



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physiologie Cellulaire
Laboratoire des Biotechnologies, Environnement et Santé

Projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme
de Master en science de la nature et de la vie
Filière Sciences Biologiques

Option : Génétique et physiologie

Thème :

**GENOTYPAGE DU VIRUS DE LA ROUGEOLE
CIRCULANT EN ALGERIE**

Réalisé par : M^{lle} MAHIDINE SARA

Soutenu le : 16/09/2018

Devant le jury composé de:

Pr. D. GUETARNI	Professeur, Université de Blida 1	Président
Dr. A. ABDUL HUSSEIN	Maître de conférences B, Univ. de Blida 1	Examinatrice
Dr. M.A. BELOUFA	Maître Assistant, Institut Pasteur d'Algérie	Promoteur

Blida – Septembre 2018

REMERCIEMENTS

Je remercie Allah, tout puissant, de m'avoir donné la force et l'audace pour dépasser toutes les difficultés rencontrées.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon promoteur de mémoire Dr. Beloufa Mohamed Amine. Je le remercie pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour le partage de sa riche expérience, pour sa modestie et pour la confiance qu'il m'a accordée.

Ma plus grande gratitude va aussi au Dr. Derrar Fawzi, qu'il trouve ici le témoignage de mon profond respect.

Je n'oublierai jamais de remercier Dr. Yebbous Ben Said Sid Ahmed pour son soutien et son aide précieux.

Mes sincères remerciements vont au Dr. Mohamed Said Ramdane, pour la qualité de son enseignement et pour ses conseils avisés.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à Mme Doudou Fattouma pour ses conseils, ses encouragements, et pour l'ambiance agréable tout au long de ce stage.

Je tiens à remercier Pr. D. Gettarni de me faire l'honneur de juger ce travail.

J'adresse aussi mes sincères remerciements au Dr. A. Abdul Hussein pour avoir accepté d'examiner ce travail et aussi pour la qualité de son enseignement.

Mes plus profonds remerciements vont à mes parents. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse gratitude.

Enfin, un grand merci à ma meilleure amie Melle Ouchait Asma qui me soutient bien au-delà de ce mémoire.

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS	02
TABLE DES MATIERES	03
LISTE DES ILLUSTRATIONS	05
LISTE DES TABLEAUX	07
LISTE DES ABREVIATIONS	08
INTRODUCTION	09
CHAPITRE 1 : BIBLIOGRAPHIE	11
1. LEVIRUS DE LA ROUGEOLE	12
1.1. Historique	12
1.2. Taxonomie	12
1.3. Structure et génome	13
1.4. Cycle virale	14
2. LA MALADIE DE LA ROUGEULE	16
2.1. Physiopathologie	16
2.2. Réponse immunitaire	18
2.3. Diagnostic virologique	19
2.4. Vaccination	20
3. EPIDEMIOLOGIE DU VIRUS DE LA ROUGEOLE	21
3.1. Situation épidémiologique	21
3.1.1. Dans le monde	21
3.1.2. En Algérie	21
3.2. Epidémiologie moléculaire de la rougeole	23
3.2.1. Génotypage du virus de la rougeole	23
3.2.2. Classification génétiques des différentes souches	23
3.2.3. Distribution géographique des différents génotypes	24

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES	25
1. MATERIEL BIOLOGIQUE	26
2. REACTIFS, MATERIELS ET EQUIPEMENTS UTILISES	26
2.1. Réactifs et matériels	26
2.2. Equipements	27
3. METHODES	28
3.1. Extraction de l'ARN viral (total)	28
3.2. Détection du virus de la rougeole par RT-PCR en temps réel	29
3.3. Génotypage du virus rougeoleux	33
3.3.1. RT-PCR classique de génotypage	33
3.3.2. Révélation des produits de PCR	35
3.3.3. Purification des produits de PCR	36
3.4. Réaction de séquençage des produits d'amplification	37
3.4.1. Principe	37
3.4.2. Procédure	39
3.4.3. Traitement de données et analyse phylogénétique	39
3.4.4. Analyse des séquences avec BASTN	40
3.4.5. Nomenclature des souches virales	41
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	42
1. Résultats de la détection de l'ARN viral	43
2. Résultats de la PCR de génotypage	44
3. Résultats du séquençage	45
3.1. Identification du génotype	45
3.2. Analyse des génotypes avec BLASTN	48
CONCLUSION	54
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	56
ANNEXES	62

ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Organisation du génome du virus de la rougeole.	13
Figure 2 : Récepteurs cellulaires identifiés pour le MeV .	15
Figure 3 : Cycle viral du virus de la rougeole.	16
Figure 4 : Epidémiologie du virus de la rougeole en Algérie.	23
Figure 5 : Distribution global des génotypes du virus de la rougeole 2010-2016.	25
Figure 6 : Mécanisme d'adsorption des acides nucléique à la silice.	26
Figure 7 : Principal étapes d'extraction des acides nucléiques.	29
Figure 8 : Principe de la technologie Taqman.	30
Figure 9 : Représentation d'une courbe d'amplification de PCR en temps réel.	31
Figure 10 : Représentation schématique du principe de la RT-PCR.	34
Figure 11 : Principe du la réaction de séquençage.	38
Figure 12 : Exemple d'un chromatogramme.	38
Figure 13 : Résultats de PCR en temps réel en une seule étape pour la détection de l'ARN viral.	43
Figure 14 : Séquences nucléotidiques (450 pb) de la partie C terminal du gène N de la nucléoprotéine N, identifiée en 2011, 2012 et en 2016.	49
Figure 15 : Résultats de PCR en temps réel en une seule étape pour la détection de l'ARNase P.	44
Figure 16 : Révélation sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplifications de RT-PCR de génotypage en une seule étape.	45
Figure 17 : Arbre phylogénétique généré au moyen du logiciel Méga 7.0 retraçant la parenté des souches virales obtenues avec les souches de références de l'OMS.	46

- Figure 18 :** Exemple de divergence en nucléotides des séquences virales (génotype B3) identifiées entre 2011 et 2012 avec la souche de référence Ibadan.NIE/97/1. 47
- Figure 19 :** Exemple de divergence en nucléotides des séquences virales (génotype B3) identifiées en 2016 avec la souche de référence Ibadan.NIE/97/1. 47
- Figure 20 :** Exemple de divergence en nucléotides de la séquence virale (génotype D4) identifiée en 2011 avec la souche de référence Montreal.CAN/89. 48
- Figure 21 :** Résultats d'analyse avec le logiciel BLASTN. Alignement de la séquence C-terminal (450pb) du gène de la nucléoprotéine d'une souche du virus rougeoleux détecté au cours de l'épidémie de 2011 avec la souche MVs/Sfax.TUN.11.09/2[B3]. 49
- Figure 22 :** Résultats d'analyse avec le logiciel BLASTN. Alignement de la séquence C-terminal (450pb) du gène de la nucléoprotéine d'une souche du virus rougeoleux détecté au cours de l'épidémie de 2016 avec la souche MVs/Niger.NGA/2.13/[B3]. 50
- Figure 23 :** Résultat d'analyse avec le logiciel BLASTN. Alignement de la séquence C-terminal (450pb) du gène de la nucléoprotéine d'une souche virale D4 détecté au cours de l'épidémie de 2011 avec la souche MVi/Paris.FRA/18.11[D4]. 51
- Figure 24 :** Arbre phylogénétiques généré au moyen du logiciel Mega 7.0, par la méthode du maximum de parcimonie, retraçant la relation entre les souches obtenues et les souches les plus proches de GenBank. 52

TABLEAUX

Tableau 1 : Vaccin anti-rougeoleux.	20
Tableau 2 : Séquences des amorces et de la sonde TaqMan, utilisées pour la détection de l'ARN viral rougeoleux.	31
Tableau 3 : Séquences des amorces et de la sonde TaqMan, utilisées pour la détection de l'ARN Human RNaseP.	32
Tableau 4 : Composition du mélange réactionnel.	32
Tableau 5 : Interprétation des valeurs CT.	33
Tableau 6 : Séquence des amorces utilisées pour la réaction de génotypage.	34
Tableau 7 : Composition du mélange réactionnel.	35
Tableau 8 : Fluorochromes accepteurs utilisés par la technologie Big Dye Terminator.	38
Tableau 9 : Composition du mélange réactionnel de la réaction de séquence.	39
Tableau 10 : Valeurs Ct obtenus pour la détection du MV et de l'ARNPase .	46
Tableau 11 : Résultats globale de l'étude.	53

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
BHQ : Black Hole Quencher®
CDC: Centers for Disease Control and prevention
Ct : Cycle Threshold
dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate
dNTPs :
Ed : la souche Edmonston
EdA : la souche Edmonston A
EdB : la souche Edmonston B
GS : gene start
GN : gene end
MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MeV : virus de la rougeole
Min : minutes
Mix : mélange réactionnel
MVs: measeles virus sample
OMS : Organisation mondiale de la Santé
PCR : polymerase chain reaction
pb : paires de bases
qPCR : quantitative polymerase chain reaction
RdRp : ARN-polymérase ARN dépendante
RNP : ribonucléoparticule
RT : reverse transcriptase
RT-PCR : real-time polymerase chain reaction
SAP : Shrimp Alkaline Phosphatase
Sec : secondes
Taq : *Thermus aquaticus*
µl : microlitre

INTRODUCTION

La rougeole est une maladie virale extrêmement contagieuse. Elle est due à un virus appartenant au genre *Morbillivirus*, de la famille des *Paramyxoviridae*. La transmission de ce virus se fait essentiellement par voie respiratoire, par les microgouttelettes des sécrétions nasopharyngées de personnes infectés. Les souches virales du virus rougeoleux sont réparti en groupes appelés génotype. Elles sont à l'origine, chaque année, d'un nombre très élevés de cas de rougeole à travers le monde.

La rougeole a l'image d'une maladie bénigne, de par ses symptômes (éruption, fièvre, fatigue, toux), se révèle d'une grande sévérité chez les enfants de moins d'un an, les adultes de plus de 20 ans, ainsi que chez les patients immunodéprimés. Elle provoque de graves complications, avec un taux d'hospitalisation non négligeable et un taux de mortalité très élevé. Cependant, La rougeole est l'une des maladies infectieuses susceptibles d'être prévenues par une vaccination, Entre 2000 et 2016, l'OMS estime que la vaccination anti-rougeoleuse a évité 20,4 millions de décès. Le nombre de décès à l'échelle mondiale a diminué de 84%, passant de 550 100 en 2000 à 89 780 en 2016.

Le réservoir du virus de la rougeole étant strictement humain, l'espoir justifié de l'élimination de la rougeole par la vaccination mobilise donc la communauté internationale d'où l'initiative mondiale lancée en 2001 par l'OMS avec un objectif d'éliminer la rougeole d'ici 2020.

L'Algérie à l'instar des pays du monde qui se sont engagés à éliminer la rougeole a adopté une politique vaccinale qui a permis une forte baisse de l'incidence de la maladie sans pour autant atteindre l'objectif d'élimination. En effet, cette année, nous assistons à une résurgence de la maladie avec plus de 6 483 cas enregistrés à travers 29 wilayas du pays et 09 décès recensés. Le virus de la rougeole circule donc toujours sur le territoire algérien et ceci en raison d'une couverture vaccinale sub-optimale.

Une surveillance moléculaire visant à identifier le génotype viral circulant s'avère nécessaire afin de contrôler et atteindre les objectifs d'élimination. L'OMS recommande d'exercer une surveillance virologique basée sur l'épidémiologie moléculaire du virus de la

rougeole, à toutes les phases de la lutte anti-rougeoleuse, et de développer les activités pour obtenir un tableau exact de la répartition mondiale des génotypes virales. L'OMS a défini les séquences génomiques cibles qui sont utilisées pour le génotypage du virus rougeoleux. Il est recommandé de séquencer les 450 nucléotides de l'extrémité COOH du gène la nucléoprotéine comme cible principale de génotypage, et la région complète du gène codant pour l'hémagglutinine H (1854 nucléotides) comme cible secondaire. Ces cibles permettent d'identifier les 24 génotypes de la rougeole (A, B1, B2, B3, C1, C2, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11, E, F, G1, G2, G3, H1 et H2) connus jusqu'à présent.

Ainsi, dans le but de déterminer le génotype du virus de la rougeole à l'origine des épidémies de rougeole en Algérie, une étude a été réalisée à l'Institut Pasteur d'Algérie, auprès du laboratoire national de référence de la rougeole accrédité par l'OMS, le laboratoire ROR (Rougeole-Oreillons-Rubéole). Ce dernier est chargé de la surveillance virologique de la rougeole dans une perspective d'élimination, de la confirmation des épidémies et des cas suspect de rougeole et du génotypage des différentes souches du virus circulant sur le territoire algérien.

Cette étude va permettre grâce à l'identification du génotype du virus de la rougeole circulant en Algérie :

- D'identifier et de documenter la source et les voies de transmission de ce virus (souches autochtones ou importées).

- D'évaluer l'efficacité des programmes de vaccination.

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE VIRUS DE LA ROUGEOLE

1.1. Historique :

La rougeole est connue depuis l'antiquité. Les premières épidémies seraient survenues dans la vallée du Tigre et de l'Euphrate en Mésopotamie il y'a plus de 6000 ans (Berche et Dorniol 2007), (Mammette 2002). La première description clinique de la rougeole a été faite au Xe siècle par le grand savant Iranien Abu-Bakr-Mohammed-ibn-zakaria al-Razi (860-932) ou Rhazès, qui la distingua de la variole dans son traité sur la petite vérole et la rougeole (Razès 1866). Par la suite, La rougeole fut parfaitement décrite en Europe par le médecin anglais Thomas Sydenham (1624-1689), au XVIIe siècle, suite à la grande épidémie londonienne de 1660-1664 qui a permis de la distinguer de la scarlatine et d'autres exanthèmes (Berche et Dorniol 2007). En 1757, la transmission de la maladie a pu être démontrée expérimentalement par Francis Home, un médecin écossé qui avait inoculé à un sujet sain du sang d'un rougeoleux pour tenter de l'immuniser. L'entité clinique et le caractère épidémique de la maladie n'ont été bien précisés qu'en 1846 par le jeune médecin danois Peter Panum (1846), présent lors d'une épidémie aux îles Féroé (Borderon, Goudeau, et Barthez 2007). Plus tard, en 1954 John Franklin Enders (1897-1985), l'un des pionniers de la recherche en virologie, et son étudiant Thomas Peeble purent isoler le virus de la rougeole en inoculant des cellules primaires de rein humain avec un échantillon sanguin prélevé sur un enfant nommé David Edmonston, atteint de rougeole (Berche et Dorniol 2007). Cette grande avancée a accéléré la mise au point d'un vaccin dans les années 60, lui-même à l'origine de la diminution de la morbidité et mortalité liée à la rougeole grâce à son introduction dans le programme élargi des vaccinations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1974.

1.2. Taxonomie :

Le virus de la rougeole appartient à l'ordre des *Mononegavirales*, à la famille des *Paramyxoviridae*, sous-familles des *Paramyxovirina*, et au genre *Morbillivirus* (Mammette 2002).

Le genre *Morbillivirus* regroupe aussi de nombreux virus animaux : le virus de la maladie de Carré des chiens, le virus de la peste bovine, le virus de la peste des petits ruminants, et des virus infectants les mammifères marins (McCarthy et Goodman 2010).

En dépit du tropisme essentiellement restreint à l'homme, le virus de la rougeole aurait évolué à partir d'un morbillivirus animal : le virus de la peste bovine dont il est très proche génétiquement (Sheshberadaran et al. 1986). Il a été engendré dans un environnement où les humains et les bovins cohabitaient. Furuse et *al* ont montré que les deux virus ont divergé aux alentours des XI^e-XIII^e siècles (Furuse, Suzuki, et Oshitani 2010).

1.3. Structure et génome :

C'est un virus enveloppé, pléomorphe avec un diamètre compris entre 150 à 350 nm (Lund et al. 1984). L'enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique, est hérissée de spicules de glycoprotéines H et F sur sa face externe et est tapissée sur sa face interne par la protéine de matrice M (Figure 1). L'hémagglutinine H reconnaît les sites récepteurs des cellules cibles et s'y lie et la protéine F permet la fusion de l'enveloppe du virus à la membrane plasmique des cellules (Navaratnarajah et al. 2008).

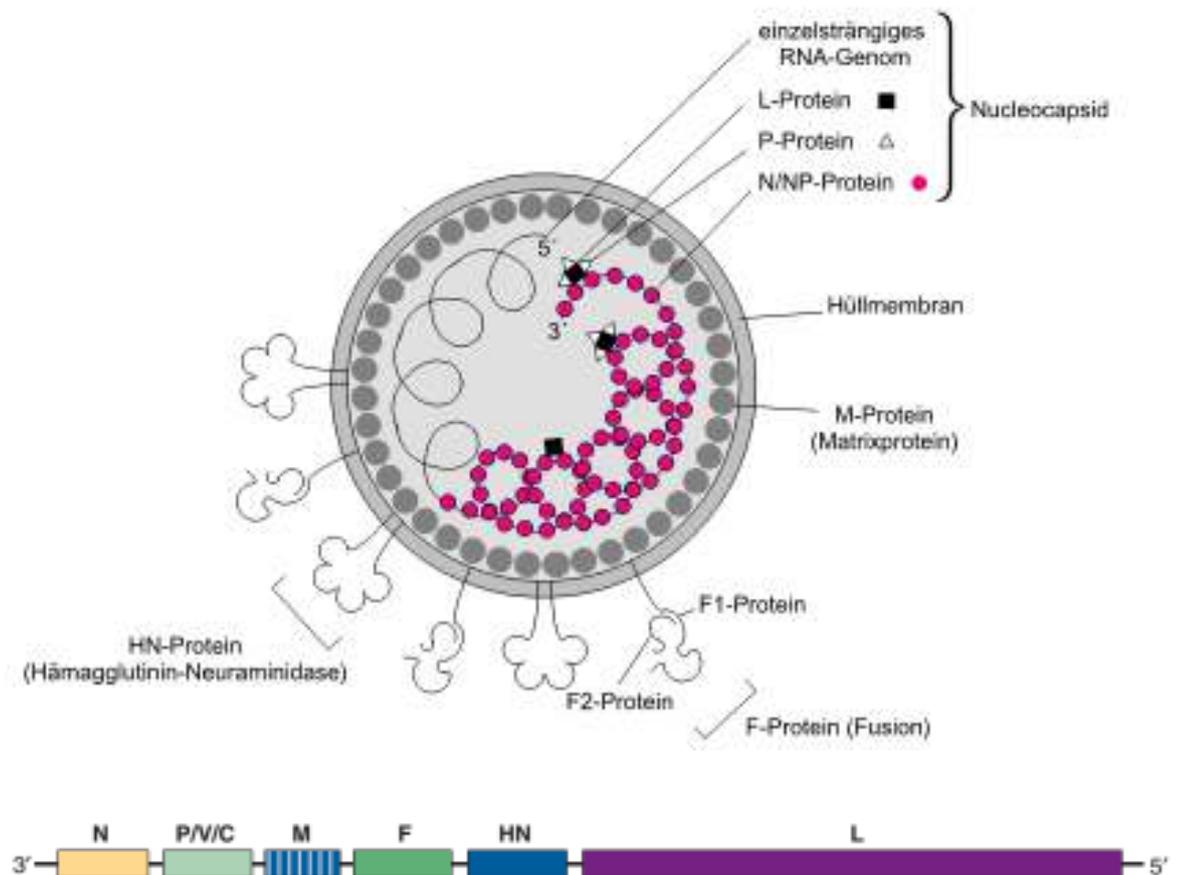


Figure 1 : Organisation du génome du virus de la rougeole.

Le génome viral est constitué d'un brin d'ARN, non segmenté de polarité négative. Entièrement séquencé (15 894 nucléotides) (Blumberg et al. 1988), il est constitué de six unités transcriptionnelles (gènes N, P, M, F, H et L) qui possèdent une structure commune, flanquées par deux séquences non traduites mais transcrites (leader et trailer) (Barrett et Underwood 1985) (Richardson et al. 1985). Ces gènes codent pour six protéines structurales, la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la protéine de fusion (F), l'hémagglutinine (H) et la protéine L (large).

De plus, deux protéines non structurales (C et V), sont codées à l'intérieur du gène P. Le codon d'initiation utilisé pour la synthèse de la protéine C est situé 19 nucléotides plus loin que celui utilisé pour la protéine P et V (Bellini et al. 1985). En revanche, la protéine V est produite suite à un phénomène d'édition de ARN par insertion (la polymérase insère en position 751 une guanosine supplémentaire) (Cattaneo et al. 1989) (Hausmann et al. 1999). Ces deux protéines (C et V) bloquent les voies de signalisation conduisant à la synthèse des IFN (Hahm 2009), permettant ainsi la propagation du virus.

Au sein de chaque gène, on distingue une séquence GS (gene start) et une séquence GE (gene end) et chaque unité est séparée de la précédente par une courte séquence intergénique (GAA ou GCA) (Griffin 2006). Cette ARN virale est complexé avec 2649 protéines N pour former la nucléocapside, une structure hélicoïdale relativement souple mesurant 1,25 µm environ de long pour un diamètre externe de 18 nm (Lund et al. 1984). Le long de cette structure, environ 300 protéines P se fixent aux protéines N. Ces protéines servent d'ancrage à la protéine L garante de l'activité ARN-polymérase ARN dépendante (RdRp). L'ensemble ARN-N/P/L constitue le complexe transcriptionnellement actif appelé ribonucléoparticule (RNP) (Longhi 2009).

1.4. Cycle viral :

Le cycle viral commence par la fixation de la protéine H à des récepteurs membranaires présents à la surface de la cellule hôte. Les récepteurs utilisés par ce virus morbilleux sont : le CD46 (Naniche et al. 1993) (Dhiman N et al.), CD150 (Tatsuo et al. 2000) (Dhiman N et al.) et la Nectine-4 (Noyce et al. 2011), (Mühlebach et al. 2011) (figure 2). Cette fixation induit un changement de conformation des protéines H et F. Le peptide hydrophobe de la protéine F est ainsi exposé et va s'insérer dans la membrane

cytoplasmique de la cellule, ce qui permet de réduire la distance entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire et entraîne la fusion avec celle-ci (Hang et Dutch.2012). La nucléocapside est alors libérée dans le cytoplasme cellulaire et est utilisée comme matrice pour la transcription en ARNm et aussi pour la réplication de l'ARN génomique (figure 3). La transcription est assurée par l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) constituée des protéines L et P. Cette transcription se fait de manière séquentielle du fait du détachement de la polymérase entre les jonctions de gènes. Après un signal encore mal caractérisé, la polymérase passe d'une activité de transcription à une activité de réplication. Elle ne s'arrête plus au niveau des jonctions entre gènes et synthétise un ARN de polarité positive qui correspond au génome complet. Cet anti-génome sert de matrice pour la production de nouveaux brins d'ARN génomiques. L'ARN génomique nouvellement synthétisé est encapsidé, et soit utilisé pour un nouveau cycle de transcription, soit transporté à la membrane plasmique pour l'assemblage de nouveaux virions : Les nouveaux génomes fabriqués s'assemblent autour des protéines de la capsidie formant des nucléocapsides. La protéine M relie les nucléocapsides aux extrémités cytoplasmiques des protéines d'enveloppes. La particule virale une fois assemblée sort de la cellule par bourgeonnement (Rima BK, Duprex WP.2009).

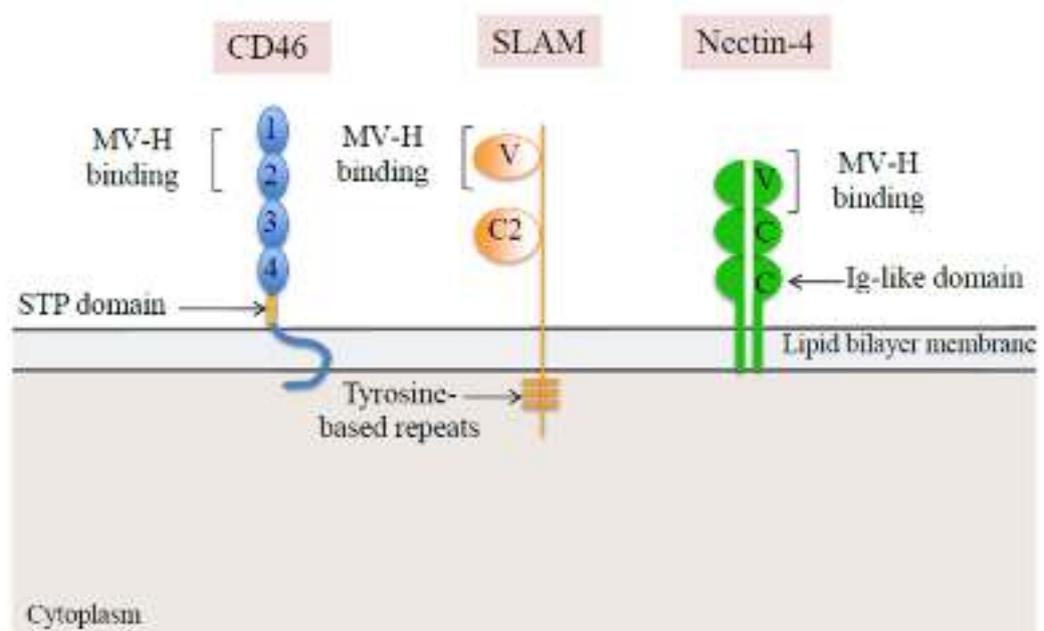


Figure 2 : Récepteurs cellulaires identifiés pour le MeV. STP domain: domaine riche en sérine-thréonine-proline; V: domaine variable; C: domaine constant ; les numéros 1-4 représentent des séquences courtes répétées (SCR).

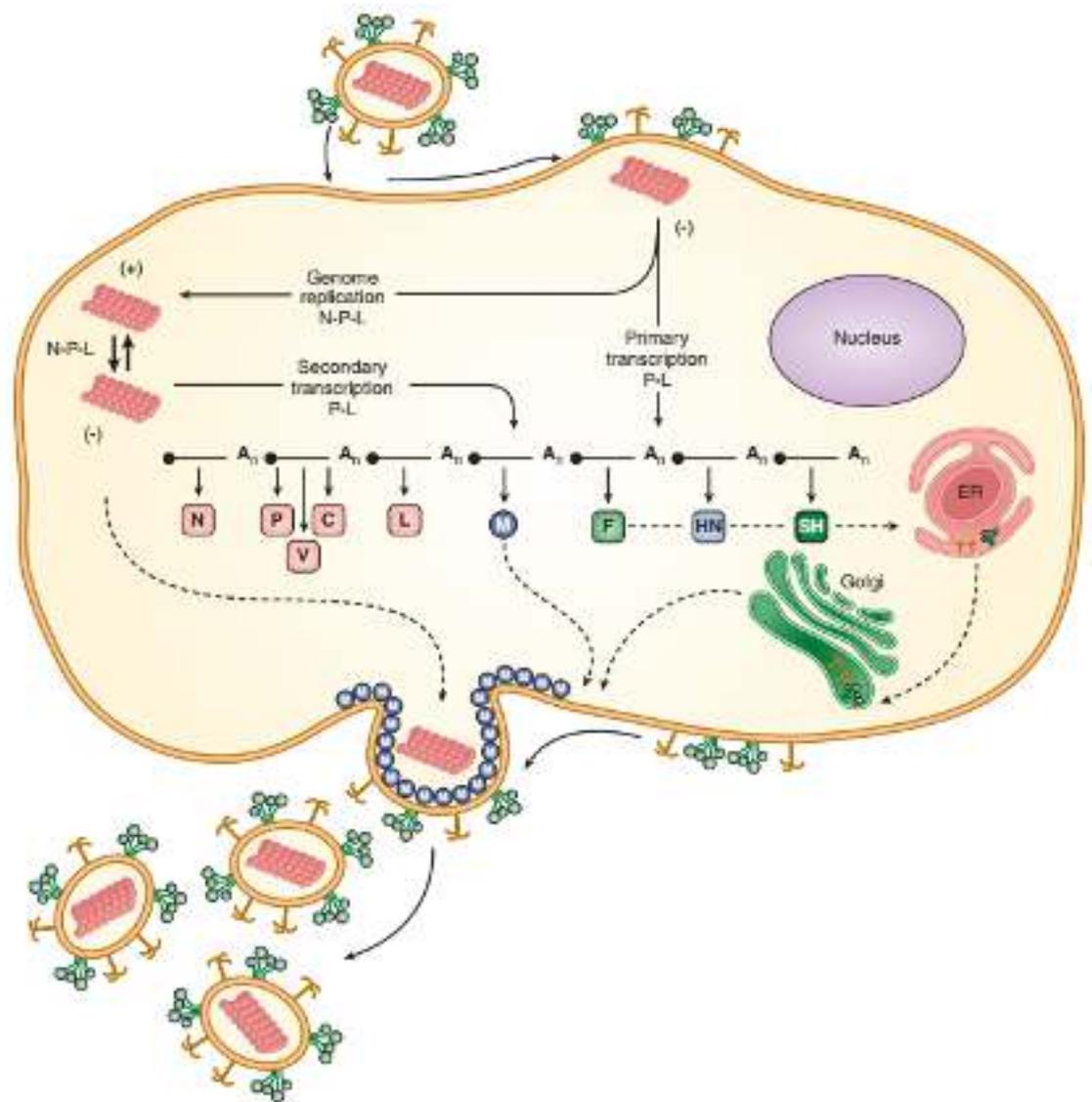


Figure 3 : Cycle viral du virus de la rougeole. (Copyright GD Parks and RA Lamb, 2006).

2. LA MALADIE DE LA ROUGEOLE :

2.1. Physiopathologie :

Le virus de la rougeole se transmet directement par les microgouttelettes des sécrétions nasopharyngées de personnes contaminés. Il se propage par alors par aérosolisation et infecte les voies respiratoires. Il se multiplie au niveau de la muqueuse respiratoire puis gagne les ganglions lymphatiques drainants, véhiculé par les macrophages alvéolaires et/ou les cellules dendritiques (Esolen LM et al. 1993) (Grosjean et al. 1997). Les ganglions seraient un site important de réplication, responsables de la première virémie (Katz M

1995). Dans le sang le virus est véhiculé par les leucocytes et/ou monocytes sanguins et disséminé au niveau des organes lymphoïdes secondaires dans lesquels sa réplication conduit à une deuxième phase de virémie qui étend l'infection à tout l'organisme (Moench et al. 1988). Cette étape de dissémination du virus dans l'organisme correspond à la période d'incubation du virus, qui est silencieuse et dure en moyenne 10 jours à partir du comptage. La phase d'invasion (2 à 4 jours) se manifeste par l'apparition d'une fièvre à 39-40 °C, d'un catarrhe oculo-respiratoire (toux, rhinite, conjonctivite) accompagné d'un malaise général. À la fin de cette phase d'invasion apparaît le signe de Köplick, inconstant mais pathognomonique de la maladie. Il correspond à un semis de points blancs entourés d'un halo inflammatoire et siégeant en regard des molaires supérieures. Il disparaît lorsque l'exanthème apparaît. La période de contagiosité est maximale dans les 2 à 4 jours qui précèdent le rash, et jusqu'à 4 jours après l'apparition de celui-ci. L'éruption de type maculo-papuleuse d'évolution descendante et qui débute derrière les oreilles, s'étend ensuite au visage et au tronc et touche en dernier les paumes et les plantes. Elle s'efface dans l'ordre d'apparition à partir du troisième jour (Perry RT, Halsey NA 2004) Beaudoux J-L et al.2013).

La fréquence de complication est relativement élevée, et varie en fonction de l'état de santé général et de l'âge des patients. En effet, le risque de complications est plus important chez les enfants âgés de moins d'un an ainsi que chez les adultes, en particulier chez les personnes immunodéprimées. Elles impliquent habituellement les voies respiratoires et le système nerveux central (Freymuth F et al. 2013) La pneumonie représente la complication la plus fréquente chez l'enfant et l'adulte. Elle peut être sévère, voire mortelle, et être due au virus de la rougeole lui-même, ou à des surinfections virales ou bactériennes (Perry RT et Halsey NA 2004). L'otite moyenne aiguë semble être une complication très fréquente chez l'enfant de moins de 5 ans. Les laryngo-trachéobronchites sont surtout des complications observées chez le nourrisson (Sabella C 2010).

Les complications plus dramatiques sont de l'ordre neurologique. L'encéphalomyélite post-infectieuse touche majoritairement les adolescents et les adultes jeunes, et à un moindre degré les plus jeunes enfants. La mortalité est très élevée, de l'ordre de 25 % (Johnson et al. 1984). La panencéphalite subaiguë sclérosante (PSS) est une complication gravissime mais très rare de la rougeole. Elle est liée à la persistance du virus dans le système nerveux central et touche les enfants et les adultes jeunes.

L'évolution se fait vers la démence, puis le décès survient 1 à 4 ans après le début des signes (Rima et Duprex 2005).

2.2. Réponse immunitaire :

La présence du virus de la rougeole dans l'organisme provoque une réaction du système immunitaire avec production d'anticorps. Le virus sauvage de la rougeole induit une réponse humorale et cellulaire qui protège les convalescents à vie contre une réinfection. Il a été montré que l'administration passive de gammaglobulines spécifiques de la rougeole peut inhiber l'infection par le virus (Janeway 1945), ce qui suggère que l'immunité humorale est suffisante pour protéger les individus contre une réinfection. Cependant, l'évolution progressive de la maladie chez des personnes qui souffrent d'anomalies congénitales ou acquises de la réponse cellulaire, indique que cette dernière est indispensable pour l'élimination du virus après infection (Kaplan.L. J 1992).

Des anticorps spécifiques du virus de la rougeole sont détectables dès l'apparition de l'éruption (Bech 1959). Les IgM sont produits en premier et indiquent une primo-infection. Les anticorps IgG et IgA, détectables quelques jours plus tard dans le sérum ainsi que dans les sécrétions, persistent à vie. Les IgM quant à eux disparaissent dans les 8 semaines après l'éruption. Les IgG sont dirigés contre toutes les protéines virales, mais majoritairement contre la nucléoprotéine (Bouche, Ertl, et Muller 2002). Cependant seuls les IgG spécifiques des protéines H et F contribuent à la neutralisation du virus (de Swart, Yüksel, et Osterhaus 2005).

L'analyse des cytokines dans le sang ainsi que la détection directe des différents types de cellules T prouvent que des cellules T CD8+ ainsi que des cellules T CD4+ de type I et II sont activées au cours de la maladie. Les cellules CD8+ responsables de l'éruption, seraient activées pendant la phase prodromique. Parmi les cellules T CD4+, celles du type I semblent être dominantes pendant l'éruption, tandis que celles du type II dominant pendant la phase de convalescence (D. E. Griffin 1995) (D. E. Griffin et Ward 1993).

Paradoxalement l'induction d'une réponse immunitaire efficace et de longue durée contre le virus de la rougeole est suivie d'un état d'immunosuppression général qui peut persister pendant plusieurs mois (Tamashiro et al. 1987) qui associe lymphopénies B et T

et diminution des réponses humorales et cellulaires contre d'autres pathogènes. Ce phénomène pourrait expliquer, en partie, la fréquence des surinfections bactériennes faisant suite à l'infection rougeoleuse (Moss, Ota, et Griffin 2004) (Diane E. Griffin, Lin, et Pan 2012).

2.3. Diagnostic virologique :

Le diagnostic de la maladie doit être confirmé au laboratoire pour chaque cas clinique de rougeole afin de porter un diagnostic définitif car un diagnostic différentiel se pose avec d'autres affections à fièvres éruptives notamment des infections par le virus rubéoleux, et par le parvovirus B19. Les méthodes de diagnostic de la rougeole se basent essentiellement sur le titrage d'anticorps anti-rougeoleux (méthode indirect) et sur la détection du virus par RT-PCR (méthode direct) (WHO 2007).

La détection des anticorps IgM est la méthode de référence pour le diagnostic de l'infection rougeoleuse. Leur mise en évidence à partir de prélèvement sanguin est réalisée à l'aide de techniques enzymatiques ELISA ou EIA permet d'infirmer le diagnostic d'une infection rougeoleuse. Les IgM apparaissent à peu près au moment de l'éruption cutanée et persistent environ 60 jours mais elles sont le plus souvent positives du 3ème au 28ème jour suivant le début de l'éruption. Un prélèvement réalisé au cours des trois premiers jours de l'éruption, négatif en IgM ne permet pas d'exclure l'infection et doit être suivi d'un second prélèvement. Les IgG apparaissent au même moment que les IgM ; une élévation d'au moins quatre fois leur titre sur deux prélèvements espacés de 10 à 20 jours permet de confirmer le diagnostic. La sérologie doit être interprétée en fonction des antécédents vaccinaux (WHO 2007).

La détection de l'ARN du virus rougeoleux est réalisée en utilisant la transcription inverse couplée à l'amplification génique en temps réel (qRT-PCR) à partir d'échantillons de salive, d'urine, ou d'écouvillonnage rhino-pharyngé. En cas d'amplification positive, le génotypage de la souche viral est alors réalisé par une réaction de séquençage du fragment de 450 nucléotides de la partie C-terminale du gène N de la nucléoprotéine et/ou de la séquence complète du gène H de l'hémagglutination selon les recommandations de l'OMS.

Le génotype ainsi déterminé permet alors un traçage épidémiologique de la circulation des souches virales (souches autochtones ou importées). Notant qu'en cas d'épidémie il n'est pas nécessaire de confirmer chaque cas suspect par un diagnostic virologique. La présence de symptômes de la rougeole avec un lien épidémiologique (cas confirmé au laboratoire) est suffisante pour poser le diagnostic (WHO 2007).

2.4. Vaccination :

Le meilleur moyen de lutter contre la rougeole reste la prévention vaccinale. Le vaccin anti-rougeoleux est un vaccin vivant atténué associé aux vaccins contre les oreillons et la rubéole (vaccins trivalents ROR) (Caseris et al. 2015). Les souches utilisées dans les vaccins rougeoleux dérivent du même virus Edmonston de génotype A. La souche Edmonston (Ed) du virus a été isolée en 1954 par culture sur cellules primaires humaines. L'adaptation du VR Ed aux fibroblastes d'embryon de poulet a produit les souches EdA et EdB. Des passages ultérieurs sur fibroblastes d'embryon de poulet ont produit les souches Schwarz plus atténuées et les plus utilisés actuellement car mieux tolérée (D. E. Griffin et Pan 2009).

Le vaccin provoque une infection inapparente ou bénigne, non contagieuse (Guérin N 2007) Même si le taux d'anticorps induits par la vaccination est inférieur à celui obtenu après la maladie, les données épidémiologiques et sérologiques prouvent que la protection induite est durable, et ce, probablement pendant toute la vie (Markowitz et al. 1990). La plupart des enfants qui n'ont pas répondu à une première dose vont répondre à une seconde, cependant des échecs de vaccination après 2 doses peuvent survenir, mais reste très rares et ne jouent qu'un rôle mineur dans la transmission de la maladie et la survenue d'épidémies (Poland et al. 1997) (Guérin N 2007).

En Algérie la vaccination anti rougeoleuse a été introduite dans le calendrier vaccinal en 1985 (décret 85-282). Aux vues des différentes modifications des profils épidémiologiques de la rougeole en Algérie, il a été nécessaire de revoir en plusieurs fois le calendrier vaccinal afin de l'adapter en fonction de ces variabilités. Depuis 2014, le calendrier vaccinal recommande une première dose du vaccin à 9 mois et une deuxième dose à 18 mois pour protéger le plus tôt possible les nourrissons (tableau 1) [53].

Tableau 1 : Vaccin anti-rougeoleux.

Vaccin ROR combiné	Rougeole : souche Schwartz Rubéole : soucewistar Oreillons : souche JerylLynm
Mode d'administration	Voie sous- cutanée
Groupe d'âge cible	09 mois une première dose 18 mois une deuxième dose
Volume par dose	0.5 ml
Condition de stockage	+2°C à +8°C. Ne pas congeler
Présentation	Poudre + solvant Doit être reconstitué avant utilisation et utilisé dans les 6h

La couverture vaccinale en Algérie peut être considérée comme étant appréciable, selon les statistiques du ministère de la Santé et de l'OMS, en effet un taux de couverture vaccinal régulier de 95% est enregistré depuis 2011 (OMS 2017), (OMS 2014). Cependant on note quelque disparité au niveau de certaines wilaya du pays ou des flambés épidémiques ont été recensés ces dernières années. Cette couverture vaccinale reste donc insuffisante pour atteindre l'objectif de l'élimination de la maladie.

3. EPIDEMIOLOGIE DU VIRUS DE LA ROUGEOLE :

3.1. Situation épidémiologique :

La rougeole est l'une des infections virales les plus contagieuses. En effet, le virus rougeoleux dont l'homme est le seul réservoir naturel connu, est l'un des pathogènes le plus apte à une transmission interhumaine avec 12 à 18 personnes infectées à partir d'un seul cas (Griffin DE 2001). Cependant l'épidémiologie de cette maladie a connu des changements importants suite à l'introduction de la vaccination.

3.1.1. Dans le monde :

Avant l'introduction du vaccin anti-rougeoleux en 1963, des épidémies de rougeole de grande ampleur se produisaient environ tous les 2 à 3 ans et on estimait à 30 millions le nombre de cas et à plus de 2 millions le nombre de décès associés survenant dans le monde chaque année (OMS 2017). L'intensification des activités de vaccination a permis de faire baisser considérablement le nombre de décès dus à la rougeole. Selon les données actualisées, de l'OMS le nombre de cas de rougeole a régressé, passant de 29 068 400 en

2000 à 6976 800 en 2016. Au cours de la même période, on estime que le nombre de décès dus à la rougeole a baissé de 84%, passant de 550 100 en 2000 à 89 780 en 2016 (OMS 2016).

3.1.2. En Algérie :

Le vaccin contre la rougeole a été introduit dans le calendrier vaccinal Algérien en 1985, en instituant une seule dose du vaccin anti-rougeoleux à l'âge de 09 mois [59]. Cependant les épidémies de Rougeole déclarées durant les années 90 (avec 21003 cas en 1996 et 19573 cas en 1997), ont incité la Direction de la Prévention du Ministère de la Santé et de la Population à organiser en 1997 une campagne nationale de vaccination touchant tous les enfants en milieu scolaire avec en plus le renforcement du calendrier national de vaccinations par une 2^{ème} dose du vaccin à l'âge de 06 ans (elle vise à conférer une immunité aux enfants qui n'ont pas réagi à la première dose du vaccin), ce qui a permis une baisse significative des cas déclarés (3388 cas en 1998 et 1889 cas en l'an 2000) (Ould Kada 2017).

D'autre part et dans une perspective d'élimination de la rougeole, un plan national (instruction ministérielle n°2 du 9 avril 2001) a été mis en place par la direction de la prévention instituant un système de surveillance sérologique avec la collaboration de l'Institut Pasteur d'Algérie (devant toute flambée de rougeole il est impératif de faire une sérologie). Ce programme avait pour objectifs de réduire la mortalité et la morbidité par rougeole de 95% d'ici l'an 2005 par rapport au seuil de l'année 97, d'atteindre un taux de couverture vaccinale d'au moins de 90 % pour les enfants de moins d'un an (1ère dose) et un taux et de 90 % pour les enfants âgés de 6 ans (2ème dose) à l'entrée scolaire [61].

Aussi dans le cadre du renforcement des activités du programme national d'élimination de la rougeole un plan de surveillance au cas par cas suspect de rougeole a été mis en place en 2009 selon l'instruction ministérielle n°654DP/MSPRH d'avril 2009 et conformément aux recommandations de l'OMS. Il consistait en la notification exhaustive des cas, à la confirmation du diagnostic par la sérologie suite à l'éclosion d'épidémies de rubéole confondues avec la rougeole et la réalisation d'une enquête épidémiologique autour de chaque cas. Cette surveillance renforcée aide à identifier et investiguer les flambées épidémiques, à prévenir les épidémies par l'identification des zones et des populations à risque, et à évaluer les stratégies de vaccination [62].

Ces efforts de vaccination et de surveillance ont permis une forte baisse de l'incidence de la rougeole dans notre pays, (passant de 65,5 cas pour 100.000 habitants en 1996 à 0,31 cas en 2009 et à 0,07 cas pour 100.000 habitants en 2012.) sans pour autant éviter la formation de poches d'individus non-protégés (parents réticent à l'idée de faire vacciner leurs enfants et/ou individus habitant les zones enclavées, zones éparses et les nomades) qui ont échappés à la vaccination et qui sont source des prochains foyer épidémiques [53]. Ceci explique les pics épidémiques de rougeole observés au cours de ces dernières années comme c'est le cas actuellement avec les flambées épidémique dans plusieurs wilaya du pays où on assiste à une résurgence de la maladie avec au totale 6 483 cas déclarés (figure 4).

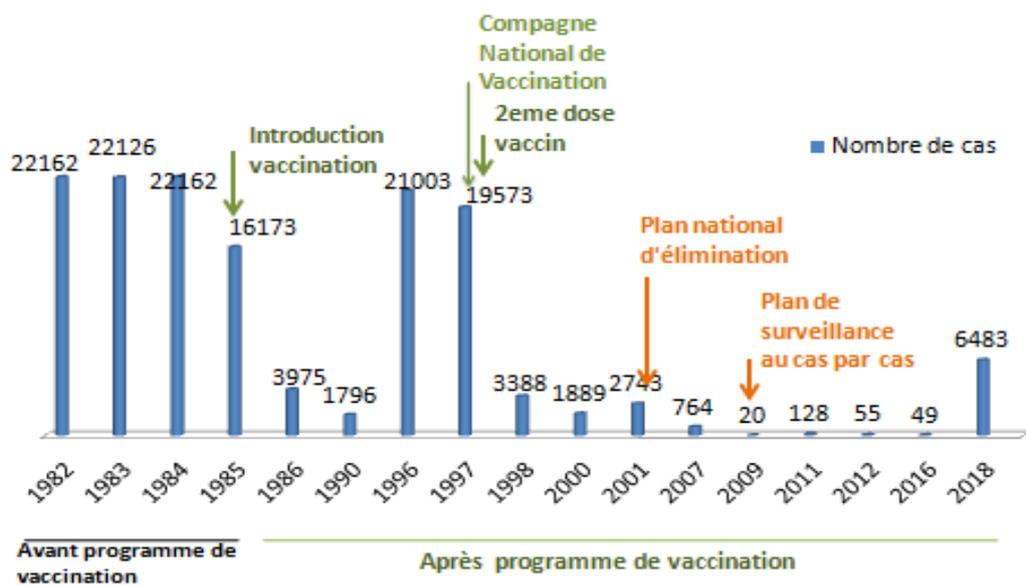


Figure 4 : Epidémiologie du virus de la rougeole en Algérie.

3.2. Epidémiologie moléculaire de la rougeole :

L'épidémiologie moléculaire du virus de la rougeole est un outil précieux dans le cadre de la surveillance de la maladie. Basée sur le génotypage des souches virales qui circulent dans une région, un pays, un continent, elle permet d'identifier la source et les voies de transmission du virus, et d'évaluer l'efficacité des programmes de vaccination.

Aussi elle constitue un élément clé dans la surveillance de l'élimination de la maladie en démontrant l'absence d'un génotype endémique (OMS 2015) (OMS 2018).

3.2.1. Génotypage du virus de la rougeole :

Un aspect important de la surveillance de la maladie est la capacité à différencier les lignées, les types ou les variantes d'un pathogène. Ce processus est généralement désigné sous le nom de typage et, historiquement, les pathogènes du même genre ou de la même espèce sont génotypés selon leurs caractéristiques phénotypiques (marqueurs biochimiques ou sérologiques). Toutefois, pour un certain nombre de pathogènes, y compris le virus de la rougeole, il existe trop peu de différences phénotypiques pour employer cette méthode de typage. L'avènement de la technologie de séquençage de l'ADN a permis de déceler les zones des génomes présentant une variabilité permettant de différencier les différentes souches, il s'agit du processus de génotypage (Hiebert J 2015).

3.2.2. Classification génétiques des différentes souches :

Bien que monotypique du point de vue sérologique le virus de la rougeole présente une grande diversité génétique du fait de l'absence du système de correction des erreurs (proof reading) des ARN polymérases ARN-dépendantes. Le taux de mutation observé est donc relativement élevé : 9.10^{-5} nucléotide par cycle répliatif, soit 1.43 mutation par cycle (Schrag, Rota, et Bellini 1999). Ceci implique une grande variabilité au sein du pool d'ARN génomique produit. Ainsi, la variabilité nucléotidique atteint 7% pour les gènes les plus variables, le gène N de la nucléoprotéine et le gène H de l'hémagglutination. Dans la région C-terminale du gène N (NP-HVR pour nucleoprotein hypervariable region), la diversité génétique entre deux souches sauvages peut même être supérieure à 13% (Mulders, Truong, et Muller 2001). Cette variabilité génétiques entres les différentes souches sauvages a permis de les classer en en huit clades (A à H) rassemblant jusqu'à présent 24 génotypes (A, B1–B3, C1–C2, D1–D11, E, F, G1–G3 et H1–H2). (Tableau en Annexe A). Les lettres désignent la principale variante génétique (clade) et les chiffres, les sous-clades. Certains clades ne comportent qu'un seul génotype et la désignation du clade et du génotype est alors identique (clade A= génotype A). D'autres, comme le clade D, sont représentés par plusieurs génotypes désignés par la lettre du clade suivie d'un numéro

pour le sous clade (D1, D2,...). Une souche de référence a été assignée à chaque génotype et qui représente le premier isolat de chaque génotype. Rappelons que la définition des génotypes et la démarcation entre différents clades sont basées sur la variabilité (divergence nucléotidique) observée dans les parties les plus variables du génome, (gène N et H). Les critères pour définir un nouveau génotype ont été établie par l’OMS, une variabilité de plus de 2,5 % dans le fragment C-terminal du gène N (450 nt) et 2 % dans le gène H (1851 nt) par rapport à la souche la plus étroitement apparentée, est requise pour la désignation de nouveaux génotypes (OMS 2001).

3.2.3. Distribution géographique des différents génotypes :

La distribution des génotypes varie selon les pays, cependant plusieurs génotypes peuvent circuler partout dans le monde. Leur identification permet de signer l’origine géographique des souches; par exemple, les génotypes B2 et B3 sont plutôt présents en Afrique, les génotypes D8, D9, H1 sont présents en Asie. Cinq génotypes B1, E, F, G1, D1, n’ont pas été détecté depuis 25 ans et sont considérés comme étant inactif (Riddell MA 2005), d’autres ont émergé récemment comme observé en Chine (Zhang et al. 2010).

Le génotypage permet le traçage épidémiologique de la circulation des virus, dans une communauté, une région, un pays, ou un continent. Il existe schématiquement deux modes de distribution des génotypes du virus de la rougeole dans le monde, selon que les pays ont éliminé, ou non, la maladie par la vaccination. Dans les pays où la rougeole a pratiquement disparu, les quelques cas de rougeole sont en général associés à des génotypes différents, importés d’autres pays où l’infection est endémique. Dans ces derniers où l’infection continue à se répandre, la majorité des rougeoles est liée à un génotype indigène (Freymuth F 2011).

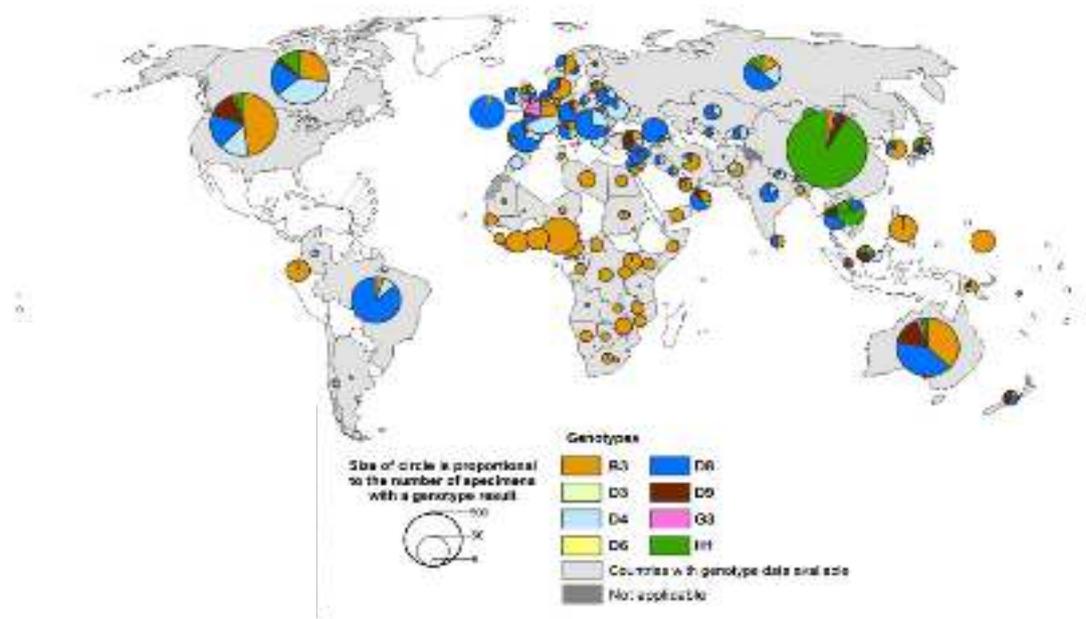


Figure 5 : Distribution globale des génotypes du virus de la rougeole selon l’OMS, période 2010-2016.

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

1. Echantillonnages :

Notre étude comporte au total 26 prélèvements de gorge collectés à partir de cas de rougeole confirmés sérologiquement (présence d'IgM antirougeoleux) durant les épidémies de qui ont sévi en Algérie, en 2011 dans la wilaya de M'sila et Biskra et en 2012 et 2016 dans la wilaya d'El Bayadh. Les prélèvements ont été réalisés dans la semaine suivant l'apparition de l'éruption, au moyen d'un écouvillon stérile (grattage du fond de la gorge) et ont été placés dans un milieu de transport viral (1 ou 2 ml), puis expédiés au laboratoire en respectant la chaîne de froid (Icebox), dans un délai de 48-72 heures. Au laboratoire, les échantillons réceptionnés ont été aliquotés, codifiés et congelés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Dans le but de déterminer le génotype du virus de la rougeole à l'origine des épidémies de 2011, 2012 et 2016, toutes les étapes d'analyse ont été effectuées suivant un protocole normalisé de l'OMS et qui consiste à :

- L'extraction de l'ARN viral à partir des prélèvements préalablement décongelés.
- La détection de l'ARN viral par RT-PCR en temps réel en ciblant une région conservée de 75 pb gène qui code pour la nucléoprotéine N.
- Une RT-PCR classique pour générer un fragment de 600 pb du gène qui code pour la nucléoprotéine N encadrant la région hypervariable de 450 pb (cible du génotypage).
- Le séquençage par la méthode de Sanger adaptée à la fluorescence du fragment de 600pb généré lors de la RT-PCR classique.
- Un traitement des séquences obtenues suivie d'un alignement de ces séquences avec les séquences de génotypes de références de l'OMS à l'aide du logiciel Mega.7.0.
- Une analyse des séquences avec le logiciel BLASTN pour l'identification des souches virales les plus proches des souches retrouvées.

2. REACTIFS, MATERIELS ET EQUIPEMENTS UTILISES :

2.1. Réactifs :

- Tampon TBE 1× (Tris-Borate-EDTA)
- Agarose
- Syber Green
- Colorant de charge contenant le bleu de bromophénol
- Marqueur de poids moléculaire
- Ethanol à 70%
- Eau déminéralisée
- Eau exempte de nucléase
- Inhibiteur RNase 2000 unités
- Kit SuperScript III PlatinumOneStepqRT- PCR (Invitrogen, #11732-020)
- Kit Qiagen One-step RT-PCR
- Kit MeaslesGenotyping RT-PCR, Version 2.0 (amorces et contrôle RNA)
- Kit BigDyeTerminator v3.1
- Amorces de séquençage MeV214 et MeV216
- Vaccin anti-rougeoleux

2.2. Matériels et équipements :

- Support du gel d'agarose et peignes
- Cuve d'électrophorèse pour gel d'agarose
- Générateur de courant électrique
- Eprouvette gradué
- Micropipettes
- Pointes stériles à filtre anti-aérosol
- Microtubes à centrifuger stériles 1.5 ml, 0.2 ml
- Portoir réfrigérant pour microtubes
- Plaque de réaction optique 96 puits ou microtubes en barettes
- Bécher ou flacon en verre

- Papier aluminium
- Feuille adhésive optique
- ThermocycleurABI 7500 Real-time PCR
- ThermocycleurAB GeneAmp PCR System 9700
- Analyseur génétique ABI Prism 3100
- Centrifugeuse avec support pour plaques à 96 puits
- Microcentrifugeuse réfrigérée à 4 °C avec rotor pour microtubes de 1.5 ml et tubes de 0.2 ml
- Hôte avec lumière UV désignée pour la PCR
- Congélateur -20°C et -70°C
- Tran-illuminateur UV
- Vortex agitateur
- Bain marie à 50 °C
- Micro-onde
- Parafilm
- Gants
- Blouse

3. METHODES

3.1. Extraction de l'ARN viral (total) :

L'ARN viral a été extrait à partir des échantillons de gorge en utilisant le kit Qiagen Viral RNA mini Kit.

3.1.1. Principe :

L'extraction des acides nucléiques avec le kit Qiagen est basée sur le principe des interactions ioniques entre les particules d'une mini membrane de silice et les acides nucléiques en présence de sels chaotropiques. Les acides nucléiques sont adsorbés par la silice dans des conditions de sel élevées, et en présence d'alcool, via le mécanisme illustré à la figure 4. Un agent chaotropique ayant une force ionique élevée dénature les

biomolécules en perturbant la formation d'hydratation autour d'eux. Il intervient comme compétiteur dans les relations que les acides nucléiques établissent avec l'eau. Les cations de l'agent chaotropique se lient à la silice chargée négativement, formant un pont qui permet ainsi aux acides nucléiques chargé aussi négativement de se lier à la silice. L'ajout d'une solution à faible teneur en sel entraîne la rupture du pont ionique et l'association des molécules d'eau avec la silice éluant ainsi les acides nucléiques.

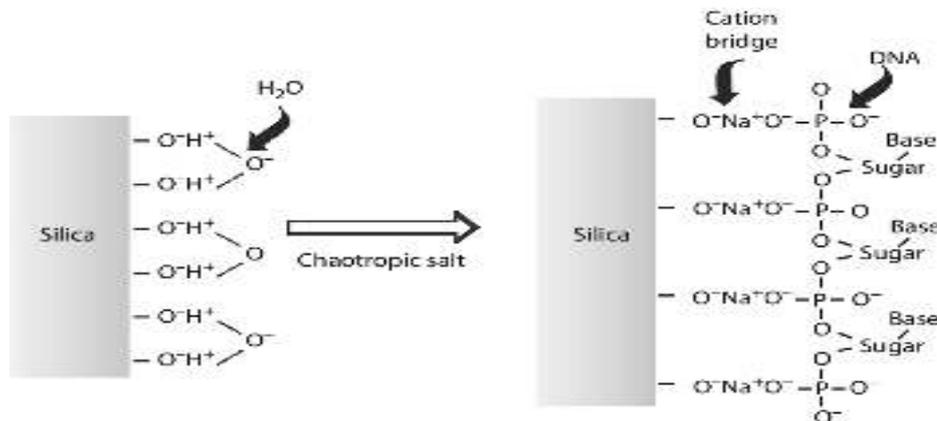


Figure 6 : Mécanisme d'adsorption des acides nucléique à la silice.

3.1.2. Procédure :

Selon le protocole défini par le fournisseur, l'échantillon est d'abord lysé dans des conditions hautement dénaturantes pour inactiver les RNases et assurer l'isolement de l'ARN viral intact. Pour ce faire, 140 μ l d'échantillon ont été traité avec 560 μ l de tampon de lyse AVL, à T° ambiante et de l'éthanol absolu (560 μ l) a été rajouté à la solution. Ensuite de 630 μ l de ce mélange ont été transféré sur une mini colonne de centrifugation (Qiagen Mini spin column) sur laquelle l'ARN total se fixe. Après une centrifugé à 8000 tpm pendant 1 min l'effluent a été éliminé et la colonne a été lavée avec deux tampons de lavage AW1 et AW2. Des centrifugations ont été réalisées après chaque lavage afin de permettre une élimination efficace de tous contaminants. L'ARN a été ensuite élué avec 60 μ l de tampon d'éluion AVE, centrifugé à 8000 tr/min et a été conservé à -80°C (figure5).

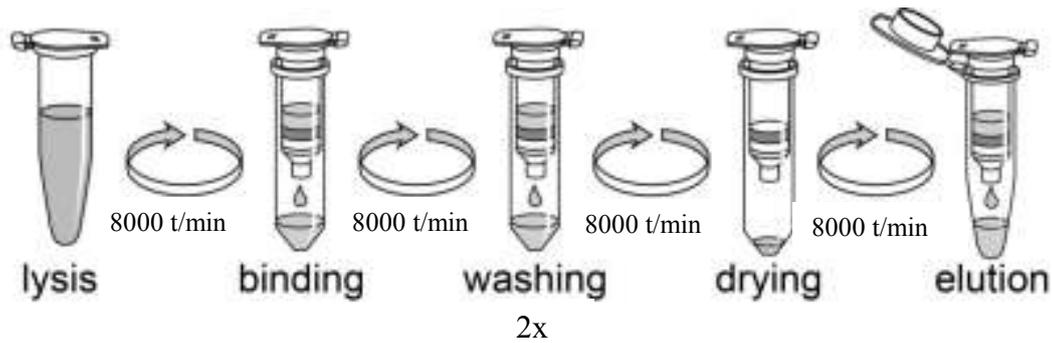


Figure 7 : Principal étapes d'extraction des acides nucléiques.

3.2. Détection du virus de la rougeole par RT-PCR en temps réel :

La présence de l'ARN viral dans les échantillons de gorge est détectée par RT-PCR en temps réel en utilisant des amorces spécifique encadrant une séquence de 75pb du gène qui code pour la nucléoprotéine N.

3.2.1. Principe :

La RT-PCR en temps réel est une technique permettant de réaliser une PCR quantitative (qPCR) à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est alors rétro transcrit par la reverse transcriptase en ADNc qui servira de matrice pour la réaction de qPCR. Cette qPCR combine l'amplification de la séquence cible par l'utilisation d'amorces spécifique avec la détection et la quantification d'un signal fluorescent grâce à l'usage de sondes marquées. Il existe différents systèmes de sondes, mais seule la technologie des sondes d'hydrolyse de type TaqMan, utilisée dans notre travail, sera détaillée ci-après. Cette technologie repose sur l'utilisation d'une sonde doublement marquée par un émetteur de fluorescence « reporter » en 5' et par un bloqueur de fluorescence « quencher » en 3' et sur l'exploitation de l'activité exonucléasique 5'-3' de l'ADN polymérase. Au cours de l'élongation, l'hydrolyse de cette sonde hybridée à sa cible par la Taq polymérase aura pour conséquence d'éloigner le reporter de l'environnement du quencher, rétablissant ainsi l'émission de la fluorescence du reporter (Figure 6). L'intensité de la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de produits amplifiés. Elle est mesurée à la fin de l'étape

d'élongation de chaque cycle de PCR, et aboutit à une courbe d'allure sigmoïdale (Figure 7). Chaque échantillon est alors caractérisé par un Ct (cycle threshold) ou cycle seuil qui correspond au nombre de cycles à partir duquel le signal de fluorescence devient significativement supérieur au bruit de fond.

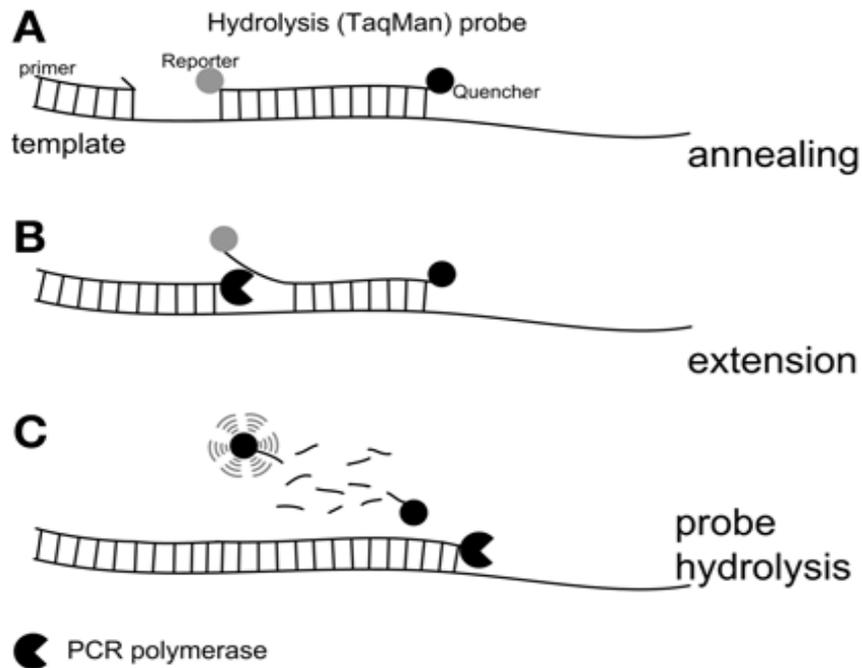


Figure 8 : Principe de la technologie Taqman. A) À la température d'appariement, les amorces et la sonde s'hybrident sur leurs séquences cibles respectives. B) Durant l'extension La polymérase se déplace et hydrolyse la sonde. C) Le fluorochrome émetteur est donc libéré de l'inhibition du suppresseur, ce qui permet l'émission de la fluorescence.

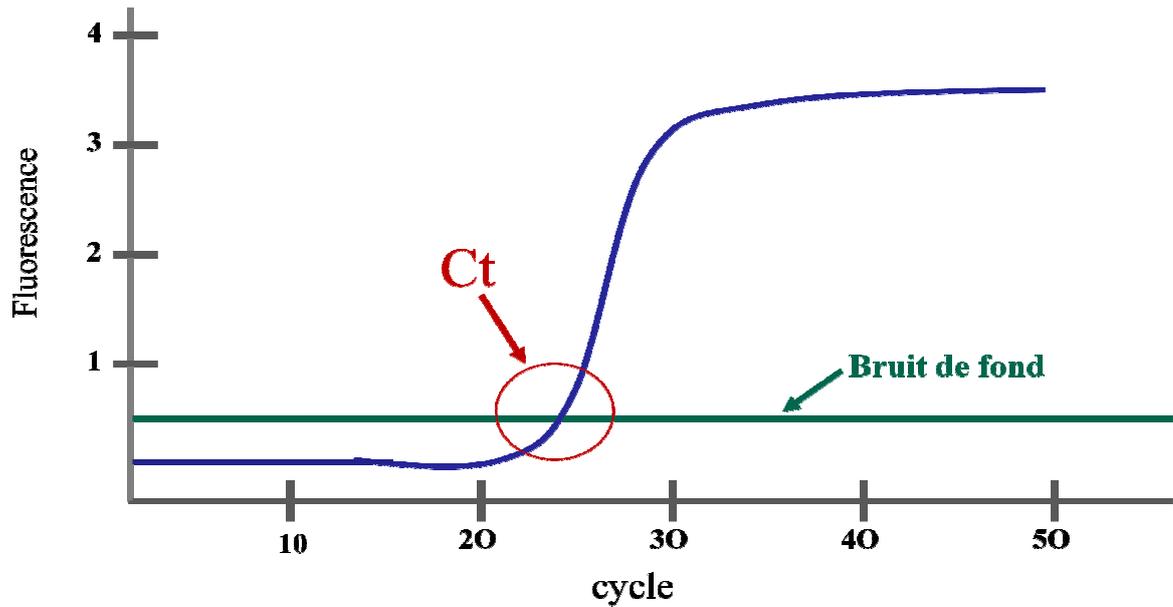


Figure 9 : Représentation d'une courbe d'amplification de PCR en temps réel.

3.2.2. Procédure :

La RT-PCR en temps réel a été réalisée en utilisant le kit SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen). Ce système combine la Reverse Transcriptase (RT) et la TaqDNA Polymerase dans un même tampon ce qui permet de réaliser la réaction RT et la réaction de PCR dans un seul tube en une seule étape. Les sondes et les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau 2. Ils ont été fournis par le CDC (MeV real-time RT-PCR kit). Les sondes (Technologie TaqMan) sont marquées à l'extrémité 3' avec un rapporteur fluorescent : 6-carboxyfluorescein (FAM) et à l'extrémité 5' avec le quencher non fluorescent : Black Hole Quencher-1 (BHQ).

Tableau 2 : Séquences des amorces et de la sonde TaqMan, utilisées pour la détection de l'ARN viral rougeoleux.

Amorces	Séquences
Amorce sens (MVN1139-F)	5' TGG CAT CTG AAC TCG GTA TCA C 3'
Amorce antisens (MVN1213-R)	5' TGT CCT CAG TAG TAT GCA TTG CAA 3'
Sonde	5' FAM CCG AGG ATG CAA GGC TTG TTT CAG A BHQ3'

Un autre ensemble amorce/sonde tableau qui détecte un gène domestique Human RNase P mRNA a été utilisé comme un contrôle interne (tableau 3).

Tableau 3 : Séquences des amorces et de la sonde TaqMan, utilisées pour la détection de l'ARN Human RNaseP.

Amorces	Séquences
Amorce sens (HURNASE-P-F)	5' AGA TTT GGA CCT GCG AGC G 3'
Amorce antisens (HURNASE-P R)	5' GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT 3'
Sonde	5' FAM TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG BHQ1 3

Deux mélanges réactionnels (mix) ont été préparés séparément pour les deux ensembles amorce /sonde (MeV et RNase P) en utilisant les réactifs répertoriés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Composition du mélange réactionnel.

Composants	Volume (µl) pour une réaction
Eau exempte de nucléase	7,2
2xSS Tampon	12,5
Mix Amorce/Sonde	2
Rox	0,05
Inhibiteur RNase	0,25
Mix SSIII RT/Taq	0,5
	20

Par la suite 20 µl de chaque mélange réactionnel ont été répartis dans les puits d'une barrette de micro-tubes pour PCR. Un volume de 5 µl d'échantillons ou de témoins négatifs ou positifs a été ajouté dans les puits correspondant. Les micro-tubes ont été insérée dans un thermocycleur Temps Réel (ABI 7500 RealTime Thermocycler) avec la

programmation des cycles suivants: une étape RT de 30 min à 48°C, suivie d'une activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 5 min à 95°C, puis un enchaînement de 40 cycles de dénaturation à 95°C (5 sec), et d'hybridation-élongation à 60°C pendant (1min).

Les résultats de détection de fluorescence sont analysés en temps réel avec le logiciel 7500 Software qui va déterminer le cycle seuil de détection de fluorescence (CT). Un CT<40 détermine la positivité de l'échantillon ou du contrôle pour la cible recherchée (tableau 5).

Tableau 5 : Interprétation des valeurs CT.

MeV	RNase P	Résultat échantillon
CT<40	CT<40	Positive
CT<40	Indéterminé	Positive
Indéterminé	<40	Négative
Indéterminé	Indéterminé	Indéterminé

3.3. Génotypage du virus rougeoleux :

Les prélèvements retrouvés positifs par la RT-PCR en temps réel, ont été soumis à une RT-PCR classique de génotypage à l'aide d'amorces spécifique pour l'amplification d'un fragment hypervariable (634 nucléotides environ) de la partie C terminal du gène N de la nucléoprotéine en vue de la détermination du génotype du virus rougeoleux par une réaction de séquençage.

3.3.1. RT-PCR classique de géotypage :

3.3.1.1. Principe :

La RT-PCR est une technique permettant de réaliser une PCR à partir d'un échantillon d'ARN. Elle repose sur une réaction de rétrotranscription de l'ARN en ADNc par le biais de la reverse transcriptase. Cette ADNc synthétisé sera amplifié durant la réaction de PCR (figure 8).

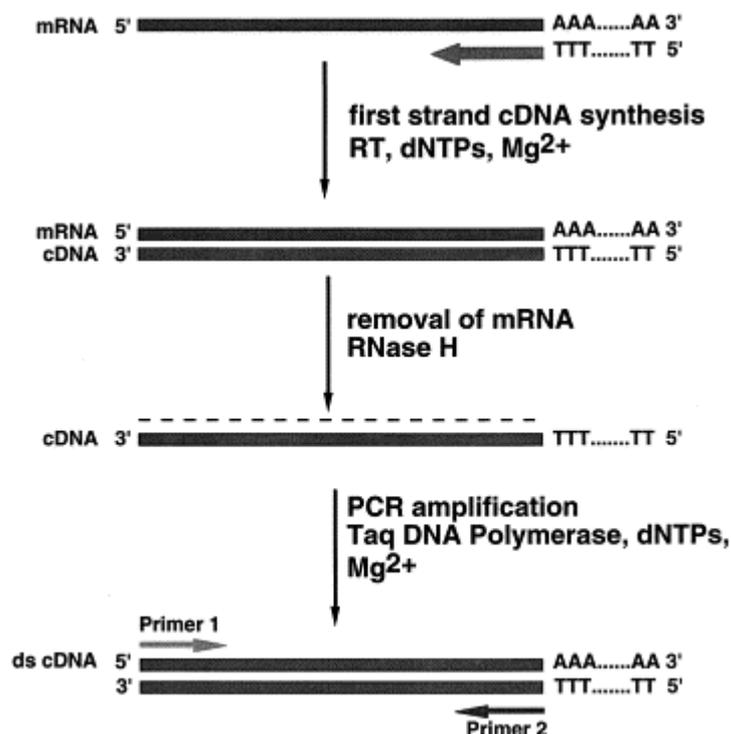


Figure 10 : Représentation schématique du principe de la RT-PCR.

3.3.1.2. Procédure :

La réaction RT-PCR a été réalisée en utilisant le kit Superscript III One-Step RT-PCR (Invitrogen). Elle combine la synthèse de l'ADNc et la PCR subséquente dans un seul tube grâce à l'utilisation d'un mix d'enzymes, (Superscript Reverse Transcriptases et la Hot StarTaq DNA Polymerase). Les amorces utilisées ont été fournis par le CDC (Measles Genotyping RT-PCR Kit) (tableau 6). Le mélange réactionnel a été préparé comme indiqué dans le tableau 7.

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour la réaction de génotypage.

Amorces	Séquences
Amorce sens (MeV216)	5' TGG AGC TAT GCC ATG GGA GT 3'
Amorce antisens (MeV214)	5' TAA CAA TGA TGG AGG GTA GG 3'

Tableau 7 : Composition du mélange réactionnel.

Composants	Volume (µl) pour une réaction
Eau exempte de nucléase	7.5
5x Tampon	25
Mix dNTP	2
Amorce F (MeV 216)	1.5
Amorce R (MeV 214)	1.5
Inhibiteur RNase 20 U/µl	0,5
Mix d'enzyme SS III (RT/Taq)	2
MgSO4 (5 mM)	2
	40

Ensuite 10µL d'ARN précédemment extrait ont été ajoutés au mix réactionnel préalablement répartis sur les microtubes de PCR. Un Contrôle positif et un contrôle négatif ont été inclus dans la réaction qui a été réaliser dans un thermocycleur AB GeneAmp PCR System 9700 avec la programmation des cycles suivants: une étape RT de 30 min à 50°C suivie d'une activation de la Taq polymérase à 95°C pendant 15 min puis un enchaînement de 40 cycles : de dénaturation à 95°C (30 sec), d'hybridation à 55°C (30 sec), et d'élongation à 72°C (30 sec) et enfin une élongation final à 72°C (10 min) puis la conservation à 4°C.

3.3.2. Révélation des produits de PCR

Les produits de PCR obtenus ont été ensuite révélés par une électrophorèse sur gel d'agarose afin de vérifier l'intégrité des bandes.

3.3.2.1. Principe :

L'électrophorèse est une méthode de séparation de particules chargées électriquement. Elle est basée sur le déplacement de ces molécules sous l'effet d'un champ électrique obtenu par un générateur de courant continu et dont les bornes sont reliées à la cathode et à l'anode. Les phénomènes de séparation se produisent dans un support poreux approprié comme par exemple le gel d'agarose (extraits d'algues) immergé dans un tampon d'une concentration convenable et dont les ions conduisent le courant. Cette méthode utilisée de façon standard pour séparer, identifier et purifier les fragments d'acides nucléiques. Ces derniers dans un milieu légèrement basique se comportent comme une chaîne polyaionique (chargé négativement). Ainsi soumis à un champ électrique ils migrent vers l'anode plus ou moins rapidement suivant leur masse moléculaire exprimée en nombre de paires de bases (pb).

3.3.2.2. Principe :

Des gels d'agarose à 2% ont été préparés en solubilisant 2 g d'agarose en poudre dans 100 ml de tampon Tris Borate EDTA (TBE 1X) à l'aide d'une micro-onde. Une fois complètement dissous, 1 µl d'un agent intercalant le Syber Green ont été ajoutés au mélange qui a été transféré dans un moule où des peignes ont été insérés. Après solidification, les peignes ont été retirés du gel polymérisé et ce dernier a été par la suite immergé dans une cuvette d'électrophorèse remplie de tampon TBE 1X. Avant le chargement des échantillons sur le gel, 2 µl de colorant de charge étaient mélangés avec 5 µl de produit de PCR. Chaque échantillon a été déposé dans un des puits du gel ainsi qu'un marqueur de taille (100 à 1000 pb), un contrôle positif et contrôle négatif. Le gel a été ensuite exposé pendant environ 1h min à un courant électrique de 5-10 V/cm. Après migration des échantillons, le gel a été placé sous un trans-illuminateur UV afin de visualiser les bandes.

3.3.3. Purification des produits de PCR :

Les produits de PCR ont été purifiés en utilisant le kit USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup (Affymetrix). Ce kit est conçu pour une purification rapide et efficace des produits de PCR il comporte le réactif ExoSAP qui contient deux enzymes hydrolytiques l'exonucléase I qui dégrade l'ADN simple brin et la Shrimp Alkaline Phosphatase : SAP qui hydrolyse les dNTPs. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Nous avons utilisé 2 µl de l'enzyme ExoSAP avec 5 µl du produit PCR.

3.4. Réaction de séquençage des produits d'amplification :

Le séquençage de l'ARN viral est effectué sur les produits purifiés de l'RT-PCR de génotypage en ciblant une région de 450 nucléotides de la partie C terminal du gène N requis pour la détermination du génotype du virus rougeoleux.

3.4.1. Principe :

Le séquençage permet de déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN préalablement amplifié par PCR. Le principe repose sur la méthode de Sanger adapté à la fluorescence (Figure 9). La réaction de l'élongation par la Taq polymérase est interrompue de manière aléatoire par l'incorporation de ddNTP (technologie Big Dye Terminator) interrupteurs de chaîne, à la place de dNTP, bloquant ainsi la synthèse. La technologie Big Dye Terminator utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur et qui est différent pour chaque type de ddNTP (Tableau 8). Chaque produit monobrin se termine alors par un ddNTP marqué par un fluorochrome différent et dont le spectre d'émission est spécifique. Une électrophorèse capillaire sur un gel très résolutif autorise la séparation de ces brins selon leur taille tandis que l'excitation du fluorochrome donneur par un rayon laser va libérer une fluorescence captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Ce signal lumineux est traité par un ordinateur qui donne les résultats

sous forme d'un chromatogramme par une succession de pics de couleurs différentes (figure 10). Chaque couleur correspondant à un nucléotide donné. Cela permet d'assigner une base et de déterminer la séquence nucléotidique et ainsi de positionner et à d'identification chaque base.

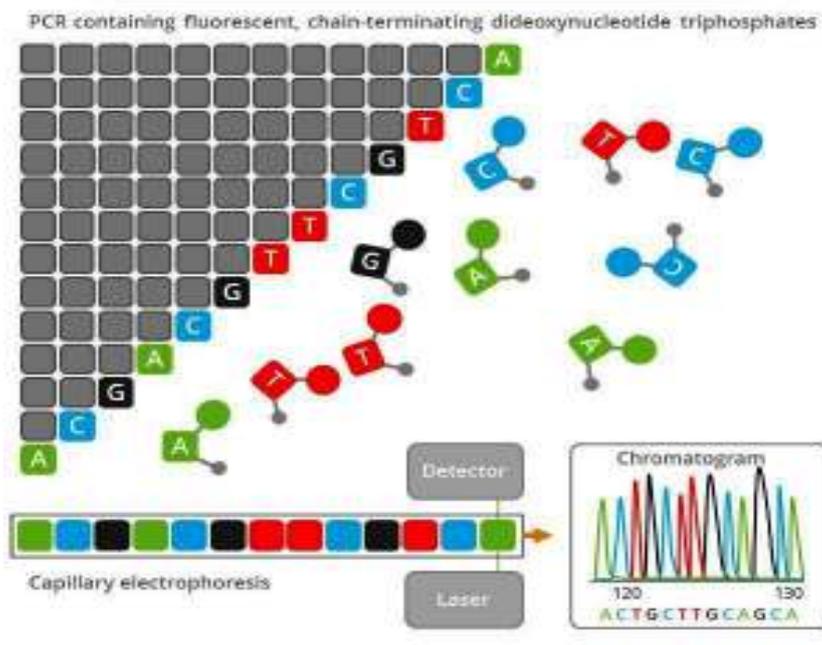


Figure 11 : Principe de la réaction de séquençage.

Tableau 8 : Fluorochromes accepteurs utilisé par la technologie Big Dye Terminator.

ddNTP	d-Rhodamine
A	Dichloro[R6G]
T	dichloro[ROX]
C	dichloro[R110]
G	dichloro[TAMRA]

L'amplification a été conduite dans un thermocycleur (AB GeneAmp PCR System 9700) avec un enchaînement de 25 cycles de dénaturation à 96°C (30 sec), d'hybridation à 50°C (15 sec), et d'élongation à 60°C (4 min).

Les amplicons marqués générés en fin de réaction ont été purifiés par une précipitation à l'éthanol/EDTA avant d'être soumis à une électrophorèse capillaire dans le séquenceur automatisé ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.4.3. Traitement de données et analyse phylogénétique

En fin d'analyse le séquenceur fournit des fichiers sous forme brute, qui sont traduits en nucléotides par un logiciel interne à l'automate. Le traitement de ces données a été par la suite réalisé avec le Logiciel Mega 7.0. (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Ce logiciel de bioinformatique a été utilisé dans un premier temps pour ses fonctions d'alignement de séquences. Cependant, avant d'être alignées, les séquences inverses sont inversées et complétées à l'aide de la fonction reverse complement sequences, afin d'obtenir la séquence codante dans le sens 5'-3' et pouvoir la superposer à la séquence Forward. Par la suite, des conflits apparaissent dans la zone de superposition des deux séquences, ils sont corrigés en vérifiant les chromatogrammes et en choisissant le nucléotide le plus adapté par rapport à son score de qualité. La séquence finale issue de la comparaison des deux séquences correspond à la zone située entre les amorces. Les séquences des extrémités correspondant aux amorces sont ainsi éliminées.

Une fois les séquences nettoyées, la détermination du génotype viral est alors réalisée par la génération d'un arbre phylogénétique à l'aide du logiciel Mega.7.0. Pour ce faire, les séquences obtenues ont été d'abord alignées avec les séquences de référence des différents génotypes de l'OMS, en utilisant un logiciel d'alignement multiple Clustal-W du logiciel MEGA 7.0. Les alignements ainsi vérifiés vont être la base de l'analyse phylogénétique, puisqu'ils mettent en exergue les divergences accumulées entre les sites des séquences au cours de leur histoire évolutive. Ainsi, à partir de ces alignements un arbre phylogénétique a été construit selon la méthode du maximum de parcimonie (principe en Annexe B) implémenté dans le logiciel MEGA 7.0. Cet arbre phylogénétique généré va permettre d'établir les relations de parenté existant entre les différents génotypes en fonction de l'homologie maximale des séquences N-450 par rapport aux génotypes de référence de l'OMS. Enfin, la robustesse de l'arbre phylogénétique obtenue est déterminée par la

méthode de ré-échantillonnage « bootstrap » appliquée 1000 fois (principe en Annexe C). La robustesse est d'autant plus élevée que le bootstrap est important.

3.4.4. Analyse des séquences avec BLASTN

Dans le but d'identifier les souches virales les plus proches de nos souches, les séquences sont soumises au logiciel BLASTN « **Basic Local Alignment Search Tool** » (nucléotide BLAST) d'accès libre sur Internet, dans la base de données National Center for Biotechnology Information (NCBI). Il s'agit d'un outil de recherche d'homologies entre une séquence nucléique dite requête et une banque de séquences (GenBank). BLASTN présente ses résultats en une liste de séquences ayant un alignement significatif, chacune associée à un score (score brut de l'alignement) et une E-value (nombre d'alignements différents que l'on peut espérer trouver dans les banques avec un score supérieur ou égal au score d'alignement obtenu). Plus la E-value est faible, plus le score de l'alignement est significatif.

3.4.5. Nomenclature des souches virales :

Les séquences obtenues ont été désignées suivant la nomenclature standardisée de l'OMS. Le début de la nomenclature comporte l'abréviation MVs désignant que la séquence a été établie à partir d'un ARN extrait d'un matériel clinique. Les autres données qui doivent figurer dans le nom de la séquence sont :

- Ville ou État/province dans lesquels le cas s'est produit.
- Pays qui est désigné par les lettres ISO-3.
- Date d'apparition de l'éruption cutanée par semaine (1-53) et année épidémiologique.
- Numéro d'isolement/de séquence si >1 pour la même semaine épidémiologique et le même endroit (si besoin est). Les séquences MVs provenant de différents cas doivent avoir des numéros d'isolement/de séquence différents lorsque la date et l'endroit sont identiques.
- Génotype entre crochets. Pour l'attribution à un génotype, il est nécessaire d'avoir le séquençage de la fenêtre minimum de 450 nucléotides de la nucléoprotéine.

CHAPITRE 3 :
RESULTATS
ET INTERPRETATION

4. RESULTATS DE LA DETECTION DE L'ARN VIRAL :

L'ARN viral a pu être détecté par qRT-PCR à partir des 26 échantillons de gorge. Les résultats de l'analyse ont été obtenus par lecture directe de la valeur des Ct relevés à partir des courbes d'amplification générées pour chaque échantillon. Toutes les courbes ont présenté un aspect caractéristique d'amplification exponentielle, ce qui est indispensable à la validation de la détection (Figure13) et (Figure14). Rappelons qu'un échantillon est considéré comme positif pour la détection de l'ARN viral, si une valeur $Ct < 40$ est obtenue pour le fluorochrome FAM ce qui a été vérifié pour nos 26 prélèvements analysés. Aussi, tous les échantillons analysés avec le couple d'amorce du contrôle interne (RNase P), ont présentés des valeurs $Ct < 40$ ce qui indique une bonne extraction de l'ARN total (tableau 10).

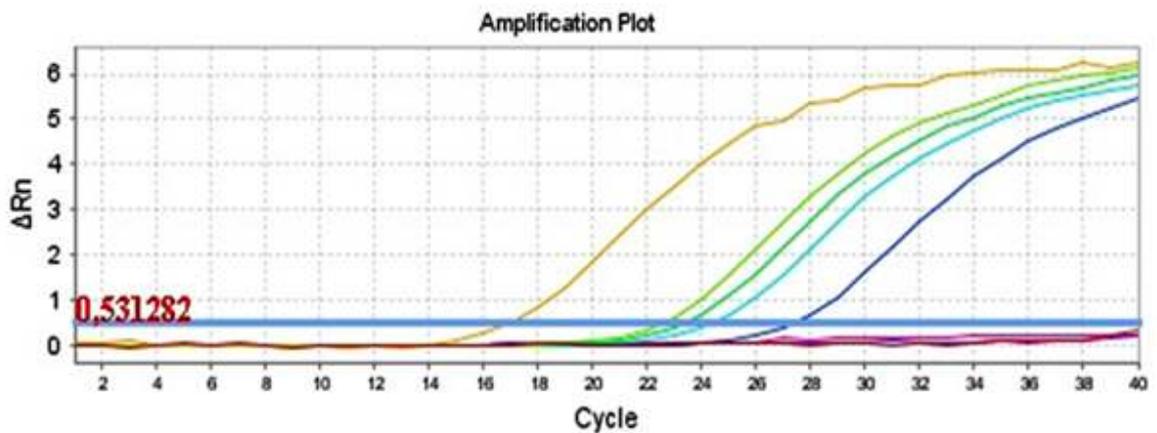


Figure 13: Résultats de PCR en temps réel en une seule étape pour la Détection de l'ARN viral. La ligne seuil : 0.531, correspond au seuil de détection optique au delà du quel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle. La projection du point d'intersection de la courbe d'amplification et de la ligne seuil de fluorescence sur l'axe des abscisses détermine le cycle seuil (Ct).

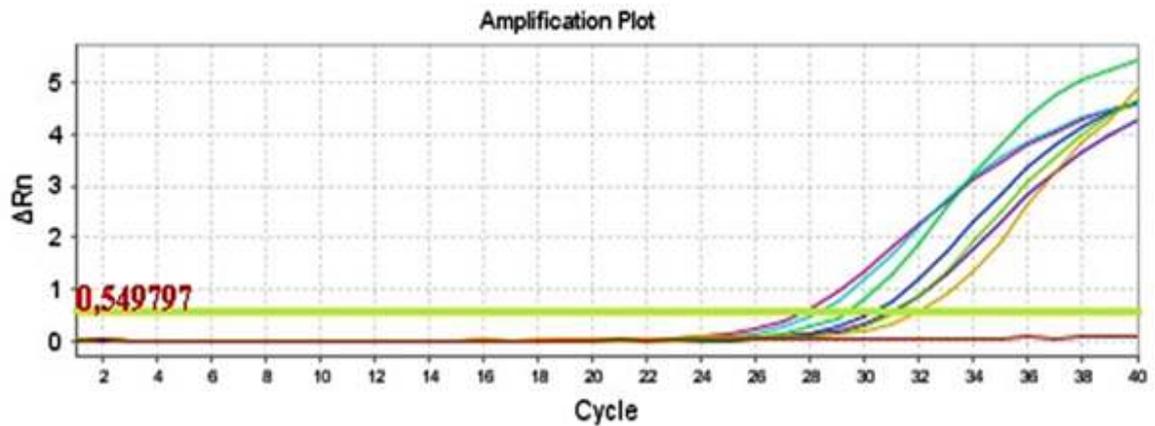


Figure 14 : Résultats de PCR en temps réel en une seule étape pour la détection de l'ARNase P. La ligne seuil : 0.549, correspond au seuil de détection optique au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle. La projection du point d'intersection de la courbe d'amplification et de la ligne seuil de fluorescence sur l'axe des abscisses détermine le cycle seuil (Ct).

Tableau 10 : Valeurs Ct obtenus pour la détection du MV et de l'ARNPase.

Code/Année Echantillons	Valeurs Ct pour la détection du MV	Valeurs Ct pour la détection de ARNPase
025/2011	31.5	32.6
032/2011	37.4	33.7
033/2011	31.9	30.5
036/2011	36.1	31.8
037/2011	29.3	30.8
038/2011	30.2	30.6
039/2011	32.2	33.1
059/2011	35.8	34.4
060/2011	35.2	34.1
061/2011	33.3	32.2
071/2011	32.7	29.7
099/2011	31.6	34.4
119/2011	29.6	29.9
294/2011	34.5	32.9

476/2011	30.9	31.2
101/2012	29.2	30.3
102/2012	32.4	30.5
016/2016	22.4	26.8
017/2016	22.8	28.3
019/2016	23.6	28.7
020/2016	24.4	31.2
026/2016	27.6	31.3
027/2016	22.9	32.0
029/2016	27.1	28.1
030/2016	27.6	28.9
031/2016	25.3	22.1

5. RESULTATS DE LA PCR DE GENOTYPAGE :

Les amplicons obtenues à partir du couple d'amorce MeV214/ MeV216, ont été révélés par une migration électrophorétique sur gel d'agarose à 2 %. Pour chaque échantillon nous avons pu obtenir une bande unique et de taille attendue (environ 634 pb) et qui correspond à la partie C-terminale du gène N (450 pb) de la nucléoprotéine du virus rougeoleux. Le contrôle positif utilisé et qui correspond au vaccin anti-rougeoleux a aussi été révélé avec succès par la présence d'une bande de même taille (Figure 13).

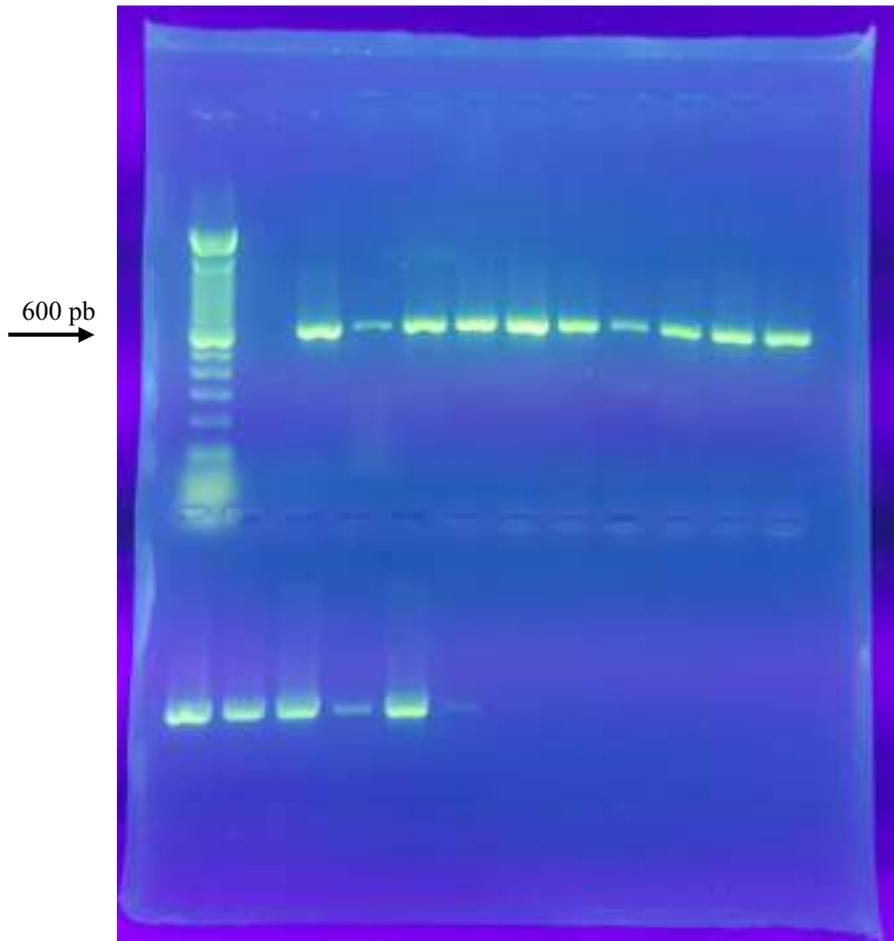


Figure 15 : Révélation sur gel d'agarose à 2% des produits d'amplifications de RT-PCR de génotypage en une seule étape. Puits n°1 : Marqueur de taille. Puits n°2 : Contrôle négatif. Puits n°3 et n°13 : Contrôle positif. Puits n°4-17 : Echantillons

6. RESULTATS DU SEQUENÇAGE :

6.1. Identification du génotype :

A l'issue du séquençage, 26 séquences nucléotidiques d'une longueur de 450 pb ont été obtenues et qui correspondent tous à la partie C-terminal du gène N de la nucléoprotéine du virus rougeoleux, (figure 16).

>025/2011

GTCAGTTCACATTGGCATCTGAACTCGGTATCACTGCCGAGGATGCAAGGCTTGTTTC
 AGAGATTGCAATGCACACTACTGAGGACAGGATCAGTAGAGCAGTTGGACCCAGACAAGCCCA
 AGTGTCAATTTCTACACGGTGATCAAAGTGAGAATGAGCTGCCGAGATTGGGGAGCAAGGAGGA
 CAGGAGGGTCAAACAGAGCCGAGGAGAAGCCGGGGGAGAGCCACAGAGAAACCGGGCCAGCA
 GAGCAAGTGATGCGAGAGCCGCCATCCTCCAACCGGCACACCCCTAGACATTGACACTGCATC
 GGAGTTCAGCCAAGATCCGCAAGACAGTCGAAGGTCAGCCGATGCTCTGATTAGGCTGCAAGC
 CATGGCAGGAATCTCGGAAGAACAAGACTCGGACACGGACACCCCTAGAGTGTACAATGATAG
 AGACCTTCTAGAC

>0476/2012

GTCAGTTCACATTGGCATCTGAACTCGGTATCACTGCCGAGGATGCAAGGCTTGTTTC
 AGAGATTGCAATGCACACTACTGAGGACAGGATCAGTAGAGCAGTTGGACCCAGACAAGCCCA
 AGTGTCAATTTCTACACGGTGATCAAAGTGAGAATGAGCTGCCGAGATTGGGGAGCAAGGAGGA
 CAGGAGGGTCAAACAGAGCCGAGGAGAAGCCGGGGGAGAGCCACAGAGAAACCGGGCCAGCA
 GAGCAAGTGATGCGAGAGCCGCCATCCTCCAACCGGCACACCCCTAGACATTGACACTGCATC
 GGAGTTCAGCCAAGATCCGCAAGACAGTCGAAGGTCAGCCGATGCTCTGATTAGGCTGCAAGC
 CATGGCAGGAATCTCGGAAGAACAAGACTCGGACACGGACACCCCTAGAGTGTACAATGATAG
 AGACCTTCTAGAC

>0102/2016

GTCAGTTCACATTGGCATCTGAACTCGGTATAACTGCCGAGGATGCAAGGCTTGTTTC
 AGAGATTGCAATGCATACTACTGAGGACAGGATCAGCAGAGCAGTTGGACCCAGACAAGCCCA
 AGTATCATTCTACACGGTGATCAAAGTGAGAATGAGCTGCCGAGATTGGGGGGTAAGGAGGA
 CAGGAGGGTCAAACAGAACCGAGGAGAAGCCGGGGGAGAGCCACAGAGAAACCGAGCCAGCA
 GAGCAAGTGATGCGAGAGCTGCTCATCCTCCAACCGGCACACCCCTAGACATTGACACTGCATC
 GGAGTTCAGCCAAGATCCGCAGGACAGTCGAAGGTCAGCCGATGCCCTGCTTAGGCTGCAAGC
 CATGGCAGGAATCTCGGGAGAGCAGGACTCAGACACGGACACCCCTAGAGTGTACAATGATAG
 AGACCTTCTAGAC

Figure 16: séquences nucléotidiques (450 pb) de la partie C terminal du gène N de la nucléoprotéine N, identifiée en 2011, 2012 et en 2016.

L'alignement de ces séquences avec les génotypes de références de l'OMS, à l'aide du logiciel MEGA 7.0, a permis de construire un arbre phylogénique retraçant la parenté entre les différentes souches et identifiant ainsi les génotypes correspondants. La majorité des souches virales ont été identifiées comme étant du génotype B3 et s'apparentent tous avec la souche de référence de l'OMS Ibadan.NIE/97/1 (Figure 15). Cette souche de référence a été isolée pour la première fois au Nigeria (Hanses et al. 1999). Les souches virales de génotype B3 de 2011, 2012, et de 2016 se regroupent en 2 groupes (clusters) distincts. Le groupe 1, contient 15 séquences virales identifiées entre 2011 et 2012. Ces séquences sont extrêmement stables et ne présentent aucune différence nucléotidique entre elles. Tandis que, le groupe 2 qui comprend 10 séquences virales identifiées en 2016, présentant une variabilité de 0.44% et qui correspond à des transitions A-G et T-C. La divergence en nucléotides du groupe 1 avec la souche de référence Ibadan.NIE/97/1 est estimée à 1.8 %. En effet, par une analyse des séquences nous pouvons distinguer clairement 8 sites variables (Figure 16).

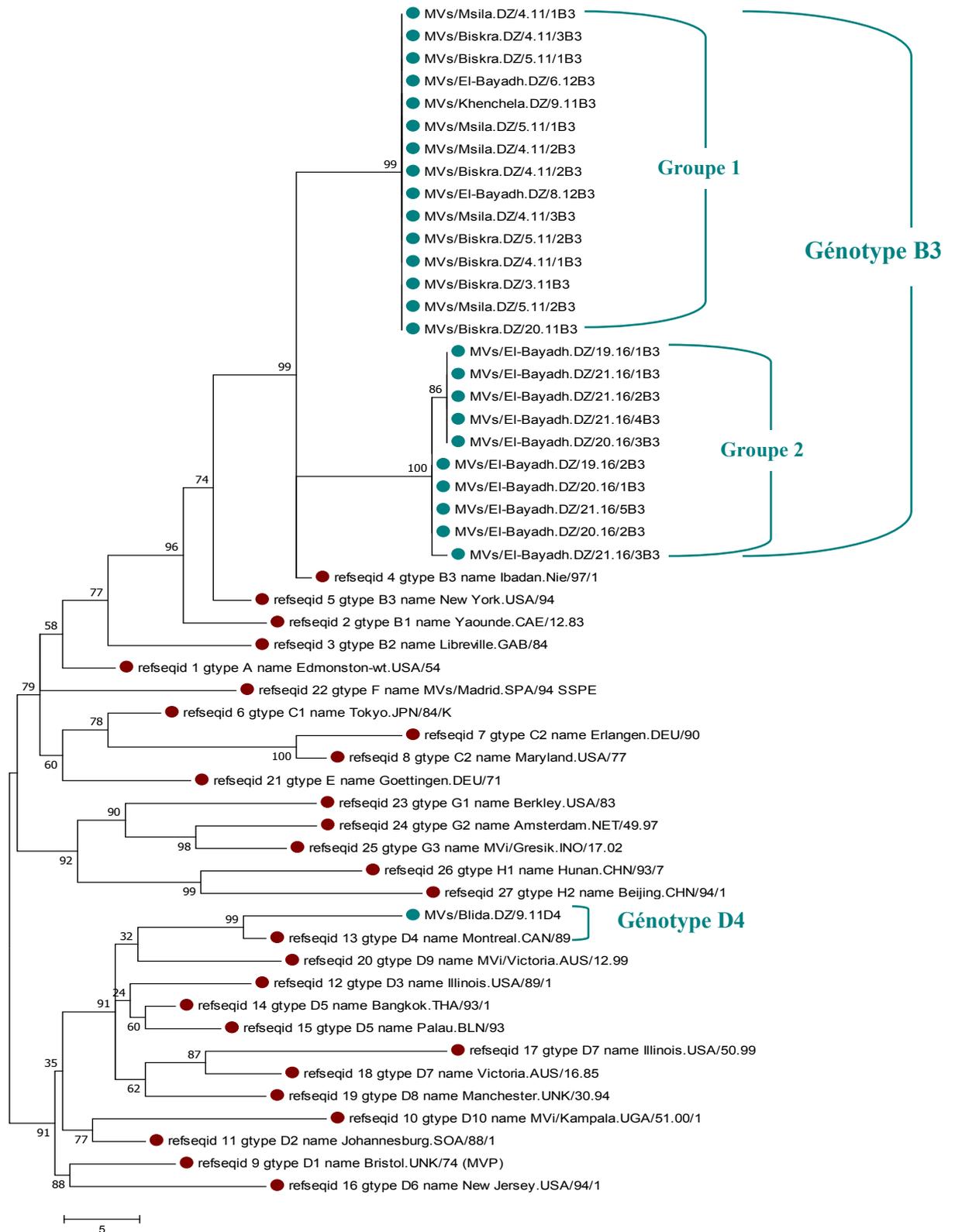


Figure 17 : Arbre phylogénétique générés au moyen du logiciel Méga 7.0, par la méthode du maximum de parcimonie retraçant la parenté des souches virales obtenues avec les souches de références de l'OMS. Les séquences d'intérêts sont marquées avec des un cercles verts. Les séquences de références avec un cercle rouge. Les valeurs de « bootstrap » sont précisées en amont des nœuds.

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15						
1. MVs/El-Bayadh.DZ/0.12B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
2. MVs/El-Bayadh.DZ/6.12B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
3. MVs/Msila.DZ/4.11/1B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
4. MVs/Biskra.DZ/3.11B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
5. MVs/Biskra.DZ/4.11/1B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
6. MVs/Biskra.DZ/4.11/2B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
7. MVs/Biskra.DZ/4.11/3B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
8. MVs/Biskra.DZ/5.11/1B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
9. MVs/Biskra.DZ/5.11/2B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
10. MVs/Msila.DZ/4.11/2B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
11. MVs/Msila.DZ/5.11/1B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
12. MVs/Msila.DZ/5.11/2B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
13. MVs/Msila.DZ/4.11/3B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
14. MVs/Khenchela.DZ/9.11B3	G	C	T	C	T	G	A	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C
15. refseqid 4 gtype B3 name Ibadan.NIE/97/1	G	C	C	C	T	G	C	T	T	A	G	G	C	T	G	C	A	A	G	C	C

Figure 18 : Exemple de divergence en nucléotides des séquences virales (génotype B3) identifiées entre 2011 et 2012 avec la souche de référence Ibadan.NIE/97/1.

Pour le groupe 2, la divergence est plus importante, estimée à 2.44% pour 11 sites variables (Figure 16). Les variabilités nucléotidiques observées reflètent l'évolution de l'espèce au fil du temps et correspondent à des substitutions de type transitions (C-T), (T-C), (A-G) (G-A), et de type transvasions (A-C). Cette variabilité comprise entre 1.8% et 2.44% se situe dans les limites de la variabilité observées pour les mêmes génotypes de rougeole (moins de 2,5% dans le gène N) et confirme leur classification dans le génotype B3.

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1. MVs/El-Bayadh.DZ/19.16/1B3	A	T	C	T	C	G	G	G	A	G	A	G	C	A	G	G	A	C	T	C	A	
2. MVs/El-Bayadh.DZ/19.16/2B3	A	T	C	T	C	G	G	G	A	G	A	G	C	A	G	G	A	C	T	C	A	
3. MVs/El-Bayadh.DZ/20.16/1B3	A	T	C	T	C	G	G	G	A	G	A	G	C	A	G	G	A	C	T	C	A	
4. MVs/El-Bayadh.DZ/20.16/2B3	A	T	C	T	C	G	G	G	A	G	A	G	C	A	G	G	A	C	T	C	A	
5. MVs/El-Bayadh.DZ/21.16/1B3	A	T	C	T	C	G	G	G	A	G	A	G	C	A	G	G	A	C	T	C	A	
6. MVs/El-Bayadh.DZ/21.16/2B3	A	T	C	T	C	G	G	G	A	G	A	G	C	A	G	G	A	C	T	C	A	
7. MVs/El-Bayadh.DZ/21.16/3B3	A	T	C	T	C	G	G	G	A	G	A	G	C	A	G	G	A	C	T	C	A	
8. MVs/El-Bayadh.DZ/21.16/4B3	A	T	C	T	C	G	G	G	A	G	A	G	C	A	G	G	A	C	T	C	A	
9. MVs/El-Bayadh.DZ/21.16/5B3	A	T	C	T	C	G	G	G	A	G	A	G	C	A	G	G	A	C	T	C	A	
10. MVs/El-Bayadh.DZ/20.16/3B3	A	T	C	T	C	G	G	G	A	G	A	G	C	A	G	G	A	C	T	C	A	
11. refseqid 4 gtype B3 name Ibadan.NIE/97/1	A	T	C	T	C	G	G	A	A	G	A	A	C	A	A	G	A	C	T	C	A	

Figure 19 : Exemple de divergence en nucléotides des séquences virales (génotype B3) identifiées en 2016 avec la souche de référence Ibadan.NIE/97/1.

Une seule souche a été identifiée comme étant du génotype D4 durant l'année de 2011. Cette souche virale s'apparente avec la souche de référence Montreal.CAN/89 (figure 14). Cette souche a été isolée pour la première fois au Canada (Hanses et al. 1999). La divergence nucléotidique entre la souche virale D4 et la souche de référence Montreal.CAN/89 est estimée à 2.66 % (figure 17). Cette variabilité dépasse légèrement la divergence maximale en nucléotides de 2,5%, que l'on retrouve couramment parmi les séquences du même génotype. Dans ce cas, il est recommandé de séquencer le gène H entier avec un minimum de 2% de divergence nucléotidique avec la souche de référence pour plus de précision dans la détermination du génotype.

Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20				
1. MVs/Blida.DZ/9.11D4	A	T	C	A	G	C	A	C	T	C	C	C	C	T	A	G	A	C	G	T	T	G	A	C
2. refseqid 13 gtype D4 name Montreal.CAN/89	A	C	C	A	G	C	A	C	A	C	C	C	C	T	A	G	A	C	A	T	T	G	A	C

Figure 20 : Exemple de divergence en nucléotides de la séquence virale (génotype D4) identifiée en 2011 avec la souche de référence Montreal.CAN/89.

6.2. Analyse des génotypes avec BLASTN :

La comparaison des séquences des souches virales génotypées avec les séquences nucléotidiques répertoriées dans la base de données NCBI, par l'interface BLASTN, a permis d'identifier les souches les plus proches avec une complète ou une très proche similitude moléculaire, allant de 99% à 100%. Ainsi, les souches virale de génotype B3 identifiées au cours de l'année de 2011 et de 2012, étaient identiques (identité à 100% ; E-value : 0), à la souche MVs/Sfax.TUN.11.09/2[B3] (numéro d'enregistrement GenBank : FN564355.1) (Figure18). Cette souche a été identifiée en 2009 en Tunisie comme étant de génotype B3.1 (Sondes Haddad-Boubakera 2009) En effet, les différents isolats du génotype B3 couramment rencontrés en Afrique, sont subdivisés en trois sous-groupes, B3.1, B3.2 et B3.3, distingués l'un de l'autre au niveau génétique et par analyse

comparative des séquences (Hanses et al. 1999). La similitude des souches algérienne de 2011 et de 2012 avec la souche Tunisien indique donc une circulation du virus entre les deux pays voisins. D'autre part, les souches de génotype B3 identifiées au cours de l'année de 2016, présentaient une homologie (identité à 99% ; E-value :0), avec la souche MVs/Niger.NGA/2.13/[B3] (numéro d'enregistrement GenBank : KX943221.1) isolée au Niger (Figure 19). Cette souche de génotype B3.1 est largement réparti dans les régions Africaines sub-sahariennes (Hanses et al. 1999) (Rota et Bellini 2003). Une transmission et une circulation du virus entre les pays d'Afrique n'est donc pas à exclure. Ces résultats peuvent être interpréter comme l'absence d'une souche autochtone et mettent en évidence une hétérogénéité du variant de génotype B3.1 circulant qui est à l'origine des cas de rougeole en Algérie.

Measles virus partial N gene for nucleocapsid protein, genomic RNA, strain MVs/Sfax.TUN.11.09/2(B3)
 Sequence ID: [FN564355.1](#) Length: 456 Number of Matches: 1
[▶ See 6 more title\(s\)](#)

Range 1: 4 to 453 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
812 bits(900)	0.0	450/450(100%)	0/450(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTCAGTTCACATTTGGCATCTGAACTCGGTATCACTGCCGAGGATGCAAGGCTTGTTC	60		
Sbjct 4	GTCAGTTCACATTTGGCATCTGAACTCGGTATCACTGCCGAGGATGCAAGGCTTGTTC	63		
Query 61	GAGATTGCAATGCACACTACTGAGGACAGGATCAGTAGAGCAGTTGGACCCAGACAAGCC	120		
Sbjct 64	GAGATTGCAATGCACACTACTGAGGACAGGATCAGTAGAGCAGTTGGACCCAGACAAGCC	123		
Query 121	CAAGTGTCAATTTCTACACGGTGATCAAAGTGAGAATGAGCTGCCGAGATTGGGGAGCAAG	180		
Sbjct 124	CAAGTGTCAATTTCTACACGGTGATCAAAGTGAGAATGAGCTGCCGAGATTGGGGAGCAAG	183		
Query 181	GAGGACAGGAGGGTCAAACAGAGCCGAGGAGAAGCCGGGAGAGCCACAGAGAAAACCGGG	240		
Sbjct 184	GAGGACAGGAGGGTCAAACAGAGCCGAGGAGAAGCCGGGAGAGCCACAGAGAAAACCGGG	243		
Query 241	CCCAGCAGAGCAAGTGATGCGAGAGCCGCCATCCTCCAACCGGCACACCCCTAGACATT	300		
Sbjct 244	CCCAGCAGAGCAAGTGATGCGAGAGCCGCCATCCTCCAACCGGCACACCCCTAGACATT	303		
Query 301	GACACTGCATCGGAGTTCAGCCAAGATCCGCAAGACAGTCGAAGGTCAGCCGATGCTCTG	360		
Sbjct 304	GACACTGCATCGGAGTTCAGCCAAGATCCGCAAGACAGTCGAAGGTCAGCCGATGCTCTG	363		
Query 361	ATTAGGCTGCAAGCCATGGCAGGAATCTCGGAAGAACAAGACTCGGACACGGACACCCCT	420		
Sbjct 364	ATTAGGCTGCAAGCCATGGCAGGAATCTCGGAAGAACAAGACTCGGACACGGACACCCCT	423		
Query 421	AGAGTGTACAATGATAGAGACCTTCTAGAC	450		
Sbjct 424	AGAGTGTACAATGATAGAGACCTTCTAGAC	453		

Figure 21 : Résultat d'analyse avec le logiciel BLASTN. Alignement de la séquence C-terminal (450pb) du gène de la nucléoprotéine d'une souche du virus rougeoleux détecté au

cours de l'année de 2011 avec la souche MVs/Sfax.TUN.11.09/2[B3] (numéro d'enregistrement GenBank : FN564355.1).

Measles virus genotype B3 strain MVs/Niger.NGA/2.13/[B3] nucleoprotein (N) gene, partial cds
Sequence ID: [KX943221.1](#) Length: 450 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 450		GenBank	Graphics			▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand			
789 bits(874)	0.0	445/450(99%)	0/450(0%)	Plus/Plus			
Query	1	GTCAGTCCACATTGGCATCTGAACTCGGTATAA	CGCGAGGATGCAAGGCTTGT	TTCA	60		
Sbjct	1	GTCAGTCCACATTGGCATCTGAACTCGGTATAA	CGCGAGGATGCAAGGCTTGT	TTCA	60		
Query	61	GAGATTGCAATGCATACTACTGAGGACAGGATCAGCAGAGCAGTTGGACCCAGACAAGCC		120			
Sbjct	61	GAGATTGCAATGCATACTACTGAGGACAGGATCAGCAGAGCAGTTGGACCCAGACAAGCC		120			
Query	121	CAAGTATCATTTCTACACGGTGATCAAAGTGAGAATGAGCTGCCGAGATTGGGGGGTAAG		180			
Sbjct	121	CAAGTATCATTTCTACACGGTGATCAAAGTGAGAATGAGCTGCCGAGATTGGGGGGTAAG		180			
Query	181	GAGGACAGGAGGGTCAAACAGAACCGAGGAGAAGCCGGGGAGAGCCACAGAGAAACCGAG		240			
Sbjct	181	GAGGACAGGAGGGTCAAACAGAACCGAGGAGAAGCCGGGGAGAGCCACAGAGAAACCGAG		240			
Query	241	CCCAGCAGAGCAAGTGATGCGAGAGCTGCTCATCCTCCAACCGGCACACCCCTAGACATT		300			
Sbjct	241	CCCAGCAGAGCAAGTGATGCGAGAGCTGCTCATCCTCCAACCGGCACACCCCTAGACATT		300			
Query	301	GACACTGCATCGGAGTTCAGCCAAGATCCGCAGGACAGTCGAAGGTCAGCCGATGCCCTG		360			
Sbjct	301	GACACTGCATCGGAGTTCAGCCAAGATCCGCAGGACAGTCGAAGGTCAGCCGATGCCCTG		360			
Query	361	CTTAGGCTGCAAGCCATGGCAGGAATCTCGGGAGAGCAGGACTCAGACACGGACACCCCT		420			
Sbjct	361	CTTAGGCTGCAAGCCATGGCAGGAATCTCGGAAGAACAAGACTCAGACACGGACACCCCT		420			
Query	421	AGAGTGTACAATGATAGAGACCTTCTAGAC		450			
Sbjct	421	AGAGTGTACAATGATAGAGACCTTCTAGAC		450			

Figure 22 : Résultat d'analyse avec le logiciel BLASTN. Alignement de la séquence C-terminal (450pb) du gène de la nucléoprotéine d'une souche du virus rougeoleux détecté au cours de l'année de 2016 avec la souche MVs/Niger.NGA/2.13/[B3] (numéro d'enregistrement GenBank : KX943221.1).

L'analyse de la séquence du génotype D4 qui a été identifiée pour une seule souche durant l'épidémie de 2011, avec le logiciel BLASTN, a révélé une très forte homologie (identité à 100% ; E-value : 0), avec la souche MVi/Paris.FRA/18.11[D4] isolée en France (numéro d'enregistrement GenBank: MF449469.1) (Figure 20). Ce génotype est largement

répandu dans plusieurs pays européens, dont l'Allemagne, la Croatie, la France, l'Italie, la Roumanie et la Russie (OMS 2008). En outre, ce cas de rougeole s'est déclaré suite à un séjour en France, qui a connu de 2008 à 2011 une grande épidémie de rougeole où le génotype D4 était majoritaire [77]. Ceci confirme qu'il s'agit bien d'un cas de rougeole importé.

Measles virus genotype D4 strain MVi/Paris.FRA/18.11[D4], complete genome
Sequence ID: [MF449469.1](#) Length: 15894 Number of Matches: 1

Range 1: 1233 to 1682 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
B12 bits(900)	0.0	450/450(100%)	0/450(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTCAGTTCACATTGGCATCTGAACTCGGTATCACTGCCGAGGATGCAAGGCTTGTTC	60		
Sbjct 1233	GTCAGTTCACATTGGCATCTGAACTCGGTATCACTGCCGAGGATGCAAGGCTTGTTC	1292		
Query 61	GAGATTGCAATGCATACTACTGAGGACAGGATCAGTAGAGCGGTTGGACCCAGACAAGCC	120		
Sbjct 1293	GAGATTGCAATGCATACTACTGAGGACAGGATCAGTAGAGCGGTTGGACCCAGACAAGCC	1352		
Query 121	CAAGTGTCAATTTATACACGGTGATCAAAGTGAAAATGAGCTACCAGGATTGGGGGGCAAG	180		
Sbjct 1353	CAAGTGTCAATTTATACACGGTGATCAAAGTGAAAATGAGCTACCAGGATTGGGGGGCAAG	1412		
Query 181	GAAGATAGGAGGGTCAAACAGGGTCGGGGGGAAAGCCAGGGAGAGCTACAGAGAAACCGGA	240		
Sbjct 1413	GAAGATAGGAGGGTCAAACAGGGTCGGGGGGAAAGCCAGGGAGAGCTACAGAGAAACCGGA	1472		
Query 241	TCCAGTAGAGCAAGTGATGTGAGAGCTGCCCATCTTCCAATCAGCACTCCCCCTAGACGTT	300		
Sbjct 1473	TCCAGTAGAGCAAGTGATGTGAGAGCTGCCCATCTTCCAATCAGCACTCCCCCTAGACGTT	1532		
Query 301	GACACTGCATCAGAGTCAGGCCAAGATCCGCAGGACAGTCGAAGGTCAGCTGACGCCCTG	360		
Sbjct 1533	GACACTGCATCAGAGTCAGGCCAAGATCCGCAGGACAGTCGAAGGTCAGCTGACGCCCTG	1592		
Query 361	CTCAGGTTGCAGGCCATGGCAGGAATCTTGGAAAGAACAGGCTCAGATACAGACATCTCT	420		
Sbjct 1593	CTCAGGTTGCAGGCCATGGCAGGAATCTTGGAAAGAACAGGCTCAGATACAGACATCTCT	1652		
Query 421	CGGGTGTACAATGACAAAGATCTTCTAGAC	450		
Sbjct 1653	CGGGTGTACAATGACAAAGATCTTCTAGAC	1682		

Figure 23 : Résultat d'analyse avec le logiciel BLASTN. Alignement de la séquence C-terminal (450pb) du gène de la nucléoprotéine d'une souche virale D4 détecté au cours de l'année de 2011 avec la souche MVi/Paris.FRA/18.11[D4] (numéro d'enregistrement GenBank : MF449469.1).

Afin de retracer et d'illustrer la relation de parenté des souches identifiées en 2011, 2012 et 2016, avec les souches de GenBank de génotypes B3.1, B3.2, B3 et D4, un arbre phylogénétique a été générés au moyen du logiciel Mega 7.0 (figure 21).

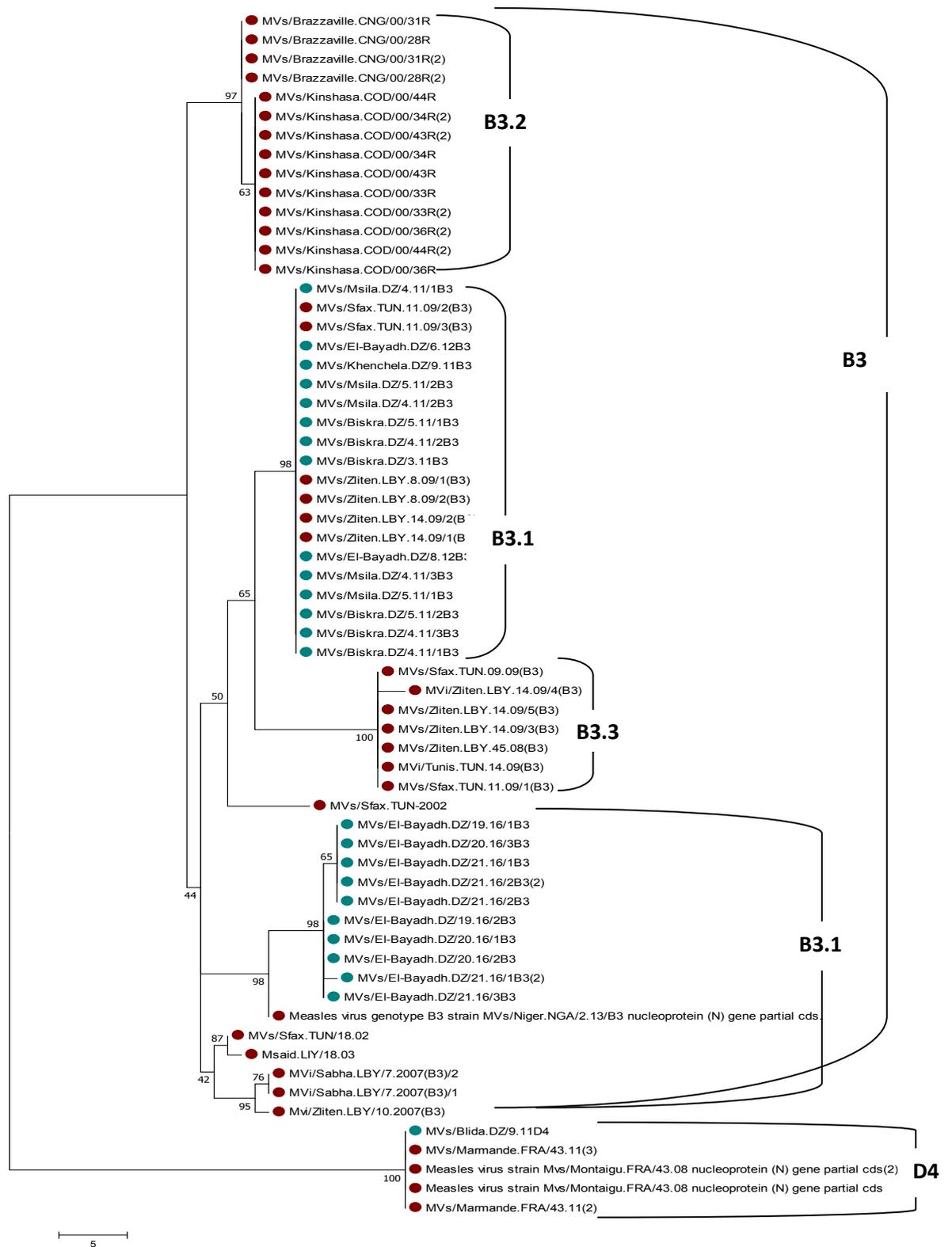


Figure 24 : Arbre phylogénétiques générés au moyen du logiciel Mega 7.0, par la méthode du maximum de parcimonie, retraçant la relation entre les souches obtenues et les souches plus

proches de GenBank. Les séquences d'intérêts sont marquées avec des un cercles verts. Les séquences de références avec un cercle rouge. Les valeurs de bootstrap sont précisées en amont des nœuds.

Le tableau ci-après présente les résultats globaux de l'étude (tableau 11).

Tableau 11 : Résultats globale de l'étude.

Année	Wilaya	qRT-PCR de detection	RT-PCR de Génotypage	Génotypage par séquençage	Nomenclature
025	M'sila	P	P	B3	MVs/M'sila.DZ/4.11/1[B3]
032	Biskra	P	P	B3	MVs/Biskra.DZ/3.11[B3]
033	Biskra	P	P	B3	MVs/Biskra.DZ/4.11/1[B3]
036	Biskra	P	P	B3	MVs/Biskra.DZ/4.11/2[B3]
037	Biskra	P	P	B3	MVs/Biskra.DZ/4.11/3[B3]
038	Biskra	P	P	B3	MVs/Biskra.DZ/5.11/1[B3]
039	Biskra	P	P	B3	MVs/Biskra.DZ/5.11/2[B3]
059	M'sila	P	P	B3	MVs/M'sila.DZ/4.11/2[B3]
060	M'sila	P	P	B3	MVs/M'sila.DZ/5.11/1[B3]
061	M'sila	P	P	B3	MVs/M'sila.DZ/5.11/2[B3]
071	M'sila	P	P	B3	MVs/M'sila.DZ/4.11/3[B3]
099	Blida	P	P	D4	MVs/Blida.DZ/9.11[D4]
0119	Biskra	P	P	B3	MVs/Biskra.DZ/9.11[B3]
0294	Biskra	P	P	B3	MVs/Biskra.DZ/20.11[B3]
0476	El-bayadh	P	P	B3	MVs/El-Bayadh.DZ/8.12[B3]
0101	El-bayadh	P	P	B3	MVs/El-Bayadh.DZ/6.12[B3]
0102	El-bayadh	P	P	B3	MVs/El-Bayadh.DZ/19.16/1[B3]
016	El-bayadh	P	P	B3	MVs/El-Bayadh.DZ/19.16/1[B3]
017	El-bayadh	P	P	B3	MVs/El-Bayadh.DZ/19.16/2[B3]
019	El-bayadh	P	P	B3	MVs/El-Bayadh.DZ/20.16/1[B3]
020	El-bayadh	P	P	B3	MVs/El-Bayadh.DZ/20.16/2[B3]
026	El-bayadh	P	P	B3	MVs/El-Bayadh.DZ/21.16/1[B3]
027	El-bayadh	P	P	B3	MVs/El-Bayadh.DZ/21.16/2[B3]
029	El-bayadh	P	P	B3	MVs/El-Bayadh.DZ/21.16/3[B3]
030	El-bayadh	P	P	B3	MVs/El-Bayadh.DZ/21.16/4[B3]
031	El-bayadh	P	P	B3	MVs/El-Bayadh.DZ/20.16/3[B3]

CONCLUSION

La rougeole reste présente en Algérie malgré les efforts déployés en matière de lutte contre cette pathologie. En effet, une couverture vaccinale stable et appréciée au niveau national est enregistrée ces dernières années. Cependant, des disparités existent au niveau de certaines Wilayas et qui sont à l'origine de la résurgence de cette maladie. L'épidémiologie moléculaire apporte une contribution très importante à l'objectif d'élimination de la rougeole grâce à la détermination du génotype circulant, qui permet un traçage épidémiologique de la circulation des souches virales et la détection de cas importés. En effet, cette étude a permis grâce à l'épidémiologie moléculaire d'identifier le génotype B3.1 comme étant le génotype majoritaire responsable des cas de rougeoles déclarées en Algérie durant les années de 2011, 2012 et 2016. L'hétérogénéité de ce génotype entre les années (2011-2012) et (2016) suggère l'absence d'une souche autochtone, et met en évidence la circulation active des souches virales entre les pays voisins.

La détection d'un cas importé de génotype D4 en 2011, démontre l'utilité du génotypage dans le cadre de la surveillance et de l'élimination de la maladie.

Tant en Algérie qu'à l'étranger, le maintien d'une couverture vaccinale élevée et uniforme au niveau national par le vaccin anti-rougeoleux, demeure l'élément essentiel d'une stratégie en vue d'atteindre et de maintenir l'objectif d'élimination.

REFERENCES

- Barrett, T., et B. Underwood. 1985. « Comparison of Messenger RNAs Induced in Cells Infected with Each Member of the Morbillivirus Group ». *Virology* 145 (1): 195-99.
- Bech, V. 1959. « Studies on the Development of Complement Fixing Antibodies in Measles Patients. Observations during a Measles Epidemic in Greenland ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 83 (septembre): 267-75.
- Bellini, W. J., G. Englund, S. Rozenblatt, H. Arnheiter, et C. D. Richardson. 1985. « Measles Virus P Gene Codes for Two Proteins ». *Journal of Virology* 53 (3): 908-19.
- Berche, Patrick, et Raphaèle Dorniol. 2007. *Une histoire des microbes*. <http://proxy.cm.umoncton.ca/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=779011>.
- Blumberg, B. M., J. C. Crowley, J. I. Silverman, J. Menonna, S. D. Cook, et P. C. Dowling. 1988. « Measles Virus L Protein Evidences Elements of Ancestral RNA Polymerase ». *Virology* 164 (2): 487-97.
- Borderon, J.-C., A. Goudeau, et M.-A. Barthez. 2007. « Rougeole (I). Le virus. Aspects épidémiologiques et cliniques ». *EMC - Maladies infectieuses* 4 (2): 1-28. [https://doi.org/10.1016/S1166-8598\(07\)41779-3](https://doi.org/10.1016/S1166-8598(07)41779-3).
- Bouche, Fabienne B., Oliver T. Ertl, et Claude P. Muller. 2002. « Neutralizing B Cell Response in Measles ». *Viral Immunology* 15 (3): 451-71. <https://doi.org/10.1089/088282402760312331>.
- Caseris, M., C. Burdet, R. Lepeule, N. Houhou, P. Yeni, Y. Yazdanpanah, et V. Joly. 2015. « Actualité de la rougeole ». *La Revue de Médecine Interne* 36 (5): 339-45. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2014.10.362>.
- Cattaneo, R., K. Kaelin, K. Bacsko, et M. A. Billeter. 1989. « Measles Virus Editing Provides an Additional Cysteine-Rich Protein ». *Cell* 56 (5): 759-64.
- Furuse, Yuki, Akira Suzuki, et Hitoshi Oshitani. 2010. « Origin of Measles Virus: Divergence from Rinderpest Virus between the 11th and 12th Centuries ». *Virology Journal* 7 (mars): 52. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-52>.
- Griffin, D. E. 1995. « Immune Responses during Measles Virus Infection ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 191: 117-34.
- Griffin, D. E., et C. H. Pan. 2009. « Measles: Old Vaccines, New Vaccines ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 330: 191-212.
- Griffin, D. E., et B. J. Ward. 1993. « Differential CD4 T Cell Activation in Measles ». *The Journal of Infectious Diseases* 168 (2): 275-81.
- Griffin, Diane E., Wen-Hsuan Lin, et Chien-Hsiung Pan. 2012. « Measles Virus, Immune Control, and Persistence ». *FEMS Microbiology Reviews* 36 (3): 649-62. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00330.x>.
- Grosjean, I., C. Caux, C. Bella, I. Berger, F. Wild, J. Banchemereau, et D. Kaiserlian. 1997. « Measles Virus Infects Human Dendritic Cells and Blocks Their Allostimulatory Properties for CD4+ T Cells ». *The Journal of Experimental Medicine* 186 (6): 801-12.
- Hahm, B. 2009. « Hostile Communication of Measles Virus with Host Innate Immunity and Dendritic Cells ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 330: 271-87.

- Hanses, F., A. T. Truong, W. Ammerlaan, O. Ikusika, F. Adu, A. O. Oyefolu, S. A. Omilabu, et C. P. Muller. 1999. « Molecular Epidemiology of Nigerian and Ghanaian Measles Virus Isolates Reveals a Genotype Circulating Widely in Western and Central Africa ». *The Journal of General Virology* 80 (Pt 4) (avril): 871-77. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-4-871>.
- Hausmann, S., D. Garcin, C. Delenda, et D. Kolakofsky. 1999. « The Versatility of Paramyxovirus RNA Polymerase Stuttering ». *Journal of Virology* 73 (7): 5568-76.
- Janeway, C. A. 1945. « Use of Concentrated Human Serum Gamma-Globulin in the Prevention and Attenuation of Measles ». *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 21 (4): 202-22.
- Johnson, R. T., D. E. Griffin, R. L. Hirsch, J. S. Wolinsky, S. Roedenbeck, I. Lindo de Soriano, et A. Vaisberg. 1984. « Measles Encephalomyelitis--Clinical and Immunologic Studies ». *The New England Journal of Medicine* 310 (3): 137-41. <https://doi.org/10.1056/NEJM198401193100301>.
- Longhi, S. 2009. « Nucleocapsid Structure and Function ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 329: 103-28.
- Lund, G. A., D. L. Tyrrell, R. D. Bradley, et D. G. Scraba. 1984. « The Molecular Length of Measles Virus RNA and the Structural Organization of Measles Nucleocapsids ». *The Journal of General Virology* 65 (Pt 9) (septembre): 1535-42. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-9-1535>.
- Mammette, A. 2002. *Virologie médicale*. Lyon: Presses universitaires de Lyon.
- Markowitz, L. E., S. R. Preblud, P. E. Fine, et W. A. Orenstein. 1990. « Duration of Live Measles Vaccine-Induced Immunity ». *The Pediatric Infectious Disease Journal* 9 (2): 101-10.
- McCarthy, Alex J., et Simon J. Goodman. 2010. « Reassessing Conflicting Evolutionary Histories of the Paramyxoviridae and the Origins of Respiraviruses with Bayesian Multigene Phylogenies ». *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 10 (1): 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.002>.
- Moench, T. R., D. E. Griffin, C. R. Obriecht, A. J. Vaisberg, et R. T. Johnson. 1988. « Acute Measles in Patients with and without Neurological Involvement: Distribution of Measles Virus Antigen and RNA ». *The Journal of Infectious Diseases* 158 (2): 433-42.
- Moss, William J., Martin O. Ota, et Diane E. Griffin. 2004. « Measles: Immune Suppression and Immune Responses ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (8): 1380-85. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.019>.
- Mühlebach, Michael D., Mathieu Mateo, Patrick L. Sinn, Steffen Prüfer, Katharina M. Uhlig, Vincent H. J. Leonard, Chanakha K. Navaratnarajah, et al. 2011. « Adherens Junction Protein Nectin-4 Is the Epithelial Receptor for Measles Virus ». *Nature* 480 (7378): 530-33. <https://doi.org/10.1038/nature10639>.
- Mulders, M. N., A. T. Truong, et C. P. Muller. 2001. « Monitoring of Measles Elimination Using Molecular Epidemiology ». *Vaccine* 19 (17-19): 2245-49.

- Naniche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Roubourdin-Combe, et D. Gerlier. 1993. « Human Membrane Cofactor Protein (CD46) Acts as a Cellular Receptor for Measles Virus ». *Journal of Virology* 67 (10): 6025-32.
- Navaratnarajah, Chanakha K., Sompong Vongpunsawad, Numan Oezguen, Thilo Stehle, Werner Braun, Takao Hashiguchi, Katsumi Maenaka, Yusuke Yanagi, et Roberto Cattaneo. 2008. « Dynamic Interaction of the Measles Virus Hemagglutinin with Its Receptor Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM, CD150) ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (17): 11763-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800896200>.
- Noyce, Ryan S., Daniel G. Bondre, Michael N. Ha, Liang-Tzung Lin, Gary Sisson, Ming-Sound Tsao, et Christopher D. Richardson. 2011. « Tumor Cell Marker PVRL4 (Nectin 4) Is an Epithelial Cell Receptor for Measles Virus ». *PLoS Pathogens* 7 (8): e1002240. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002240>.
- Poland, G. A., R. M. Jacobson, A. M. Thampy, S. A. Colbourne, P. C. Wollan, J. J. Lipsky, et S. J. Jacobsen. 1997. « Measles Reimmunization in Children Seronegative after Initial Immunization ». *JAMA* 277 (14): 1156-58.
- Richardson, C. D., A. Berkovich, S. Rozenblatt, et W. J. Bellini. 1985. « Use of Antibodies Directed against Synthetic Peptides for Identifying cDNA Clones, Establishing Reading Frames, and Deducing the Gene Order of Measles Virus ». *Journal of Virology* 54 (1): 186-93.
- Rima, Bertus K., et W. Paul Duprex. 2005. « Molecular Mechanisms of Measles Virus Persistence ». *Virus Research* 111 (2): 132-47. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.005>.
- Rota, Paul A., et William J. Bellini. 2003. « Update on the Global Distribution of Genotypes of Wild Type Measles Viruses ». *The Journal of Infectious Diseases* 187 Suppl 1 (mai): S270-276. <https://doi.org/10.1086/368042>.
- Schrag, S. J., P. A. Rota, et W. J. Bellini. 1999. « Spontaneous Mutation Rate of Measles Virus: Direct Estimation Based on Mutations Conferring Monoclonal Antibody Resistance ». *Journal of Virology* 73 (1): 51-54.
- Swart, Rik L. de, Selma Yüksel, et Albert D. M. E. Osterhaus. 2005. « Relative Contributions of Measles Virus Hemagglutinin- and Fusion Protein-Specific Serum Antibodies to Virus Neutralization ». *Journal of Virology* 79 (17): 11547-51. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11547-11551.2005>.
- Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, et Y. Yanagi. 2000. « SLAM (CDw150) Is a Cellular Receptor for Measles Virus ». *Nature* 406 (6798): 893-97. <https://doi.org/10.1038/35022579>.
- Zhang, Yan, Zhengrong Ding, Huiling Wang, Liqun Li, Yankun Pang, Kevin E. Brown, Songtao Xu, et al. 2010. « New Measles Virus Genotype Associated with Outbreak, China ». *Emerging Infectious Diseases* 16 (6): 943-47. <https://doi.org/10.3201/eid1606.100089>.

Annexes

ANNEXES A : Génotype des souches de référence du virus rougeoleux (WHO, 2005).

Génotype	Etat	Souches de référence	Numéros d'accès à Genbank	
			Gene H	Gene N
A	Actif	Edmonston-wt. USA154	U03669	U01987
B1	Inactif	Yaounde.CAE/12.83 "Y-14"	AF079552	U01998
B2	Actif	Libreville.GAB/84 "R-96"	AF079551	U01994
B3	Actif	New York.USA194	L46752	L46753
		<i>Ibadan.NIE/97/1</i>	AJ239133	AJ232203
C1	Actif	Tokyo.JPN/84/K	AY047365	AY043459
C2	Actif	Maryland.USA177 "JM"	M81898	M89921
		Erlangen.OEU/90 "WTF"	Z80808	X84872
D1	Inactif	Bristol.UNK174 (MVP)	Z80805	001005
D2	Actif	Johannesburg.SOA188/1	AF085198	U64582
D3	Actif	Illinois. USA189/1 "Chicago-1"	M81895	U01977
D4	Actif	Montreal. CAN/89	AF079554	U01976
D5	Actif	Palau.BLA193	L46757	L46758
		Bangkok. THA/93/1	AF009575	AF079555
D6	Actif	New Jersey.USA194/1	L46749	L46750
D7	Actif	Victoria.AUS/16.85	AF247202	AF243450
		Illinois. USA150. 99	AY043461	AY037020
D8	Actif	Manchester.UNK130.94	U29285	AF280803
D9	Actif	Victoria.AUS/12.99	AY127853	AF481485
D10	Actif	Kampala.UGA151.00/1	AY923213	AY923185
E	Inactif	Goettingen.DEU/71 "Braxator"	Z80797	X84879

F	Inactif	MVs/Madrid.SPA194	SSPE	Z80830	X84865
G1	Inactif	Berkeley. USA/83		AF079553	U01974
G2	Actif	Amsterdam.NET/49.97		AF171231	AF171232
G3	Actif	Gresik.1 <i>NO/17. 02</i>		AY184218	AY184217
Hi	Actif	Hunan.CHN/93/7		AF045201	AF045212
H2	Actif	Beijing.CHN/94/1		AF045203	AF045217

ANNEXE B : Outils bioinformatiques utilisés dans l'analyse des données du séquençage :

- 1) Logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) : est un logiciel multi-fonctions permettant de construire et de visualiser des alignements et des phylogénies. Les méthodes de construction d'arbres phylogénétiques implantés dans le logiciel Mega sont :
 - a) La méthode de parcimonie (MP, Maximum Parsimony method) permet la construction de l'arbre évolutif le plus court. La méthode prend en compte les événements mutationnels (substitution, insertion/délétion) survenus sur les sites dits informatifs. Un site est dit informatif si pour la position considérée il existe au moins deux nucléotides différents et que chacun d'eux est présent au moins une fois. Les arbres sont alors construits avec des longueurs de branches correspondant à la somme d'événements mutationnels pour un site donné. L'arbre choisi est le plus court, soit celui qui nécessite le moins de changements.
 - b) la méthode des distances avec la construction d'un arbre selon la méthode Neighbor Joining (NJ) ou méthode du plus proche voisin. Cette méthode consiste à établir une matrice de distance entre chaque paire de séquences et de construire un arbre phylogénétique à partir de cette matrice en respectant le principe de parcimonie. Les paires de séquences d'unité taxonomique sont regroupées successivement selon leur similarité pour obtenir l'arbre phylogénétique le plus parcimonieux.
 - c) La méthode du maximum de vraisemblance (ML, Maximum Likelihood) qui consiste à construire un arbre phylogénétique dont l'ordre des branchements et les longueurs des branches optimales sont estimés et dont la vraisemblance est calculée, étant donné les séquences nucléotidiques et le modèle d'évolution choisi. Le modèle d'évolution est déterminé grâce au logiciel FindModel.

2) Logiciels BLAST et du BLASTN :

Le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est un programme de recherche de similarité développé par NCBI. La conception de l'algorithme est basée sur un modèle statistique établi d'après les travaux de Karlin et Altschul (1990 et 1993). L'unité fondamentale de BLAST est le HSP (High-scoring Segment Pair). Un HSP correspond à une région de similitude la plus longue possible entre deux séquences, ayant un score supérieur ou égal à un score seuil. Un deuxième score MSP (Maximal-scoring Segment Pair) a été défini comme étant le meilleur score obtenu parmi tous les couples possibles que peuvent produire deux séquences. Les méthodes statistiques sont alors appliquées pour déterminer la signification biologique des MSP, et par extrapolation, la signification des scores HSP obtenus lors de la comparaison. Ce logiciel possède en fait quatre programmes distincts de comparaison de séquences avec les bases de données. BLASTN (séquence nucléique contre base nucléique), BLASTP (séquence protéique contre base protéique), BLASTX (séquence nucléique traduite en six phases contre base protéique), et TBLASTN (séquence protéique contre base nucléique traduite en six phases). Pour la recherche de spécificité qui nous intéresse, seul BLASTN est utilisé. Ce logiciel et les utilitaires associés sont disponibles sur le site de téléchargement du NCBI18 pour presque tous les systèmes d'exploitation.

La stratégie de BLASTN consiste à rechercher tous les mots de longueur W dans la séquence, comparer ces mots avec les séquences de la banque afin d'identifier les homologues exactes (les hits), puis réaliser une extension du segment, quand cela est possible. Cette extension est réalisée à partir du mot commun dans les deux directions le long de chaque séquence, de manière à ce que le score cumulé puisse être amélioré. L'extension est arrêtée dans les trois cas suivants :

- le score cumulé descend d'une quantité x donnée par rapport à la valeur maximale qu'il avait atteinte.
- le score cumulé devient inférieur ou égal à zéro.
- la fin d'une des deux séquences est atteinte.

La signification des alignements est ensuite évaluée statistiquement en fonction de la longueur et de la composition de la séquence, de la taille de la banque et de la matrice de scores utilisée. Le fichier de sortie contient une liste de séquences ayant un alignement significatif, c'est-à-dire les séquences ayant une valeur e inférieure au seuil fixé lors de la

recherche. Pour chacune de ces séquences, deux paramètres sont calculés pour évaluer la qualité de l'alignement. Le premier est le score S' qui est dérivé du score brut de l'alignement. Il a été normalisé et peut donc être utilisé pour comparer des scores provenant de recherches différentes. Le second est la valeur e (e-value) qui correspond au nombre d'alignements différents qui peuvent potentiellement exister dans les banques avec un score supérieur ou égal à S' (c'est-à-dire la probabilité d'observer au hasard ce score à travers la banque de séquences considérée). L'alignement est donc d'autant plus significatif que la valeur e est faible. Les fichiers contenant les séquences à étudier doivent être au format FASTA. Il s'agit d'un format très courant dans lequel une description simple de la séquence est donnée sur une première ligne qui est suivie des lignes contenant la séquence. La ligne de description se distingue des lignes de séquence en étant toujours précédée du symbole « > »

ANNEXE C : Principe de bootstrap :

Il est possible d'estimer statistiquement le niveau de confiance d'un arbre phylogénétique produit par les méthodes du maximum de parcimonie (MP) grâce à la méthode du bootstrap (Felsenstein 2004). La méthode du bootstrap a pour but d'estimer le niveau de confiance des relations entre taxons prédites par les méthodes de reconstruction phylogénétique. Le principe du bootstrap est de ré-échantillonner la matrice originale en remplaçant les caractères. Ceci revient à couper la matrice de données en colonnes individuelles de données et à en sélectionner une au hasard qui deviendra le premier caractère d'une nouvelle matrice de données. La colonne sélectionnée est ensuite remise dans le groupe de colonnes issues de la première matrice et une nouvelle colonne de données est tirée au hasard. Le processus est répété jusqu'à ce que la nouvelle matrice soit de la même taille que la matrice originale. Certains caractères pourront donc être sélectionnés plusieurs fois alors que d'autres ne seront pas sélectionnés du tout. Ce processus de bootstrap est répété plusieurs fois, généralement entre 100 et 1000 fois, et des phylogénies sont reconstruites à chaque fois. Une fois la procédure de bootstrap terminée, un arbre consensus est construit à partir des arbres optimaux générés par chacun des 100 ou 1000 bootstraps. Le support de bootstrap indiqué, en pourcentage, pour chaque noeud de l'arbre consensus correspond au nombre de fois où ce noeud a été reconstruit durant la procédure de bootstrap.

