

## ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DU VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE AU BÉNIN EN 2010 \*

**Kamila Gorna<sup>1</sup>, Evelyne Houndjè<sup>2,3,4</sup>, Aurore Romey<sup>1</sup>, Anthony Relmy<sup>1</sup>,  
Sandra Blaise-Boisseau<sup>1</sup>, Marc Kpodékon<sup>2,5</sup>, Claude Saegerman<sup>4</sup>, François Moutou<sup>1</sup>,  
Stephan Zientara<sup>1</sup> et Labib Bakkali Kassimi<sup>1</sup>**

### RÉSUMÉ

Cette étude décrit l'isolement et la caractérisation du virus de la fièvre aphteuse circulant au Bénin entre Juin et Août 2010. Dans ce but, 77 échantillons de tissus épithéliaux, collectés dans trois départements au nord du Bénin ont été analysés. Le virus de la fièvre aphteuse a été isolé à partir de 42 échantillons et 33 isolats ont été identifiés comme appartenant au sérotype O et 9 au sérotype A. L'analyse phylogénétique a permis d'identifier deux groupes différents d'isolats de type O, et un seul groupe d'isolats de type A. La comparaison avec les séquences disponibles dans la base de données GenBank a mis en évidence une relation étroite entre les isolats du Bénin et les souches de topotype O de l'Afrique de l'Ouest et de topotype africain A de génotype VI. La caractérisation des souches circulantes dans cette région devrait contribuer à une meilleure sélection des souches vaccinales et permettre également la mise à jour des données d'épidémiologie moléculaire disponibles.

**Mot-clés** : fièvre aphteuse, Afrique de l'Ouest, Bénin, isolement viral, diagnostic moléculaire.

### SUMMARY

This study describes the isolation and characterization of FMDV circulating in Benin between June and August 2010. Epithelial tissue samples (n=77) collected in three departments in the Northern part of Benin were analysed. FMDV was isolated from 42 samples. Within these isolates, 33 were typed as serotype O and 9 as serotype A. Phylogenetic analysis allowed the identification of two different groups of type O isolates, and one group of type A isolates. VP1 sequence comparison with sequences available in the GenBank database revealed a close relationship between the Benin isolates and strains of topotype O of West Africa (WA) and the African topotype A of genotype VI. A better identification of recent strains circulating in this region of West Africa should contribute to improve the selection of strains for vaccine production and to update available data on the molecular epidemiology of f FMDV in West Africa in general.

**Keywords**: Foot-and-Mouth Disease, West Africa, Benin, Virus isolation, Molecular diagnosis.



\* Texte de la communication orale présentée au cours des Journées scientifiques AEEMA, 31 mai 2013

<sup>1</sup> Anses, Laboratoire de santé animale, UMR1161 (Anses, Inra, Enva), 23 Avenue du Général de Gaulle 94706 Maisons-Alfort, France

<sup>2</sup> Laboratoire de recherche en biologie appliquée, Département de production et santé animale, Ecole polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 2009, Cotonou, Bénin.

<sup>3</sup> Département de santé animale. Institut de médecine tropicale, Nationalestraat, 155, Anvers, Belgique.

<sup>4</sup> Unité de recherche en épidémiologie et analyse de risques (UREAR-ULg), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, B42, 4000 Liège, Belgique.

<sup>5</sup> Département de production et santé animales, Ecole polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 2009, Cotonou, Bénin

---

## I -INTRODUCTION

---

Le virus de la fièvre aphteuse (le virus de la FA ou FMDV en anglais) appartient au genre *Aphthovirus* au sein de la famille *Picornaviridae*. C'est un virus non enveloppé, de symétrie icosaédrique, contenant un génome à ARN simple brin de polarité positive. Il présente une importante variabilité génétique et antigénique avec sept sérotypes immunologiquement et génétiquement distincts (O, A, C, Asia1, SAT 1 à 3) chacun subdivisé en plusieurs topotypes et génotypes. Ce virus provoque une maladie transfrontalière hautement contagieuse qui affecte les artiodactyles qu'ils soient domestiques (bovins, ovins, caprins, et porcins) ou sauvages (buffle, cerf, sanglier...) [Grubman et Baxt, 2004 ; Thompson *et al.*, 1994]. La FA se manifeste par de la fièvre et des vésicules qui apparaissent rapidement dans la cavité buccale, sur la langue, les mamelles et entre les ongles. La maladie entraîne une morbidité élevée ainsi qu'une faible mortalité notamment chez les jeunes animaux (myocardite) et des avortements chez les femelles gestantes. Les animaux malades guérissent en 10 à 15 jours, mais la maladie les laisse affaiblis et engendre de lourdes pertes de production laitière [Grubman et Baxt, 2004 ; Thompson *et al.*, 1994]. De plus, il a été rapporté que ce virus peut parfois provoquer une infection asymptomatique de longue durée chez les ruminants [Ayebazibwe *et al.*, 2010 ; Salt *et al.*, 1993 ; Vosloo *et al.*, 2003] et principalement chez environ 50 % des bovins domestiques ou sauvages infectés. En cas d'épizootie, l'impact économique est important, en raison des mesures de lutte mises en place et des pertes commerciales liées à l'embargo sur le pays atteint [Thompson *et al.*, 2002]. Dans les pays où la maladie est enzootique, les épizooties de FA provoquent des pertes considérables liées à la non valorisation des produits issus du bétail.

La circulation du virus de la fièvre aphteuse se maintient dans trois grands groupes épidémiologiques (Afrique, Asie et Amérique du Sud) qui sont divisés en sept sous-groupes selon les caractéristiques du virus et sa circulation plus régionale [Di Nardo *et al.*, 2011 ; Paton *et al.*,

2009]. Six des sept sérotypes du virus de la fièvre aphteuse (hors Asia1) ont déjà été signalés en Afrique. Dans cette région, la transhumance des animaux, le commerce ou le nomadisme jouent un rôle important dans l'élevage du bétail qui repose en effet sur la forte mobilité des troupeaux au travers des chemins migratoires. Ces routes sont souvent définies par l'accessibilité aux sources d'eau et/ou aux sources d'alimentation pour les animaux ainsi que par les habitudes sociales. De plus, l'organisation des points de contrôle transfrontaliers entre les différents pays et régions n'est pas optimale. La plupart des pays de l'Afrique de l'Ouest ne pratiquent pas la vaccination contre la FA ou leurs campagnes de vaccination ne sont pas efficaces. Dans ces circonstances, il est difficile de contrôler la propagation de ce virus. De plus, des difficultés dans la collecte d'échantillons et le manque de moyens pour les transporter dans les conditions appropriées jusqu'aux laboratoires dédiés rendent l'isolement du virus difficile et, par conséquent, il est impossible de réaliser des études complètes des foyers suspects [Couacy-Hymann *et al.*, 2006 ; Di Nardo *et al.*, 2011 ; Vosloo *et al.*, 2002]. Cependant, depuis plusieurs années, le programme d'éradication de la peste bovine en Afrique a permis une meilleure sensibilisation à la FA, et les foyers sont désormais plus régulièrement signalés à l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE). Néanmoins, peu d'informations sur les souches de la FA circulant en Afrique de l'Ouest sont disponibles et il n'existe pas d'études épidémiologiques récentes dans cette région [Bastos *et al.*, 2003 ; Dehoux et Hounsou-Ve, 1991 ; Nawathe et Goni, 1976 ; Sangaré *et al.*, 2001 ; Sangaré *et al.*, 2003]. Le but de ce travail était d'isoler et de caractériser le virus de la fièvre aphteuse dans des échantillons prélevés à partir de cas suspects de fièvre aphteuse au Bénin. Les résultats, présentés dans cette étude, apportent des éléments pour l'étude de l'évolution de la FA dans cette région et permettent également la mise à jour des données moléculaires actuellement disponibles.

---

## II - MATÉRIELS ET MÉTHODES

---

### 1. ÉCHANTILLONS

Les échantillons (n = 77) de tissu épithélial issus de lésions sur la langue de bovins suspectés d'être atteints de fièvre aphteuse ont été recueillis entre juin et août 2010 au Bénin. L'échantillonnage a été effectué dans trois départements du nord du Bénin : Borgou (52 échantillons), Atacora (12 échantillons) et Alibori (13 échantillons). Les échantillons ont été placés dans un milieu de transport approprié et conservés sous régime du froid négatif jusqu'à l'arrivée au Laboratoire français de référence pour la fièvre aphteuse.

### 2. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Chaque échantillon de tissu épithélial a été broyé avec du sable stérile à l'aide d'un mortier et d'un pilon pour obtenir une suspension à 10 % ou 20 % (poids/volume) dans du milieu de culture contenant des antibiotiques.

### 3. ISOLEMENT VIRAL ET IDENTIFICATION DU SÉROTYPE PAR Ag-ELISA

Les suspensions de tissu épithélial ont été inoculées sur une monocouche de cellules fœtales de langue de chèvre (lignée cellulaire ZZ-R 127) [Brehm *et al.*, 2009] sensibles au virus de la FA. Les cultures cellulaires ont été observées à 24, 48 et 72 h après inoculation. En l'absence d'effet cytopathique (ECP) après 72 h, un deuxième passage sur les cellules ZZ-R 127 a été réalisé. Un échantillon a été considéré négatif si aucun ECP n'a été observé 72 h après le deuxième passage sur culture cellulaire. Si la culture cellulaire a présenté un ECP, la suspension virale a été mise en culture sur les cellules IBRS-2 (lignée de fibroblastes de rein de porc), pour production virale. Les suspensions virales ainsi produites sur cellules IBRS-2 ont ensuite été utilisées pour confirmer la présence du virus de la FA et identifier le sérotype du virus isolé par Elisa de capture d'antigène (Ag-ELISA) selon le protocole décrit dans le Manuel de l'OIE pour les animaux terrestres [OIE, 2012].

### 4. RT-PCR

Les tests de diagnostic moléculaire ont été effectués à partir de l'ARN viral extrait des suspensions d'échantillons (broyats d'épithélium).

#### 4.1. RT-PCR EN TEMPS RÉEL

La détection du génome de la FA a été réalisée grâce à une méthode interne de RT-PCR en temps réel duplex en une étape, ciblant la région conservée du gène 3D codant pour la polymérase du virus de la fièvre aphteuse.

#### 4.2. RT-PCR CONVENTIONNELLE

Sur la base des résultats de l'Ag-ELISA, les amorces spécifiques de sérotype ont été choisies pour amplifier la région du génome codant pour la VP1 de type O ou de type A. Trois différentes paires d'amorces ont été utilisées pour l'amplification du virus de la FA de type O (O-1C244F/EUR-2B52R, O-1C272F/EUR-2B52R et O-1C283F/EUR-2B52R) et deux paires différentes d'amorces ont été utilisées pour l'amplification du virus de la FA de type A (A-1C562F/EUR-2B52R et A-1C612F/EUR-2B52R) [Ayelet *et al.*, 2009].

### 5. SÉQUENÇAGE ET ANALYSE DE SÉQUENCES

Le séquençage double brin des amplicons de RT-PCR a été réalisé à l'aide des amorces utilisées pour l'amplification de la région VP1 par RT-PCR. Les séquences obtenues pour chaque isolat ont été assemblées et vérifiées en utilisant le logiciel SeqMan (DNAStar, Lasergene 8). Ensuite, les séquences complètes de VP1 correspondant à chaque variant génétique (en prenant en compte l'emplacement géographique d'échantillon) ont été enregistrées dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès indiqués dans le tableau 1. La comparaison des séquences VP1 avec celles disponibles dans la base de données NCBI GenBank a été réalisée en utilisant la méthode Clustal W avec le logiciel MEGA 5.05 [Tamura et Nei, 1993 ; Tamura *et al.*, 2004 ; Tamura *et al.*, 2011].

Tableau 1

Les virus de la fièvre aphteuse isolés à partir d'échantillons du Bénin en 2010  
et les numéros d'accession GenBank de leurs séquences VP1

Numéro d'échantillon	Département	Commune	Isolat	Sérotype	Numéro de variant Génétique	Numéro d'Accession Gene Bank		
B1	Borgou	PARAKOU (Guéma market)	BEN/30/2010	O	O/V9	KC832983		
B2			BEN/31/2010	O	O/V9	KC832983*		
B3			BEN/32/2010	O	O/V8	KC832984		
B4			BEN/33/2010	O	O/V10	KC832985		
B5			BEN/37/2010	O	O/V1	KC832973*		
B6			BEN/34/2010	O	O/V1	KC832973*		
B14	Atacora	Toucountouna	BEN/40/2010	O	O/V11	KC832986		
B15	Atacora	Cobly	BEN/26/2010	O	O/V7	KC832981		
B21	Alibori	Banikoara	BEN/35/2010	A	A/V5	KC832971		
B23	Alibori	Gogounou	BEN/27/2010	A	A/V1	KC832970*		
B24			BEN/36/2010	A	A/V2	KC832972		
B28			BEN/24/2010	A	A/V1	KC832970		
B31			BEN/29/2010	A	A/V1	KC832970*		
B32			Borgou	Kalalé	BEN/25/2010	O	O/V1	KC832980
B33	BEN/28/2010	O			O/V8	KC832982		
B34	BEN/38/2010	O			O/V1	KC832980*		
B35	BEN/41/2010	O			O/V1	KC832980*		
B39	Borgou	Sinendé (Guessou-Bani)			BEN/42/2010	O	O/V12	KC832987
B44	Borgou	Bembéréké	BEN/19/2010	A	A/V6	KC832968		
B48	Borgou	Doubé N'dali	BEN/20/2010	O	O/V1	KC832977		
B49	Borgou	Bembéréké	BEN/21/2010	O	O/V5	KC832978		
B51			BEN/22/2010	O	O/V6	KC832979		
B52			BEN/14/2010	O	O/V4	KC832976		
B53			BEN/15/2010	O	O/V4	KC832976*		
B54			BEN/16/2010	O	O/V4	KC832976*		
B55			BEN/17/2010	O	O/V4	KC832976*		
B56			Borgou	Nikki	BEN/23/2010	A	A/V4	KC832969
B58			Borgou	Kalalé	BEN/18/2010	A	A/V3	KC832967
B59					BEN/43/2010	A	A/V3	KC832967*
B61			Borgou	PARAKOU (Guéma market)	BEN/4/2010	O	O/V1	KC832973*
B62	BEN/5/2010	O			O/V1	KC832973*		
B63	BEN/6/2010	O			O/V1	KC832973*		
B64	Borgou	PARAKOU Boko/Yacoumba	BEN/12/2010	O	O/V1	KC832973*		
B65			BEN/10/2010	O	O/V1	KC832973*		
B66			BEN/13/2010	O	O/V1	KC832973*		
B67			BEN/7/2010	O	O/V1	KC832973*		
B69			BEN/11/2010	O	O/V1	KC832973*		
B70			BEN/8/2010	O	O/V1	KC832973*		
B72			Borgou	PARAKOU (Guéma market)	BEN/9/2010	O	O/V3	KC832975
B73					BEN/1/2010	O	O/V1	KC832973
B75	BEN/2/2010	O			O/V2	KC832974		
B76	BEN/3/2010	O			O/V2	KC832974*		

\* Numéro d'accession de séquences ayant homologie de 100 %

### III - RÉSULTATS

#### 1. DÉTECTION DU VIRUS PAR RT-PCR EN TEMPS RÉEL

L'ARN issu du broyat de chacun des 77 échantillons a été utilisé pour détecter la présence du génome viral. La RT-PCR en temps réel ciblant la région 3D a permis de détecter le génome du virus de la FA dans 76 échantillons. Un seul échantillon s'est révélé négatif.

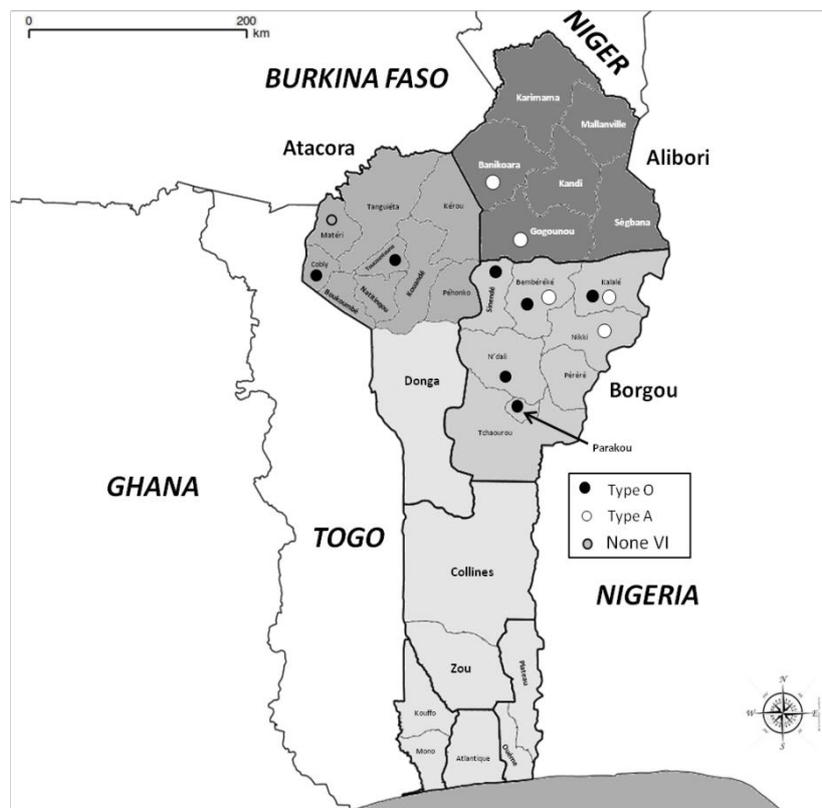
#### 2. ISOLEMENT VIRAL, Ag-ELISA, RT-PCR CONVENTIONNELLE

Le virus de la fièvre aphteuse a été isolé à partir de 42 échantillons et le sérotype de chaque isolat a

été déterminé par Ag-ELISA à partir des cultures cellulaires infectées. Le sérotype a été confirmé par séquençage du gène codant pour la VP1. Ces analyses ont permis d'identifier 33 isolats de sérotype O et neuf isolats de sérotype A (tableau 1, figure 1). Le sérotype O a été isolé à partir d'échantillons prélevés dans Atacora (deux isolats) et Borgou (31 isolats). Le sérotype A a été isolé à partir d'échantillons prélevés dans Alibori (cinq isolats) et Borgou (quatre isolats) (tableau 1, figure 1).

Figure 1

La carte du Bénin, indiquant les lieux d'échantillonnage et la localisation géographique des isolats du virus de la FA ainsi que leur sérotype caractérisés pendant cette étude



### 3. ANALYSES PHYLOGÉNÉTIQUES

#### 3.1. SÉROTYPE O

La comparaison de la séquence codant pour la VP1 des 33 isolats de sérotype O a mis en évidence 12 variants génétiques (10 de Borgou et 2 de Atacora) avec une similarité de séquence comprise entre 99,8 % et 91,2 % (tableau 2). Le variant prédominant contient 16 isolats provenant de Borgou, précisément dans les communes suivantes: Parakou (12 isolats), Doubé N'Dali (un isolat) et Kalalé (trois isolats). D'après la classification des souches de la FA de sérotype O et A, les souches ayant une homologie de 95 % ou plus de la séquence nucléotidique du gène VP1 peuvent être considérées comme proches. Celles qui présentent 85 % d'homologie ou moins sont considérées comme distinctes et peuvent être classées dans des groupes de topotypes séparés [Ayelet *et al.*, 2009; Bronsvort *et al.*, 2004; Habiela *et al.*, 2010; Knowles et Samuel, 2003; Knowles *et al.*, 2005]. Les virus de type O isolés dans cette étude dans le même département peuvent être considérés comme très proches car ils

montrent une homologie de séquence comprise entre 99,4 % et 99,8 %. Par contre, les isolats de Borgou et d'Atacora sont moins apparentés, montrant seulement une homologie comprise entre 91,2 % et 91,4 %. Par conséquent, ils peuvent être divisés en deux groupes distincts (tableau 2). Les séquences représentatives des isolats de Borgou (BEN/1/2010) et de Atacora (BEN/26/2010) ont été comparés avec les séquences disponibles dans la base de données GenBank (tableau 3, figure 2). L'analyse a montré que les isolats Bénin sont proches (91,7 et 93,1 %) de la souche isolée au Togo en 2005 (O/TOG/4/2005) qui appartient au topotype Afrique de l'Ouest. Ces isolats présentent une homologie de 86,3 % avec la souche de référence du topotype Afrique de l'Ouest (O/GNA/5/93). Les isolats du Bénin sont distincts des souches appartenant au topotype d'Afrique de l'Est (EA-1 à EA-4), avec 80,1 à 81,1 % de similarité pour les topotypes EA-1, EA-3 et EA-4, et 74,6 et 77,7 % pour le topotype EA-2 (tableau 3). Ils montrent cependant, moins de différence avec la souche O/SUD/83 du Soudan (86,2 et 86,6 %), classée dans le topotype EA-3.

Tableau 2

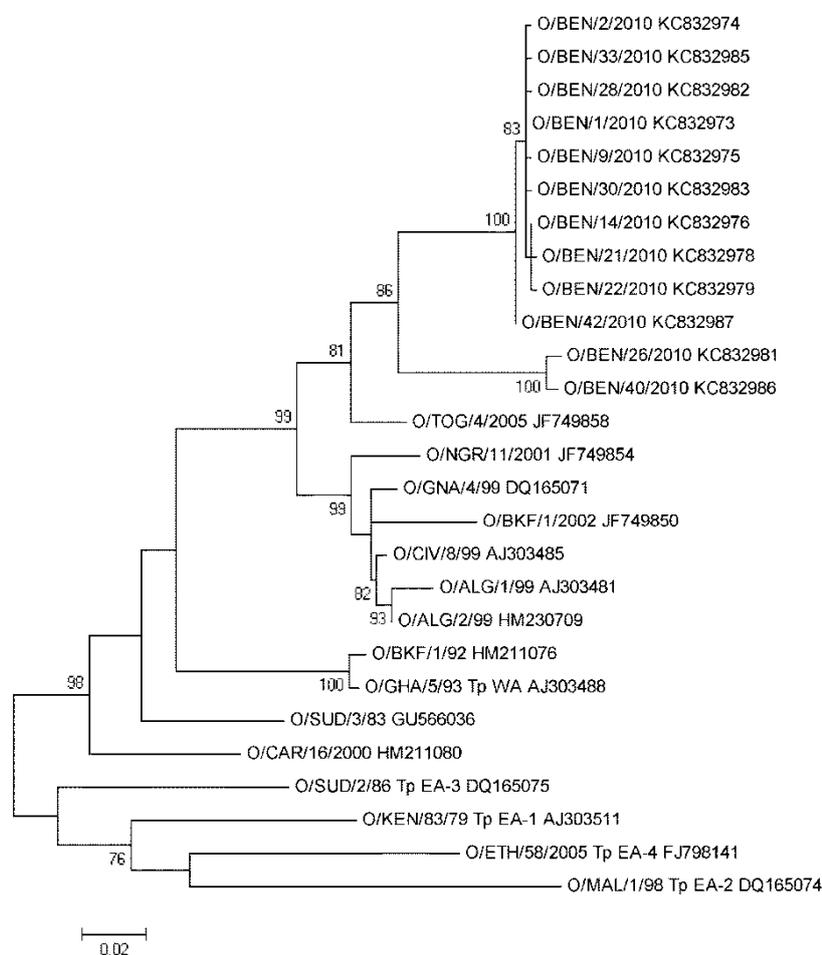
Pourcentage d'homologie entre les séquences VP1 de variants génétiques de type O isolés au Bénin en 2010

	O/V1	O/V2	O/V3	O/V4	O/V5	O/V6	O/V7	O/V8	O/V9	O/V10	O/V11
O/V1											
O/V2	99,8										
O/V3	99,8	99,7									
O/V4	99,8	99,7	99,7								
O/V5	99,7	99,5	99,5	99,8							
O/V6	99,7	99,5	99,5	99,8	99,7						
O/V7	91,4	91,2	91,2	91,4	91,2	91,2					
O/V8	99,8	99,7	99,7	99,7	99,5	99,5	91,2				
O/V9	99,8	99,7	99,7	99,7	99,5	99,5	91,2	99,7			
O/V10	99,8	99,7	99,7	99,7	99,5	99,6	91,2	99,7	99,7		
O/V11	91,4	91,2	91,2	91,4	91,2	91,2	99,2	91,2	91,2	91,2	
O/V12	99,7	99,5	99,5	99,5	99,4	99,4	91,4	99,5	99,5	99,5	91,4

V: variant génétique

Figure 2

**Dendrogramme, montrant les relations génétiques entre les séquences nucléotidiques codant la protéine VP1 des variants différents de sérotype O isolés au Bénin et les séquences homologues présentes sur GenBank. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions nucléotidiques par site.**



### 3.2. SÉROTYPE A

Les virus de sérotype A ont été détectés dans Borgou et Alibori. L'analyse de la séquence VP1 des neuf isolats a permis de distinguer six variants (trois à Borgou et trois à Alibori) (tableaux 1 et 4). L'homologie de séquences est de 98,9 à 99,9 % entre les variants d'Alibori et de 99,4 à 99,9 % entre les variants de Borgou. Les isolats de Borgou et d'Alibori sont également très proches (98,6 %). La plus grande différence (1,4 %) a été observée entre les isolats BEN/19/2010 et BEN/36/2010. Ces données ont permis de les classer dans un seul et même groupe. Les séquences VP1 de ces deux isolats ont été comparées avec des séquences de

type A disponibles dans la base de données GenBank (tableau 5, figure 3). La comparaison de ces séquences a indiqué une forte relation entre les isolats du Bénin et les souches de génotype VI isolées en Afrique de l'Ouest. Ils sont en effet proches de la souche gambienne GAM/44/98 (92,1 et 92,4 %), de la souche malienne MAI/2/97 (91,9 et 92,3 %), d'une souche du Sénégal A/Senegal/2006 (90,8 et 91,5 %) et de la souche CIV/4/95 isolée en Côte-d'Ivoire (90,3 et 91,5 %). L'analyse de la séquence partielle de la région codant pour la VP1 a également révélé une forte homologie avec la souche Sénégalaise SEN/10/97 (91,7 et 92,1 %) (tableau 5).

Tableau 3

Comparaison de deux séquences VP1 représentatives de type O de Bénin avec les séquences VP1, provenant des régions Ouest, Est et Nord de l'Afrique, disponibles dans la base de données GenBank

Souche	Topotype	Numéro d'Accession	% d'homologie	
			BEN/1/2010 de Borgou	BEN/26/2010 de Atacora
O/TOG/4/2005	Tp WA*	JF749858	93,1	91,7
O/CIV/8/99	Tp WA	AJ303485	90,0	89,5
O/GNA/4/99	Tp WA	DQ165071	90,0	89,1
O/ALG/2/99	Tp WA	HM230709	89,8	89,1
O/NGR/11/2001	Tp WA	JF749854	89,6	88,9
O/ALG/1/99	Tp WA	AJ303481	88,6	87,9
O/BKF/1/2002	Tp WA	JF749850	88,1	86,8
O/CAR/16/2000	Tp WA	HM211080	87,8	87,3
O/GHA/5/93	Tp WA	AJ303488	86,3	86,3
O/SUD/3/83	Tp EA-3	GU566036	86,2	86,6
O/BKF/1/92	Tp WA	HM211076	86,1	86,1
O/KEN/83/79	Tp EA-1	AJ303511	80,2	80,6
O/MAL/1/98	Tp EA-2	DQ165074	74,6	77,7
O/SUD/2/86	Tp EA-3	DQ165075	81,1	80,1

\*Tp: Topotype, WA: Afrique de l'Ouest (=West Africa), EA: Afrique de l'Est (=East Africa)

Tableau 4

Pourcentage d'homologie entre les séquences VP1 de variants génétiques de type A isolés au Bénin en 2010

	A/V1	A/V2	A/V3	A/V4	A/V5
A/V1					
A/V2	99,9				
A/V3	99,2	99,1			
A/V4	99,1	99,2	99,9		
A/V5	99,0	98,9	99,4	99,3	
A/V6	98,7	98,6	99,5	99,4	98,9

V: variant génétique

Tableau 5

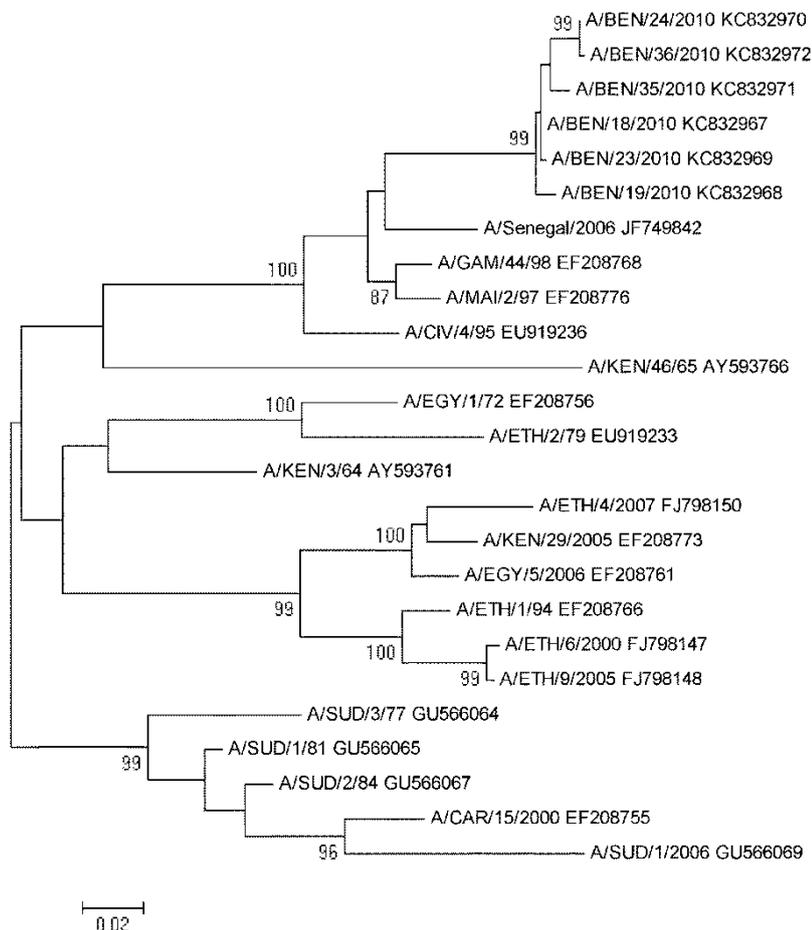
**Comparaison de deux séquences VP1 représentatives de type A de Bénin avec les séquences VP1, provenant des régions Ouest et Est de l'Afrique, disponibles dans la base de données GenBank**

Souche	Topotype	Numéro d'Accession	% d'homologie	
			BEN/19/2010 de Borgou	BEN/36/2010 de Alibori
A/GAM/44/98	Tp Africa GVI	EF208768	92,2	92,0
A/MAI/2/97	Tp Africa GVI	EF208776	92,2	91,7
A/SEN/10/97#	Tp Africa GVI	EU919237	91,8	91,5
A/Senegal/2006	Tp Africa GVI	JF749842	91,3	91,1
A/CIV/4/95	Tp Africa GVI	EU919236	90,7	89,8
A/SUD/1/81	Tp Africa GIV	GU566065	82,8	81,8
A/KEN/3/64	Tp Africa GIII	AY593761	81,8	81,7
A/SUD/2/84	Tp Africa GIV	GU566067	81,6	80,1
A/SUD/3/77	Tp Africa GIV	GU566064	81,4	81,3
A/CAR/15/2000	Tp Africa GIV	EF208755	81,0	80,8
A/ETH/2/79	Tp Africa GII	EU919233	79,7	79,6
A/EGY/5/2006	Tp Africa GVII	EF208761	79,4	79,4
A/SUD/1/2006	Tp Africa GIV	GU566069	79,2	78,6
A/ETH/1/94	Tp Africa GVII	EF208766	79,0	78,8
A/EGY/1/72	Tp Africa GII	EF208756	78,3	78,2
A/KEN/29/2005	Tp Africa GVII	EF208773	78,1	77,7
A/ETH/4/2007	Tp Africa GVII	FJ798150	77,8	77,3
A/ETH/9/2005	Tp Africa GVII	FJ798148	77,3	77,1
A/ETH/6/2000	Tp Africa GVII	FJ798147	77,0	76,7
KEN/46/65	Tp Africa GVIII	AY593766	76,5	75,7

\* Tp: Topotype, #: séquence incomplète de VP1

Figure 3

Dendrogramme, montrant les relations génétiques entre les séquences nucléotidiques codant la protéine VP1 des variants différents de sérotype A isolés au Bénin et les séquences homologues présentes sur GenBank. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions nucléotidiques par site.



#### IV - DISCUSSION

Les territoires d'Afrique de l'Ouest sont des régions dans lesquelles la circulation du virus de la fièvre aphteuse est constante. Quatre des sept sérotypes, à savoir O, A, SAT 1 et SAT 2, ont été responsables d'épizooties dans cette région au cours des dernières décennies. Par ailleurs, des foyers de FA impliquant les sérotypes O, A et SAT2 ont également été signalés au cours de la dernière décennie dans tous les pays ayant une frontière avec le Bénin [Données disponibles dans les rapports du Laboratoire mondial de référence FAO pour la fièvre aphteuse, 2012, FAO World Reference Laboratory for FMD].

Dans cette étude, nous avons analysé un échantillon de prélèvements de terrain (n=77) provenant de trois départements du Bénin (Borgou, Atacora, Alibori). L'analyse par RT-PCR en temps réel ciblant le gène codant pour la polymérase virale 3D a permis de détecter la présence du génome du virus de la FA dans 76 échantillons sur 77. Cependant, le virus n'a pu être isolé qu'à partir de 42 échantillons. Ceci est probablement dû à la qualité de conservation des échantillons dans le milieu de transport. Parmi ces 42 isolats, 33 ont été caractérisés comme étant de sérotype O et neuf de sérotypes A. La séquence

codant pour la protéine VP1 du virus de la fièvre aphteuse est utilisée pour étudier les relations entre les différents isolats du virus [Beck et Strohmaier, 1987] et les études d'épidémiologie moléculaire [Ayelet *et al.*, 2009 ; Bronsvort *et al.*, 2004 ; Habiela *et al.*, 2010 ; Knowles *et al.*, 2005]. Des études sur l'analyse de la relation génétique entre les différentes souches de virus de la fièvre aphteuse suggèrent que les virus ayant moins de 5 % de différences dans la séquence VP1 peuvent être considérés comme étant très proches et ceux avec plus de 15 % comme distincts [Knowles et Samuel, 2003]. Dans notre étude, l'analyse des séquences VP1 a mis en évidence la circulation de deux groupes différents de virus de type O au Bénin : l'un dans le département Atacora et l'autre dans le département Borgou. Ces deux groupes présentent une différence entre 8,6 et 8,8 % dans la séquence VP1, ce qui conduit à la conclusion qu'ils sont liés mais provenaient probablement de deux sources différentes. Les virus de type O de Borgou sont très répandus dans ce département. Une grande partie des virus isolés provient des échantillons prélevés dans les marchés d'animaux de Parakou. Le variant génétique dominant est présent à Parakou ainsi que dans les provinces plus éloignées telles que N'Dali et Kalalé. Nous avons détecté ce sérotype dans les zones proches de la frontière avec le département Alibori mais pas dans ce département. Toutefois, le nombre d'échantillons provenant d'Alibori est insuffisant pour conclure définitivement sur l'absence de virus de la FA type O dans ce département. Les virus de sérotype A isolés dans cette étude appartiennent au même groupe puisque leur séquences VP1 ne diffèrent pas plus de 1,4 %. Ce sérotype a été isolé à partir des échantillons prélevés dans Alibori et dans Borgou, mais pas dans Atacora. Les communes de Borgou où le sérotype A a été détecté sont voisines avec Alibori. Ce sérotype peut être distribué dans ces départements à cause des mouvements perpétuels d'animaux liés au commerce des animaux et à la transhumance [Couacy-Hymann *et al.*, 2006 ; Dehoux et Hounsou-Ve, 1991 ; Di Nardo *et al.*, 2011]. Les isolats du Bénin de sérotype A appartiennent au topotype africain de génotype VI (GVI) et sont proches des souches A/GAM/44/98, A/MAI/2/97, A/Senegal/2006 et A/CIV/4/95 (tableau 5). Les isolats de sérotype O du Bénin appartiennent au topotype Afrique de l'Ouest (WA) et sont proches de la souche O/TOG/4/2005 (tableau 3). Cependant, l'absence de données récentes sur les souches circulant en Afrique de l'Ouest, en particulier dans des pays voisins du Bénin, rend difficile une identification claire de la source

d'introduction des virus isolés dans cette étude.

Les études épidémiologiques du virus de la fièvre aphteuse sont difficiles à réaliser dans cette région d'Afrique. Cependant, après plusieurs années d'observation des notifications des épizooties en Afrique de l'Ouest, les régions sources primaires potentielles d'infection ont été identifiées. Elles sont considérées comme des réservoirs de la FA et sont associées à une forte densité d'animaux et une incidence fréquente de foyers signalés [Couacy-Hymann *et al.*, 2006]. Deux de ces sources primaires d'infection sont situées dans les zones frontalières du Bénin : la première sur le terrain du Parc Naturel W et la deuxième, à la frontière avec le Nigeria et le Niger [Couacy-Hymann *et al.*, 2006]. Le mouvement incontrôlé des animaux pendant la transhumance ainsi que le commerce d'animaux et de produits issus du bétail constituent les principaux facteurs de risque impliqués dans la propagation des maladies transfrontalières telles que la FA. La transhumance et le commerce transfrontalier des animaux jouent un rôle très important dans les pays d'Afrique de l'Ouest et Centrale. Il existe plusieurs flux de commerce des animaux et de leurs produits [Di Nardo *et al.*, 2011 ; Guilbert *et al.*, 2009 ; Kamuanga *et al.*, 2008]. Donc, il est probable que le virus de la fièvre aphteuse ait été introduit au Bénin à partir de ces zones de transhumance et de commerce d'animaux vivants.

Cette étude décrit le premier isolement et la caractérisation de souches du virus de la FA circulant au Bénin. Les données obtenues dans cette étude doivent être utilisées conjointement avec les données récentes recueillies auprès des pays voisins pour construire une stratégie régionale visant à contrôler la propagation de la FA en Afrique de l'Ouest. Puisque cette étude fournit seulement des données sur l'émergence de la fièvre aphteuse pour l'année 2010, les campagnes d'échantillonnages réguliers sont nécessaires pour assurer le suivi de la propagation et l'évolution de ce virus. D'ailleurs, davantage d'attention devrait être accordée aux études sur les mouvements d'animaux liés à la transhumance du bétail. Cette surveillance interrégionale et transfrontalière est nécessaire pour suivre la propagation de la FA. L'analyse des séquences et l'isolement viral réalisé dans cette étude ont permis d'obtenir des informations sur les relations génétiques existant entre les différentes souches en circulation au Bénin et devraient contribuer au développement de campagnes de vaccination adaptées. L'analyse complémentaire de la séquence du génome complet des isolats pourrait aider à une meilleure

compréhension du virus et de son évolution. Ces données pourraient également mettre en évidence d'éventuelles recombinaisons génétiques [Tosh *et al.*, 2002] et/ou d'autres modifications conduisant à l'émergence de nouveaux variants qui pourraient échapper à la protection vaccinale. L'information

épidémiologique et moléculaire sur la FA, associée à la sensibilisation de la population africaine quant à la gravité du problème lié à ce virus, devra sûrement conduire à mieux contrôler la propagation de cette maladie animale d'importance majeure en Afrique.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Ayebazibwe C., Mwiine F.N., Tjørnehøj K., Balinda S.N., Muwanika V.B., Ademun Okurut A.R., Belsham G.J., Normann P., Siegismund H.R., Alexandersen S. - The role of African buffalos (*Syncerus caffer*) in the maintenance of foot-and-mouth disease in Uganda. *BMC Vet. Res.*, 2010, **11**, 6-54.
- Ayelet G., Mahapatra M., Gelaye E., Egziabher B.G., Rufeal T., Sahle M., Ferris N.P., Wadsworth J., Hutchings G.H., Knowles N.J. - Genetic characterization of foot-and-mouth disease viruses, Ethiopia, 1981-2007. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, **15**(9), 1409-1417.
- Bronsvort B.M., Radford A.D., Tanya V.N., Nfon C., Kitching R.P., Morgan K.L. - Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease viruses in the Adamawa province of Cameroon. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**(5), 2186-2196.
- Couacy-Hymann E., Aplogan G.L., Sangaré O., Compaoré Z., Karimu J., Awoueme K.A., Seini A., Martin V., Valarcher J.F. - Etude rétrospective de la fièvre aphteuse en Afrique de l'Ouest de 1970 à 2003. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 2006, **25**(3), 1013-1024.
- Bastos A.D, Haydon D.T., Sangaré O., Boshoff C.I., Edrich J.L., Thomson G.R. - The implications of virus diversity within the SAT 2 serotype for control of foot-and-mouth disease in sub-Saharan Africa. *J. Gen. Virol.*, 2003, **84**(Pt 6), 1595-1606.
- Beck E., Strohmaier K. - Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.*, 1987, **61**(5), 1621-1629.
- Brehm K.E., Ferris N.P., Lenk M., Riebe R., Haas B. - Highly Sensitive Fetal Goat Tongue Cell Line for Detection and Isolation of Foot-and-Mouth Disease Virus. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, **47**(10), 3156-3160.
- Dehoux J.P., Hounsou-Ve G. - Epizootie de fièvre aphteuse au Nord-Bénin durant la saison sèche 1990-1991. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.*, 1991, **44**(3), 261-262.
- Di Nardo A., Knowles N.J., Paton D.J. - Combining livestock trade patterns with phylogenetics to help understand the spread of foot and mouth disease in sub-Saharan Africa, the Middle East and Southeast Asia. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 2011, **30** (1), 63-85.
- FAO World Reference Laboratory for FMD. Molecular Epidemiology Reports disponibles sur: [http://www.wrlfmd.org/fmd\\_genotyping/index.html](http://www.wrlfmd.org/fmd_genotyping/index.html) (accédé le 21 Novembre 2012).
- Grubman M. J., Baxt B. - Foot-and-Mouth Disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2004, **17**(2), 465-493.
- Guibert B., Banzhaf M., Soulé G., Balami H., Idé G. - Etude régionale sur les contextes de la commercialisation du bétail/accès aux marchés et défis d'amélioration des conditions de vie des communautés pastorales., 2009. IRAM study; disponible sur: <http://www.iram-fr.org/documents/Rapport%20iram%20commercialisation%20betail%20def.pdf> (accédé le 21 Novembre 2012).
- Habiela M., Ferris N.P., Hutchings G.H., Wadsworth J., Reid S.M., Madi M., Ebert K., Sumption K.J., Knowles N.J., King D.P., Paton D.J. - Molecular characterization of foot-and-mouth disease viruses collected from Sudan. *Transbound Emerg. Dis.*, 2010, **57**(5), 305-314.
- Kamuanga M.J.B., Somda J., Sanon Y., Kagone H. - Élevage et marché régional au Sahel et en Afrique de l'Ouest, Potentialités et défis: Etude réalisée dans le cadre du partenariat entre la Commission de la CEDEAO et le Secrétariat du CSAO/OCDE sur l'avenir de l'élevage au Sahel et en Afrique de l'Ouest, Issy-les-Moulineaux, France, 2008, p. 150.

- Knowles N.J., Samuel A.R. - Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.*, 2003, **91**(1), 65-80.
- Knowles N.J., Samuel A.R., Davies P.R., Midgley R.J., Valarcher J.F. - Pandemic strain of foot-and-mouth disease virus serotype O. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, **11**(12), 1887-1893.
- Nawathe D.R, Goni M. - La Fièvre Aphteuse au Nigeria. *Bull. Anim. Health Prod. Afr. Mar.*, 1976, **24**(1), 1-4.
- OIE - Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres, 2012, 7ème Édition, Chapitre: 2.1.5
- Paton D.J., Sumption K.J., Charleston B. - Options for control of foot-and-mouth disease: knowledge, capability and policy. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 2009, **364**, 2657-2667.
- Salt J.S. The carrier state in foot and mouth disease-an immunological review. *Br. Vet. J.*, 1993, **149**(3), 207-223.
- Sangare O., Bastos A.D., Marquardt O., Venter E.H., Vosloo W., Thomson G.R. - Molecular epidemiology of serotype O foot-and-mouth disease virus with emphasis on West and South Africa. *Virus Genes.*, 2001, **22**(3), 345-51.
- Sangare O., Bastos A.D., Venter E.H., Vosloo W. - Retrospective genetic analysis of SAT-1 type foot-and-mouth disease outbreaks in West Africa (1975-1981). *Vet. Microbiol.*, 2003, **93**(4), 279-289.
- Tamura K., Nei M. - Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution.*, 1993, **10**, 512-526.
- Tamura K., Nei M., Kumar S. - Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 2004, **101**, 11030-11035.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. - MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, **28**(10), 2731-2739.
- Thompson D., Muriel P., Russel D., Osborne P., Bromley A., Rowland M., Creigh-Tyte S., Brown C. - Economic costs of foot and mouth disease outbreak in United Kingdom in 2001. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 2002, **21** (3), 675-687.
- Thompson G.R. - Foot and mouth disease. In: JAW Coetz, G. Thompson, RC Tustin, NPJ Kriek editors, Infectious diseases of livestock with special reference to Sothorn Africa, vol. 2 Cape Town: Oxford University Press., 1994, p. 825-52.
- Tosh C., Hemadri D., Sanyal A. - Evidence of recombination in the capsid-coding region of type A foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.*, 2002, **83**(Pt 10), 2455-2460.
- Vosloo W., Bastos A.D.S., Sangare O., Hargreaves S.K., Thomson G.R. - Review of the status and control of foot and mouth disease in sub-Saharan Africa. *Rev. sci. Tech. Off. int. Epiz.*, 2002, **21**(3), 437-449.
- Vosloo W., Bastos A.D.S., Sahle M., Sangare O., Dwarka R.M. - Virus Topotypes and the Role of Wildlife in Foot and Mouth Disease in Africa. In: Conservation and Development Interventions at the Wildlife/Livestock Interface Implications for Wildlife, Livestock and Human Health., 2003, Chapitre 10, Edited and compiled by Steven A. Osofsky.

