000 ; Fakhfakh et al., 2005] exprimé en log DICT50/ml (Logarithme de l'inverse de la dilution virale initiale donnant 50% de l'ECP) :

$$TI = d + (n + N/2) r/N$$

- d : dilution la plus élevée présentant 100% d'effet cytopathogène.
- r : raison de dilution.
- N : nombre de cupules par dilution.
- n : nombre de cupules présentant un effet cytopathique entre 0 et 100%.

**d- Titrage par PCR en temps réel :**

En plus du titrage infectieux effectué sur cellules et qui révèle la présence des particules virales infectieuses, les isolats ont été aussi titré par PCR en temps réel, qui est une méthode quantitative et sensible pour la détection de l'ADN viral et ce dans le but de réunir les résultats du titrage infectieux et ceux de la PCR quantitative (Protocole en Partie II Chapitre I et annexes).

### 3- Infection expérimentale :

#### a- Contrôle du statut immunitaire du mouton :

##### ❖ La Séroneutralisation :

C'est une technique destinée à la détection de la présence d'anticorps anti-virus de la clavelée, dans le sérum des animaux vaccinés. Le sérum est mis en présence de quantités décroissantes des virus qui ont fait l'objet de cette étude. On peut vérifier aussi, les effets cytopathogènes caractéristiques du virus et la réduction du titre sur cellules (Annexes).

Afin de choisir les moutons qui seront les sujets de cette expérimentation, on a réalisé le test de séroneutralisation (Annexes) sur les sérums de 23 moutons jeunes de sexes, âges, poids et races confondus, pour ne choisir que les sujets séronégatifs à la clavelée.

- Le sérum est obtenu après centrifugation des tubes à une vitesse de 2500 tour/min pendant 15 min, le surnageant est récupéré dans des tubes stériles puis inactivé à 56°C pendant 30 min dans un bain marie.

- Les sérums sont ensuite dépistés vis-à-vis des anticorps de la clavelée en utilisant la technique de séroneutralisation sur culture cellulaire (Annexes).

- les moutons choisis, sont ceux dont les sérums ne présentent pas d'anticorps anti-clavelée.

#### b- Préparation des moutons à l'inoculation :

Les moutons à inoculer sont rasés au niveau du flanc qui sera le lieu d'inoculation virale. Un prélèvement de sang est réalisé à partir de ces animaux, juste avant inoculation, il représente le prélèvement J0 (Figure 32).



*Figure 32 : Mouton à flanc rasé.*

#### c- Inoculation de la suspension virale et production de la pustule géante :

La suspension virale à inoculer est diluée dans le milieu d'entretien de façon à avoir  $10^5$  DICT50 par inoculum. L'inoculation est réalisée au niveau du flanc rasé, en un seul point, par voie intra-dermique, utilisant un volume de 20 ml pour produire une pustule géante au niveau du flanc [Bowden et al. 2008].

#### **4- Suivi clinique des animaux :**

Les animaux inoculés sont suivis quotidiennement par observation de leur état général (appétit, comportement), par observation d'éventuels signes cliniques et par relevé de la température rectale. Le diamètre de la réaction locale est également enregistré chaque jour, durant toute la période du suivi.

##### **a- Suivi sérologique et virologique :**

###### **❖ Suivi sérologique :**

Des prises de sang ont été effectuées, dans des tubes secs, depuis le premier jour de l'expérimentation, puis le 7<sup>ème</sup>, le 14<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour pour la recherche des anticorps et le suivi de l'installation de l'immunité anti-claveuse [OIE., 2017].

###### **❖ Suivi virologique et ré-isolement viral :**

Des prélèvements sanguins ont été réalisés, chaque 3 jours dans des tubes EDTA, pour le suivi de la virémie, et ce, par la recherche de l'ADN viral du virus de la clavelée dans les prélèvements de sang total (présence ou absence du virus), en utilisant la PCR en temps réel.

Les moutons qui ont présenté une pustule géante importante et une généralisation des signes cliniques de la maladie, sont sacrifiés pour le prélèvement du tissu inflammatoire au niveau de la pustule géante, de la lymphe et des croûtes cutanées, où se concentre le virus de la clavelée [OIE, 2017]. Les prélèvements de lymphe sont répartis dans des tubes stériles et conservés à -80°C.

Le tissu inflammatoire et les croûtes sont broyés dans une solution saline tamponnée, (PBS) additionné d'antibiotiques (Annexes). Le broyat, clarifié par centrifugation, est répartis dans des ampoules stériles, puis stocké à -80°C pour le titrage *in vivo*.

##### **5- Titrage *in vivo* :**

Parmi les cinq prélèvements testés sur moutons, trois ont montré un pouvoir pathogène élevé. Ces trois souches ont été titrées sur moutons au niveau du flanc rasé (titrage *in vivo*). Le mélange du broyat du tissu inflammatoire et de la lymphe de chacune des trois souches est dilué de 10 en 10 dans le milieu d'entretien (dilutions allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ ) (même principe que le titrage *in vitro*) et chaque dilution est inoculée par voie sous cutané en cinq points. Le volume inoculé par point est de 0.1 ml (figure 33) [Achour et *al.*, 2000].



***Figure33 : Titrage In-Vivo.***

Le suivi du titrage est réalisé chaque jour pour l'observation des papules, lieu de multiplication du virus. Le titre viral est déterminé le 7<sup>ème</sup> jour en dénombrant le nombre de réactions positives par dilution. Le calcul du titre est réalisé par la méthode de Spearman Karber précédemment décrite.

### **III- RESULTATS :**

#### **1- Production et titrage des souches virales sur cellules de cœur d'agneau (ICO1) :**

##### **a- Passages de Rafrâchissement :**

L'inoculation des isolats Oujda N°1 et 2 et Berkane a montré un ECP caractéristique dès le premier passage sur cellules. L'ECP se manifeste par l'apparition de foyers de cellules infectées, ballonnées et réfringentes à partir du 2<sup>ème</sup> jour qui suit l'infection (figure 34).

La nécrose des cellules infectées fait apparaître des plages de lyse (figure 35) dont la confluence aboutit à une destruction de l'assise cellulaire au 6<sup>ème</sup> jour post-inoculation (figure 36 et 37).

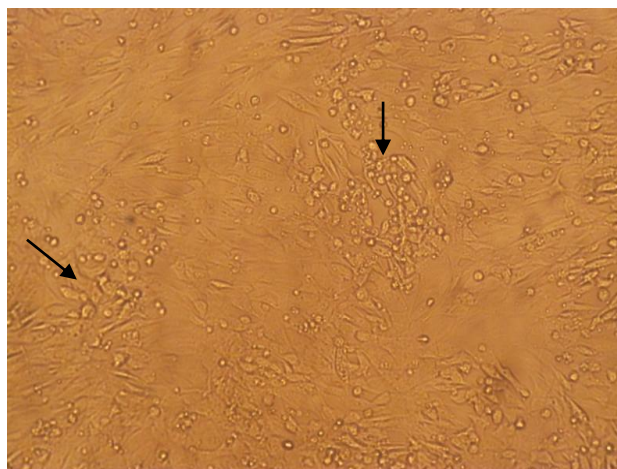
L'isolat Azilal ne s'est manifesté sur cellules, qu'à partir du 6<sup>ème</sup> jour du 1<sup>er</sup> passage de rafraichissement sur les cellules ICO1, en laissant apparaître des foyers de cellules infectées sur 80% du tapis cellulaire, sans avoir une destruction cellulaire.

Les isolats d'Errachidia et Haouz n'ont pas montré d'ECP au niveau du 1<sup>er</sup> passage de rafraichissement.

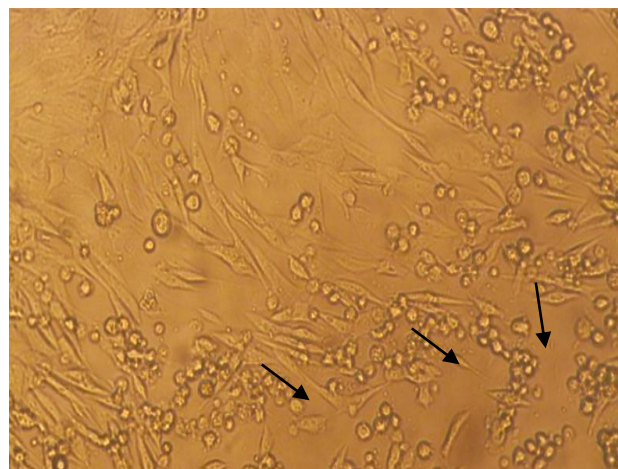
Un second passage sur cellules ICO1 a été réalisé, pour les quatre souches, pour la reproductibilité de l'ECP et la production de l'inoculum.

Ce second passage a révélé un ECP caractéristique, à partir du 2<sup>ème</sup> jour qui suit l'infection pour les souches Berkane, Oujda et Azilal, alors que les souches Errachidia et Haouz n'ont pas manifesté d'ECP. Ces deux souches ont été donc abandonnées, seules les quatre souches ayant manifesté un ECP caractéristique et reproductible ont été retenues.

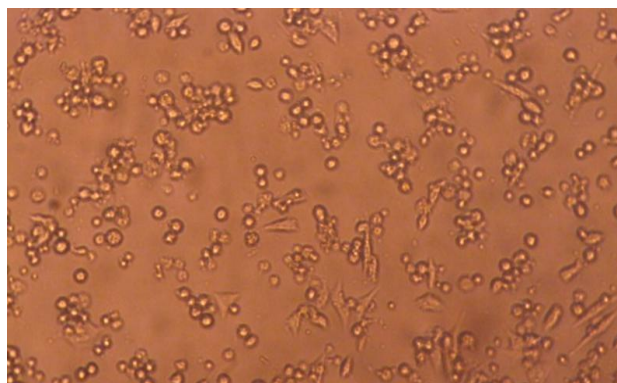
Les quatre souches ont été titrées sur cellules ICO1, pour la quantification des particules virales infectieuses.



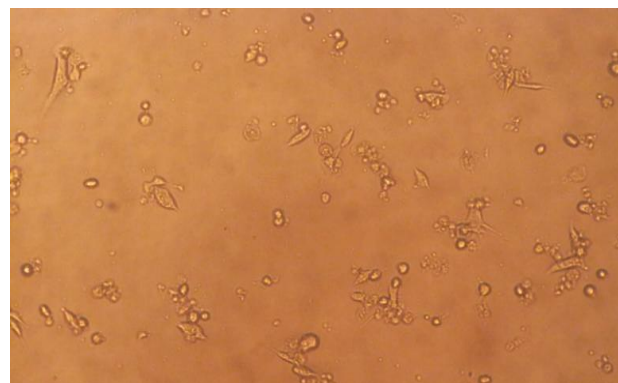
**Figure 34 :** *Foyers de multiplication du virus de la clavelée, observés au microscope inversé. Grossissement : ×1000.*



**Figure35:** *Plages de lyse observées au microscope inversé. Grossissement : ×1000.*



**Figure 36 :** *Destruction de l'assise cellulaire observée au microscope inversé. Grossissement : ×1000.*



**Figure37:** *Nécrose et Destruction totale du tapis cellulaire observées au microscope inversé. Grossissement : ×1000.*

**b- Détermination du titre infectieux des souches produites :**

**Tableau X :** *Résultats du titrage infectieux sur culture cellulaire.*

	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
<b>Oujda 1</b>	6+/6	6+/6	6+/6	6+/6	6+/6	2+/6	0+/6
<b>Oujda 2</b>	6+/6	6+/6	6+/6	6+/6	5+/6	3+/6	0+/6
<b>Berkane (BeniChiker)</b>	6+/6	6+/6	6+/6	6+/6	6+/6	5+/6	0+/6
<b>Azilal</b>	6+/6	6+/6	6+/6	6+/6	6+/6	2+/6	0+/6

Les titres obtenus sont exprimés en log DICT50/ml (dose infectieuse de 50% de la culture cellulaire) et présentés dans le tableau XI.

**Tableau XI : Titres infectieux obtenus**

	Oujda1	Oujda2	Berkane(Benichiker)	Azilal
<b>Titres infectieux</b>	6,8	6,8	7,32	5,8

- La souche de Barkane est la souche qui a présenté le titre infectieux le plus élevé.
- Les souches d'Oujda N°1 et 2 et Azilal ont le même titre qui est de 6,8 DICT50/ml.

Ces résultats corrént avec les résultats de la culture sur cellules ICO1, puisque les souches Berkane, Oujda N°1 et 2 et Azilal présentent un ECP précoce et une généralisation rapide.

**c- Titrage des suspensions virales par PCR en temps réel :**

Les résultats de la quantification de la charge virale par PCR en temps réel, de chaque souche virale, sont représentés par des valeurs de Ct, dans le tableau suivant :

**Tableau XII : Valeurs de Ct obtenus après le titrage par PCR en temps réel.**

	Oujda 1	Oujda2	Berkane	Azilal
<b>Valeurs (Ct)</b>	26,9	28,65	30,62	33,74

Les résultats du titrage par PCR en temps réel, montrent que les 4 souches représentent une charge virale importante en faveur d'une inoculation In-Vivo.

**2- Résultats de l'infection expérimentale :**

Les souches Oujda N°1 et 2, Berkane (Benichiker) et Azilal produites et titrées sur cellules ICO1 et quantifiées par PCR en temps réel quantitative, ont été choisies pour l'inoculation des moutons par voie intradermique sur flanc rasé.

**a- Suivi clinique :**

➤ **Réaction locale :**

La mesure de la réaction locale aux points d'inoculation (Figures38, 39, 40,41) est effectuée quotidiennement. Les résultats obtenus pour chaque mouton infecté sont représentés sur la figure 43 qui montre les courbes des diamètres des lésions locales (en cm), apparues après inoculation de 10<sup>5</sup> DICT 50, en un seul point, pour la production de la pustule géante.



***Figure 38 : Réaction locale de la souche de Berkane.***



***Figure 39 : réaction locale de la souche d'Oujda N°1***



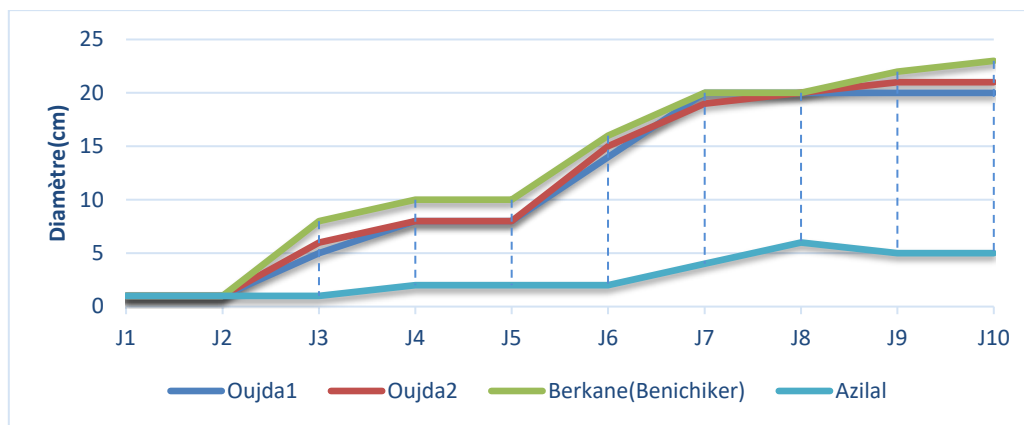
***Figure 40 : Réaction locale de la souche Oujda N°2***



***Figure 41 : Réaction locale de la souche Azilal***

Dès le troisième jour après l'inoculation, on remarque l'apparition d'une réaction douloureuse au niveau de la région d'injection, pour les différentes souches.

Cette réaction se manifeste par, un durcissement de la peau et une inflammation importante, le diamètre maximal de 20 à 23 cm est obtenu le 8<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> jour pour les souches Oujda et Berkane (figures 39, 40, 41), alors que la souche d'Azilal n'a pas montré une réaction locale significative, comparativement aux autres souches. Le diamètre maximal atteint était de 5 cm le 8<sup>ème</sup> jour, puis il a régressé progressivement par la suite (figure 42).

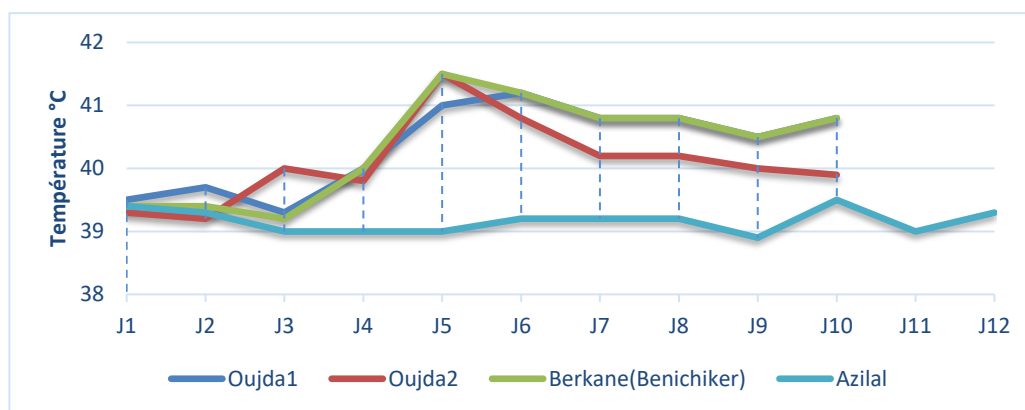


**Figure 42 :** Valeurs du diamètre de la réaction locale produite pour les 4 moutons infectés

➤ **Suivi thermique : température rectale**

La température corporelle des moutons reste stable après l’inoculation, pour toutes les souches, jusqu’au 4<sup>ème</sup> jour où elle atteint 40°C, puis elle augmente pour atteindre 41°C le 5<sup>ème</sup> jour pour les deux souches d’Oujda et celle de Berkane. Elle diminue par la suite, et atteint vers le 10<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour la température corporelle usuelle pour la souche Oujda2, alors que pour les souches Oujda1 et Berkane, les moutons ont maintenu l’hyperthermie.

Pour la souche d’Azilal, on remarque l’absence de l’hyperthermie, la température reste stable aux environ de 39°C, durant toute la période de l’expérimentation (figure 43).



**Figure 43 :** Valeurs de la température rectale des moutons infectés par les 4 souches virales de la clavelée.

**b- Manifestation générale de la maladie :**

Pour tous les moutons pendant les 5 premiers jours après l’inoculation, aucune réaction généralisée n’a été observée, mais à partir du 6<sup>ème</sup> jour, nous avons noté le début de la généralisation caractérisée par l’apparition de papules rougeâtres partout sur le corps et présence d’œdème autour du point d’inoculation et un jetage nasale pour la souche de Berkane,

l'apparition de papules rougeâtres qui entourent la région d'inoculation, et présence des croûtes au niveau de la tête pour les souches d'Oujda 1 et 2 et l'apparition de quelques papules mais pas de signes remarquables pour celle d'Azilal.

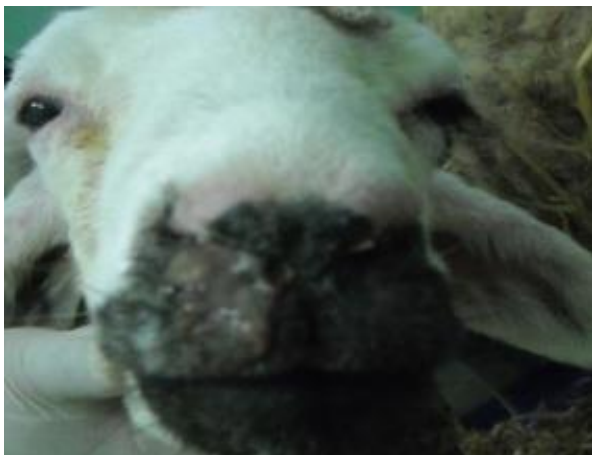
A partir du 8<sup>ème</sup> jour, les éruptions cutanées sont apparues sous forme de papules, vésicules et croûtes, se généralisant chez les moutons inoculés par les 2 souches d'Oujda et celle de Berkane. Un œdème facial au niveau de la tête et un jetage nasal ont été également observés. Par contre, concernant la souche d'Azilal, les signes cliniques ont été enregistrés, mais avec une faible intensité.



***Figure 44 : Papules au niveau des oreilles et œdème facial.***



***Figure 45: Croûtes au niveau de la tête.***



***Figure 46 : Décharges nasales et oculaires***

### 3- Suivi virologique et sérologique :



**Figure 47 : Généralisation de la maladie**

#### a- Suivi virologique et ré-isolément viral:

La PCR en temps réel réalisée sur les prélèvements de sang des animaux infectés (tableau XIII) a montré une faible détection de l'ADN viral claveléux même durant la période de la virémie (J5 à J10), où une hyperthermie a été enregistrée chez les ovins inoculés avec les souches Oujda et Berkane. Des taux élevés du virus ont été cependant, obtenus dans les prélèvements du tissu inflammatoire et de la lymphe, suite aux Ct obtenus précocement.

**Tableau XIII : Résultats de la PCR en temps réel réalisée sur les prélèvements de sang total et les prélèvements de biopsie (tissu inflammatoire et lymphe) des moutons inoculés.**

	Sang total (Ct)				Broyat tissu inflammatoire (Ct)	Lymphe (Ct)
	J0	J3	J6	J9		
<b>Ovin Berkane (BeniChiker)</b>	37,47	39,70	37,53	45	18,15	17,18
<b>Ovin Oujda 1</b>	39,65	43,03	36,70	36,45	22,62	35,54
<b>Ovin Oujda 2</b>	38,29	45	37,80	37,58	17,25	23,45
<b>Ovin Azilal</b>	39,59	37,86	38,61	38,68		

#### b- Suivi sérologique :

La séroneutralisation effectuée sur les prélèvements de sérums, à J7 et J10 après inoculation, a montré la présence d'anticorps anti clavelée avec des titres de 0,9 chez un mouton le 7<sup>ème</sup> jour qui suit l'infection. Le 10<sup>ème</sup> jour après inoculation, l'ensemble des animaux inoculés

ont montré une séroconversion avec des titres représentatifs pour la souche de Berkane (Tableau XIV), alors que la souche d’Azilal n’a pas présenté une immunité anti-claveuse.

**Tableau XIV: Titres des anticorps neutralisants chez les 4 ovins inoculés.**

	Oujda1	Oujda2	Berkane	Azilal
<b>J0</b>	--	--	--	--
<b>J7</b>	--	--	0.9	<0.66
<b>J14</b>	1.02	1.26	1.38	--

**4- Titrage In-Vivo :**

Parmi les 4 souches inoculées sur moutons, trois souches ont été choisies pour le titrage *in vivo* (souches de Berkane, Oujda N°1 et 2), car elles ont montré une pathogénécité forte caractérisée par une hyperthermie, des signes cliniques généralisés et une charge virale considérable dans le tissu inflammatoire et lymphatique.

Dès le 3<sup>ème</sup> jour suivant l’injection des dilutions virales par voie sous cutanée, on a observé l’apparition d’une réaction locale au niveau du point d’injection. Le 9<sup>ème</sup> jour, et pour l’ensemble des souches virales, une réaction généralisée s’est produite par l’apparition des papules et des croûtes chez les 3 moutons (figures 48, 49 et 50). La lecture du titre infectieux a donné les résultats rapportés dans le tableau XIV.



**Figure 48 : Réactions locales aux points d’injection de la souche de Berkane.**



**Figure 49 : Réactions locales aux points d’injection de la souche d’Oujda N°1.**



**Figure 50** : Réactions locales aux points d’injection de la souche d’Oujda N°2.

**Tableau XV** : Résultats de la lecture des titrages *in vivo*.

	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
<b>Oujda 1</b>	5+/5	5+/5	5+/5	5+/5	1+/5	0+/5	0+/5
<b>Oujda 2</b>	5+/5	5+/5	5+/5	5+/5	3+/5	0+/5	0/5
<b>Berkane(BeniChiker)</b>	5+/5	5+/5	5+/5	5+/5	5+/5	1+/5	0+/5

Selon la méthode de Spearman Karber exprimé en log DR 50/ml (Doses Réactionnelles 50%) on a obtenu les titres présentés dans le tableau XVI. Les résultats obtenus confirment que la souche de la région de Berkane (Benichiker) représente le titre infectieux le plus élevé en comparaison avec les deux autres souches d’Oujda testées.

**Tableau XVI**: Titres infectieux des 3 souches virales *in vivo*.

	Oujda1	Oujda2	Berkane
<b>Titres infectieux</b>	5.7	6.1	6.7

#### IV- DISCUSSION :

Dans cette étude, nous avons évalué le pouvoir pathogène de quatre isolats marocains du virus de la clavelée, ayant satisfait les contrôles biologiques de laboratoire. Les 4 souches virales sont de différentes régions du royaume : Oujda N°1 et N°2, Berkane (Benichiker), et Azilal.

Les cultures de cellules de cœur d’agneau (ICO1) semblent représenter une bonne permissivité et multiplicité pour les souches utilisées du virus de la clavelée. En effet, les résultats obtenus après inoculation des souches virales montrent que l’ECP se manifeste à partir du 2<sup>ème</sup> jour pour les isolats de Oujda N°1 et 2 et de Berkane, cet effet est caractérisé par l’apparition de foyers qui sont constitués de cellules arrondies, très réfringentes, bien visibles et individualisées [El Harrak, 1987 ; Hosamani et al., 2008 ; Sadri et Fallahi, 2010 ; OIE, 2017].

La nécrose cellulaire se manifeste le 6<sup>ème</sup> jour après l'inoculation virale pour les mêmes isolats, ce qui aboutit à la destruction totale de l'assise cellulaire. Par contre, la souche d'Azilal n'a pas montré d'ECP qu'à partir du 6<sup>ème</sup> jour du premier passage.

Après le 2<sup>ème</sup> passage, les isolats d'Oujda, Berkane, et Azilal ont montré un ECP caractéristique à partir du 2<sup>ème</sup> jour d'incubation, alors que les souche d'Errachidia et Haouz n'ont rien montré et cela peut être dû d'une part aux conditions et à la durée de conservation des souches virales (la plupart des souches sont isolées et conservées dans les années 90), ou d'autre part, au type de cellules et de la multiplicité d'infection utilisés, ainsi qu'à la période de récolte, selon les résultats obtenu par Achour et *al.* (2000).

D'autre part, des études réalisées par Fakhfakh et *al.* (2005) ont montré que les souches étudiées ont présenté le même aspect d'ECP sur culture cellulaire, qui est caractéristique du virus de la clavelée, mais sur PCR en temps réel elles étaient négatives, c'est-à-dire que ces souches peuvent être un autre virus tel que le virus de l'echtyma contagieux (ORF) qui touche les ovins et donne les mêmes signes que le virus de la clavelée, que ça soit sur culture cellulaire ou sur les animaux (croutes, papules, etc.).

Après l'infection expérimentale, une augmentation du diamètre de la région d'inoculation est observée avec durcissement de la peau et inflammation, pour atteindre son maximum entre le 8<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour pour les deux souches d'Oujda et Berkane, les mêmes résultats ont été obtenus par Bowden et al, 2008, par contre la souche d'Azilal n'a pas montré de réaction locale significative.

D'après le relevé thermique obtenu, la température reste stable durant les quatre jours post-inoculation. L'hyperthermie s'est manifestée à partir du 5<sup>ème</sup> jour pour atteindre 41°C pour les deux souches d'Oujda et la souche de Berkane puis elle a diminué vers le 10<sup>ème</sup> jour pour la souche Oujda2, ce qui confirme les résultats obtenus par Bowden et *al.* (2008) et ceux rapportés par Mirzaie et *al.*, (2015) ainsi que Wolff et *al.*, en 2020, alors que les souches d'Oujda1 et Berkane, elles ont gardé leur hyperthermie. Concernant la souche d'Azilal, la température reste stable et normale pendant toute la période de l'expérimentation.

Les signes cliniques apparaissent dès le 6<sup>ème</sup> jour, par la généralisation de la maladie chez tous les moutons, avec une manifestation des éruptions cutanées sous forme de papules partout sur le corps de l'animal et des croûtes au niveau de la tête, avec des sécrétions nasales et abattement qui sont observées, surtout chez les animaux inoculés par les 2 souches d'Oujda et celle de Berkane. Ces manifestations cliniques ont été rapportées par plusieurs chercheurs [Afshar et *al.*, 1986 ; Bowden et *al.*, 2008 ; El Harrak, 1987 ; FAO., 2000 ; Fassi Fehri et al, 1983 ; Fassi Fehri et al, 1984 ; Mirzaie et *al.*, (2015) ; OIE., 2017 ; Wolff et *al.*, 2020]. La

souche d'Azilal, par contre, n'a pas montré de signes cliniques importants. En effet, la température est restée stable (39,4°C) durant toute la période de l'expérimentation, chose qui nous mène à dire que cette souche virale est moins pathogène que les autres souches testées. Les mêmes résultats qui confirment que le degré de pathogénicité et sa gravité diffère d'une souche à l'autre ont été obtenus par d'autres auteurs [Achour et *al.*, 2000 ; Bowden et *al.*, 2008].

Le titrage du virus de la clavelée sur culture cellulaire a donné des résultats qui oscillent entre 5,8 DICT50/ml pour la souche d'Azilal et 7,32 DICT50/ml pour la souche de Berkane. Selon Achour et *al.* (2000), le titre obtenu *in vitro* était relativement faible entre  $10^3$  et  $10^5$  DICT50, et entre  $10^{-6,5}$  et  $10^{-6,7}$  pour Sadri et Fallahi (2010).

Le titrage sur le flanc des moutons, des deux souches d'Oujda et celle de Berkane, a entraîné la généralisation de l'infection, sous forme de manifestations cutanées, partout dans le corps de l'animal, et une augmentation du diamètre des points d'injection (jusqu'à la dilution  $10^{-6}$  pour la souche de Berkane), avec une hyperthermie qui apparaît dès le 5<sup>ème</sup> jour après l'inoculation pour la souche de Berkane, et à partir du 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour pour les 2 souches d'Oujda, les mêmes résultats ont été obtenus par Achour et *al.* (2000). Les titres obtenus sont de 5,7 DR50/ml pour la souche d'Oujda N°1, 6,1 DR50/ml pour la souche d'Oujda N°2 et de 6,7 DR50/ml pour la souche de Berkane. D'après les résultats obtenus à partir des titrages infectieux des souches virales, on peut déduire que le titrage *in vivo*, donne des titres infectieux inférieurs à ceux du titrage *in vitro*, pour la souche de Berkane et les deux souches d'Oujda.

La plupart des auteurs apprécient les propriétés immunogènes du virus de la clavelée [Achour et *al.*, 2000 ; Amitha et *al.*, 2010 ; Fassi Fehri et *al.*, 1984]. La séroneutralisation réalisée le 7<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour post-inoculation montre que tous les animaux ont séroconverti avec des titres neutralisants élevés allant de 0,9 à 1,38 pour la souche de Berkane. Ce qui signifie la présence d'anticorps neutralisants anti-clavelée dans les sérums à tester. Pour plusieurs auteurs, ces anticorps ne présentent pas une bonne protection contre le virus de la clavelée [Achour et *al.*, 2000 ; Amitha et *al.*, 2010], ceci explique le cas de la souche d'Azilal, puisqu'on n'a pas noté la présence d'anticorps dans le sérum du mouton inoculé, mais une résistance contre le virus inoculé décrite par la guérison de la maladie a été remarquée. Selon Diallo et *al.*, 2010, les animaux qui survivent à la maladie présentent une immunité solide et durable.

Afshar et *al.* (1986) et Balinsky et *al.* (2008), ont noté que les anticorps neutralisants apparaissent à partir du 14<sup>ème</sup> jour après l'inoculation par la souche virale. Or, pour Amitha et *al.* (2010) ils apparaissent vers le 21<sup>ème</sup> jour.

Les résultats obtenus par la technique de la PCR en temps réel montrent la présence du virus, avec des Ct significatifs, dans le tissu inflammatoire et la lymphe, ce qui confirme la présence d'une charge virale très élevée dans les échantillons de biopsie, pour les trois souches étudiées, et cela est en accord avec les résultats obtenus par plusieurs chercheurs [Balisky et al, 2008 ; Heine et al, 1999 ; Ireland et Binopal, 1998 ; Mangana-Vougiouka et al, 1999 ; Wolff et al., 2020]. Par contre, les résultats étaient très faibles et même nuls pour la virémie dans le sang.

L'absence du virus dans les prélèvements sanguins peut être due, selon Balisky et al. (2008), Bowden et al. (2008) et Zro et al., 2014, à la présence d'inhibiteurs dans le sang, ou à une basse virémie associée aux infections par le virus de la clavelée.

On peut dire aussi que, cette absence peut être due à la sensibilité des kits utilisés pour la détection du virus dans le sang, ou même que le virus emprunte d'autres voies pour circuler dans le corps de l'animal (par exemple : la voie lymphatique car nous avons détecté une charge virale très élevée dans la lymphe).

#### **V- CONCLUSION :**

L'étude expérimentale réalisée dans ce chapitre nous a permis de tracer un profil du pouvoir pathogène de chacune des souches analysées, par la détermination des titres infectieux *in vitro* et *in vivo*, et la description de la pathogénicité de ces souches par infection expérimentale et suivi clinique. Selon les résultats obtenus, la souche de Berkane semble être la plus pathogène. Afin de bien comprendre pourquoi une souche est plus pathogène qu'une autre, on aura recours à la modélisation des structures 3D des deux protéines séquencées de la souche de Berkane en comparaison avec la souche vaccinale atténuée utilisée au Maroc.

## **CHAPITRE III**

# CHAPITRE III : ETUDE DE LA STRUCTURE DE LA PROTEINE D'ENVELOPPE P32 et la RPO30 EN TRI- DIMENSION (3D) PAR LA MODELISATION MOLECULAIRE

## I- INTRODUCTION :

Depuis toujours, le degré de pathogénicité du virus de la clavelée a été lié à la race ou l'âge des moutons infectés et même à leur immunité, mais il n'existe pas de rapports qui expliquent pourquoi une souche est dite plus ou moins pathogène qu'une autre. L'objectif donc de ce chapitre, est la comparaison de la structure tridimensionnelle de la protéine d'enveloppe P32 et la protéine RPO30 de la souche Marocaine la plus pathogène et la souche vaccinale atténuée du virus de la clavelée utilisée au Maroc. En étudiant les épitopes prédits et le mécanisme d'action de ces protéines, nous souhaiterons déterminer s'il existe une relation entre le degré de pathogénicité de chaque souche et la conformation de ces protéines en 3D.

## II- MATERIEL & METHODES :

### 1- Modélisation des structures protéiques

La bioinformatique est une approche innovante dans les recherches récentes sur l'analyse de la séquence et la prédiction de la structure des protéines. Avec l'apparition de la bioinformatique, il est maintenant possible de comprendre la relation entre la séquence d'acides aminés et la structure tridimensionnelle (3D) des protéines. L'un des défis principaux de la bioinformatique est l'optimisation de la masse des informations contenues dans une séquence non seulement pour dériver des moyens efficaces de stockage et de récupération des données à partir d'une séquence, mais aussi pour concevoir plus d'outils d'analyse. Ainsi, il existe un besoin continu de convertir les informations de séquence en connaissances biochimiques et biophysiques et de déchiffrer les indices structurels, fonctionnels et évolutifs codés dans le langage des séquences biologiques [Attwood et Parry-Smith, 2003].

Chaque séquence d'acides aminés détermine par son repliement une unique structure tridimensionnelle (3D). La connaissance de cette structure est cruciale pour déterminer sa fonction biologique et son mécanisme d'action (activité enzymatique, transport, signalisation, liaison avec un ligand, un récepteur, une membrane, etc.).

A l'heure actuelle, le séquençage des protéines évolue avec un rythme exponentiel, plus d'un million de protéines sont séquencées et sont disponibles dans les bases de données (SwissProt, Protein Research Foundation et Protein Information Resource) [Zhang et al., 2017]. Cependant, le nombre des bases de données de structure protéique est limité, citant PDB (Protein Data Bank) [Berman et al., 2003] et NCBI. La détermination de la structure 3D à partir d'une séquence protéique est un défi expérimental et computationnel faisant rassembler les biologistes, les chimistes et les physiciens. Fondamentalement, des techniques de cristallographie aux rayons X ou de résonance magnétique nucléaire (RMN) sont utilisées, elles sont coûteuses, longues et complexes. Par conséquent, des méthodes prédictives dites *in silico*, rapide et efficace, regroupent un très large ensemble de méthodes numériques fondées sur les lois de la physique, les statistiques et de la chimie qui, utilisant les approches des mathématiques, permettent de simuler ou de modéliser un phénomène biologique à l'aide de l'outil informatique. Généralement il existe 2 grandes classes : les méthodes de « modélisation comparative » dite « Homologie » et les méthodes « ab initio ». Les premières dépendent de l'existence de protéines homologues dont les structures ont été déterminées expérimentalement. Les secondes méthodes ne se basent que sur des lois physiques et statistiques. Les algorithmes utilisés par ces derniers, sont très gourmands en temps de calcul et les résultats obtenus progressent avec les progrès en informatique. A l'heure actuelle, et malgré les immenses progrès des méthodes "ab initio", les méthodes comparatives sont encore celles qui proposent les meilleures prédictions [Tam et al., 2003 ; PiuZZi, 2010].

#### **a- Modélisations des protéines P32 et RPO30**

Pour répondre à la problématique évoquée, un alignement des séquences protéiques pour valider l'homologie a été effectué. Dans cette étude la modélisation est faite en utilisant I-TASSER, puis avec COACH et un autre Meta serveurs afin de déterminer les sites actifs immunogènes de ces deux protéines.

Dans ce chapitre nous nous intéressons essentiellement à la modélisation tridimensionnelle (3D) de la structure des protéines P32 et RPO30. A partir de la séquence protéique dont la structure 3D est déjà analysée par alignement protéique, nous allons rechercher des séquences homologues, afin de les détecter et les appliquer sur notre modèle décrit par PiuZZi en 2010. Toutes ces manipulations ont été élaborées par le logiciel CHIMERA V.01.

Vu des scores échéants d'homologie, nous avons passé par la suite à l'*ab initio* comme techniques qui se base sur les lois physiques et statistiques permettant de réduire l'erreur au niveau prédictive.

La modélisation 3D a été réalisée avec I-TASSER, qui est un serveur offrant un service de prédiction de la structure et la fonction d'une protéine. Il permet aux utilisateurs académiques de produire des modèles 3D de qualité à partir de la séquence d'acides aminés. Les résultats fournis par I-TASSER sont sous forme de plusieurs modèles 3D classés selon un score « TM-score ». Il est considéré qu'un score supérieur à 0.5 indique que le modèle généré a une topologie correcte. Cependant un score inférieur à 0.17 indique une ressemblance aléatoire.

Après la modélisation 3D, l'étape suivante était le calcul et la détermination du site actif des régions modélisées, le site où a lieu l'interaction ligand qui a pour résultat l'activation ou la désactivation de la fonction biologique de celle-ci.

Le calcul du site actif a été réalisé avec COACH qui est un méta-serveur pour la prédiction du « ligand binding domaine ». Il est disponible avec la suite de programme dans le site d'I-TASSER, les modèles 3D générés par ce dernier sont pris par COACH pour prédire tous les sites actifs avec leurs ligands. Les sites actifs obtenus par COACH sont des coordonnées sous cette forme de «X/Y/Z/Xs/Ys/Zs» ou «X, Y et Z» présentent la position du site actif dans l'espace tridimensionnel et pour «Xs, Ys, et Zs» présentent la taille de la boîte contenant le site actif immunogène.

Le RAMACHANDRAN est un indicateur qui permet de contrôler la qualité des structures protéiques déterminées par cristallographie ou RMN, il nous donne des informations sur la conformation de la protéine en 3D. Grâce à ce diagramme, nous pouvons identifier les structures secondaires potentielles selon les angles de torsions, deux types de cette dernière peuvent engendrer par un acide aminé, soient l'angle phi ( $\phi$ ), et l'angle psi ( $\psi$ ).

L'angle psi ( $\Psi$ ) est l'angle de rotation autour de la liaison C $\alpha$ -C (de C=O) du plan 1 et l'angle phi ( $\phi$ ) est celui de rotation autour de la liaison C $\alpha$ -N (de N-H) du plan 2.

Dans ce diagramme de RAMACHANDRAN, les feuillets bêta sont situés dans le quadrant supérieur gauche quand les angles phi sont plus petits que -30 et lorsque les angles psi sont plus grands que 90 [Bergeron, 2010]. Puis, les hélices alpha tournant vers la gauche sont dans la partie supérieure à droite alors que les hélices alpha tournant vers la droite sont dans la partie inférieure à gauche [Piuzzi, 2010].

## **2- Evaluation de la qualité de la modélisation 3D de la protéine P32 et RPO30**

L'évaluation de la qualité de la protéine, la modélisation, la conformation et la protéine en 3D a été réalisé par "PROSESS : Protein Structure évaluation Suite & Server". Le PROSESS est un serveur web conçu pour évaluer et valider les structures de protéines et permet d'intégrer une variété d'analyse:

- Qualité covalente et géométrique

- La qualité liaison non covalente
- La qualité de l'angle de torsion
- La qualité de déplacement chimique

Le PROSESS produit des tableaux détaillés avec des explications, des images et des graphiques qui résument les résultats en les comparant avec des valeurs observées dans les structures de protéines de haute qualité. Ce serveur est utilisé pour coordonner l'emplacement de liaisons hydrogènes, structure secondaire et l'analyse géométrique, ainsi que pour le calcul de repliement et l'énergétique de solvants et des corrélations de déplacement chimique, corrélérer la mobilité de la structure avec le déplacement chimique et ainsi que pour le calcul de l'angle de torsion et les changements chimiques [Berjanskii et al., 2010].

### 3- Prédiction des épitopes des Cellules B et T :

La séquence aminoacide de la protéine d'enveloppe à été soumise aux serveurs (tableau XVII et XVIII), par la suite les séquences ont subi une procédure de datamining pour sélectionner les séquences communes entre les différents outils.

**Tableau XVII:** liste des outils web disponibles pour la prédiction continue des épitopes des cellules B et T.

Outils	Source (URL)	Fichiers d'entrée
ABCPred	<a href="http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/">http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/</a>	FASTA
BCPREDS	<a href="http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/">http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/</a>	FASTA
BepiPred	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred">http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred</a>	FASTA or FASTA file
LBtope	<a href="http://crdd.osdd.net/raghava/lbtope/">http://crdd.osdd.net/raghava/lbtope/</a>	FASTA or FASTA file
Bcepred	<a href="http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/">http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/</a>	FASTA or FASTA file
SVMTriP	<a href="http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/">http://sysbio.unl.edu/SVMTriP/</a>	FASTA

**Tableau XVIII:** liste des outils web disponibles pour la prédiction discontinue et conformationnelle des épitopes des cellules B et T.

Tool	Source (URL)	Input data
DiscoTope	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope-2.0/">http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope-2.0/</a>	PDB ID or PDB file
BePro (PEPITO)	<a href="http://pepito.proteomics.ics.uci.edu/">http://pepito.proteomics.ics.uci.edu/</a>	PDB ID or PDB file
ElliPro	<a href="http://tools.immuneepitope.org/ellipro/">http://tools.immuneepitope.org/ellipro/</a>	FASTA or Swiss-Prot ID

Tool	Source (URL)	Input data
SEPPA	<a href="http://badd.tongji.edu.cn/seppa/">http://badd.tongji.edu.cn/seppa/</a>	PDB ID or PDB file
EPITOPIA	<a href="http://epitopia.tau.ac.il/">http://epitopia.tau.ac.il/</a>	FASTA/PDB ID or PDB file
CBTOPE	<a href="http://www.imtech.res.in/raghava/cbtope/">http://www.imtech.res.in/raghava/cbtope/</a>	FASTA or FASTA file
EPCES	<a href="http://sysbio.unl.edu/EPCES/">http://sysbio.unl.edu/EPCES/</a>	PDB ID or PDB file
EPSVR	<a href="http://sysbio.unl.edu/EPSVR/">http://sysbio.unl.edu/EPSVR/</a>	PDB ID or PDB file
PEASE	<a href="http://www.ofranlab.org/PEASE">http://www.ofranlab.org/PEASE</a>	Ag PDB ID or PDB file Ab FASTA or FASTA file
EpiPred	<a href="http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/sabdab-sabpred/EpiPred.php">http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/sabdab-sabpred/EpiPred.php</a>	PDB ID or PDB file

### III- RESULTATS ET DISCUSSION

#### 1- Modélisations de la protéine *P32* et *RPO30*

##### a- Conformation spatiale de la structure *P32* et *RPO30* en 3D

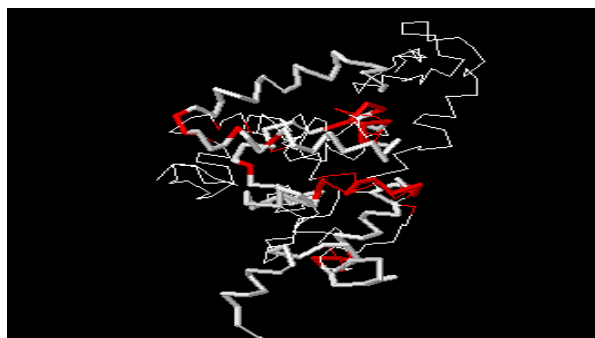
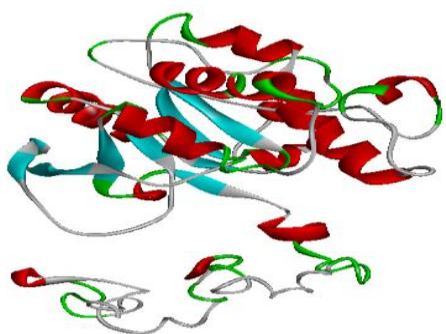
La connaissance des structures 3D et des fonctions des macromolécules dans l'étude des interactions hôte-pathogène est très importante. Ainsi, pour la prédiction de la structure 3D des protéines *P32* et *RPO30*, nous avons adopté la voie computationnelle.

Les résultats obtenus après l'analyse par homologie ont révélé l'inexistence des structures cristallisées de la protéine d'enveloppe et la *RPO30* dans les bases de données.

En raison de l'absence d'un homologue étroit avec la structure et la fonction connues de la *P32* et la *RPO30*, nous avons fait appel aux outils de l'*ab initio* et la possibilité de produire un modèle structurel à l'aide des serveurs de prédiction de structure via I-TASSER.

La structure 3D de la *P32* n'a pas montré de différences et ce, à cause de la conservation totale de la séquence protéique du gène séquencé (de plus de 100 séquences depuis 1996 jusqu'à 2017).

L'analyse de structure 3D de la protéine *RPO30* de la souche pathogène et vaccinale a démontré une différence dans la région C terminale qui prédit être un épitope, ces mutations provoquent une chute du score prédictif des épitopes, ce qui influence les types de reconnaissances déclarés, la figure démontre les régions différentes en rouge entre les deux structures et les régions identiques sont colorées en blanc (Figure 51 et figure 52).



**Figure 51:** Structure en 3D de la RPO30 sous forme Helice prédite par I-Tasser de la souche pathogène et vaccinale

**Figure 52:** Structure en 3D de la RPO30 avec les régions différentes entre les deux souches en rouges selon TM-align

La confiance pour la qualité des modèles prédits est donnée par le C-score qui est égal à -2.8 pour la P32 et de -2.5 pour la RPO30 selon Roy (2010), cette valeur doit être comprise entre -5 et 2) ce qui signifie que ces modèles sont biologiquement fonctionnels. Alors que la similitude topologique entre ce modèle et le modèle exprimé par le score TM, est de l'ordre de  $0.4 \pm 0.15$  et  $0.5 \pm 0.15$  pour la P32 et la RPO30 respectivement. La RMSD des protéines modélisées est de l'ordre de 12.7 et  $9.3 \pm 4.2 \text{ \AA}$  respectivement.

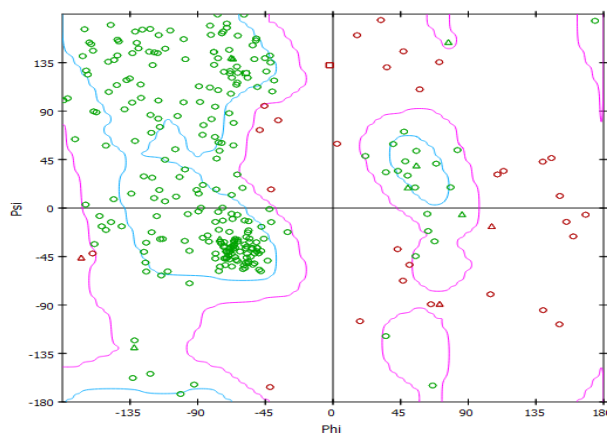
#### **b- Stabilité de la structure des protéines P32 et RPO30 en 3D**

Les structures modèles obtenues ont subi une évaluation via RAMACHANDRAN et Progress server. Le modèle de référence a une qualité moyenne de 2.5 et une qualité de liaison covalente de 3.5, angles non-covalents (3.5) et de torsion (1.5) calculés par l'outil serveur PROCESS. Les régions définies à l'aide des paramètres ProCheck (Morris A L1992) ont répertorié 88,5% des résidus dans les régions les plus favorisées et 11,5% des résidus dans les régions autorisées supplémentaires du diagramme de Ramachandran (Figure 53).

L'analyse de l'indice d'instabilité a permis de mesurer la stabilité de la protéine dans le tube de test, cet indice est de 53.79 ce qui signifie que la P32 et la RPO30 ont une stabilité moyenne cependant leur demi-vie prévue par protparam est supérieure à 20h *in vivo* est plus de 30h dans les réticulocytes mammaliens *in vitro*. L'importance interprétée dépend de la durée du cycle virale dans la cellule.

L'indice aliphatique d'une protéine est défini comme le volume relatif occupé par les chaînes latérales aliphatiques (alanine, valine, isoleucine et leucine). Il peut être considéré comme un facteur positif pour l'augmentation de la thermo stabilité des protéines globulaires. Il est de 73.42 avec une grande moyenne d'hydrophatie (GRAVY): -0.637.

Sur la base des résultats de l'évaluation, le modèle peut être utilisé de manière fiable pour les études de répartition structurelle et de charge, ainsi que pour l'analyse d'acides aminés fonctionnels et l'alignement des séquences multiples.



**Figure 53: Diagramme de RAMACHANDRAN**

**2- Prédiction des épitopes**

L'immunité anti-clavelée implique à la fois la réponse immunitaire humorale (Lymphocytes B) et la réponse immunitaire à médiation cellulaire (Lymphocyte T)

**a- Epitopes des lymphocytes B**

Les séquences sont soumises à différents algorithmes afin d'étudier l'accessibilité, l'hydrophobicité, la flexibilité et l'antigénicité.

Les résultats de l'étude ont montré qu'au niveau des cellules B, il existe deux épitopes avec une forte probabilité d'antigénicité et d'immunogénicité. Le 1<sup>er</sup> épitope est situé parmi les acides aminés 3 et 30, et le second épitope est localisé parmi les AA 140 et 170 avec une accessibilité et une flexibilité supérieure à +3. Cependant, la spécificité est d'environ 85% avec un seuil d'environ 60%. (Tableau XIX). Ces régions de séquences ont été caractérisées par près de 5 résidus avec un score supérieur à 4 pour l'IEPD.

**Tableau XIX : Epitopes prédits au niveau des cellules B.**

Positions	Epitopes	Score
15	DIYKYVKEK	0.988
107	ILRYILFGIKCVQKN	0.904

**b- Epitopes reconnus par les lymphocytes T**

Pour les épitopes reconnus par les cellules T, et puisque la complexité de la structure 3D modélisée par i-tasser a été soumise à la liste 2 du serveur et selon la nature d'épitope, le processus d'exploration des données était plus complexe en se basant sur la région puis sur les

parties communes entre les régions. Les résultats étaient très divers et complexes mais les épitopes les plus communs sont résumés dans le Tableau XX.

**TableauXX : Epitopes prédits au niveau des cellules T.**

Positions	Epitopes	Score
133 à 150	DKKYNLPCPECKSKNTIP	0,785
16 à 38	KLSYRNKPLIDTNKEYSDICNLIRTTNGTE	0,757

➤ **Epitopes discontinus prédits**

Les épitopes conformationnels sont: (A:I126, A:R130, A:D131, A:I132, A:N133, A:E135, A:E136, A:F138, A:N139, A:D142, A:K143, A:K144, A:Y145, A:N146, A:L147, A:P148, A:C149, A:P150, A:E151, A:C152, A:K153, A:S154, A:K155, A:N156, A:T157, A:I158, A:P159, A:V160, A:I162, A:V168, A:P170, A:L171, A:C172, A:R173, A:S174, A:V175) et (A:M1, A:D2, A:D3, A:D4, A:N5, A:T6, A:T7, A:P8, A:Q11, A:D12, A:E14, A:D15, A:I16, A:Y18, A:K19, A:V21, A:K22, A:E23, A:K24, A:S25, A:K26, A:V27, A:K28, A:E29, A:I47, A:N48, A:T49, A:K50, A:S51, A:N52, A:I53, A:E54, A:E55, A:T56, A:K57, A:F58, A:E59, A:P60, A:R61, A:N62, A:E67, A:S69, A:K70, A:D71, A:S72, A:K73, A:N74, A:K75, A:L76, A:S77, A:Y78, A:R79, A:N80, A:K81, A:P82, A:L83, A:I84, A:D85, A:T86, A:N87, A:K88, A:E89, A:S91, A:D92, A:I93, A:C94, A:N95, A:L96, A:I97, A:R98, A:T99, A:T100, A:N101, A:G102, A:T103, A:E104, A:K105, A:E106, A:I107, A:F113), ces épitopes ont quelques résidus en commun avec les épitopes linéaires B et T.

En combinant les résultats de la prédiction des épitopes linéaires et conformationnels, deux épitopes étaient clairement immunogènes. Les acides aminés d'arginine (R), d'acide glutamique (E) et de lysine (K) sont les plus fréquents dans les protéines. Ces acides aminés contiennent des chaînes latérales avec des groupes fonctionnels basiques (arginine, lysine) et acides (acide glutamique) qui permettent la formation de liaisons ioniques (liaisons électrostatiques) et de liaisons hydrogène, ce sont les interactions qui se produisent également lorsque l'anticorps reconnaît l'épitope.

Ces acides aminés sont également des résidus avec des valeurs scalaires plus importantes, ils constituent aussi un facteur important pour l'immunogénicité d'un antigène ou d'un peptide synthétique. Ces résultats indiquent que les épitopes linéaires de lymphocytes B prédits simultanément dans cette étude en utilisant les trois programmes sont de bons candidats à tester dans des dosages diagnostiques et des vaccins contre le virus.

L'identification d'épitopes utilisant la bioinformatique présente encore des limites, et des études sont donc nécessaires pour améliorer la précision des méthodes de prédiction des

épitopes à reconnaître par les cellules B. Selon Greenbaum et *al.*, 2002, une meilleure précision peut être obtenue en améliorant la qualité des bases de données existantes, qui contiennent des épitopes mal définis. Ceci est important car les méthodes de prédiction utilisent des bases de données épitopiques pour évaluer l'efficacité de la méthode.

Les résultats de prédiction produits par plusieurs méthodes peuvent être différents, il peut être plus approprié d'utiliser plusieurs outils pour obtenir des résultats plus cohérents et plus précis, ce qui était l'approche utilisée dans cette étude. Par la suite, les données bioinformatiques doivent être confirmées par des essais au laboratoire afin que l'information soit introduite plus précisément dans les bases de données.

#### **IV- Conclusion**

L'hypothèse supposant que la *P32* est une protéine responsable de pathogénéicité a été rejeté par le dite travail qui a démontré la conservation totale de ce gène et par conséquent, il est peut-être dépourvu de l'impact sur l'effet immunologique et antigénique. Alors que pour la protéine *RPO30* la différence observée au niveau de la région C terminal, provoque des déformations structurelles de la région « ARVPPLCRSV » qui est typiquement un épitope linéaire pour la souche vaccinale. Après l'accumulation d'une série des mutations, l'effet antigénique a diminué et le score prédictif de l'immunogénicité prévue a subi une chute remarquable de 90% à 30% avec le changement de la reconnaissance linéaire à une reconnaissance discontinue par les cellules T après présentation via les DC (les Dendritic cells) et les cellules présentatrices (PCS). Tout cela permet de supposer que l'une des causes influençant l'effet antigénique des souches vaccinales atténuées est due dans une partie à l'ensemble des mutations accumulées au niveau de la région C terminal de la protéine *RPO30*.

## **CHAPITRE IV**

## **CHAPITRE IV: PRODUCTION ET CONTRÔLES D'UN NOUVEAU VACCIN INACTIVÉ CONTRE LA CLAVELEE**

### **I- INTRODUCTION :**

Au Maroc, l'élevage ovin est menacé par les infections liées au SPV, vu que la maladie est toujours présente au royaume, elle a été déclarée par les services vétérinaires responsables en janvier 2017. Elle représente un danger sérieux à cause des pertes économiques importantes.

La lutte contre ce virus, se fait principalement à travers la vaccination régulière des moutons en utilisant le vaccin vivant atténué Roumania. Ce dernier donne des effets secondaires remarquables chez les moutons vaccinés. Pour cette raison, nous avons opté à produire un vaccin inactivé, adjuvé à partir de la souche de Berkane identifiée et caractérisée par les techniques de biologie moléculaire (séquençage et phylogénie), et par l'étude de son pouvoir pathogène et immunogène chez les moutons inoculés ainsi que par la modélisation des structures 3D des protéines.

Pour des raisons de confidentialité le nom des produits utilisés ne peut être communiqué et rendu publique.

### **II- MATERIEL ET METHODES**

#### **1- Vaccin :**

Produit à partir de la souche Berkane P5 ré-isolée sur moutons à partir du tissu inflammatoire, au cours de l'expérimentation réalisée au chapitre II de la partie 2 et qui a subi 3 passages sur cellules ICO1 afin de réaliser la production d'antigène (PA).

Ces cellules sont spécialement préparées pour produire le vaccin, à partir d'un lot de semence caractérisée. La semence de travail est inoculée aux cellules ; qui seront par la suite incubées pendant plusieurs jours, afin de favoriser la multiplication du virus. A la fin de cette période, le surnageant de la culture cellulaire est recueilli. Le vaccin est préparé selon la technologie adoptée par Biopharma pour la production d'un vaccin inactivé.

Ce vaccin est adjuvé à l'hydroxyde d'alumine.

#### **2- Souche d'épreuve**

La souche utilisée pour le contrôle d'efficacité du vaccin produit est la souche sauvage de Berkane produite sur moutons comme décrit dans le chapitre II de la partie 2.

### **3- Animaux**

Afin d'évaluer l'innocuité et l'efficacité du vaccin produit, 8 ovins de race locale, de sexes et âges confondus, non vaccinés et issus de mères non vaccinées et séronégatifs à la clavelée ovine ont été utilisés.

Ces animaux sont hébergés au sein de l'animalerie de Biopharma sous les conditions exigées par l'organisation mondiale de la santé animale (OIE).

### **4- Préparation de la culture virale**

La préparation de la culture cellulaire et l'inoculation virale ont été décrites dans le chapitre I de la partie 2.

### **5- Vaccination des moutons**

L'administration du vaccin s'effectue par voie intramusculaire au niveau de la cuisse, avec la dose vaccinale recommandée par le fabricant. Un rappel vaccinal est réalisé au 14<sup>ème</sup> jour après la première vaccination en utilisant la même dose. 4 moutons ont été vaccinés par 2 lots de vaccin différents : 2 moutons ont reçu 0,3 ml du lot A01 du vaccin inactivé par la  $\beta$ -propiolactone et 2 moutons ont reçu 0,2 ml du lot A02 inactivé par la formaldehyde (ou Formol), d'autre part, un mouton non vacciné est considéré comme témoin de la vaccination.

### **6- Suivi clinique**

#### **a- Contrôle d'innocuité :**

Le test d'innocuité consiste à surveiller les animaux vaccinés par relevé quotidien de la température rectale et par examen clinique minutieux effectué par le même clinicien pendant 15 jours après vaccination. L'examen clinique permet d'évaluer la présence d'éventuels signes cliniques, soit sous forme de réactions locales ou générales liées à l'administration du vaccin.

#### **b- Contrôle d'activité**

Le contrôle d'activité est basé sur la recherche d'anticorps neutralisants dans les sérums d'animaux vaccinés. Ces anticorps sont recherchés avant la vaccination puis chaque 7 jours après la vaccination jusqu'au 35<sup>ème</sup> jour, qui est consacré à l'épreuve virulente.

Ce contrôle est réalisé par la technique de la séroneutralisation sur culture cellulaire, décrite dans le chapitre II de la partie 2 et en annexe.

#### **c- Contrôle d'efficacité par épreuve virulente**

Avant de réaliser le contrôle d'efficacité sur les moutons vaccinés et témoins, ils ont été transportés de la ferme vers l'animalerie de Biopharma en respectant les consignes exigées par l'OIE. Les animaux sont accueillis 3 jours avant l'épreuve afin d'éviter l'administration du virus aux ovins en cas de stress.

L'épreuve virulente est réalisée sur 2 groupes d'animaux (les 4 ovins vaccinés et l'ovin témoin de l'épreuve) au 21<sup>ème</sup> jour après l'administration de la dose de rappel, 1 témoin supplémentaire de l'expérimentation est traité dans les mêmes conditions.

L'évaluation de l'efficacité est effectuée sur flanc rasé des moutons vaccinés et témoin par l'inoculation des dilutions virales de la souche sauvage 'Berkane' par voie sous cutanée. L'indice de protection (IP) est égal à la différence logarithmique entre le titre obtenu sur les animaux témoins (non vaccinés) et celui observé chez les animaux vaccinés, selon la formule suivante :

$$IP = (\text{titre obtenu avec les animaux témoins (non vaccinés)}) - (\text{titre obtenu sur animaux vaccinés})$$

Si  $IP > 2$  : le vaccin induit une protection chez les animaux.

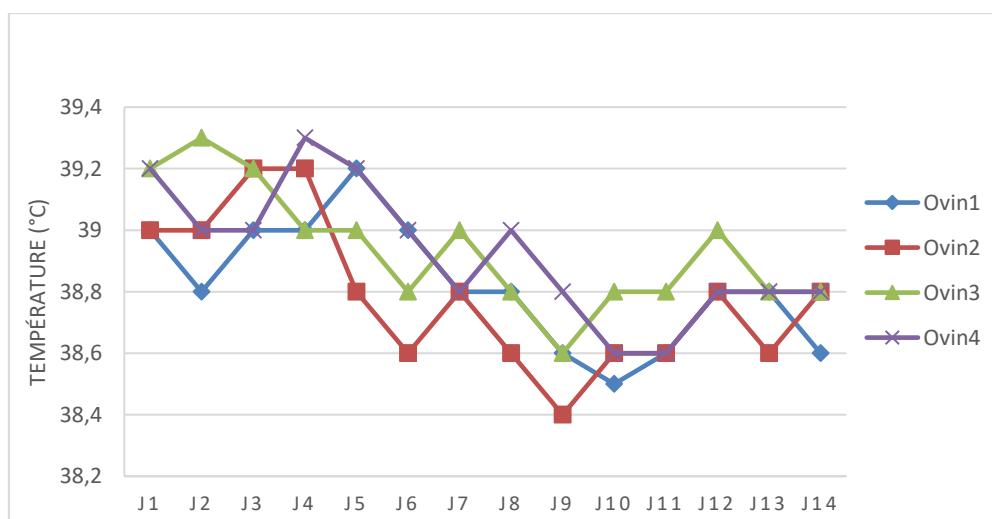
Si  $IP < 2$  : le vaccin n'induit pas de protection.

### III- RESULTATS

#### 1- Contrôle d'innocuité :

##### a- Température rectale :

Après la vaccination, la température corporelle des moutons vaccinés n'a pas montré une augmentation significative ou hyperthermie pour les 2 lots administrés, elle atteint une valeur maximale qui varie entre 39 et 39,3 °C, qui va diminuer par la suite jusqu'à atteindre la température usuelle chez tous les ovins (figure 54).



**Figure 54 :** Températures rectales des 4 ovins inoculés pas les deux lots de vaccins (Lot A01 : Ovin1 et 2 ; Lot A02 : Ovin 3 et 4)

##### b- Réactions locales et générales :

Chez tous les animaux vaccinés, aucune réaction locale au niveau du point d'inoculation, ou générale n'a été observée. Ils se comportent de façon normale sans le moindre symptôme lié au SPV, durant les jours post-vaccination pour les deux lots administrés.

Les deux lots de vaccins sont dotés d'une innocuité parfaite.

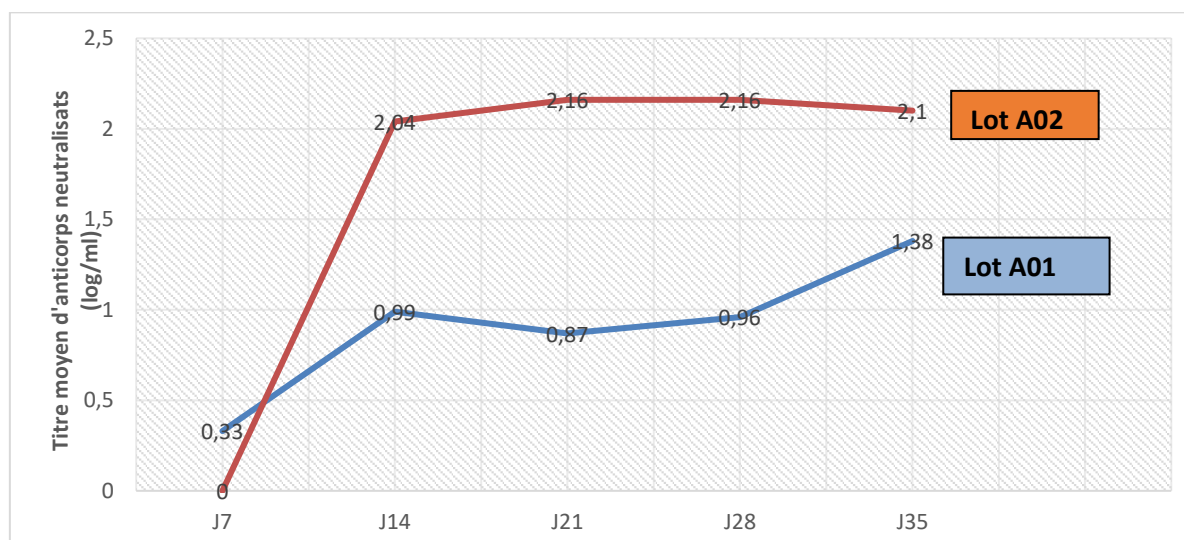
**2- Contrôle d'activité via la recherche d'anticorps neutralisants:**

Le test de la séroneutralisation réalisé chaque 7 jours après la vaccination a montré la séroconversion des animaux par l'installation de l'immunité dès le 14<sup>ème</sup> jour avec des titres importants et ascendants pour les ovins vaccinés par le lot AO2. Les ovins inoculés par le lot A01 ont aussi présenté une réponse sérologique post vaccinale dès le 7<sup>ème</sup> jour avec des titres moins significatifs en les comparant avec le lot AO2 (Tableau XXI).

**Tableau XXI : Cinétique d'apparition des anticorps neutralisants chez les moutons vaccinés : Le chiffre mentionne le titre d'anticorps.**

	A01		A02		Témoin
	Ovin 1	Ovin 2	Ovin 3	Ovin 4	
<b>J0</b>	0	0	0	0	-
<b>J7</b>	≤ 0,66	0	0	0	-
<b>J14</b>	1,98	0	1,86	2,12	-
<b>J21</b>	1,74	0	2,1	2,22	-
<b>J28</b>	1,26	≤ 0,66	2,1	2,22	-
<b>J35</b>	1,86	0,9	1,98	2,22	-

La figure suivante représente le titre moyen des anticorps neutralisants pour les deux lots utilisés :



**Figure 55 : Titre moyen des anticorps neutralisants pour chacun des lots testés (A01 et A02).**

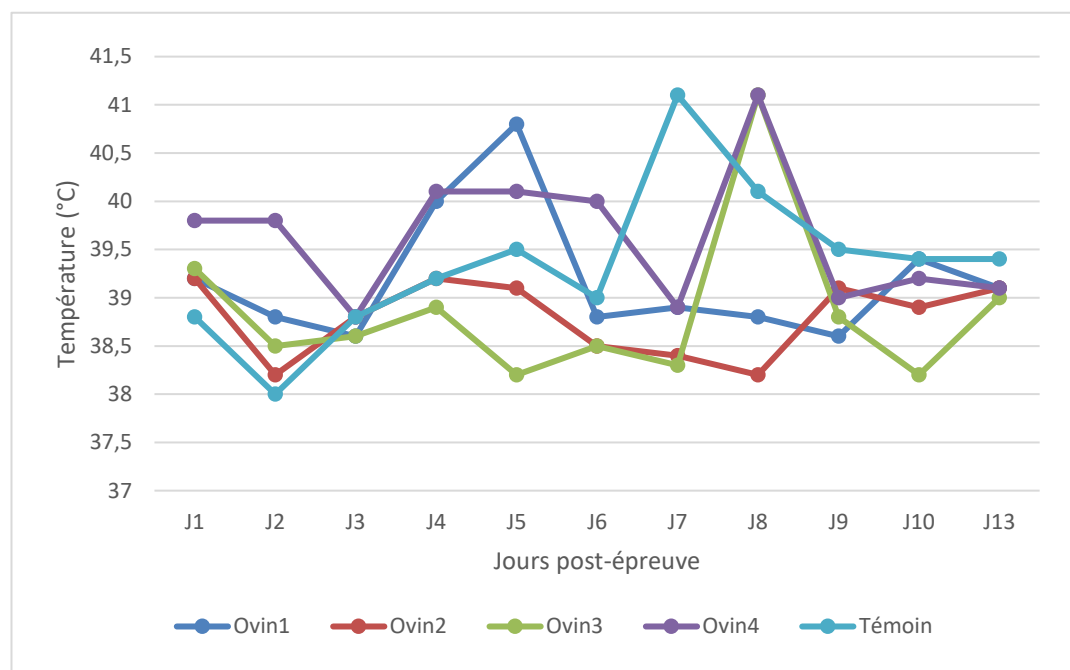
Selon les résultats obtenus, le lot A02 du vaccin inactivé au formaldéhyde donne une bonne séroconversion comparativement au lot A01 du vaccin inactivé par la BPL.

### 3- Contrôle d'efficacité par épreuve virulente : évaluation du pouvoir protecteur du vaccin

L'épreuve virulente est réalisée sur flanc rasé des ovins, par l'administration des dilutions allant de  $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-5}$  et de  $10^{-3}$  jusqu'à  $10^{-7}$  pour les ovins vaccinés et témoins respectivement. La température corporelle est le suivi clinique et sérologique des moutons ont eu lieu chaque jour, 13 à 15 jours après l'administration du virus.

#### a- Suivi de l'hyperthermie :

Au cours de l'épreuve, les ovins ont maintenu une température physiologique normale jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour pour l'ovin 1 vacciné par le lot A01. Au 8<sup>ème</sup> jour de l'épreuve les ovins vaccinés pas le lot A02 ont montré une hyperthermie qui a atteint 41 °C et qui va diminuer par la suite jusqu'à la valeur de 39,1°C. Concernant l'ovin témoin, il a présenté une hyperthermie à partir du 7<sup>ème</sup> jour d'une valeur de 41,1 qui va diminuer par la suite (figure).

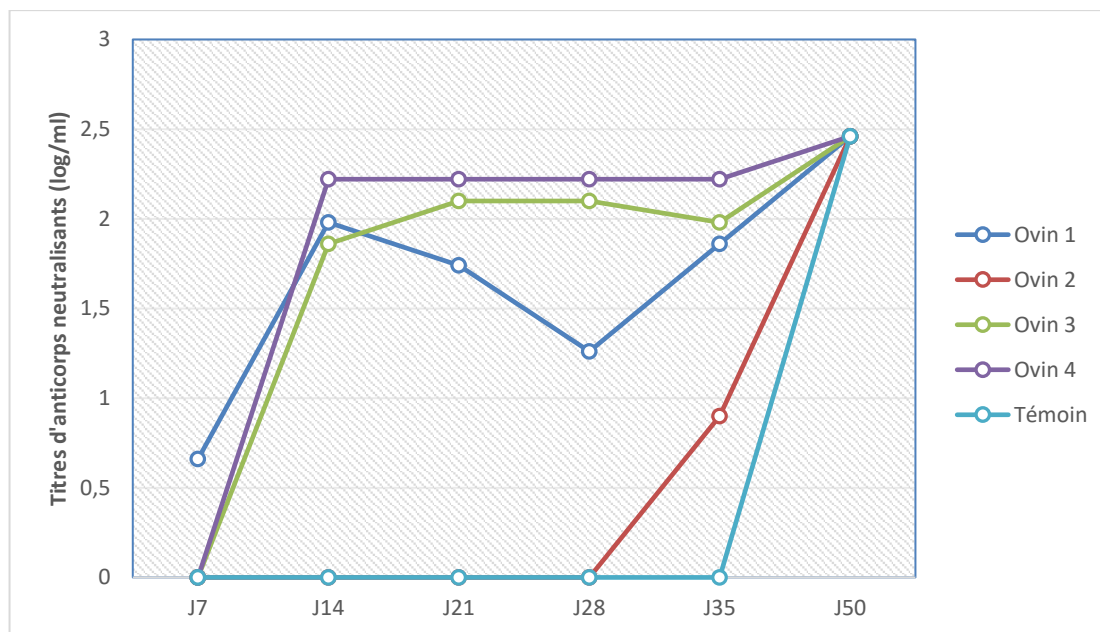


**Figure 56 :** Suivi de la température corporelle après l'épreuve virulente.

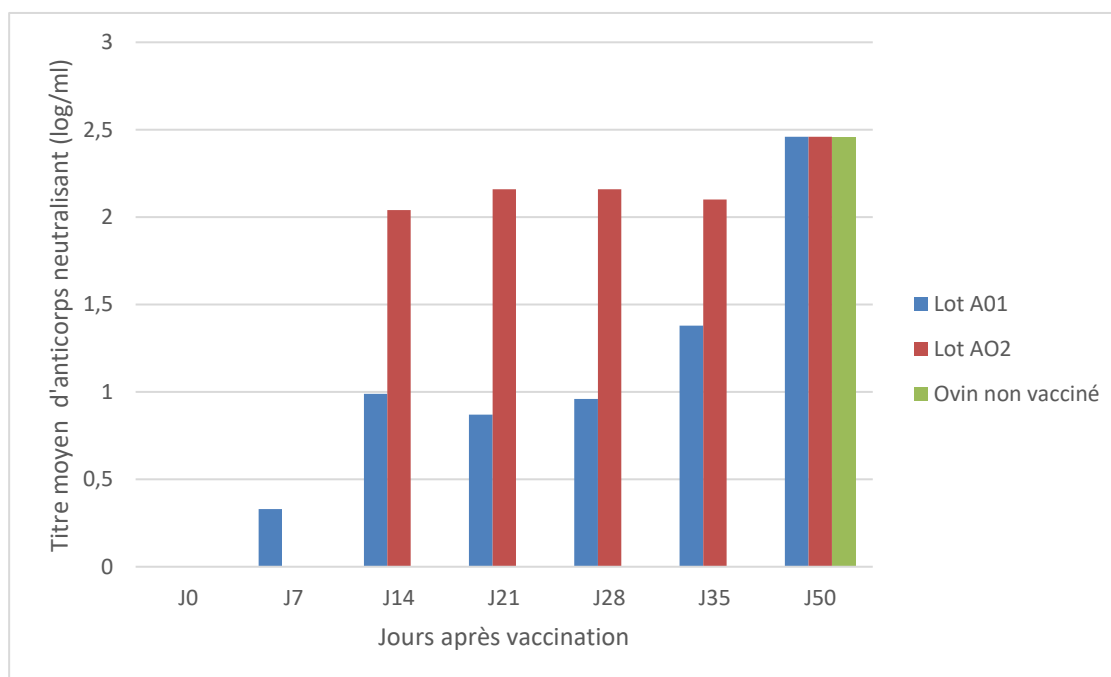
#### b- Cinétique d'anticorps avant et après l'épreuve virulente

La cinétique d'anticorps a montré que le vaccin produit une immunité avec des titres détectables dès le 7<sup>ème</sup> jour après la vaccination et qui vont augmenter différemment d'un ovin à l'autre après le rappel vers le 14<sup>ème</sup> jour, jusqu'à atteindre un titre de 2,46 chez tous les ovins vaccinés et témoin après l'épreuve virulente (Figure 57).

D'après les résultats obtenus, le lot A02 confère une réponse immunitaire importante durant toute l'expérimentation avec des titres importants par rapport au lot A01 (Figure 58).



**Figure 57 :** Cinétique d’anticorps neutralisants par ovin.



**Figure 58 :** Cinétique d’anticorps neutralisants par lot.

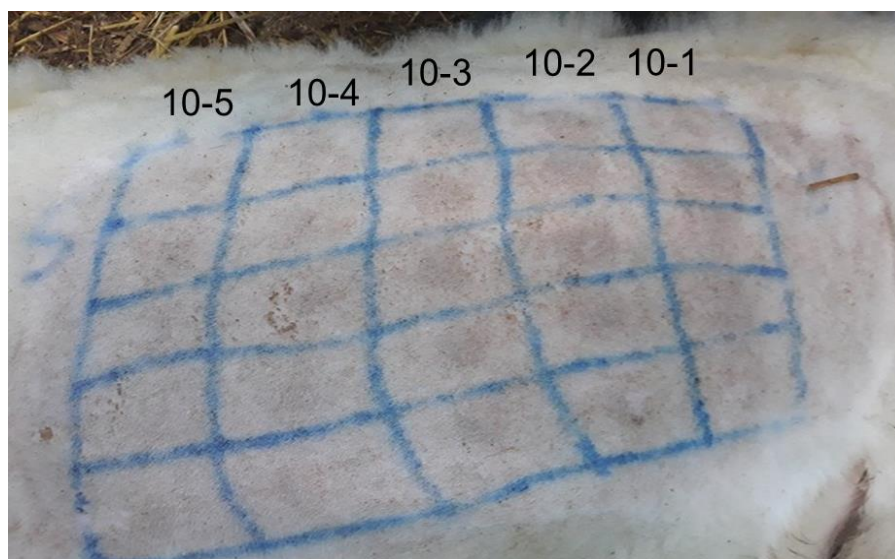
**c- Réactions locales, titre infectieux et indice de protection**

Après le challenge, des réactions locales sont apparues au niveau des sites d’injection du témoin dans les dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ , à partir du J2, et vont augmenter de taille jusqu’au  $10^{\text{ème}}$  jour pour qu’elles s’estompent par la suite. Des nodules cutanés caractéristiques du SPV (non associés aux sites d’injection) sont observés entre J10 et J11 avec généralisation de la maladie. Les titres obtenus sur le flanc sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau XXII : Titres infectieux des ovins vaccinés par les deux lots A01 et A02 et l'ovin témoin non vacciné.**

	Titre infectieux en log DR 50		Témoin
	A01	A02	
1	5,5		8,5
2	2,3		
3		3,3	
4		3,5	

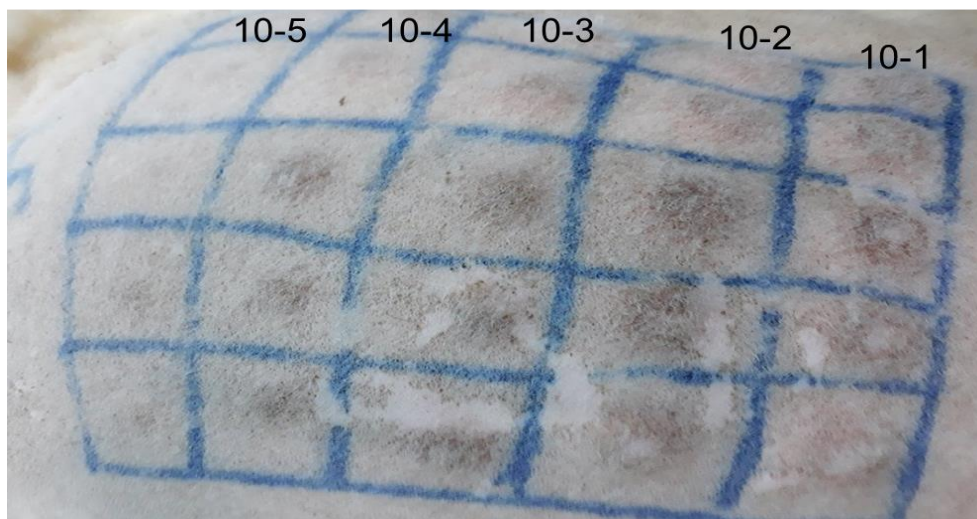
Pour les ovins vaccinés par le « lot A02 », deux jours après l'épreuve, les points d'inoculation correspondant au virus le plus concentré  $10^{-1}$  représentent le siège des nodules arrondis de 1 mm de diamètre (figure 59). Au quatrième jour, le diamètre de ces réactions augmente avec une apparition de petits nodules à la dilution  $10^{-5}$ . Ces nodules s'estompent au bout du 10<sup>ème</sup> jour.



**Figure 59 : Nodules apparaissent chez l'ovin 3 vaccinés par le « lot A02 ».**

Les mêmes résultats ont été obtenus pour le deuxième ovin (ovin4) vacciné par le « lot A02 ».

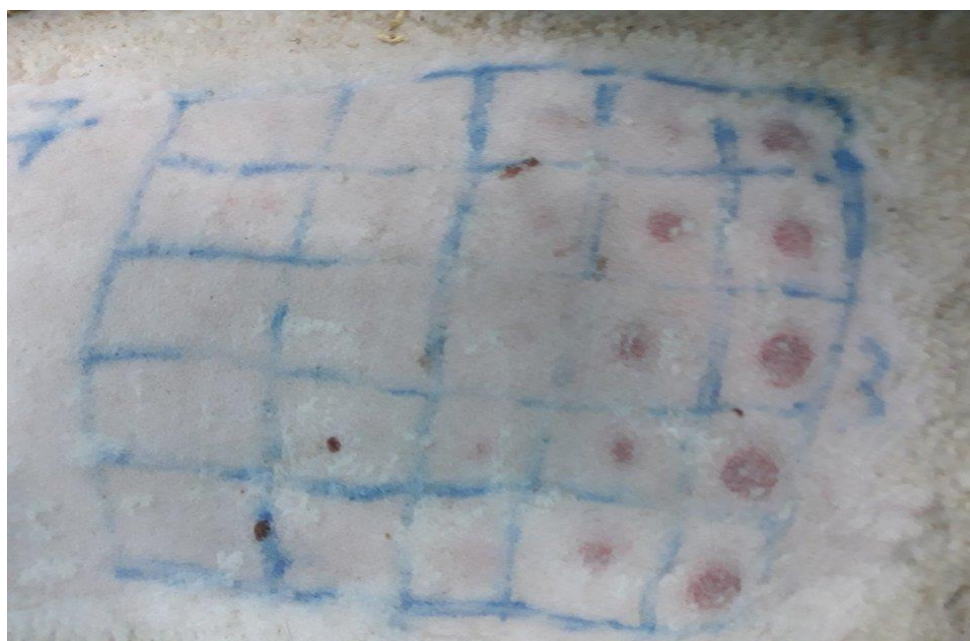
Quant aux ovins vaccinés par le « lot A01 », deux jours après l'épreuve, les points d'inoculation correspondant à la concentration la plus élevée  $10^{-1}$  sont sous forme de nodules arrondis de 1 mm de diamètre (figure 60), qui augmentent de diamètre vers le quatrième jour avec apparition de petits nodules à la dilution  $10^{-5}$ . Ces nodules diminuent aussi au bout du 10<sup>ème</sup> jour.



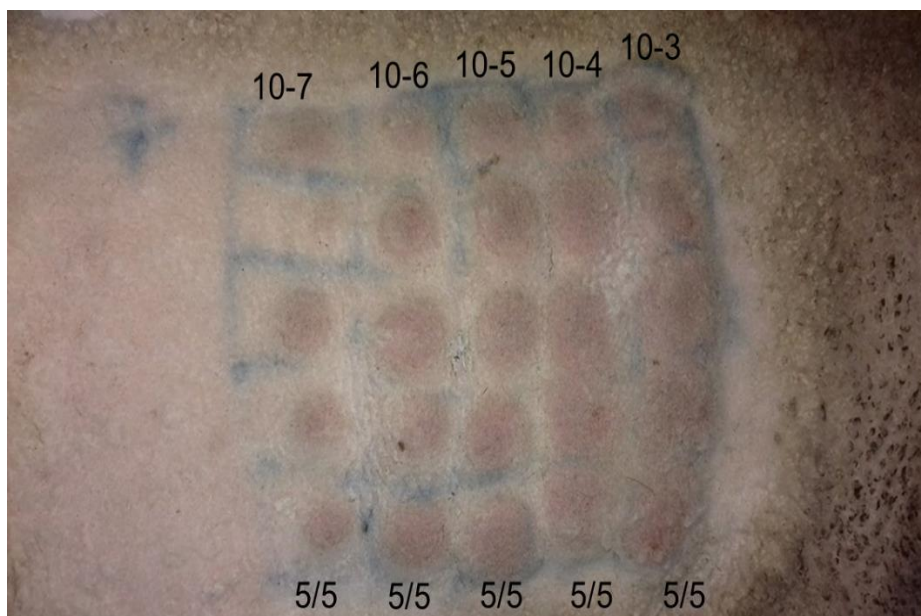
**Figure 60 : Nodules chez l'ovin 1 vacciné par le lot A01.**

Les mêmes résultats sont obtenus pour le deuxième ovin (ovin2) vacciné par le « lot A01».

Pour l'ovin témoin non vacciné, des nodules arrondis rougeâtres apparaissent le troisième jour de l'épreuve dans les points d'inoculation de la dilution la plus concentré en virus ( $10^{-3}$ ), ces nodules vont se généraliser dans tous les point d'injections au bout du 7ème jour (figure 61 et figure 62).



**Figure 61 : Lectures des nodules apparaissant chez l'ovin témoin non vacciné**



**Figure 62 : Généralisation des nodules chez l'ovin témoin non vacciné**

Les ovins ont été suivis pendant 15 jours, sans manifestation de réaction générale, par contre l'ovin témoin non vacciné a montré une généralisation de la maladie (figure 63).



**Figure 63 : Papules dans les zones de laine de l'ovin non vacciné lors de l'épreuve virulente et début de généralisation.**

La généralisation chez l'ovin témoin non vacciné est caractérisée par une hyperthermie, abattements, des lésions cutanées, des nodules dans les parties de laine (figure35), perte d'appétit, écrasement des dents, tristesse et une souffrance (figure 64).



**Figure 64 :** *L’ovin témoin présentant des signes cliniques dus à la généralisation de la maladie.*

- **Calculs des titres infectieux et des indices de protection :**

Selon la méthode de Spearman Karber exprimé en log DR 50/ml (Doses Réactionnelles 50%) on a obtenu les titres présentés dans le tableau, ainsi que les indices de protection pour les deux lots de vaccin :

	Titre infectieux en DR 50/ml		Témoin	Indice de protection (log)
	A01	A02		
<b>1</b>	5,5	-	8,5	3
<b>2</b>	2,5	-		6
<b>3</b>	-	3,3		5,2
<b>4</b>	-	3,5		5

Selon les résultats obtenus, le vaccin inactivé produit induit une très bonne protection chez les ovins vaccinés avec des indices protection élevés (supérieurs à 2log) et qui varient entre 6, 5 et 5,2 pour le lot A01 et A02 respectivement.

**IV- DISCUSSION :**

Une variété de vaccins vivants atténués a été utilisée contre la clavelée dans les pays endémiques et même au Maroc. L’utilisation de ce type de vaccins a été bannie en raison de son potentiel d’induire la maladie chez les animaux et du risque de contamination par des agents pathogènes étrangers. L’utilisation de vaccins inactivés serait donc une alternative pour protéger le bétail contre la variole ovine [Boumart et al., 2016].

Dans le présent chapitre, la production du vaccin inactivé a été réalisée à partir de la souche de terrain (Berkane), produite dans le deuxième chapitre, afin de donner naissance à un vaccin adapté à la pathologie locale.

La protection engendrée par le vaccin vivant atténué est assurée par une réponse immunitaire à la fois à médiation cellulaire et humorale. Contrairement aux vaccins inactivés, qui ont été considérés pour longtemps moins efficaces dans la stimulation de la réponse immunitaire à médiation cellulaire résultante de l'infection à SPV [El Harrak, 1987].

De plus, chez les moutons vaccinés, une faible corrélation entre les taux d'anticorps et le statut immunitaire des animaux a été rapportée [Kitching, 1986], suggérant que des vaccins vivants sont nécessaires au développement d'une immunité efficace et permanente [Perenlei et Solyom, 1986 ; Ramani et Sundarajan 1976].

Dans la présente étude, les moutons ont été suivis pendant 2 semaines après la primovaccination et 3 semaines après la dose de rappel. Les lots de vaccin inactivé utilisés ont satisfait à tous les tests de contrôle au laboratoire, ils ont été sûrs à utiliser, vu que tous les ovins vaccinés restaient en bonne santé, aucune augmentation de la température corporelle ni de réaction locale ou générale n'a été observé. La réponse sérologique a été détectée à partir du 14<sup>ème</sup> jour pour les ovins vaccinés par le lot A02, inactivé par le formaldéhyde, avec des titres significatifs contrairement aux ovins vaccinés par le lot A01, inactivé par le BPL, la réponse sérologique est apparue à partir du 7<sup>ème</sup> jour mais avec des titres moins significatifs. Le taux d'anticorps a augmenté après l'administration du virus lors de l'épreuve virulente et a pu atteindre une valeur de 2,46. Ceci est en accord avec des études réalisées précédemment, montrant une augmentation des titres d'anticorps entre le 7<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour après la vaccination et une augmentation de la réponse immunitaire après l'épreuve [Awad et *al.*, 2003 ; Bhanuprakash et *al.*, 2004 ; Boumart et *al.*, 2016]. Les titres d'anticorps obtenus en utilisant un vaccin produit à partir d'une souche Marocaine de terrain étaient plus élevés par rapport aux titres obtenus dans l'étude de Boumart et *al.*, (2016), qui ont produit un vaccin inactivé à partir de la souche Yougoslave Romania.

La séroconversion détectée pour le lot A02 est obtenue avec une dose vaccinale minimale (0.2 ml) comparativement au lot A01 (0.3 ml) qui sont des doses généralement utilisées pour un vaccin vivant. Pour la souche Romania qui est une souche vivante atténuée, la dose vaccinale utilisée est de 0.5 ml.

En général, la dose vaccinale pour un vaccin inactivé est toujours supérieure à celle d'un vaccin atténué. Un vaccin inactivé est incapable de se multiplier dans l'organisme, donc il faut augmenter la dose pour induire une bonne réponse immunitaire. Pour la souche vaccinale « Berkane » elle est dotée d'un bon pouvoir pathogène, selon les résultats obtenus dans le deuxième chapitre, et d'un bon titre infectieux (8,5 log DR50/ml) qui font d'elle une souche vaccinale pourvue d'un bon pouvoir immunogène.

Plusieurs chercheurs ont rapporté que la cinétique de la réponse immunitaire chez les moutons vaccinés a montré que le vaccin inactivé fournit des niveaux d'anticorps détectables pendant plus de neuf mois, ce qui suggère qu'un rappel annuel avec ce vaccin est suffisant pour maintenir une bonne protection au niveau de la population. La durée à long terme de la protection doit être confirmée en utilisant une expérience de challenge [Awad et *al.*, 2003, Boumart et *al.*, 2016, Sólyom et *al.*, 1982].

Quant au contrôle d'efficacité, les vaccins SPV inactivés ont pu protéger les animaux vaccinés contre la généralisation de la maladie observée chez les moutons non vaccinés, malgré les titres élevés du virus de l'épreuve virulente. Une courte augmentation de la température corporelle dans les deux groupes vaccinés a été observée pendant deux jours, ce qui peut être une réponse physiologique normale déclenchée par n'importe quel antigène.

Aux points d'inoculation, l'inflammation n'a été observée que dans de faibles dilutions pour les 2 groupes d'ovins vaccinés par des lots différents, avec des titres infectieux plus faibles en les comparants au titre obtenu chez l'ovin témoin. Cette réaction est due à la l'installation de la réponse immunitaire de type cellulaire dans le point d'injection et la reconnaissance de l'antigène par les cellules immunitaires. D'ailleurs plusieurs études ont montré que le vaccin inactivé n'induit pas une immunité humorale mais plutôt une immunité à médiation cellulaire. Ces résultats ont été rapportés par Jennifer et *al.*, (2010), qui ont constaté que la réaction immunitaire développée par le vaccin inactivé est à médiation cellulaire, les cellules NK jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'infection Poxvirale *in vivo*, ce qui peut générer des petits nodules dans le point d'injection qui s'estompe par la suite.

Ces nodules se gonflent plus chez le groupe d'ovin vacciné par le lot A01 en comparaison avec le groupe d'ovins vaccinés par le lot A02, ceci est à cause de la qualité des anticorps qui sont moins puissants pour le lot A01, et donc laissant une défaillance immunitaire chez les ovins de ce groupe.

En revanche, les moutons non vaccinés présentaient des signes cliniques caractéristiques, des lésions de variole primaire et secondaire avec une forte fièvre entre J4 et J11 après l'administration du virus d'épreuve. Le titre viral obtenu chez l'ovin témoin non vacciné a atteint  $10^{8,5}$  DR50 / ml, soit le titre normal de la souche virulente chez le mouton.

Selon les recommandations de l'OIE, un vaccin est considéré fiable et acceptable lorsqu'il confère une résistance au virus d'épreuve 100 fois plus élevée chez les animaux vaccinés que chez les animaux non vaccinés (El Harrak, 1978). Ceci correspond à un indice de protection supérieur à 2,5, seuil qui a été largement dépassé par les ovins vaccinés par les deux lots du vaccin claveleux inactivé. Les indices de protection obtenus varient entre 6,5 et 5,2 pour

le lot A01 et A02 respectivement. Ces valeurs sont comparables à celles normalement obtenues avec d'autres vaccins vivants [Fakri et *al.*, 2015, Boumart et *al.*, 2016].

#### V- CONCLUSION

L'étude actuelle a montré que le vaccin SPV inactivé produit à partir d'une souche Marocaine de terrain confère une très bonne protection pour contrôler et prévenir la variole ovine au Maroc, il pourra même remplacer le vaccin vivant atténué qui produit des effets secondaires chez les animaux vaccinés. Le vaccin inactivé ne présente aucun risque de diffusion, de contamination ou de propagation d'agents pathogène.

***PARTIE III : DISCUSSION GENERALE***

## DISCUSSION GENERALE

Selon les critères de classification adoptés depuis toujours, le SPV et les autres pathologies liées au CaPVs sont classées en se basant sur l'hôte à partir duquel ont été prélevées. De ce fait, le premier chapitre de ce travail, portait sur la caractérisation moléculaire du SPV au Maroc, en se basant sur les résultats de séquençage de deux gènes différents : le gène de la protéine d'enveloppe *P32* et le gène de la sous-unité de l'ARN polymérase ADN-dépendant *RPO30*. Les résultats de l'étude phylogénétique basée sur le gène codant pour la *P32*, ont montré une hyper-conservation de ce gène chez tous les isolats Marocains comparativement aux souches de référence et aux souches isolées dans différentes régions du monde. Aucune modification génétique considérable n'a été notifiée au niveau de ce gène. Les résultats montrent aussi que les isolats locaux sont étroitement liés entre eux et présentent des pourcentages d'homologie élevés (99 à 100%) ce qui reflète leur affiliation au sein du même clade avec les autres souches de référence sélectionnées à partir de la Genbank. En se basant sur ce gène, on peut dire qu'il peut servir juste pour l'identification de l'agent causal de la clavelée lors du diagnostic par la technique de la PCR, chose qui a été rapportée par d'autres chercheurs [Hein et *al.*, 1999 ; Balinsky et *al.*, 2008 ; Varshovi et *al.*, 2009 ; Sumana et *al.*, 2020].

D'autre part, le séquençage du gène codant pour la *RPO30* a montré plusieurs divergences au niveau des souches Marocaines, car, dans un premier temps, cette portion de génome n'a pas été amplifiée chez tous les isolats. Le séquençage réalisé est spécifique du SPV, vu qu'il se base sur la séquence contenant une modification caractérisée par une délétion de 21 nucléotides qui correspond à la délétion de 7 acides aminés, cette modification est considérée comme une signature du SPV [Lamien et *al.*, 2011]. Les pourcentages d'homologie en comparaison avec les souches de références étaient élevés : entre 99-100 avec les SPVs, 98% avec GPV et 97% avec LSDV [Lamien et *al.*, 2011 ; Zhou et *al.*, 2012]. Les résultats obtenus ont montré la subdivision des CaPVs en 3 groupes avec l'existence de sous-groupes, les mêmes résultats ont été rapportée par d'autres chercheurs, qui ont classé les CaPVs en d'autres « sous lignées » [Lamien et *al.*, 2011 ; Zhou et *al.*, 2012, Zhu et *al.*, 2013 ; Su et *al.*, 2015].

Bien que les séquences du gène codant pour la *P32* et du gène codant pour la *RPO30* puissent être utilisées pour différencier SPV, GPV et LSDV, on ignore si les informations portées par ces gènes peuvent renseigner sur la spécificité et la réceptivité de l'hôte. Lamien et *al.*, (2011), et en se basant sur le séquençage du gène qui cod pour la *RPO30*, ont pu démontré que la souche Kenya (KS-1), qui a été considérée depuis son isolement comme étant un SPV, est

en réalité une souche de LSDV. Son affiliation historique au SPV revient au fait qu'elle a été isolée à partir d'un mouton.

Avant les résultats révolutionnaires du séquençage basé sur le gène codant pour la RPO30, la classification des CaPVs se faisait d'une manière aléatoire en se basant sur l'espèce cible. Cette classification n'a pas été mise en cause durant plusieurs années du fait de la présence d'une immunité croisée entre les différents virus du groupe. Il a été alors admis que tous les virus isolés chez les moutons sont des SPV, ceux isolés chez les chèvres sont des GPV et ceux provenant des bovins sont des LSDV.

Avec les travaux de Lamien et *al.*, en 2011, qui ont révolutionné la classification des CaPVs, beaucoup de souches ont été reclassées et redéfinies quant à leur affiliation taxonomique, notamment la souche Oman 84 qui était considérée un SPV alors qu'elle est GPV. La souche Arabie Saoudite 93 considérée GPV est en réalité un SPV, de même que pour la souche vaccinale Nigeria 99 affiliée comme étant un GPV alors que le séquençage a démontré qu'elle est un SPV.

Tenant compte de ces considérations qui relatent la perméabilité de la barrière de l'espèce, la similarité des signes cliniques et la présence de l'immunité croisée entre les différents virus du groupe CaPV, il est donc judicieux d'établir une base de classification claire pour différencier entre les différents virus du groupe. Une analyse génétique basée sur le séquençage du full génome des trois virus restituerait certainement une définition des gènes discriminatifs des CaPV.

Les résultats de notre travail, fondés sur l'analyse phylogénétiques vis-à-vis des gènes codants pour les *P32* et *RPO30* pour la comparaison des souches Marocaines considérées comme étant SPV, sur la base des résultats de l'espèce cible de l'isolement et des résultats de la qPCR ont néanmoins contribué à la classification de chacune des souches collectées sur une période étalée sur une trentaine d'années. Pour renforcer le contrôle épidémiologique et par la suite prophylactique une analyse des souches du groupe des CaPV doit se référer au gène codant pour la *RPO30* [Zeedan et *al.*, 2020].

Le deuxième chapitre portant sur la caractérisation du pouvoir pathogène de quelques isolats marocains du SPV *in vitro* et *in vivo*, nous a permis de concrétiser les informations fournies par l'étude moléculaire. Les résultats de l'inoculation sur cellules ICO1, ont montré que le SPV se multiplie de façon considérable sur ces lignées de cellules, vu que l'ECP se manifeste à partir du 2<sup>ème</sup> jour après l'inoculation et conduit à la nécrose cellulaire au bout du 6<sup>ème</sup> jour [El Harrak, 1987 ; Hosamani et *al.*, 2008 ; Sadri et Fallahi, 2010 ; OIE, 2017].

D'autre part les symptômes engendrés par l'infection expérimentale, ont été caractérisés pas une augmentation de la température corporelle (41°C) des moutons inoculés par les souches de Berkane et d'Oujda à partir du 5<sup>ème</sup> jour, de plus, les signes cliniques sont apparus dès le 6<sup>ème</sup> jour, ils sont caractérisés par la manifestation des éruptions cutanées sous forme de papules partout dans le corps de l'animal et des croûtes au niveau de la tête, avec des sécrétions nasales et abattement, ces signes cliniques ont été décrits par plusieurs rapporteurs [Afshar et al., 1986 ; Bowden et al., 2008 ; El Harrak, 1987 ; FAO., 2000 ; Fassi Fehri et al, 1983 ; Fassi Fehri et al, 1984 ; Mirzaie et al., 2015 ; OIE., 2017 ; Wolff et al., 2020]. Contrairement aux isolats de la région orientale du Maroc, la souche d'Azilal n'a pas montré d'effets caractéristiques du SPV après l'infection expérimentale. Selon Achour et al., (2000) et Bowden et al., 2008, le degré de pathogénicité peut différer d'une souche à une autre.

La comparaison des titres infectieux du SPV *in vitro* et *in vivo* a montré que sur cellules les titres semblent un peu plus élevés par rapport à ceux obtenus sur moutons [Achour et al., 2000 ; Sadri et Fallahi, 2010], et cela pourrait être lié à la grande permissivité des cellules et la multiplicité du SPV au sein des ICO1, par contre le titrage *in vivo* dépend de chaque animal utilisé et aussi de la virulence du SPV testé.

Le pouvoir immunogène du SPV se caractérise par l'installation de l'immunité anti-SPV à partir du 7<sup>ème</sup> jour qui suit l'infection expérimentale, la souche de Berkane a présenté des propriétés immunogènes élevées, d'où les titres d'anticorps obtenus étaient considérables, par contre, pour la souche d'Azilal, le mouton inoculé n'a pas montré d'anticorps neutralisants dans le sérum testé. Cette différence, peut être due, d'une part au pouvoir immunogène de chacune des souches, et d'autre part au statut immunitaire des moutons infectés [Babiuk et al., 2008 ; Wolff et al., 2020].

La souche d'Azilal n'a pas montré d'effet important sur cellules ou par infection expérimentale, ainsi sur l'arbre phylogénétique basé sur la RPO30 elle n'a pas été groupée avec les isolats marocains mais avec les souches de référence LSDV. Ces résultats nous mènent à dire qu'ils existaient d'autre souches virales en circulation au Maroc, qui ont été considérées comme SPV puisqu'elles étaient isolées à partir des moutons. Pour cela il est indispensable d'étudier d'autres gènes pour mieux classifier les souches Marocaines et pour bien les identifier.

Les résultats du titrage du virus par la PCR en temps réel ont montré que cette technique est très fiable et rapide pour le diagnostic de la maladie au laboratoire mais elle a montré une limite dans notre étude, car elle n'a pas pu détecter le virus dans les prélèvements sanguins. Cette technique peut détecter le virus dans les prélèvements biologiques, tels que les croûtes, le

tissu inflammatoire et même la lymphe [Zro et al., 2014a ; Balinsky et al., 2008 ; Bowden et al., 2008].

Le troisième chapitre consacré à l'étude de la structure des protéines *P32* et *RPO30*, par la voie de la modélisation moléculaire, afin de comparer les conformations spatiales 3D entre la souche décrite pathogène dans le chapitre précédant et la souche vaccinale atténuée Romania 65, ainsi que de prédire les sites actifs communs ainsi que les sites de modification de l'atténuation, responsables de leur pouvoir pathogène et immunogène.

Les résultats de la modélisation par homologie de la *P32* n'ont pas montré de différence entre la souche pathogène et souche vaccinale, vu que les séquences d'acides aminés sont hautement conservées. D'autre part, les résultats obtenus pour la protéine *RPO30* modélisée de la souche pathogène et atténuée ont montré une valeur du RMSD de 12.7 et  $9.3 \pm 4.2 \text{Å}$  recommandée par Chothia & Lesk., 1986. Aussi, l'étude de la stabilité structurelle, a montré que les deux souches ont une stabilité moyenne.

La stabilité et le pourcentage moyen de la qualité des séquences modélisées, permettent d'avoir une accessibilité aux épitopes [Jones et al., 1992]. Le résultat de la prédiction des sites actifs a révélé que, les deux souches partagent des épitopes neutralisants communs, au niveau de la séquence du gène qui code pour *RPO30*.

La souche vaccinale atténuée a montré, des modifications au niveau de la région C terminal, ce qui a engendré des déformations structurelles au niveau de la région «ARVPPLCRSV», qui peut être considéré comme épitope linéaire pour la souche vaccinale.

L'effet antigénique diminue à cause des mutations, et le score prédictif de l'immunogénicité prévue subit une chute remarquable de 90% à 30% avec le changement de la reconnaissance linéaire à une reconnaissance discontinue par les cellules T. les résultats obtenus permettent de conclure que l'une des causes influençant l'effet antigénique des souches vaccinales atténuées est due dans une partie à l'ensemble des mutations accumulées au niveau de la région C-terminal de la protéine relative au gène codant pour la *RPO30*.

Le dernier chapitre de ce travail est consacré à la production et le contrôle d'un vaccin inactivé, adjuvé, issu d'une souche Marocaine de terrain produite à Biopharma, afin de remédier aux problèmes de prophylaxie liés à l'utilisation du vaccin vivant atténué utilisé au Maroc.

L'inactivation de la souche de Berkane a été réalisée en utilisant deux inactivants différents : la BPL et le formaldéhyde. La BPL est largement utilisé en industrie pharmaceutique biologique, vu son action directe sur le génome viral qui empêche sa réplication sans impacter les protéines antigéniques impliquées dans le processus immunitaire. La température

d'inactivation utilisant la BPL doit être réalisée entre 2 et 8°C car cette molécule est très thermolabile (elle s'hydrolyse à 37°C).

Le lot du vaccin A01 inactivé par la BPL n'a pas induit une bonne séroconversion, en effet beaucoup de travaux de recherche utilisant la betapropiolactone comme inactivant chez les Poxvirus ont rapporté que cet inactivant n'était pas approprié pour les Poxvirus, même s'il est largement utilisé pour la préparation des vaccins inactivés. La BPL acidifie le milieu et donc nécessite un système de tampon pour qu'elle n'affecte pas les protéines antigéniques virales. Pour le procédé que nous avons utilisé seule une correction de pH à des heures déterminées a été effectuée, il aurait été souhaitable de conduire l'inactivation en présence d'un tampon de pH.

Par contre, le formaldéhyde (37-40%), qui est un inactivant également utilisé en industrie pharmaceutique, a donné de bons résultats pour le virus de la clavelée. Les animaux vaccinés avec le lot A02 ont montré une bonne séroconversion avec un titre d'anticorps élevé. Son utilisation se fait à température ambiante du laboratoire (22°C +/- 3°C), car il se cristallise à basse température. Ces observations ont été aussi signalées par Lars et *al.* en 2015, en montrant que l'inactivation par le formaldéhyde à basse température (4°C) comporte un risque élevé d'inactivation incomplète.

Le contrôle d'inactivation utilisant ces deux réactifs n'a révélé aucun ECP sur les cellules ICO1 après passages successifs. Le procédé d'inactivation adopté avec la BPL et le Formaldéhyde a réussi à inactiver le virus à 100%.

Enfin, les conditions d'inactivation jouent un rôle important pour avoir de bons résultats, la quantité et la nature de modifications dans les composants viraux (protéines, ADN ou ARN) dépendra de la concentration de l'inactivant utilisé, du type de tampon et du pH du mélange selon une étude réalisée par Joost P. et *al.* en 2011, ils insistent sur l'optimisation des conditions d'inactivation pour entraîner une inactivation complète et une immunogénicité élevée et soutenue du virus.

L'utilisation de l'adjuvant, après l'inactivation de la souche pathogène, permet au vaccin de circuler dans le corps et d'augmenter la réponse immunitaire, pour cela, Mohan T. et *al.* l'ont également utilisé pour ses propriétés d'augmenter l'effet d'un vaccin en stimulant le système immunitaire à répondre au vaccin, plus vigoureusement, et ainsi fournir une immunité accrue à la maladie [Mohan T., 2013].

Le choix de l'hydroxyde d'alumine comme adjuvant est fait grâce à ses propriétés physico-chimiques et sa capacité de stimuler l'immunité adaptative, d'ailleurs une étude menée par Mosca F et *al.* en 2008, ont trouvé que la vaccination avec un antigène adsorbé sur

l'hydroxyde d'alumine, induit une immunité humorale (lymphocytes B et lymphocytes T) et une production de cellules mémoires.

En effet, des travaux menés au début des années 2000 ont montré qu'après vaccination intramusculaire avec un vaccin aluminique une réaction locale inflammatoire est initiée par le complexe « antigènes sels d'aluminium », permettant un recrutement spécifique des cellules de l'immunité (monocytes, macrophages, éosinophiles), ce qui explique l'apparition des petits nodules dans le point d'injection qui s'estompe par la suite lors de la vaccination par épreuve virulente.

Pour le contrôle d'innocuité des ovins vaccinés par les deux lots du vaccin claveleux inactivé, il n'a montré aucune réaction thermique ni réactions locales, c'est l'avantage du vaccin inactivé vis-à-vis du vaccin vivant atténué qui donne des réactions locales graves générant une réticence des éleveurs à la vaccination. Plusieurs études ont confirmé l'inconvénient du vaccin vivant, parmi elles celle de Fassi-fehri M. et *al.* en 1983 qui ont testés plusieurs vaccins claveleux en les comparant avec le vaccin témoin vivant Romania, ce dernier a donné une réaction locale se traduisant par une tuméfaction de 2 à 4 cm de diamètre chez  $\frac{3}{4}$  des ovins vaccinés, évoluant au sixième jour vers la nécrose chez l'un d'entre eux. Les réactions locales secondaires sont dues à la multiplication du virus dans le point d'injection. Dans une autre étude, qui a été menée récemment par Sameeh et Eeva en 2018, pour caractériser les effets secondaires causés par le vaccin RM65, des nodules cutanés sont apparus entre le 7<sup>ème</sup> et 17<sup>ème</sup> jours après la vaccination accompagnée d'une fièvre, d'une diminution de l'alimentation et de la production de lait.

Alors, puisque le vaccin vivant atténué utilisé jusqu'à présent dans les campagnes prophylactiques contre la clavelée génère des effets indésirables secondaires, il s'est avéré que ce vaccin inactivé, selon les résultats obtenus, est très bien toléré en administration par voie intramusculaire sans produire des effets secondaires et doté d'une bonne innocuité quel que soit l'inactivant utilisé. A cet effet le vaccin inactivé présentera un avantage lors des campagnes prophylactiques, car son innocuité est meilleure.

En ce qui concerne le contrôle d'activité, les anticorps développés par le lot du vaccin A01 inactivé par la BPL n'étaient pas persistants parce qu'ils ont commencé à chuter vers le 14<sup>ème</sup> jour après la primo-vaccination et n'ont augmenté qu'après la vaccination de rappel. En outre le 2<sup>ème</sup> ovin de ce lot n'a pas répondu à la primo-vaccination, la détection des anticorps neutralisants n'a été révélée qu'après la deuxième administration de primo-vaccination avec un taux ne dépassant pas 0.9 log DN50. Pour cela une question sera posée, est ce que cet animal vacciné par ce lot est vraiment protégé contre la clavelée ?

Pour les animaux vaccinés par le lot A02 inactivé par le Formaldéhyde, ils ont développé des anticorps à partir du 7<sup>ème</sup> jour après la primo-vaccination, pour qu'ils atteignent un titre positif pour les deux ovins vers le 14<sup>ème</sup> jour avec un titre moyen de 2,1 log au 35<sup>ème</sup> jour. De plus, les anticorps développés par ce groupe d'étude sont persistants et forts. Le seuil d'anticorps obtenu par ce lot est très élevé par rapport à d'autres études comme celle de Precausta et *al.* (1979) cité par El Harrak en 1987, qui ont signalé que les titres neutralisants sont toujours faibles et dépassent rarement 1,5 log dans le cas des animaux vacciné.

D'après les résultats, les animaux vaccinés par le lot du vaccin A02 inactivé par le Formaldéhyde ont fournis une bonne réponse sérologique avec un développement d'un très bon taux d'anticorps et un titre satisfaisant vers le 14<sup>ème</sup> jour par rapport aux animaux vaccinés par le lot du vaccin inactivé par la betapropiolactone.

La séroconversion détectée pour le lot A02 est obtenue avec une dose vaccinale minime (0.2 ml) comparativement au lot A01 (0.3 ml) qui sont des doses généralement utilisé pour un vaccin vivant. Pour la souche Romania qui est une souche vivant atténuée, la dose vaccinale utilisée est de 0.5 ml.

En général, la dose vaccinale pour un vaccin inactivé est toujours supérieure à celle d'un vaccin atténué. Un vaccin inactivé est incapable de se multiplier dans l'organisme, donc il faut augmenter la dose pour induire une bonne réponse immunitaire. Pour la souche vaccinale « Berkane » elle est dotée d'un bon pouvoir pathogène selon nos résultats obtenus dans le 2<sup>ème</sup> chapitre et d'un bon titre infectieux (8,5 log DR50/ml) qui font d'elle une souche vaccinale pourvue d'un bon pouvoir immunogène.

Quant au contrôle d'efficacité, les nodules apparus le deuxième jour de l'épreuve dans les points d'injections chez les ovins vaccinés ne sont pas dus au virus. Cette réaction est due à la l'installation de la réponse immunitaire de type cellulaire dans le point d'injection et la reconnaissance de l'antigène par les cellules immunitaires. D'ailleurs plusieurs études ont montré que le vaccin inactivé n'induit pas une immunité humorale mais plutôt une immunité à médiation cellulaire. Ces constatations ont été rapportées par Jennifer et *al.*, en 2010 qui ont signalés que la réaction immunitaire développée par le vaccin inactivé est à médiation cellulaire, les cellules NK jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'infection Poxvirale *in vivo*, ce qui peut générer des petits nodules dans le point d'injection qui s'estompe par la suite.

Ces nodules se gonflent plus chez le groupe d'ovin vacciné par le lot A01 que chez le groupe d'ovins vacciné par le lot A02, ceci est dû à la qualité des anticorps qui sont moins puissant pour le lot A01, et donc laissant une défaillance immunitaire chez les ovins de ce groupe.

Pour l'ovin témoin non vacciné, il a eu des nodules vers le 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> jour du à la première reconnaissance du virus par le système immunitaire.

Un vaccin est dit acceptable lorsqu'il confère une résistance au virus d'épreuve 100 fois plus élevée chez les vaccinés que chez les animaux non vaccinés comme signalé par El Harrak en 1978. Ceci correspond à un indice de protection supérieur à 2, seuil qui a été largement dépassé par les ovins vaccinés par les deux lots « A01 » et « A02 » du vaccin claveleux inactivé. D'ailleurs tous les ovins ont présenté un indice de protection supérieur à 2log.

***PARTIE IV : CONCLUSION ET PERSPECTIVES***

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

### A. Conclusion

Ce travail a été réalisé dans l'objectif de :

- Décrire un profil épidémio-moléculaire des isolats marocains du SPV, qui ont émergé au Maroc entre les années 1981 et 2010.
- Comprendre pourquoi la clavelée existe jusqu'à présent dans notre pays malgré les programmes de lutte adoptés par les services vétérinaires responsables.
- Evaluer le pouvoir pathogène et immunogène de quelques souches Marocaines du SPV, afin de produire un vaccin inactivé à partir de la souche la mieux adaptée à la pathologie locale et la meilleure pour ses propriétés pathogéniques et immunologiques. Le choix des souches a été basé sur la pureté virologique à partir de l'analyse phylogénétique, sur les propriétés biologiques sur culture cellulaire et sur la période de la réémergence. Cette période est évaluée par le nombre de foyers déclarés avec des animaux présentant des signes cliniques sévères.

L'étude expérimentale qui a fait l'objet de cette thèse a été réalisée face à la problématique évoquée et en réponse à la réémergence du SPV au Maroc malgré les programmes de vaccination adoptés par l'état.

Les résultats obtenus dans l'étude moléculaire ont permis de reclassifier les souches virales isolées au Maroc, et qui ont été considérées pour longtemps comme SPV en se basant sur le diagnostic différentiel ainsi que sur l'isolement du virus sur culture cellulaire. En revanche, il faut revoir les techniques d'isolement du virus ainsi que sa classification en se basant sur l'hôte à partir duquel il a été prélevé.

L'étude réalisée dans le présent travail a permis non seulement de clarifier le pouvoir pathogènes des souches marocaines du virus de la clavelée, mais aussi d'en proposer des solutions de prévention, *via* la vaccination par un vaccin inactivé, adjuvé, issu d'une souche locale, qui a montré une très bonne protection chez les ovins vaccinés.

## B. Perspectives

Pour mieux contrôler la maladie de la variole ovine au Maroc dans l'avenir, et pour pouvoir proposer une stratégie de vaccination efficace, quatre volets dans ce sujet restent à développer : le séquençage du génome total est nécessaire pour la caractérisation des réassortiments génique des souches virales circulantes sur le terrain au Maroc ; la mise au point d'une nouvelle technique PCR en temps réel afin de différencier les souches de virus du SPV sans recours au séquençage.

Ainsi, dans ce contexte les perspectives suivantes sont proposées :

- ✓ Identification des souches virales dites SPV et qui ne sont pas détectées lors du séquençage du gène qui code pour la *RPO30*.
- ✓ Etude avancée pour la caractérisation moléculaire de la souche d'Azilal par séquençage de son génome complet.
- ✓ Séquençage complet du génome des souches du virus de la clavelée et leur comparaison avec d'autres souches émergentes du même virus.
- ✓ La mise au point d'une PCR en temps réel basée sur le gène codant pour la *RPO30*, afin de faciliter le diagnostic des maladies liées aux CaPVs.
- ✓ Développement d'outils moléculaires innovants (Biotechnologie) pour la conception des primers, capables de caractériser le SPV sans avoir besoin au séquençage.
- ✓ Travail dans le sens de produire des vaccins recombinants, ce qui permettra d'induire une excellente immunité contre tous les SPV en circulation au Maroc.
- ✓ Revoir la stratégie de vaccination utilisée par les services spécialisés dans la santé animale au Maroc.

***PARTIE V : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Abdel-Aziz, S.Abu-EL-Saad. and Ahmed, S.Abdel-Moneim. (2005).** Modulation of macrophage functions by sheeppox virus provides clues to understand interaction of the virus with host immune system. *Virology Journal*. 2:22.
- **Achour H.A., Bouguedour R., 2000.**Epidémiologie de la clavelée en Algérie. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1999,18 (3), 606-617.
- **Achour H.A., Bouguedour R., Bouhbal A., Guechtouli A., Aouissat M.,2000.** Étude comparative du pouvoir immunisant de quelques souches atténuées de virus de la clavelée et d'un vaccin sensibilisé. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*,19 (3), 773783).
- **Afshar A., Bundza A., Myers D.J., Dulac G.C. et Thomas F.C., 1986.** Sheep Pox: Experimental Studies with a West African Isolate. *Can Vet J*; 27: 301-306.
- **Ahn BK., Park MJ., Kim EH., Bae YC., Hong HS., Cho HJ. et Joo K. 1990.** A study on staining techniques of Golgi methods. *Kyungpook Univ Med J*. 31, 313-322.
- **Al- Shabebi AA, El-Sabagh IM, Abu-Elzein EM, Zaghawa AA, Al-Naeem AA, Housawi FM 2014.** Molecular detection and phylogenetic analysis of Sheep pox virus in Al – Hassa of Eastern Province of Saudi Arabia. *Adv. Anim. Vet. Sci*. 2 (2S): 31 – 34.
- **Ameziane N., Bogard M., Lamoril J., 2006.** Principes de biologie moléculaire en biologie Clinique. Elsevier SAS. ed. 2006: 252.
- **Amitha R. Gomes, Raveendra Hegde, Byregowda S.M., Vijayashree Varadarajan, Yeshwant S.L., Giridhar P. et Renukaprasad C., 2010.** Evaluation of humoral immune reponse to sheeppox vaccine. *Tamilnadu J. Veterinary & Animal Sciences* 6 (5) Sep –Oct 2010. p:236-238.
- **Attwood, T.K. et Parry-Smith, D.J. 2003.** Introduction to Bioinformatics, Fourth Indian reprint,Pearson Education Ltd., ISBN 81-7808-507-0, India.
- **Austin L. Hughes et Robert Friedman, 2005.** Poxvirus genome evolution by gene gain and loss, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35 (2005) 186–195.
- **Babiuk S., Bowden T. R., Boyle D. B., Wallace D. B. et Kitching R. P., 2008.** Capripoxviruses: An Emerging Worldwide Threat to Sheep, Goats and Cattle. *Journal compilation.Blackwell Verlag Transboundary and Emerging Diseases*. 55 p: 263–272.

- **Babiuk S., Wallace D.B., Smith S.J., Bowden, T.R., Dalman B., Parkyn G., Copps J. et Boyle D.B., 2009.** Detection of antibodies against capripoxviruses using an inactivated sheeppox virus ELISA. *Transbound. Emerg. Dis.*, 56, 132–141.
- **Baker K. S. and Murcia P. R., 2014.** Poxvirus in Bats... so What?. *Viruses* 2014, 6, 1564-1577; doi:10.3390/v6041564
- **Baldick Jr., C.J., Moss, B., 1993.** Characterization and temporal regulation of mRNAs encoded by vaccinia virus intermediate-stage genes. *J. Virol.* 67 (6), 3515–3527].
- **Balisky C. A., Delhon G., Prarat M., Smoliga G., French R. A., Geary S. J., Rock D. L. et Rodriguez L. L., 2008.** Rapid Preclinical Detection of Sheeppox Virus by a Real-Time PCR Assay. *Journal of clinical microbiology*, Feb. 2008, Vol. 46, N° 2, p. 438–442.
- **Baroudy, B.M., Venkatesan, S., Moss, B., 1982.** Incompletely base-paired flipflop terminal loops link the two DNA strands of the vaccinia virus genome into one uninterrupted polynucleotide chain. *Cell* 28 (2), 315–324.
- **Barry, M., Wasilenko, S.T., Stewart, T.L., Taylor, J.M., 2004.** Apoptosis regulator genes encoded by poxviruses. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 36, 19–37;
- **Berjanskii. M., Liang .Y., Zhou. J., Tang. P., Stothard. P., Zhou .Y., Cruz. J., MacDonell .C., Lin. G., Lu .P., 2010.**Wishart DS. PROSESS: a protein structure evaluation suite and server. (*Nucleic Acids Research*). 633-40.
- **Berman,H., Henrick,K. and Nakamura,H. 2003.** Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat. Struct. Biol.*, 10, 980–980.
- **Bertagnoli S. Poxvirus. In: Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R., 2003.** Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail: Europe et régions chaudes. Eds Tec & doc. Tome 1, 2003, pp. 407-414.
- **Bhanuprakash V., Moorthy ARS., Krishnappa G., Srinivasa Gowda RN., et Indrani BK., 2006.**A live attenuated vaccine for sheep pox. *Indian J Anim Sci* 2003;73(10):1093–8.
- **Bhanuprakash V., Venkatesan G., Balamurugan V., Hosamani M., Yogisharadhya R., Chauhan R. S., Pande A., Mondal B. and Singh R. K., 2010.** Pox outbreaks in Sheep and Goats at Makhdoom (Uttar Pradesh), India: Evidence of Sheeppox Virus Infection in Goats. 2010 Blackwell Verlag GmbH • *Transboundary and Emerging Diseases*: 1-8. doi:10.1111/j.1865-1682.2010.01158.x

- **Bhat, P.P., Bhat, P.N., Mishra, B.P., Kumar, S. and Singh, R.K. 1993.** A comparison of the genomes of goat, sheep and buffalo pox-virus isolates. *Indian Journal of Animal Sciences* 63: 1075–1078.
- **Black, D.N., Hammond, J.M. and Kitching, R.P., 1986.** Genomic relationship between Capripoxviruses. *Virus Research* 5, 277-292.
- **Blancou J., 1999.** Histoire de la surveillance et du contrôle de la clavelée jusqu’au XIXème siècle. Communication présentée le 5 juin 1999, avant la publication de l’ouvrage du même auteur, intitulé : Histoire de la surveillance et du contrôle des maladies animales transmissibles (Office international des épizooties, 2000, 366 pages).
- **Boulter, E. A. and Appleyard, G. 1973.** Differences between extracellular and intracellular forms of poxviruses and their implications. *Progress in Medical Virology* 16, 86±108.
- **Boumart Zineb, Daouam Samira, Belkourati Imane, Rafi Lamya, Tuppurainen Eeva, TadlaouiKhalid Omari and El Harrak Mehdi, 2016.** Comparative innocuity and efficacy of live and LSDvated sheeppox vaccines. *BMC Veterinary Research* (2016) 12:133
- **Bowden T. R., Babiuk S. L., Parkyn G. R., Copps J. S., Boyle D. B., 2008.** Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology* 371 (2008): 380–393.
- **Bowden T.R., Coupar B.E., Babiuk S.L., White J.R., Boyd V., Duch C.J., Shiell B.J., Ueda N., Parkyn G.R., Copps J.S. & Boyle D.B. 2009.** Detection of antibodies specific for sheeppox and goatpox viruses using recombinant capripoxvirus antigens in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods*, 161 (1): 19–29.
- **Broyles, S.S., Pennington, M.J., 1990.** Vaccinia virus gene encoding a 30kilodalton subunit of the viral DNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 64, 5376–5382.
- **Broyles, S.S., 2003.** Vaccinia virus transcription. *J. Gen. Virol.* 84 (Pt 9), 2293–2303.
- **Carn V.M., 1994.** An antigen trapping ELISA for the detection of capripoxvirus in tissue culture supernatant and biopsy samples. *J. Virol. Methods*, 51: 95–102.
- **Carter, G.C., Rodger, G., Murphy, B.J., Law, M., Krauss, O., Hollinshead, M., Smith, G.L., 2003.** Vaccinia virus cores are transported on microtubules. *J. Gen. Virol.* 84 (Pt 9), 2443–2458.; Ward, (2005)
- **Chibssa, T.R., Settypalli, T.B.K., Berguido, F.J. et al., 2019.** An HRM Assay to Differentiate Sheeppox Virus Vaccine Strains from Sheeppox Virus Field Isolates and

other Capripoxvirus Species. *Sci Rep* **9**, 6646. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43158-x>

- **Chopade N.A., Kaore M.P., Chavan C.A., Rautmare S.S., Tembhurne P.A., Bhandarkar A.G. and Kurkure N.V., 2013.** Detection of Capripoxvirus from Field Outbreak of Sheep Pox in Maharashtra State by Polymerase Chain Reaction. *Indian Vet. J.*, March 2013, 90 (3) : 110 – 111.
- **Chothia. C., Lesk .A.M., 1986.** The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. (*EMBO J*). 4.823-6.
- **Condit R. C., Mousstache N., Trakman P., 2006.** In a Nutshell: Structure and assembly of the Vaccinia Virion. *Advances in virus Research*, 66, p 31-124.,
- **Da Fonseca F. G., Wolffe E. J., Weisberg A., Moss B., 2000.** Characterization of the vaccinia virus H3L envelope protein: Topology and posttranslational membrane insertion via the C-terminal hydrophobic tail. *J. Virol.*, (2000), 74, p 7508-7517.
- **Da Fonseca F. G., Weisberg A. S., Caeiro M. F., Moss B., 2004.** Vaccinia virus mutants with alanine substitutions in the conserved G5r gene fail to initiate morphogenesis at the nonpermissive temperature. *J. Virol.*, (2004), 78, p 10238-10248.
- **Damaso, C. R., J. J. Esposito, R. C. Condit, and N. Moussatche, 2000.** An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Vir.* 277, 439–449.
- **Das A., Babiuk S. and McIntosh M.T. 2012.** Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of capripoxviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 50, 1613–1620.
- **Datta, S. and Soman, J.P. 1990.** Dot-immunobinding technique in differential diagnosis of pox diseases of sheep and goats. *Indian Journal of Animal Sciences* 60: 1186–1187.
- **Davies, F.G., 1976.** Characteristics of a virus causing a pox disease of sheep and goats in Kenya, with observations on the epidemiology and control. *Journal of Hygiene (Cambridge)* 76, 163-171.
- **Davies FG, Otema C., 1981.** Relationship of capripox viruses found in Kenya with two Middle Eastern strains and some orthopox viruses. *Res Vet Sci* 1981;31(2):253–5.
- **Davies, F.G., 1982.** Observations on the epidemiology of lumpy skin disease in Kenya. *J. Hyg. (Lond.)* 88, 95–102
- **Diallo, A., and G. J. Viljoen, 2007.** Genus Capripoxvirus. In: Mercer, A. A., A. Schmidt, and O. Weber (eds), *Poxviruses*, pp. 167–181. Birkhäuser, Basel, Switzerland

- **Diallo A., Gourreau J. M., Jestin V., et al. (2010)** - GUIDE PRATIQUE de diagnostic et de gestion DES ÉPIZOOTIES. Ed. Sophie Bélichon, DGAI France Romanetti, 2010. p : 31-40.
- **Dubochet J., Adrian M., Richter K., Garces J., Wittek R., 1994.** Structure of Intracellular Mature Vaccinia Virus Observed by Cryoelectron Microscopy. Journal of Virol., (1994), 68 ; 3, p 1935-1941.,
- **Easterbrook K. B., 1966.** Controlled degradation of vaccinia virions *in vitro*: An electron microscopic study. J. Ultrastruct. Res., 14, p 484-496.,
- **El Harrak M., 1987.** Sélection d'une souche thermostable du virus de la clavelée et son utilisation dans la préparation d'un vaccin atténué. Thèse de Doctorat ES sciences agronomiques. Institut Agronomique et vétérinaire, Rabat.
- **El-Kenawy, A.A., El-Tholoth, M.S., 2010.** Sequence analysis of attachment gene of lumpy skin disease and sheep poxviruses. Virologica Sinica 25 (6), 409-16.
- **Embury-Hyatt C, Babiuk S, Manning L, Ganske S, Bowden TR, Boyle DB, Copps J., 2012.** Pathology and viral antigen distribution following experimental infection of sheep and goats with capripoxvirus. J Comp Pathol. 2012;146:106–15.
- **Fakhfakh E., Le Goff C., Albina E., Zekri S., Seghaier C., Odisseev C., Jaafoura M.H., Hammami S., 2005.** Isolement et étude moléculaire de souches des virus de la clavelée et de l'ecthyma contagieux en Tunisie. Revue Élev. Méd. vét. Pays trop., 2005, 58 (1-2) : 7-14.
- **FAO. 2000.** Food and Agriculture Organization of the United Nations - Reconnaître la clavelée. Série : FAO Manuel de terrain, Rome 2000.
- **Fassi-Fehri M., El Harrak M., Bertin F., 1983** - Etude comparative du développement de deux souches vaccinales su virus claveloux sur cellules testiculaires et rénales d'agneau. Résultats préliminaires. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1983, 2 (2), 499-507.
- **Fassi-Fehri et al., 1984 Fassi-Fehri M, El-Harrak M, Johnson O, Abbadi M, El-Jdrissi AH., 1984** - Experimental study of post vaccinal immunity to sheep pox vaccines. Ann de recherches-Veterinaires 1984;15(1):59–64.
- **Garner MG, Sawarkar SD, Brett EK., 2000.** The Extent and Impact of Sheep Pox and Goat Pox in the State of Maharashtra, India. Tropical Animal Health and Production, 32: 205-223.

- **Goebel et al., 1990** Goebel S.J., Johnson G.P., Perkus M.E., Davis S.W., Winslac J.P., Paoletti E.,1990. The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology*, 1990, 179 : 247-266.
- **McFadden G., 2005.** Poxvirus tropism, *NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY*, Volume 3, p : 201-213
- **Gelaye E., Lamien C.E., Silber R., Tuppurainen E.S., Grabherr R. et Diallo A. 2013.**Development of a costeffective method for capripoxvirus genotyping using snapback primer and dsDNA intercalating dye. *PLoS One*, 8 (10): e75971.
- **Greenbaum D., Jansen R., Gerstein M., 2002.** Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts. *Bioinformatics* 18(4):585-96.
- **Greth A, Gourreau JM, Vassart M, Nguyen-Ba-Vy MW, Charies P., 1992.** Capripoxviruses disease in an Arabian Oryx (*Oryx leucoryx*) from Saudi Arabia, 1992. *Journal of Wildlife Diseases*. 1992; 28:295–300.
- **Griffiths G., Wepf R., Wendt T., Krijnse-Locker J., Cyrklaff M., Roos N., 2001a.** Structure and Assembly of Intracellular Mature Vaccinia Virus: Isolated Particle Analysis. *Journal of Virol.*, (2001a), 75 ; 22, p 11034-11055.
- **Griffiths G., Roos N., Schleich S., Krijnse-Locker J.,2001b,** Structure and Assembly of Intracellular Mature Vaccinia Virus : Thin-Section Analyses. *Journal of Virol.*, 75 ; 22, p 11056-11070.
- **Gubser, C., Hue, S., Kellam, P., Smith, G.L., 2004.** Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J. Gen. Virol.* 85 (Pt 1), 105–117.;
- **Haig, D.M., 1998.** Poxvirus interference with the host cytokine response. *Vet Immunol Immunopathol.* 63:149-156.
- **Hasoksuz M., Gulyaz V., Sarac F., 2014.** Molecular Characterizations of Sheeppox Virus Strains. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ.* 40 (1), 95-102, 2014
- **Heine HG, Stevens MP, Foord AJ, Boyle DB., 1999.** A capripox virus detection PCR and antibody ELISA based on the major antigen P32 the homolog of the vaccinia virus H3L gene. *J Immunol Methods* 1999;227: 187–96.
- **Hiller G., Weber K., 1985.** Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment. *J. Virol.* 55,651–659.].

- **Hosamani M, Mondal B, Tembhurne PA, Bandyopadhyay SK, Singh RK, Rasool TJ., 2004.** Differentiation of sheep pox and goat poxviruses by sequence analysis and PCR-RFLP of P32 gene. *Virus Genes*. 2004 Aug;29(1):73-80.
- **Hosamani M., Bhanuprakash V., Kallesh D.J., Balamurugan V., Pande A. et Singh R.K., 2008.** *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol. 46, Octobre 2008, pp. 685-689.
- **Hughes A. L., Friedman R., 2005.** Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35 (2005) 186–195. doi:10.1016/j.ympev.2004.12.008
- **Husain, M., Moss, B., 2005.** Role of receptor-mediated endocytosis in the formation of vaccinia virus extracellular enveloped particles. *J. Virol.* 79 (7), 4080–4089.
- **Ireland D.C., Binopal YC., 1998.** Improved detection of capripoxvirus in biopsy samples by PCR. *J Virol Methods* 1998;74:1–7.
- **Jennifer M., Xiaopei H. et al. Yiping Y., 2010.** Direct TLR2 Signaling Is Critical for NK Cell Activation and Function in Response to Vaccinia Viral Infection, *PLoS Pathogene*, 6(3): e1000811.
- **Johnston, J.B., Barrett, J.W., Chang, W. 2003.** Role of the serine-threonine kinase PAK-1 in myxoma virus replication. *J. Virol.*, 77(10):5877-5888.
- **Joklik W. K., 1968.** The Poxviruses. *Annu. Rev. Microbiol*, 22, p 359-390.
- **Joost P., Bert Z., Peter H., Bernard M., 2011.** Reactions of betapropiolactone with nucleobase analogues, nucleosides and peptides: Implications for the inactivation of viruses\*, Unit Vaccinology National Institute for Public Health and the Environment.
- **Kate S. Baker and Pablo R. Murcia, 2014.** Poxviruses in Bats ... so What?, *Viruses* 2014, 6, 1564-1577.
- **Kumar S, Stecher G. and Tamura K., 2015.** MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- **Kitching RP, Mellor PS. 1986.** Insect transmission of Capripoxvirus. *Res Vet Sci* 40: 255–258.
- **Kitching, R. P., 1986a:** The control of sheep and goat pox. *Rev.Sci. Tech. Off. Int. des Epizoot.* 5, 503–511.
- **Kitching, R. P., 1986b:** Passive protection of sheep against capripoxvirus. *Res. Vet. Sci.* 41, 247–250.

- **Kitching, R. P., and Mellor P. S., 1986:** Insect transmission of capripoxvirus. *Res. Vet. Sci.* 40, 255–258.
- **Kitching, R. P., and Smale C., 1986.** Comparison of the external dimensions of capripoxvirus isolates. *Res. Vet. Sci.* 41, 425–427.
- **Kitching, R.P, Hammond, J.M. and Taylor, W.P., 1987.** A single vaccine for the control of Capripox infection in sheep and goats. *Research in Veterinary Science* *Res. Vet. Sci.* 42, 53–60.
- **Kitching, R. P., 2003:** Vaccines for lumpy skin disease, sheep pox and goat pox. *Dev. Biol.* 114, 161–167.
- **Kitching, R. P., and V. M. Carn, 2004.** Sheep pox and goat pox. *Office International des Epizooties Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, birds and bees).* OIE, Paris.
- **Knipe, D. M. & Howley, P. M. 2007.** *Fields Virology, Fifth Edition.* Editions Lippincott-Williams and Wilkins. 3177 p.
- **Kruse, N. and Weber, O. 2001.** Selective induction of apoptosis in antigen-presenting cells in mice by parapoxvirus ovis. *J Virol.* 75: 4699-4704.
- **Lamien C. E., Lelenta M., Goger W., Silber R., Tuppurainen E., Matijevic M., Luckins A. G., Diallo A., 2011a.** Real time PCR method for simultaneous detection, quantitation and differentiation of capripoxviruses. *Journal of Virological Methods:* 171 (2011) 134–140.
- **Lamien C. E., Le Goff C., Silber R., Wallace D. B., Gulyaz V., Tuppurainen E., Madani H., Caufour P., El Harrak M., Luckins A. G., Albina E., Adam T., Diallo A., 2011b.** Use of the Capripoxvirus homologue of Vaccinia virus 30 kDa RNA polymerase subunit (RPO30) gene as a novel diagnostic and genotyping target: Development of a classical PCR method to differentiate Goat poxvirus from Sheep poxvirus. *Veterinary Microbiology* 149 (2011) 30–39.
- **Lateef, Z., Fleming, S., Halliday, G., Faulkner, L., Mercer, A. and Baird, M. 2003.** Orf virus-encoded interleukin-10 inhibits maturation, antigen presentation and migration of murine dendritic cells. *J Gen Virol,* 84:1101-1109.
- **Le Goff C., Lamien C. E., Fakhfakh E., Chadeyras A., Aba-Adulugba E., Libeau G., Tuppurainen E., Wallace D. B., Adam T., Silber R., Gulyaz V., Madani H., Caufour P., Hammami S., Diallo A., and Albina E., 2009.** Capripoxvirus

- G-protein-coupled chemokine receptor: a host-range gene suitable for virus animal origin discrimination. *J. of Gen. Virol.* 90, 1967–1977.
- **Lefkowitz E.J., Wang C., Upton C., 2006.** Poxviruses: past, present and future, *Virus Research* 117 (2006) 105–118.]
  - **Le Jan C., Thiemoko C., Sow Abdou1 D., François J. L., DIOUARA A. 1987.** Observations sur la clavelte en Mauritanie. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 40 (3) : 211-214.
  - **Limon G, Gamawa AA, Ahmed AI, Lyons NA and Beard PM, 2020.** Epidemiological Characteristics and Economic Impact of Lumpy Skin Disease, Sheepox and Goatpox Among Subsistence Farmers in Northeast Nigeria. *Front.*
  - **Lorenzo, M.M., Herrera, E., Blasco, R., Isaacs, S.N., 1998.** Functional analysis of vaccinia virus B5R protein: role of the cytoplasmic tail. *Virology* 252 (2), 450–457.
  - **Mahmoud MA, Khafagi MH 2016.** Detection, identification, and differentiation of sheep pox virus and goat pox virus from clinical cases in Giza Governorate, Egypt, *Veterinary World*, 9(12):1445-1449.
  - **Maksyutov R. A., Gavrilova E. V., Agafonov A. P., Taranov O. S., Glotov A. G., Shchelkunov S. N. and Sergeev A. N., 2013.** An Outbreak of Sheep Pox in Zabajkalskij kray of Russia, Short communication. © 2013 Blackwell Verlag GmbH • *Transboundary and Emerging Diseases*. P: 1-4. doi:10.1111/tbed.12176
  - **Mangana-Vougiouka O., Martoulatos P, Koptopoulos G, Nomikou K, Bakandritsos N, Papadopoulos O., 1999** - Sheep poxvirus identification by PCR in cell cultures. *J Virol Methods* 1999;77:75–9.
  - **Martin WB, Erhan M, Onar B., 1975** - Studies on sheep pox vaccine–serum–virus neutralization tests. *Pendik Vet Kontrol Ara Enst Derg* 1975;8:26–47.
  - **Matthews R.E.F., 1982** - Classification and nomenclature of viruses. 4th report of international committee on taxonomy of viruses. S. Karger: 42-46.
  - **Mirzaie Kamran, Mohammad Seyed, Barani and Bokaie Saied, 2015.** A review of sheep pox and goat pox: perspective of their control and eradication in Iran. *J. Adv. Vet. Anim. Res.*, 2(4): 373-381, December 2015.
  - **Mohan T, Verma P, Rao DN., 2013.** Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *The Indian Journal of Medical Research*; 138(5):779-795.

- **Moss B., 2001.** Poxviridae: The Viruses and their Replication. In “Fields Virology” .D. M. Knipe, and P. M. Howley eds. and al., (2001). – p 2849-2884. Lippincott Williams & Wilkins, Philaladelphia].
- **Moss, B., Shisler, J.L., 2001.** Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. *Semin. Immunol.* 13 (1), 59–66.;
- **Moss B., Ward B. M., 2001** High-speed mass transit for poxviruses on microtubules. *Nature Cell Biology*, 3, p 245-246.,
- **Murray L., Edwards L., Tuppurainen E.S., Bachanek-Bankowska K., Oura C.A., Mioulet V. et King D.P., 2013.** Detection of capripoxvirus DNA using a novel loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Vet. Res.*, 9,90.
- **Murty, D. K., and P. P. Singh.** 1971. Epidemiological studies on an outbreak of sheep-pox in a mixed flock in Uttar Pradesh. *Indian J. Anim. Sci.*41:1072-1079.
- **Ngichabe, C.K., Binepal, Y.S., Njiru, J.W. and Carn, V.M., 1999.**Evaluation of an immunocapture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of capripoxvirus. *Veterinary Record* 145: 231–232.
- **Oğuzoğlu, T. C., F. Alkan, A. Ozkul, S. A. Vural, A. B. Güngör, and I. Burgu, 2006.** A sheeppox virus outbreak in central Turkey in 2003: isolation and identification of capripoxvirus ovis. *Vet. Res. Commun.* 30, 965–971.
- **Olga V. Chervyakova, Valentin L. Zaitsev, Bulat K. Iskakov, Elmira T. Tailakova, Vitaliy M. Strochkov, Kulyaisan T. Sultankulova, Nurlan T. Sandybayev, Gulshan E. Stanbekova, Daniyar K. Beisenov, Yergali O. Abduraimov, Muratbay Mambetaliyev, Abylay R. Sansyzybay, Natalia Y. Kovalskaya, Lev. G. Nemchinov and Rosemarie W. Hammond, 2016.** Recombinant Sheep Pox Virus Proteins Elicit Neutralizing Antibodies. *Viruses* 2016,8, 159; doi:10.3390/v806015
- **Omoga D.C.A., Macharia M., Magiri E., Kinyua J., Kasiiti J. et Holton T. 2016.**Molecular based detection, validation of a LAMP assay and phylogenetic analysis of capripoxvirus in Kenya. *J. Adv. Biol. Biotech.*, 7, 1–12.
- **Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2005 (1),** Manuel terrestre de l’OIE., *Chapitre 2.1.10*— Clavelée et variole caprine, 4<sup>ème</sup> éd., p: 237- 248.
- **Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2005 (2),** Manuel terrestre de l’OIE., *Chapitre 1.1.5.* — Validation et contrôle qualité des méthodes d’amplification en chaîne par PCR utilisées pour le diagnostic des maladies infectieuses. p : 50-60.

- **Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2008 (1)**, Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres, Chapitre 2.7.14. . Clavelée et variole caprine, 4<sup>ème</sup> éd., p : 1157-1168.
- **Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2008 (2)**, Manuel terrestre de l'OIE., *Chapitre 1.1.7.* — Les biotechnologies dans le diagnostic des maladies infectieuses et le développement des vaccins. p : 72- 89.
- **Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2010**, Manuel terrestre de l'OIE. Chapitre 2.7.14 — Clavelée et variole caprine, p : 1-6.
- **Organisation Mondiale de la Santé Animale, 2017**, Manuel terrestre de l'OIE. *Chapitre 2.7.13* — Clavelée et variole caprine, p : 1-12.
- **Payne, L.G., 1980.** Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia. J. Gen. Virol. 50, 89–100.]
- **Pickup, D.J. 1994.** Poxviral modifiers of cytokine responses to infection. Infect Agents Dis. 3:116-127.
- **Piuzzi. M., 2010.** Détermination de la structure de protéines à l'aide de données faiblement résolues. Thèse Biochimie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, Français.
- **Plowright W, Ferris RD., 1958.** The growth and cytopathogenicity of sheep pox virus in tissue culture. Br J Exp Pathol 1958; 38, p:424–35.
- **Précausta P., Kato F., et Vellut G., 1979.**A new freeze-dried living virus vaccine against Sheep-pox. Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis., Vol. 1, pp. 305-319.
- **Précausta P., Kato F., et Vellut G., 2002.**A new freeze-dried living virus vaccine against sheep-pox (Nouveau vaccin anticlaveleux a virus vivant lyophilisé), Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, Volume 1, Issue 4, 1979, Pages 305-319.
- **Puranchand, Rao, V.D.P., Chandra, R. and Garg, S.K., 1987.**A note on the antigenic relationship of sheep pox virus strains. Indian Journal of Veterinary Medicine 7: 166–168.
- **Ramyar, H., 1965.** Studies on the immunogenic properties of tissue culture sheep pox virus. Zentralbl. Veterinarmed, 123, 537-540.
- **Ramyar, H. and Hessami, M., 1967.** Development of an attenuated live virus vaccine against sheep pox. Zentralbl Veterinarmed B. 14(6), 516-9

- **Ramyar H., and Hessami M., 1970.** Studies on the duration of immunity conferred by a live modified sheep pox tissue culture virus vaccine. *Zentralblatt fur Vetmed* 1970;17B, p:869–74.
- **Regnary RL.,2007.** Poxvirus and the passive quest for novel hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 315: 345-361
- **Rao, T.V.S., Negi, B.S. and Bansal, M.P., 1996.** Identification and characterization of differentiating soluble antigens of sheep and goat poxviruses. *Acta Virologica* 40:259–262.
- **Rao TVS., Bandyopadhyay SK., 2000.** A comprehensive review of goat pox and sheep pox and their diagnosis. *Anim Health Res Rev* 2000;1(2) p:127–36.
- **Regnery, R. L., 2007.** Poxviruses and the passive quest for novel hosts. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 315, 345–361.
- **Roper, R.L., Payne, L.G., Moss, B., 1996.** Extracellular vaccinia virus envelope glycoprotein encoded by the A33R gene. *J. Virol.* 70, 3753–3762.
- **Rosales, R., Harris, N., Ahn, B.Y., Moss, B., 1994.** Purification and identification of a vaccinia virus-encoded intermediate stage promoterspecific transcription factor that has homology to eukaryotic transcription factor SII (TFIIS) and an additional role as a viral RNA polymerase subunit. *J. Biol. Chem.* 269, 14260–14267.
- **Sabban, M.S., 1957.** The cultivation of sheep pox virus on the chorioallantoic membrane of the developing chicken embryo. *American Journal of Veterinary Research* 18 (68), 618-24.
- **Sadri, R., et Fallahi, R., 2010.** A new approach to develop a vaccine against capripox infection in sheep and goats using a new strain of sheep pox virus in Iran. *Int.J.Vet.Res.* (2010), 4; 4: 221-224.
- **Sameeh M., Abutarbush, Eeva S. M., 2018,** Tuppurainen, Serological and clinical evaluation of the Yugoslavian RM65 sheep pox strain vaccine use in cattle against lumpy skin disease, *Transboundary and Emerging Diseases*, doi: 10.1111.
- **Sanger. F., Nicklen. SetCoulson. A. R.,1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. (*ProcNatlAcadSci U S A*). 74. 12. 5463-7.
- **Seet, B.T., Johnston, J.B., Brunetti, C.R., 2003.** Poxviruses and immune evasion. *Annu. Rev. Immunol.*, 21377-423.
- **Sharma, S.N.and Dhanda, M.R. 1969.** Serological studies on sheep and goat poxviruses. *Indian Journal of Animal Sciences* 40: 522–528.

- **Sharma, S. N. and Dhanda, M. R. 1971.** Studies on sheeppox and goatpox virus haemagglutination. *Indian J. Anim. Sci.*, 10 : 43-46
- **Sharma, S.N.and Dhanda, M.R. (1971).**Studies on sheep- and goat-pox viruses. Relationship with CPD and vaccinia viruses. *Indian Journal of Animal Sciences* 41: 864–867.
- **Shehbaz HA and Hassan IQ, 2017.** Phylogenetic analysis of sheepox virus isolates based on P32 gene in Iraq. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2017; 5(6): 704-708
- **Sherry L. Haller, Chen Peng, Grant McFadden, and Stefan Rothenburg, 2014.** Poxviruses and the Evolution of Host Range and Virulence, *Infect Genet Evol.* 2014 January ; 0: 15–40.
- **Seet, B.T., Johnston, J.B., Brunetti, C.R., Barrett, J.W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S.H., Lucas, A., McFadden, G., 2003.** Poxviruses and immune evasion. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 377–423].
- **Singh, R. K., M. Hosamani, V. Balamurugan, V. Bhanuprakash, T. J. Rasool, and M. P. Yadav, 2007.** Buffalopox: an emerging and re-emerging zoonosis. *Anim. Health. Res. Rev.* 8, 105–114.
- **Smith, G.L., Vanderplasschen, A., Law, M., 2002.** The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* 83 (Pt 12), 2915–2931.].
- **Stanford M.M. Werden S.J. and McFadden G., 2007,** Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Vet. Res.* 38, 299-318.
- **Stanford J.D., Rohling E.J., Bacon S., Holliday N.P., 2011.** A review of the deep and surface currents around Eirik Drift, south of Greenland:Comparison of the past with the present. *Global and Planetary Change* 79 (2011) 244–254.
- **Stram Y, Kuznetzova L, Friedgut O, Gelman B, Yadin H, Rubinstein-Guini M. 2008.** The use of lumpy skin disease virus genome termini for detection and phylogenetic analysis. *Journal of Virological Methods.* 2008; 151:225-229.
- **Stubbs S., Oura C.A., Henstocka M., Bowden T.R., King D.P. & Tuppurainen E.S. 2012.** Validation of a highthroughput real-time polymerase chain reaction assay for the detection of capripoxviral DNA. *J. Virol. Methods,*179, 419–422.
- **Su H.L., Jia H.J., Yin C., Jing Z.Z., Luo X.N. and Chen Y.X.,2015.** Phylogenetic analysis of Gansu sheeppox virus isolates based onP32, GPCR, and RPO30 genes. *Genet. Mol. Res.*; 14: 1887-1898.

- **SubbaRao, M.V., Malik, B.S. and Sharma, S.N., 1984.**Antigenic relationships among sheep pox, goat pox and CPD viruses. *Acta Virologica* 28: 380–387.
- **Sumana K, Revanaiah Y, Apsana R, Roy P, Reddy GBM, 2020.** Molecular characterization of sheeppox virus from outbreaks in Karnataka, India, *Veterinary World*, 13(2): 386-391.
- **Tam.M., Gómez. S., González-Gross. M. and Marcos. A., 2003.** Possible roles of magnesium on the immune system.. (*European Journal of Clinical Nutrition*). 57. 1193-1197.
- **Tarbouriech N, Flusin O, Sele C, Iseni F., 2012.**La synthèse du génome des poxvirus. *Virologie* 2012; 16(4) : 210-24.
- **Tian, H., Chen, Y., Wu, J., Shang, Y., Liu, X., 2010.** Serodiagnosis of sheeppox and goatpox using an indirect ELISA based on synthetic peptide targeting for the major antigen P32. *Virology Journal* 7, 245-249
- **Tulman, E.R., Afonso, C.L., Lu, Z., Zsak, L., Sur, J-H., Sandybaev, N.T., Kerembekova, U.Z., Zaitsev, G.F., Kutish, G.F., and Rock, D.L., 2002.** The genomes of sheepox and goatpox viruses. *Journal of Virology* 76, 6054-6061.
- **Tuppurainen E. S. M., Venter E. H., Shisler J. L., Gari G., Mekonnen G. A., Juleff N., De Clercq K., Upton C., Bowden T. R., Babiuk S. and Babiuk L. A., Lyons N. A., 2015.** Review: Capripox Current Status and control, *Transboundary and Emerging Diseases*, P: 1-17.
- **Upton, C., Slack, S., Hunter, A.L., Ehlers, A., Roper, R.L., 2003.** Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. *J. Virol.* 77 (13), 7590–7600.
- **Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. & Wickner, R.E. 2000.**Virus taxonomy.Classification and nomenclature of viruses, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.1121 p.
- **Varshovi, H.R.,Keyvanfar, H., Aghaiypour, K. Pourbakhsh, S.A., Shooshtari, A.H., Aghaebrahimian, M.,2009.**Capripoxvirus identification by PCR based on P32 gene. *Archives of Razi Institute*, Vol. 64, No. 1, 19-25

- **Weiss J. M., 1968. Effects of coping behavior in different warning signal conditions on stress pathology in rats, 1971.**Journal of Comparative and Physiological Psychology, Vol. 77, No.1, 1-13.
- **Wilton S., Mohandas A. R., Dales S., 1995.** Organization of the Vaccinia Envelope and Relationship to the Structure of Intracellular mature Virions. *Virology*, 214, p 503-511.].
- **Wolff, Janika; Abd El Rahman, Sahar; King, Jacqueline; El-Beskawy, Mohamed; Pohlmann, Anne; Beer, Martin; Hoffmann, Bernd. 2020.** "Establishment of a Challenge Model for Sheeppox Virus Infection" *Microorganisms* 8, no. 12: 2001.
- **Xin-Min Yan, Yue-Feng Chu, Guo-Hua Wu, Zhi-Xun Zhao, Jian Li, Hai-Xia Zhu, Qiang Zhang, 2011.** An outbreak of sheep pox associated with goat poxvirus in Gansu province of China. *Veterinary Microbiology* 156 (2012) 425–428.
- **Yao, X.D., Evans, D.H., 2003.** High-frequency genetic recombination and reactivation of orthopoxviruses from DNA fragments transfected into leporipoxvirus-infected cells. *J. Virol.* 77 (13), 7281–7290.
- **Yeruham, I., Nir, O., Braverman, Y., Davidson, M., Grinstein, H., Haymovitch, M., and Zamir, O., (1995).** Spread of lumpy skin disease in Israeli dairy herds. *The Veterinary Record*, 137, 91-93.
- **Yeruham I, Yadin H, Van Ham M., 2007.** Economic and epidemiological aspects of an outbreak of sheeppox in a dairy sheep flock. *The Veterinary Record*, 160: 236-237.
- **Zeedan GSG, Mahmoud AH, Abdalhamed AM, Ghazy AA and Abd EL-Razik KhA, 2020.** Rapid Detection and Differentiation between Sheep Pox and Goat Pox Viruses by Real-Time qPCR and Conventional PCR in Sheep and Goat in Egypt. *World Vet. J.*, 10 (1): 80-87. DOI: <https://dx.doi.org/10.36380/scil.2020.wvj11>
- **Zhang. J., Patel. V.L., Johnson. T.R., Chung .P., Turley .J.P. 2005.**Evaluating and Predicting Patient Safety for Medical Devices with Integral Information Technology. In: Henriksen .K., Battles. J.B., Marks. E.S, Lewin. D.I., editors. *Advances in Patient Safety: From Research to Implementation (Volume 2: Concepts and Methodology)*. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US).
- **Zhang C., Freddolino P. L. et Zhang Y., 2017.** COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein–protein interaction information. *Nucleic Acids Research*, 2017. doi: 10.1093/nar/gkx366
- **Zhixun Zhao, Bin Fan, Guohua Wu, Xinmin Yan, Yingguo Li, Xiaoli Zhou, Hua Yue, Xueling Dai, Haixia Zhu,Bo Tian, Jian Li and Qiang Zhang, 2017.**

Development of loop-mediated isothermal amplification assay for specific and rapid detection of differential goat Pox virus and Sheep Pox virus. BMC Microbiology 2014, 14:10 <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/14/1>

- **Zhou Tao, Jia Huaijie, Chen Guohua He, Xiaobing, Fang Yongxiang, Wang Xiaoxia, Guan Qisai, Zeng Shuang, Cui Qing et Jing Zhizhong, 2012.** Phylogenetic analysis of Chinese sheeppox and goatpox virus isolates. Virology Journal 2012, 9:25
- **Zhu X.L., Yang F., Li H.X., Dou Y.X., Meng X.L., Li H., Luo X.N and Cai X.P., 2013.** Identification and phylogenetic analysis of a sheep pox virus isolated from the Ningxia Hui Autonomous Region of China. Genet. Mol. Res. 12 (2): 1670-1678
- **Zro K., Azelmat S., Bendouro Y., Kuhn J.H., El fahime E. and ENNAJI M.M. (2014a).** PCR-based assay to detect sheeppox virus in ocular, nasal, and rectal swabs from infected Moroccan sheep. J. Virol. Methods, 2014, 38–43.
- **Zro K., Zakhm F., Melloul M., El fahime E. et ENNAJI M. M., 2014b.** A sheeppox outbreak in Morocco: isolation and identification of virus responsible for the new clinical form of disease. BMC Vet Res., 10, 31.

## Webographie:

<https://www.viprbrc.org>

<http://www.agriculture.gov.ma>

**-ONSSA, 2017**

<http://www.onssa.gov.ma/fr/sante-animale/programme-de-prophylaxie/clavelee-ovine>

**-ONSSA, 2021**

<http://www.onssa.gov.ma/fr/sante-animale/situation-epidemiologique-et-veille-sanitaire/au-niveau-national>

<https://fr.scribd.com/document/312289893/Clavelee-dahir>

[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Diseaseinformation](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation)

[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal Health in the World/docs/pdf/Disease cards/SHEEP GOAT POX.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/SHEEP_GOAT_POX.pdf)

<http://www.oie.int>

<https://www.viprbrc.org>

[www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)



***PARTIE VI : ANNEXES***

# ANNEXES

## **Annexe 1 : Appareillage, réactifs et produits utilisés dans ce travail**

### • **Appareillage :**

- ✓ Poste de Sécurité Microbiologique de classe II : l'emploi de virus vivant de la FA, agent de classe 3, impose de travailler en laboratoire confiné de catégorie 3.
- ✓ Bac réfrigérant
- ✓ Micro centrifugeuse de paillasse (réf : Hitich, Universel 320 R).
- ✓ Agitateur vibrant (réf : Heidolph, Reaxtop).
- ✓ Matériels de pipetage et de micro pipetage
- ✓ Pointes à filtres RNase et DNase free de 10, 20, 200 et 1000µL
- ✓ Microtubes de 0,2 mL, 1,5 mL et de 2 mL RNase et DNase free
- ✓ Tubes de Smart cycler compatibles avec l'appareil thermocycleur en temps réel (réf : 401740).
- ✓ Thermocycleur en temps réel (réf : 401740).
- ✓ La cuve d'électrophorèse (réf : Apelex).
- ✓ Générateur électrique (réf : Apelexps 608)
- ✓ Appareil UV (ultras violé) (réf : Biobtock).
- ✓ Plaque chauffante (réf : Hotplate B290).
- ✓ Thermocycleur conventionnel (TECHNE TC-512).
- ✓ Nanodrop 8000.
- ✓ Bio-analyseur Qiaxcel
- ✓ Séquenceur ABI 3130xl Genetic analyzer
- ✓ Système de photo documentation « G Box ».
- ✓ Boîtes de pétri (1 seule valve)
- ✓ Lame de Bistouri
- ✓ Agent désinfectant : alcool
- ✓ Bain marie
- ✓ Incubateur

### • **Réactifs et Produits**

- ✓ **Trousse la PCR en temps réel et de la PCR conventionnel :**
- ✓ Kit Invitrogen (Cat. Num. 11734-050).
- ✓ H<sub>2</sub>O ultra pure DEPC RNase/DNase free

- ✓ Agarose 1.5°/°
- ✓ Bromure d'éthidium
- ✓ Tampon de charge
- ✓ Marqueurs de sélection
- ✓ TAE (tris acide acétique glaciale EDTA)
- ✓ Kit Qiagen
- ✓ PBS (l'eau phosphatée stérile)

## **Annexe 2 : Préparation du gel d'agarose à 1.5 %**

### • Réactif :

Agarose qualité biologie moléculaire (Sigma / A9539)

### Préparation :

- ✓ La quantité de gel d'agarose à préparer dépend du moule à utiliser
- ✓ Le mini moule à gel nécessite 30 ml
- ✓ Le moule 10 x 21 cm : 80 ml
- ✓ Le moule 20 x 22 cm : 160 ml
- ✓ Faites dissoudre l'agarose dans le tampon TAE 1X à raison de 1.5 g pour 100 ml
- ✓ Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète
- ✓ Laisser refroidir jusqu'à 50°C (température supportable au toucher)
- ✓ Ajouter 50 µl de la solution de bromure d'éthidium à 10 mg /ml (concentration finale dans le gel : 0.5 mg / ml)

## **Annexe 3 : Préparation du tampon TAE 50X**

- ✓ Trizma Base (Sigma /T1503).....242g
- ✓ Acide acétique glacial (Sigma / A 62835 - C2H4O2).....57.1 ml
- ✓ EDTA 0.5 M pH 8.....100 ml
- ✓ Eau distillée stérile q.s.p.....1000 ml
- ✓ Conserver à la température ambiante

## **Annexe 4: Préparation du Tampon de charge**

- ✓ Gel PCR loading buffer (Sigma / P7208) : solution prête à l'emploi gardée à + 4°C A défaut on peut utiliser le tampon suivant :
- ✓ Bleu de bromophénol (Sigma/ B5525).....0, 25 %
- ✓ Xylène cyanol (Sigma / X 4126).....0, 25 %
- ✓ Glycérol (Sigma / G5516) .....30 %

- ✓ Conservation à + 4 °C

## **Annexe 5 : La PCR en temps réel**

### \*Extraction de l'ADN viral:

Pour chaque manipulation utilisez un témoin positif (vaccin sheeppox) et un témoin négatif (eau DEPC) qui seront traités dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser. L'extraction de l'ADN viral est réalisée par le kit Qiagen Dneasy Tissue selon la procédure suivante :

#### **Remarque :**

- Amener les échantillons à température ambiante.
- Préchauffer le bain-marie à 56°C pour l'étape 4.
- Amener le tampon AE ou l'eau à température ambiante pour l'élution à l'étape 10.
- S'assurer que le tampon AW1, le tampon AW2, et la protéase QIAGEN ont bien été préparés.
- Les centrifugations seront réalisées à température ambiantes.

1- Déposer 200µl d'échantillon dans un tube à 1,5 ml.

2- Ajouter 20µl de protéase QIAGEN (ou protéinase K).

3- Ajouter 200µl de tampon AL à l'échantillon. Mélanger 15 secondes en vortexant.

Pour assurer une lyse efficace, il est important de mélanger vigoureusement l'échantillon avec le tampon afin d'obtenir une solution homogène.

4- Incuber 10 minutes à 56°C. Le rendement en ADN est optimal après une lyse de 10 min à 56°C. Une incubation plus longue n'a aucun effet sur le rendement ou la qualité de l'ADN purifié.

5- Centrifuger brièvement le microtube de 1,5 ml.

6- Déposer avec précaution le mélange obtenu dans la colonne QIAamp (installée dans un tube collecteur de 2ml) sans mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger 1min à 6000xg (8000rpm). Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2ml et jeter le tube contenant l'effluent.

7- Ouvrir la colonne QIAamp avec précaution et ajouter 500µl de tampon AW1 sans en mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger 1min à 6000xg (8000 rpm). Transférer la colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2ml et jeter le tube contenant l'effluent.

8- Ouvrir la colonne QIAamp et ajouter 500µl de tampon AW2 sans en mouiller le bord.

Fermer le capuchon et centrifuger 3min à vitesse maximale (20000xg;14000 rpm).

9- Transférer la colonne QIAamp dans un tube propre de 1,5ml. Jeter l'ancien tube collecteur contenant l'effluent. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp et déposer dans la colonne 200µl de tampon AE ou d'eau distillée. Incuber 1minute à température ambiante puis centrifuger 1 minute à 6000xg (8000 rpm).

10-Récupérer le tube contenant l'ADN extrait.

**\*Amplification du DNA extrait :**

**1- Préparation du mélange réactionnel**

- Pour un ADN :

Réactifs	Volume par réaction
Buffer 10X	2,5 µl
Mg Cl <sub>2</sub> 5Mm	2µl
dNTP 10mM	0,25µl
Taq polymérase	1,25 U (0,25 µl si 5unités / µl)
Primer 1 (200nM)	1µl
Primer 2 (500 nM)	1µl
H <sub>2</sub> O DEPC	13µl

➤ **Calcul de la quantité de mélange réactionnel nécessaire pour l'ensemble des échantillons**

- Dans un tube de 1,5 ou 0,5 ml (selon la quantité à préparer) placé dans un bac de glace, mélanger tout les réactifs sauf la Taq qui sera ajoutée juste avant l'addition de l'ADN.
- Homogénéiser par agitation sur vortex après avoir additionner la Taq.
- Répartir **20µl** de ce mélange par tube de **0,5ml**, au nombre d'échantillons (dans la glace pilée)
- Sous la hotte, ajouter **5µl** de l'ADN extrait
- Rajouter 25 µl d'huile minérale (Sigma / M 5904) dans chaque tube pour éviter l'évaporation.
- Bien fermer les tubes
- Allumer le thermocycleur
- Mettre un peu d'huile minérale (20 µl) dans les puits pour que la température soit homogène sur toutes les parois du tube
- Placer les tubes dans le thermocycleur

2- Démarrer l'amplification programme **SPV** : 16 –17 – 18 -19

**Programme 16** : 94°C -5min -un cycle

**Programme17** : 94°C– 10 secondes

55°C– 10 secondes      40 cycles

72°C– 10 secondes

**Programme18** : 72°C– 10 min – un cycle

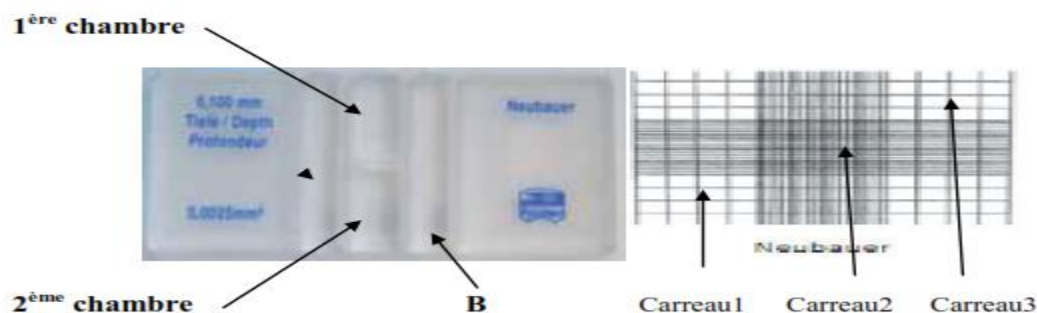
**Programme19** : +4°C–0 cycles

### **Annexe 6 : Rôle des constituants du mélange réactionnel**

Constituants	Rôle
Buffer	C'est un diluant et contient aussi les bases nucléotidiques (DNTP) pour la complémentation ou l'élongation des brins d'ADN à amplifié
MgSO4	Activateur de l'enzyme de la Taq-polymérase
ROX	Permet de normaliser les variations de fluorescence non relié à la PCR c.-à-d., minimiser les réactions non spécifiques.
Enzymes	Contient la RT ou l'enzyme de transcription qui sert qu'à partir de l'ARN avoir l'ADN complémentaire ; et la taq-polymérase qui sert pour la polymérisation des brins d'ADN et donc obtenir à la fin plusieurs copie.
P1 et P2	Les primers ou amorces sens et antisens qui servent pour la localisation de la partie du gène amplifier
Sonde	Sonde TaqMan fluorophore qui sert à émettre la fluorescence en cas de positivité
H2O	Pour compléter a un volume de 20µl

### **Annexe 7 : Numération des cellules**

- Homogénéiser par agitation la suspension cellulaire.
- Prélever quelques millilitres dans un flacon de 2 ml.
- Nettoyer la cellule de numération avec un mouchoir en papier imbibé d'alcool à 70%.
- Montrer la lamelle sur la lame en humectant les bords(B).
- Dans un flacon propre de 2ml, mettez 900µl de la solution du bleu trypan et y ajouter 100µl du prélèvement de la suspension cellulaire.
- Bien mélanger et faites déposer une goutte entre lame et lamelle dans la première chambre et une autre goutte dans la deuxième chambre.



-Placer la lame de numérations sur la platine du microscope (grossissement x100) et compter les cellules vivantes dans 3 carreaux en diagonale dans chaque chambre de la lame en utilisant le compteur manuel.

-Les cellules vivantes apparaissent rondes et brillantes avec un contour régulier. Les cellules mortes sont colorées en bleu.

-Calculer la concentration cellulaire par millilitre, en utilisant la formule suivante:

$$C = \frac{N \times 10}{10^{-4}}$$

-Avec:

- N : Nombre moyen de cellules viables comptées dans les 6 carreaux de la cellule de numération (N= Nombres de cellules calculées dans 3 carreaux en diagonale/6).

-10<sup>-4</sup>: Volume des Chambres (ml).

-10 : Facteur de dilution de la suspension cellulaire (100µl de cellules + 900µl du bleu de trypan).

## **Annexe 8 : Composition du milieu de croissance cellulaire et du milieu d'inoculation virale**

### **• Milieu de croissance cellulaire:**

- DMEM 10 fois concentré.....100ml
- Hydrolysate de lactalbumine à 2.5%..... 40ml
- Glucose à 10%..... 10ml
- Solution de L-Glutamine 200 mM..... 10ml
- Solution antibiotique antimycotique 100 X..... 10 ml
- Eau bidistillée stérile.....qsp 1000ml
- Bicarbonate de sodium à 5.6%..... 35ml
- Sérum de veau fœtal ..... 100ml

pH : 7.0 à 7.2

Stérilisation par filtration sur une cartouchemillipore0.22µ

• **Milieu d'inoculation virale:**

- DMEM 10 fois concentré..... 100ml
- Hydrolysate de lactalbumine à 2.5%..... 40ml
- Kanamycine à 50 mg/ml..... 2,3ml
- Eau bidistillée stérile.....qsp 1000ml
- Bicarbonate de sodium à 5.6%..... 35ml
- Sérum de veau fœtal irradié..... 10ml

pH : 7.2 à 7.4

Stérilisation par filtration sur une cartouchemillipore0.22µ.

**Annexe 9 : Extraction de l'ADN viral par le Kit « Purelink viral**

**DNA/RNA kit d'INVITROGEN »**

Le kit d'ARN viral / ADN viral PureLink™ est conçu pour isoler l'acide nucléique viral des liquides biologiques acellulaires tels que le plasma, le sérum et le LCR (liquide céphalo-rachidien) ainsi que le surnageant de culture cellulaire en utilisant des échantillons frais ou congelés.

Pour obtenir un rendement élevé en acides nucléiques viraux et minimiser toute dégradation, il faut suivre les instructions suivantes :

- Recueillir l'échantillon et procéder immédiatement au protocole de purification. Si vous le souhaitez, vous pouvez stocker l'échantillon à 4°C pour un stockage à court terme (≤4 heures) ou congeler l'échantillon à -20°C ou -80°C pour le stockage à long terme.
- Ne congelez pas et ne décongelez pas l'échantillon plus d'une fois.
- Retirer tous les cryoprécipités visibles des échantillons par centrifugation à ~ 7000 × g pendant 2 à 3 minutes. Utilisez le surnageant clair immédiatement pour la purification.
- Si vous devez concentrer le surnageant de culture cellulaire, utilisez des concentrateurs centrifuges appropriés.

✓ **Protéinase K**

La protéinase K est utilisée pour une lyse efficace des particules virales. Elle est active dans les conditions hautement dénaturantes de l'étape de lyse.

✓ **Volume d'échantillon**

Le mini kit d'ARN / ADN viral PureLink™ peut traiter des volumes d'échantillon de  $\leq 500 \mu\text{L}$  sans préparation de tampons supplémentaires ni transfert d'impuretés. Après la préparation du lysat, si le volume final du lysat est  $> 600 \mu\text{L}$ , vous devez effectuer plusieurs charges du lysat final sur la colonne de centrifugation.

✓ **Préparation du Wash Buffer :**

Le protocole de purification recommandé utilise 5,6  $\mu\text{g}$  du Carrier DNA par échantillon (pour un échantillon  $\leq 500 \mu\text{L}$ ). Si vous souhaitez utiliser moins de Carrier DNA par échantillon, vous devez valider la quantité du Carrier RNA nécessaire pour chaque type d'échantillon et application en aval.

Pour préparer le Carrier RNA (5.6  $\mu\text{g}$ /échantillons :

1. Ajouter 310  $\mu\text{L}$  d'eau exempte de RNase (fournie avec le kit) à 310  $\mu\text{g}$  Carrier DNA lyophilisé fourni dans un tube avec le kit pour obtenir 1  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$  de solution mère du Carrier DNA.
2. Mélanger soigneusement et aliquoter la solution en aliquotes plus petites. Conserver les aliquotes à  $-20^\circ\text{C}$ . Évitez le gel et le dégel répétés.
3. Calculer le volume du mélange tampon de lyse / Carrier DNA nécessaire pour traiter le nombre désiré d'échantillons simultanément en utilisant la formule suivante:

$$N \times 0,21 \text{ mL (volume de tampon de lyse / réaction)} = A \text{ mL}$$

$$A \text{ mL} \times 28 \mu\text{L} / \text{mL} = B \mu\text{L}$$

où

N = nombre d'échantillons

A = volume calculé du tampon de lyse (L22)

B = volume calculé de 1  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$  stock du Carrier DNA solution à ajouter au tampon de lyse (L22)

4. Décongeler la quantité requise de 1  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$  de solution mère du Carrier DNA.
5. Dans un tube stérile, ajouter le volume de solution mère du Carrier DNA (B, calculé comme ci-dessus) au volume de tampon de lyse (A, calculé comme ci-dessus). Mélanger doucement en pipetant de haut en bas. Évitez de vortexer car il génère de la mousse.
6. Conserver à  $4^\circ\text{C}$  jusqu'à utilisation. Utilisez le tampon dans l'heure.

✓ **Procédure de purification :**

**- Préparer les lysats**

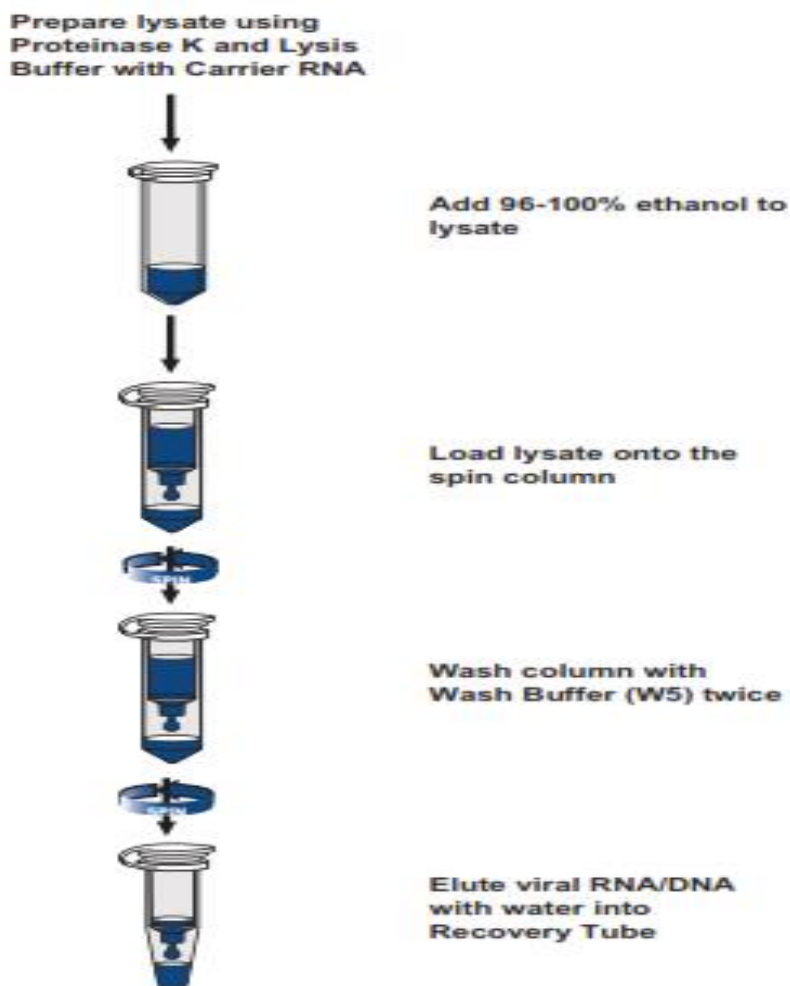
Le protocole de préparation du lysat est décrit ci-dessous pour 200 µL de matériau de départ. Si vous souhaitez traiter un volume d'échantillon > 200 µL (≤500 µL), augmentez le volume des réactifs en conséquence.

1. Ajouter 25 µL de protéinase K dans un tube à centrifuger stérile.
  2. Ajouter 200 µL d'échantillon sans cellule dans le tube de microcentrifugation.
- Remarque: Si vous traitez un échantillon de <200 µL, ajustez le volume final de l'échantillon à 200 µL en utilisant du PBS (solution saline tamponnée au phosphate) ou du NaCl à 0,9%.
3. Ajouter 200 µL de tampon de lyse (contenant 5,6 µg du Carrier RNA). Fermez le couvercle du tube et mélangez au vortex pendant 15 secondes.
  4. Incuber à 56 ° C pendant 15 minutes.
  5. Ajouter 250 µL d'éthanol à 96-100% dans le tube, fermer le couvercle et mélanger au vortex pendant 15 secondes.
  6. Incuber le lysat pendant 5 minutes à température ambiante.

**- Purification de l'ARN / ADN**

1. Ajouter le lysat ci-dessus à la colonne Viral Spin dans un tube de prélèvement.
  2. Centrifuger la colonne à 6800 × g pendant 1 minute. Jetez le tube de collecte. Placez la colonne de centrifugation dans un nouveau tube de lavage.
  3. Laver la colonne avec 500 µL de tampon de lavage (WII) avec de l'éthanol. Centrifuger à 6800 × g pendant 1 minute. Jetez le flux à travers.
  4. Répéter l'étape 3 avec 500 µL de tampon de lavage (WII) une fois.
  5. Jetez le tube de collecte et placez la colonne de centrifugation dans un autre tube de lavage propre.
  6. Centrifuger la colonne centrifuge à la vitesse maximale pendant 1 minute pour éliminer tout tampon de lavage résiduel (WII).
  7. Placez la colonne de centrifugation dans un tube de récupération propre de 1,7 ml.
  8. Éluer avec 10-50 µL d'eau stérile exempte de RNase (E3) fournie avec le kit (ajouter de l'eau au centre de la cartouche).
  9. Incuber à température ambiante pendant 1 minute. Centrifuger la colonne de centrifugation à la vitesse maximale pendant 1 minute pour éluer les acides nucléiques.
- Le tube de récupération contient des acides nucléiques viraux purifiés. Jetez la colonne de spin.
10. Stocker l'ARN / ADN viral purifié à -80 ° C ou utiliser l'ARN / ADN pour l'application en aval désirée.

La procédure de purification de l'acide nucléique viral est décrite ci-dessous en utilisant une centrifugation à base de colonne de centrifugation dans un temps total d'environ 45 minutes (Figure 54).



*Figure 65 : Procédure de purification des Acides Nucléiques.*

## **Annexe 10 : Séroneutralisation sur cultures cellulaires**

### Principe:

On vérifie par neutralisation la présence, dans le sérum des animaux vaccinés, d'anticorps anti-virus de la clavelée. Le sérum est mis en présence de quantités décroissantes de virus. On vérifiera les effets cytopathogènes caractéristiques du virus et la réduction du titre sur cellules.

### Technique:

La suspension cellulaire est obtenue à partir d'une couche cellulaire établie d'ICO1 qui est dissociée par ingestion enzymatique à la trypsine. La suspension cellulaire obtenue est, après numération, ajustée à 100000 cellules par millilitre.

Avant de commencer cette technique il faut respecter plusieurs étapes:

- Désemballer les plaques de microtitration sous flux laminaire.
- Tracer à l'aide d'un marqueur le schéma de répartition des sérums de façon à avoir quatre sérums par plaque, avec six dilutions par sérum et quatre cupules par dilution (Figure 55).
- Inscrire sur les bords de la plaque les numéros des sérums à analyser ainsi que la date du test et la référence des sérums.
- Répartir dans toutes les cupules de la plaque à l'aide d'une pipette multicanaux, 50µl du milieu d'inoculation à 1% sérum de veau. Eviter la formation des bulles d'air lors du transfert du milieu dans les puits.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25µl sérum	+50µl milieu										
B	25µl sérum											
C	25µl sérum		Sérum n°1						Sérum n°3			
D	25µl sérum											
E												
F												
G			Sérum n°2						Sérum n°4			
H												
Dilutions	1/3	1/9	1/27	1/81	1/243	1/729	1/3	1/9	1/27	1/81	1/243	1/729

**Figure 66: Distribution des sérums**

- Répartir 25µl de chaque sérum à analyser dans chacune des quatre cupules: A1 à D1 pour le sérum1, E1 à H1 pour le sérum2, A7 à D7 pour le sérum3 et E7 à H7 pour le sérum4.
- A l'aide d'une pipette à 8 canaux, prélever 25µl des cupules de la colonne 1 (A1 à H1) et les transférer à la colonne suivante (A2 à H2), homogénéiser par aspiration et refoulement et transférer 25 µl à la colonne 3 et ainsi de suite jusqu'à la colonne 6.
- Jeter les 25 µl de la dernière dilution 1/729 (colonne 6).

- Changer d'embouts et diluer de la même manière les sérums déposés dans la colonne 7.
- Diluer les sérums de contrôle selon le même procédé.
- Une fois les dilution stérminées, placer les plaques à +4°C et préparer la suspension virale.

**\*Dilution de la suspension virale:**

- Le virus utilisé doit être préalablement titré et disponible en quantité suffisante.
- La quantité de virus à mettre en contact des sérums dilués est de 50µl, elle doit contenir 100 à 300 DICT50 pour cela une dilution préalable de la suspension virale est nécessaire.
- Le virus de travail de la clavelée possède un titre moyen de 10<sup>6.8</sup> DICT50 par ml. Pour avoir 100 DICT50/µl, il faut diluer la suspension virale en quantité suffisantes pour la totalité des plaques.
- La dilution du virus est réalisée dans un bac de glace à partir du pool de 2 flacons du virus de travail.
- Reprendre les plaques des sérums et répartir 50µl de la suspension virale diluée à 100 DICT 50 dans toutes les cupules.
- Homogénéiser sur un agitateur pour plaques ou en tapant légèrement sur les bords des plaques.
- Incuber pendant une heure à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>.

**\*Préparation de la plaque de contrôle:**

**1- Titrage du virus:**

- Le pool des deux flacons de virus utilisé pour la neutralisation des sérums est dilué de 10 en 10 dans des tubes à hémolyse avec du milieu d'inoculation à 1% de sérum de veau et répartir dans la plaque de contrôle à raison de 100µl par cupule et 6 cupules par dilution (Figure 56).

**2- Titrage en retour de la solution de travail (100DICT 50/50µl):**

- La suspension virale utilisée dans la réaction est titrée à son tour par dilution au 1/10, 1/100 et 1/1000 dans des tubes à hémolyse avec du milieu à 1% sérum de veau.
- Les dilutions réalisées sont ensuite réparties dans la plaque de contrôle à raison de 50µl par cupule et 12 cupules par dilution.
- Répartir 50µl cupule de la dilution de travail dans 12 cupules.

- Ajouter 50µl du milieu d'inoculation à 1% sérum de veau dans toutes les cupules du titrage en retour.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50µl virus	+50µl milieu	Pur	→			10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
B												
C			1/10	→								
D	titrage en retour de la dilution de travail								titrage infectieux virus			
E			1/100	→								
F												
G			1/1000	→					témoin cellules			
H												

**Figure 67 : Organisation de la plaque de contrôle SN.**

### 3- Addition des cellules:

- Après incubation une heure à 37°C, ajouter 150µl par cupule de la suspension cellulaire déjà préparée et ajustée à 100000 cellules par ml, dans toutes les plaques y compris la plaque de contrôle.
- Incuber à 37°C en atmosphère humide et à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 3 à 4 jours.

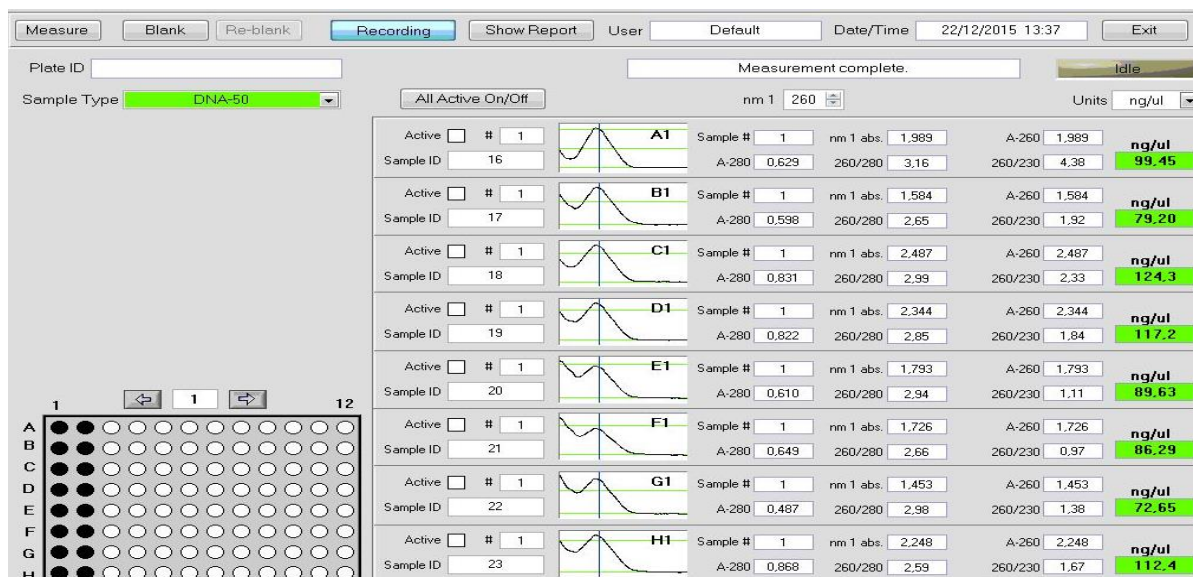
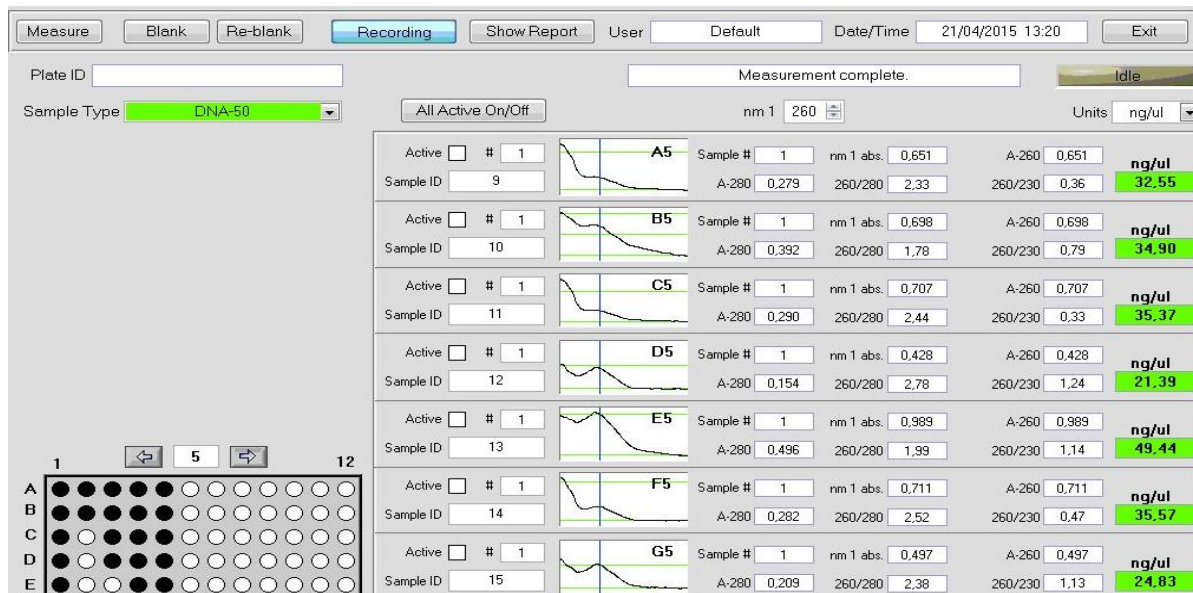
### 4- Expression et validation des résultats:

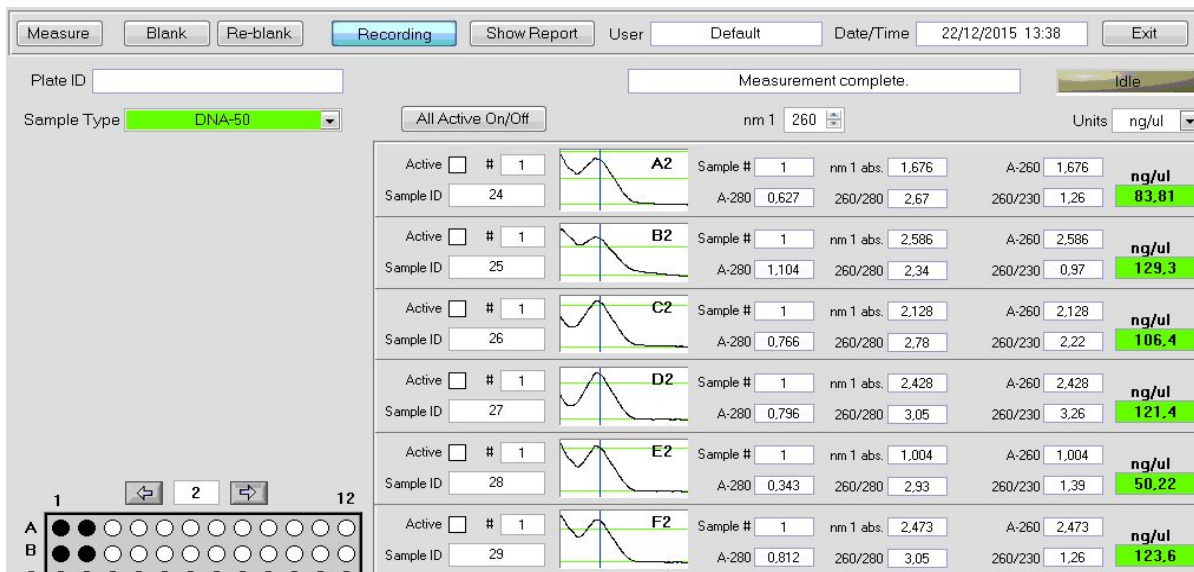
- Confirmer la validation du test en contrôlant:
  - \*Le titre du virus utilisé qui ne doit pas varier de +/-0.3 log
  - \*Le titrage en retour de la dilution du travail qui doit présenter 100% d'ECP à la dilution 1/10 ; 30 à 70% d'ECP à la dilution 1/100 et 0 à 10% d'ECP à la dilution 1/1000.
  - \*Le titrage du sérum positif qui ne doit pas varier de plus de 0.24 log.
  - \*Le témoin sérum négatif qui ne doit pas montrer une neutralisation ou même une réduction de l'effet cytopathogène (ECP) au niveau de la plus faible dilution.
  - \*Le témoin cellules qui ne doit présenter aucune lésion.
- Examiner les plaques du titrage des sérums au microscope pour détecter la présence ou l'absence d'ECP.
- Dénumérer les cupules présentant une neutralisation totale de l'ECP à partir de la dilution 1/3.
- Le titre des anticorps neutralisants (dose neutralisante 50% ou DN50%) est calculé

en appliquant la formule de SpearmanKarber.

## Annexe 11 : Résultats du dosage par Nanodrop et de l'électrophorèse

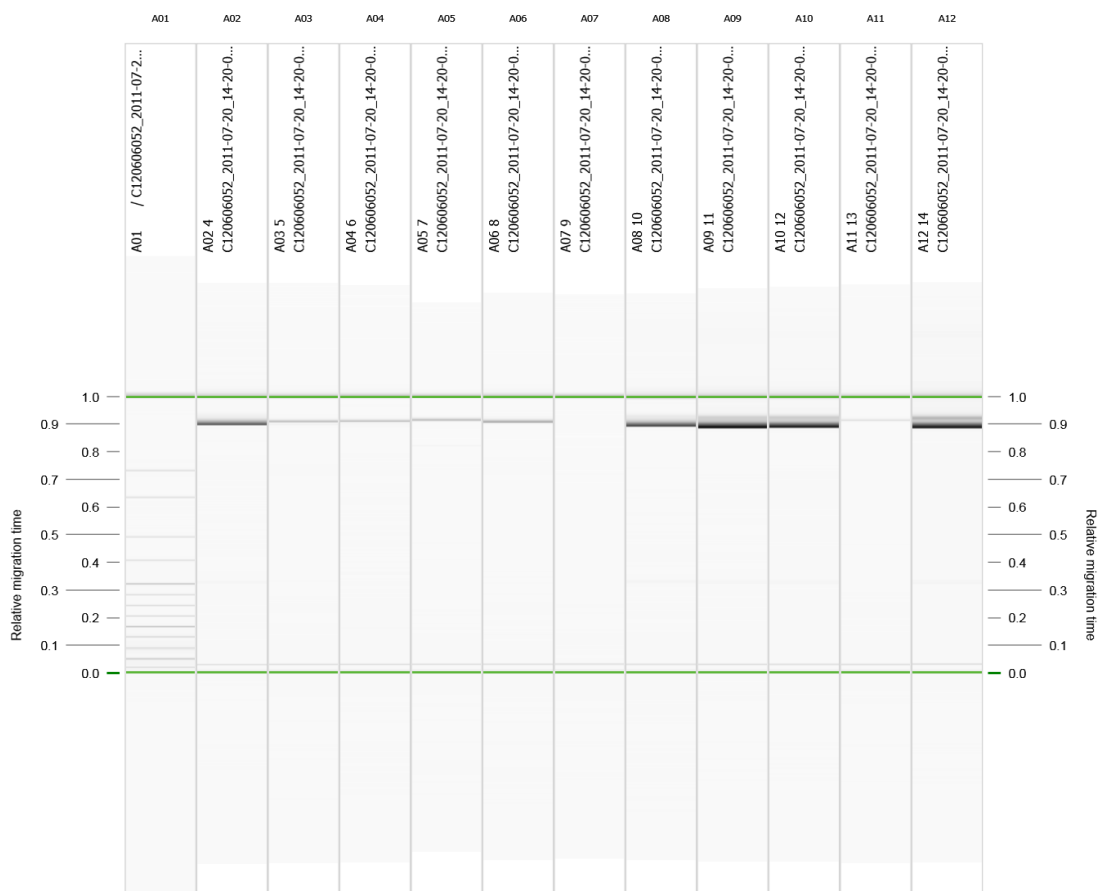
### 1- Résultats du dosage de l'ADN viral par Nanodrop

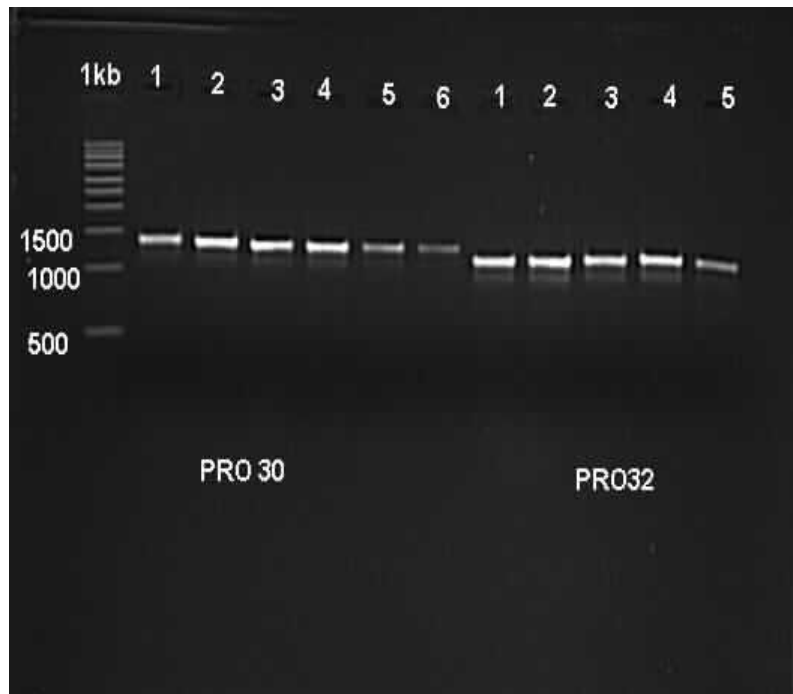
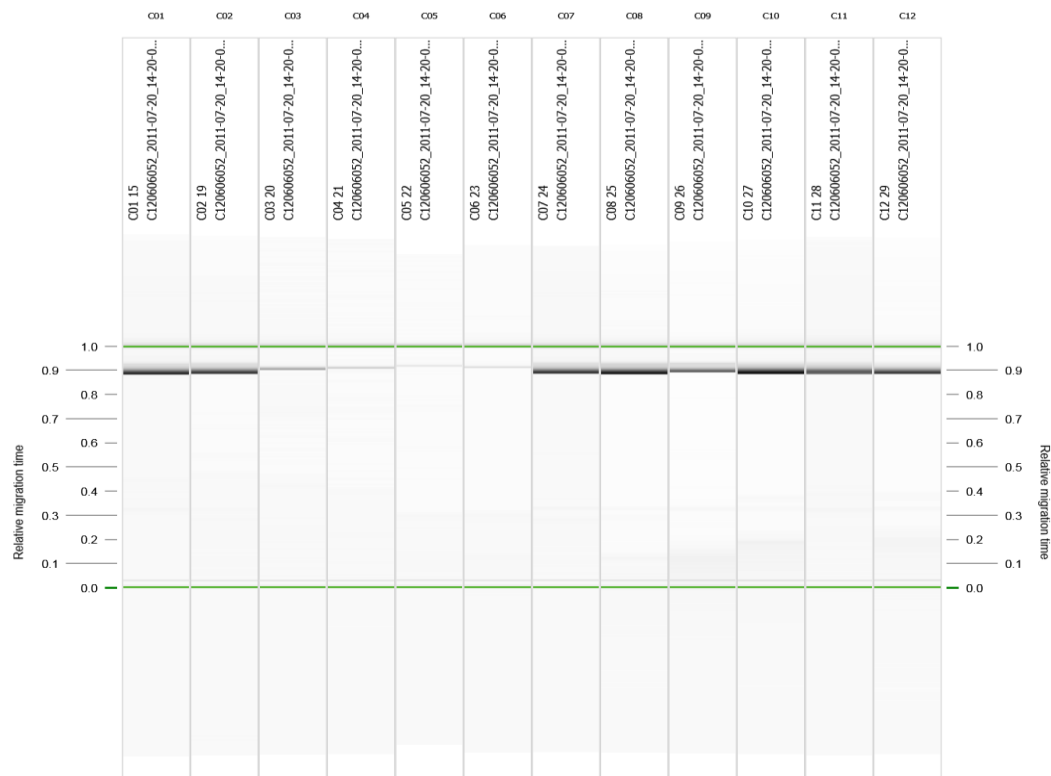




## 2- Révélation des produits PCR par électrophorèse

✓ Gène codant pour la P32





✓ Gène codant pour la RPO30 :

