

Incursion de la fièvre catarrhale ovine en Tunisie : caractérisation moléculaire des isolats viraux

S. Ben Fredj^{1*} E. Bréard² C. Sailleau² S. Zientara²
S. Zekri³ A. Boudabbous⁴ S. Hammami^{1**}

Mots-clés

Ovin – Fièvre catarrhale du mouton – Virus *bluetongue* – Biologie moléculaire – Séquence nucléotidique – Génome – Région méditerranéenne – Tunisie.

Résumé

La fièvre catarrhale du mouton a été déclarée en Tunisie en décembre 1999. D'autres cas de fièvre catarrhale du mouton ont également été répertoriés dans d'autres pays du bassin méditerranéen. L'objectif de cette étude a été, dans un premier temps, de caractériser les isolats viraux provenant de cette épizootie ayant sévi de décembre 1999 à mars 2000 et, dans un second temps, de déterminer l'origine du virus par phylogénie moléculaire. Pour se faire, les segments génomiques 2, 7 et 10 correspondant respectivement aux protéines VP2, VP7 et NS3/NS3A ont été amplifiés par PCR et séquencés. Des comparaisons de séquences de ces différents segments génomiques issus des isolats viraux tunisiens ont pu être faites avec la souche virale sauvage et vaccinale corse ainsi que d'autres souches virales de fièvre catarrhale du mouton déjà publiées sur GenBank. Les résultats présentés sous forme d'arbres phylogénétiques et de tableaux de comparaisons de séquences nucléotidiques permettent de positionner l'origine commune de la souche virale tunisienne (sérotypage 2) avec la souche virale corse responsable de l'épizootie d'octobre 2000.

■ INTRODUCTION

Décrite pour la première fois en 1881 en Afrique de Sud, la fièvre catarrhale ovine (*bluetongue*) s'est étendue, à partir de 1940, en Afrique centrale pour gagner le bassin méditerranéen et l'Asie. Actuellement, elle est signalée en Amérique du Nord et du Sud, en Australie et en Nouvelle Zélande. La première incursion de la fièvre catarrhale du mouton en Tunisie a été rapportée entre fin 1999 et début 2000, avec une atteinte de l'espèce ovine de 837 cas dont 325 morts (5). Au cours de cette même année, la maladie a été déclarée en Grèce, en Bulgarie et en Turquie. En octobre 2000, le nombre d'animaux atteints a augmenté pour atteindre 6 120 cas dont 1 318 ont eu une issue fatale. Dans les autres pays du bassin méditerranéen, l'épizootie a été également déclarée en Algérie, en Italie (Sardaigne, Sicile et Calabres), à nouveau en Grèce, pour toucher finalement la France sur l'île Corse en octobre 2000 (17).

1. Institut de la recherche vétérinaire de Tunisie, 14 rue Djebel Lakhthar, la Rabta, 1006 Tunis, Tunisie

2. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 22 rue Pierre Curie, BP 67, 94703 Maisons-Alfort Cedex, France

3. Faculté de médecine de Tunis, rue Djebel Lakhthar, 1006 Tunis, Tunisie

4. Faculté des sciences mathématiques physiques et naturelles de Tunis, El Manar II, Tunisie

* Tél. : +216 22 42 45 33 ; fax : +216 72 23 03 03

E-mail : ssmelki@yahoo.fr

** Tél. : +216 71 56 26 02 / +216 71 56 43 21 ; fax : +216 71 56 96 92

E-mail : hammami.salah@iresa.agrinet.tn

D'après les informations de l'Office international des épizooties (OIE), la maladie a ressurgi en Italie, en Corse, en Bulgarie, au Kosovo et en Yougoslavie en 2001 (9).

La fièvre catarrhale du mouton est une arbovirose d'origine virale, non contagieuse, inoculable. Elle est due à un virus à acide ribonucléique (ARN) qui appartient à la famille des *Reoviridae* et du genre *Orbivirus*. C'est un virus nu, de petite taille dont le diamètre est compris entre 68-80 nm (2). Ce virus comporte un génome de 10 segments génomiques dénommés L1 à L3, M4 à M6, S7 à S10 (4, 11, 12).

Chaque segment génomique code pour une protéine ayant une fonction particulière. La capsid externe est composée de deux protéines (VP2 et VP5) qui interviennent dans la variabilité antigénique du virus. La capsid interne est formée de deux protéines majeures (VP3 et VP7) et de trois protéines mineures (VP1, VP4 et VP6) (6, 14). On dénombre actuellement 24 sérotypes différents (12). Cette maladie s'est propagée dans le bassin méditerranéen par le biais des moucheron (arthropodes hématophages) du genre *Culicoides* (notamment l'espèce *C. imicola*) (7) et est inscrite sur la liste A de l'OIE. En général, ce vecteur se trouve entre les latitudes 35° S et 44° N, et il peut s'étendre jusqu'à 50° N au niveau de la Chine et de l'ouest de l'Amérique du Nord (3, 7, 10). Le sérotype identifié en Tunisie comme en Corse et en Italie continentale et insulaire (Sicile et Sardaigne) est le sérotype 2 (17, 18).

L'objectif du présent travail a été de caractériser de façon moléculaire les isolats viraux obtenus lors de l'épizootie de fièvre catarrhale du mouton survenue en Tunisie en décembre 1999. Pour se faire, les segments génomiques 2, 7 et 10 correspondant respectivement aux protéines VP2, VP7 et NS3/NS3A ont été amplifiés par PCR et séquencés. Des comparaisons de séquences de ces différents segments génomiques issus des isollements viraux tunisiens ont pu être faites avec la souche virale sauvage et vaccinale corse ainsi que d'autres souches virales de *bluetongue* déjà publiées dans GenBank. Les résultats présentés sous forme d'arbres phylogénétiques et de tableaux de comparaisons de séquences nucléotidiques permettent de conclure à une très forte homologie de la souche virale tunisienne avec la souche virale corse.

■ MATERIEL ET METHODES

Prélèvements biologiques

Ils ont été constitués de 42 échantillons incluant des rates et des échantillons de sang total. Les rates ont été broyées en présence de milieu essentiel minimum, supplémenté d'antibiotiques. Les échantillons de sang total additionnés d'acide édétique (EDTA) ont été lavés avec du tampon PBS puis centrifugés à 1 000 g pendant 5 min. Tous ces échantillons ont été prélevés à partir d'ovins présentant des signes cliniques de la fièvre catarrhale (jetage et hypersalivation, œdème de l'aube et de la tête...) provenant des foyers trouvés au centre du pays.

Amorces spécifiques de groupe

Ces amorces ont été déterminées afin d'amplifier les segments 7 et 10. L'amplification génomique du segment 7 a mis en jeu les amorces S7+ et S7- (tableau I), décrites précédemment (16, 18). Les amorces spécifiques du segment génomique 10 (S10P et S10M), décrites précédemment (18 ; tableau II), ont été utilisées pour amplifier le segment 10, segment spécifique des virus du groupe *bluetongue*.

Amorces spécifiques du segment 2 (spécifiques de type)

L'amplification de ce segment a permis de déterminer le sérotype du virus incriminé. Plusieurs amorces ont été utilisées pour amplifier le segment génomique 2 ; elles sont décrites dans le tableau III (17).

Les souches virales provenaient des isolats trouvés en Tunisie et en Corse (17, 19).

Isolement du virus

Le virus a été isolé à partir d'échantillons sanguins ou à partir de surnageants cellulaires ou des extraits de rates. L'isolement a été réalisé sur divers types de cellules : Vero (ref. ATTC : CCL 81), BHK-21 (ref. ATTC : CCL-10) ainsi qu'après inoculation à des oeufs embryonnés de 10 jours (9).

Tableau I

Amorces utilisées pour l'amplification du segment génomique 7 (VP7)

Amorces	Localisation (5'-3')	Séquences	Référence
S7+	1-20	GTAAAAATCTATAGAGATG	Wade-Evans et coll., 1990, <i>J. Virol. Meth.</i>
S7-	1156-1138	GTAAGTGTAATCTAAGAGA	Wade-Evans et coll., 1990, <i>J. Virol. Meth.</i>

Tableau II

Amorces utilisées pour l'amplification du segment génomique 10 (NS3)

Amorces	Localisation (5'-3')	Séquences	Référence
S10P	1-28	GTAAAAAGTGTGCGCTGCCATGCTATCC	Zientara et coll., 2001, <i>Vet. Rec.</i>
S10M	822-798	GTAAGTGTGTAGCGCCGCATACCCT	Zientara et coll., 2001, <i>Vet. Rec.</i>

Tableau III

Amorces utilisées pour amplifier le segment génomique 2 (VP2)

Amorces	Localisation (5'-3')	Séquences
PG1'	1-21	GTAAAAACAGGATCGCGAATG
M2	1196-1176	GGTCTTACGCTCCACTCATAAC
M5	1128-1148	CGATGTTTACTTTACTCTACG
P5	1681-1661	ACGGGATCATCAGTC ATCGG
PGB	1562-1582	TGGATAGTTGAGCCGATGTT
MG1'	2953-2934	GTAAGTTGAACAGATCGCGG

Extraction de l'ARN par la méthode d'isothiocyanate de guanidium

L'ARN total a été extrait à partir de 250 µl d'échantillon en présence du réactif Trizol-LS (Gibco-BRL). L'ARN une fois lavé à l'éthanol a été resuspendu dans 10 µl d'eau DEPC puis conservé à +4 °C.

Transcription inverse et amplification génique in vitro

L'ARN db a été dénaturé avec l'hydroxy méthyl mercure (HMM) (16). La transcription inverse et l'amplification génique (RT-PCR) ont été réalisées au sein du même tube RT-PCR en utilisant le kit en une étape RT-PCR (Qiagen, Courtabœuf). Le mélange réactionnel contenait 31 µl d'eau sans ribonucléase, 10 µl de tampon 5x Qiagen en une étape RT-PCR, 2 µl de désoxyribonucléotides (dNTP) (400 µM de chaque dNTP), 0,6 µM de chaque amorce et 2 µl d'enzyme. Le tableau IV présente le programme pour les trois segments génomiques.

Révélation des produits amplifiés

Dix microlitres de chaque produit d'amplification ont été déposés sur un gel d'agarose à 1 p. 100 + BET aux côtés d'un marqueur de poids moléculaire.

Détermination des séquences nucléotidiques

Les séquences nucléotidiques peuvent être déterminées directement à partir des produits PCR. Les travaux de séquençage ont été

Tableau IV

Programmes d'amplification des segments génomiques 2, 7 et 10

	VP2	VP7	VP10
RT	30'-45 °C	30'-45 °C	30'-50 °C
PCR	15'-94 °C	15'-94 °C	15'-95 °C
	1'-94 °C	10''-94 °C	1'-94 °C
	1'-50 °C	1'-45 °C	1'-72 °C
	3'-68 °C	1'30'-72 °C	10'-72 °C
	10'-68 °C	10'-72 °C	
Taille des fragments	2 950	1 156	822

confiés à la société Génome Express, Grenoble, France. L'analyse et l'alignement des séquences ont été réalisés à l'aide du logiciel EditSeq et Megalign Software (DNA Star).

RESULTATS

Isolement du virus

Le virus a été isolé au laboratoire de virologie de l'Institut de la recherche vétérinaire de Tunisie. Les résultats d'isolement du virus, après inoculation sur œufs embryonnés puis sur cellules, sont présentés dans le tableau V. Les 42 échantillons présentés dans ce tableau ont été prélevés à partir d'ovins présentant des signes cliniques de fièvre catarrhale. Des isolements sur œufs, puis des isolements sur cellules ont été réalisés.

Tableau V

Isolement viral

Prélèvements	Isolement sur œufs	Isolement sur cellules
Extraits de rates		
A1	+	+
A2	+	+
A3	+	+
Alam2	-	-
Extraits d'œufs		
1	-	+
3	-	+
4	+	+++
6	-	+
13	-	++
14	-	+
16	-	+++
17	+	+++++
Passages sur cultures cellulaires (Vero)		
1PI 1PII 1PIII	-,-,-	+,+,+
3PI 3PII 3PIII	-,-,+	++,+,+
4PI 4PII 4PIII	+,-,-	+++,,+
6PI 6PII 6PIII	-,+ ,+	+,+,+++
13PI 13PII 13PIII	-,-,-	+,+,+++
14PI 14PII 14PIII	+,-,-	+, -,++
16PI 16PII 16PIII	-,-,-	+,+,+++
17PI 17PII 17PIII	+,+,+	++++
Virus corse	++++	++++
Vaccin	+++	++++
Globules rouges		
13	-	-
14	-	-
16	-	+
17	-	+

PI : passage 1 ; PII : passage 2 ; PIII : passage 3

Isolement sur œufs : signes lésionnels (- négatif ; + positif)

Isolement sur cellules : effet cytopathique (- négatif à ++++ très positif)

Analyse des échantillons par la technique RT-PCR

L'ARN a été obtenu, à partir d'extraits de rate, d'œufs, ainsi que des surnageants cellulaires, comme décrit précédemment (19) ; ils ont été soumis à des réactions de RT-PCR spécifiques des segments génomiques 2, 7 et 10. Sur un total de 42 échantillons, 25 se sont révélés positifs.

Séquençage

Le séquençage des produits PCR des différents échantillons a permis d'obtenir une séquence partielle codant pour la VP2 de 2 884 pb, une séquence codant pour la VP7 de 1 048 pb et une séquence codant pour le segment 10 de 759 pb. Les séquences de trois segments génomiques (2, 7 et 10) obtenus à partir des produits d'amplification ont été enregistrées dans GenBank, respectivement sous les numéros d'accès AF 494094, AF 469114 et AF 469115. Ces séquences ont été comparées aux séquences des isolats corses, à la souche vaccinale ainsi qu'aux séquences publiées dans GenBank. Les résultats de ces comparaisons sont présentés sous forme de tableaux et d'arbres phylogénétiques.

Segment 10

Le tableau VI montre le pourcentage de similitude entre les souches au niveau du segment 10. Ce segment représente la spécificité du groupe du virus *bluetongue*. Par ailleurs, ce tableau indique un pourcentage de similitude de 90,8 p. 100 entre la souche tunisienne et la souche américaine, un pourcentage de similitude de 82 p. 100 entre cette même souche tunisienne et la souche chinoise, une grande homologie entre la souche tunisienne et la souche corse isolée en 2001 (99,7 p. 100), et une similitude de 49 p. 100 uniquement avec la souche vaccinale.

La figure 1 présente l'arbre phylogénétique incluant la séquence du segment 10 (fragment génomique 10) de la souche virale tunisienne parmi les séquences de souches américaines (USA), chinoises (CH) et australiennes (AU). Un séquençage de deux échantillons seq1 et seq2 (fragment de rate et sang total) a été réalisé. L'arbre illustre le positionnement des deux séquences seq1 et seq2 TUN près des souches américaines et chinoises.

Segment 7

Le segment 7 a une longueur de 1 154 pb et code pour la protéine VP7. La séquence du segment 7 de la souche tunisienne a été comparée avec les souches publiées, dont les souches isolées en Corse en

2000 et en 2001, ainsi qu'avec la souche vaccinale corse (tableau VII, figure 2). Les résultats présentés sous forme d'arbre phylogénétique ont permis d'établir clairement le positionnement de la souche tunisienne (BTV2 TUN) près des souches virales corse (BTV2 Corse 2000, BTV2 Corse 2001), vaccinale (BTV2 Vaccin) et américaine (BTV2 USA). Les résultats de cette comparaison montrent une homologie variant de 100 p. 100 avec la souche corse à 77,5 p. 100 avec des souches américaines du même sérotype.

Après avoir déterminé les pourcentages de divergence et de similitude, un arbre phylogénétique a été établi pour mieux caractériser les relations entre les isolats décrits dans différents pays. La figure 2 présente la séquence du segment 7 (TUN) de la souche virale tunisienne et les séquences des souches des différents sérotypes et provenant de différents pays tels que les Etats-Unis, le Portugal (PR), l'Australie (AU), La France (Corse), l'Afrique de Sud (SA) et l'Inde (IND).

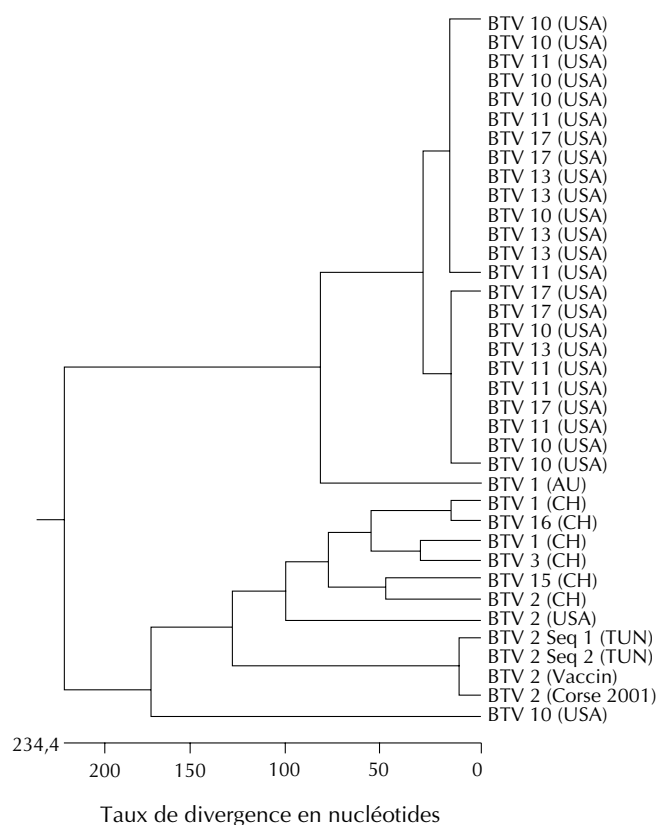


Tableau VI

Comparaison de la séquence nucléotidique tunisienne du segment 10 avec les séquences des souches publiées du même sérotype

	BTV2 (Tunisie)	BTV2 (USA)	BTV2 (Chine)	BTV2 (Vaccin)	BTV2 (Corse 2001)
D	BTV2	90,8	82	49	99,7
i	(Tunisie)				
v	BTV2	9,2	81	99,7	82,9
e	(USA)				
r	BTV2	18	19	83,5	92,4
g	(Chine)				
e	BTV2	51	0,3	16,5	83,6
n	(Vaccin)				
c	BTV2	0,3	17,1	7,6	16,4
e	(Corse 2001)				

Figure 1 : arbre phylogénétique indiquant les associations entre la séquence du segment génomique 10 de la souche tunisienne et celles d'autres souches publiées. Les comparaisons de séquences ont été réalisées à l'aide du logiciel DNA Star. Les numéros d'accès dans GenBank sont les suivants : BTV10 (USA) : AF044372 ; BTV-10 b : AF044376 ; BTV-11 (USA) : AF044377 ; BTV10 (USA) : AF044379 ; BTV10 (USA) : AF044380 ; BTV11 (USA) : AF044373 ; BTV17 (USA) : AF044375 ; BTV17 (USA) : AF044378 ; BTV13 (USA) : AF044374 ; BTV13 (USA) : IO8629 ; BTV10 (USA) : AF044711 ; BTV13 (USA) : AF044712 ; BTV13 (USA) : AF044713 ; BTV11 (USA) : AF044383 ; BTV17 (USA) : AF044707 ; BTV17 (USA) : AF044708 ; BTV10 (USA) : AF044382 ; BTV13 (USA) : AF044710 ; BTV11 (USA) : AF044702 ; BTV11 (USA) : AF044703 ; BTV17 (USA) : AF044705 ; BTV11 (USA) : AF044386 ; BTV10 (USA) : AF044384 ; BTV10 (USA) : AF044381 ; BTV1 (AU) : DO0253 ; BTV1 (CH) : AF135223 ; BTV16 (CH) : AF135229 ; BTV1 (CH) : AF135226 ; BTV3 (CH) : AF135225 ; BTV15 (CH) : AF135228 ; BTV2 (CH) : AF135227 ; BTV2 (USA) : AF135230 ; BTV2 (TUN) : AF469115 ; BTV10 (USA) : AY028210.

Tableau VII

Comparaison de la séquence tunisienne du segment 7 avec les séquences des souches publiées du même sérotype

	BTV2 (Tunisie)	BTV2 (Corse 2000)	BTV2 (Corse 2001)	BTV2 (Vaccin)	BTV2 (USA)
D		100	100	93	78,4
i					
v	0		100	93	77,5
e					
r	0	0		93	82,5
g					
e	7	7	7		82
n					
c	21,6	22,5	7,5		18
e					

Tableau VIII

Comparaison de la séquence (en nucléotides) du segment 2 de l'isolat tunisien avec les séquences des souches publiées du même sérotype

	BTV2 (Tunisie)	BTV2 (Corse 2000)	BTV2 (Corse 2001)	BTV2 (Vaccin)	BTV2 (USA)
D		99,4	56,2	96,4	74,6
i					
v	0,6		56,3	96,5	74,6
e					
r	43,8	43,7		56,9	57,9
g					
e	3,6	3,5	39,1		74,6
n					
c	24,4	24,4	42,1		25,4
e					

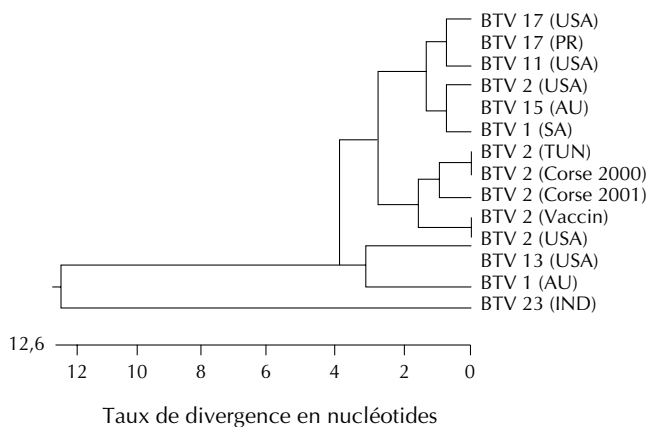


Figure 2 : arbre phylogénétique obtenu par comparaison des séquences nucléotidiques du segment génomique 7 du virus tunisien et d'autres virus publiés. Les comparaisons de séquences ont été réalisées à l'aide du logiciel DNA Star. Les numéros d'accès dans GenBank sont les suivants : BTV17 (USA) : M11787 ; BTV17 (PR) : X53693 ; BTV11 (USA) : M32102 ; BTV2 (USA) : AF188660 ; BTV1 (AU) : L11724 ; BTV1 (SA) : X53740 ; BTV2 (TUN) : AF469115 ; BTV2 (Corse 2000) : AF346302 ; BTV2 (Corse 2001) : AY079124 ; BTV2 (USA) : M64997 ; BTV13 (USA) : AF188673 ; BTV1 (AU) : U89325 ; BTV23 (IND) : AJ277802.

Segment 2

Le segment 2 spécifique du sérotype de la bluetongue comprend 2 950 pb et code pour la protéine VP2. Trois couples d'amorces ont été nécessaires pour l'obtention de la séquence codante. Ceci pouvait s'expliquer par la taille relativement élevée de la séquence du segment 2 en comparaison avec la taille des autres segments génomiques (tableau VIII). L'arbre phylogénétique (figure 3) a permis de visualiser les relations entre les souches. Les couples d'amorces utilisés pour obtenir la séquence génomique du segment 2 ont été : (PG1' - PGB) qui a permis d'amplifier une partie

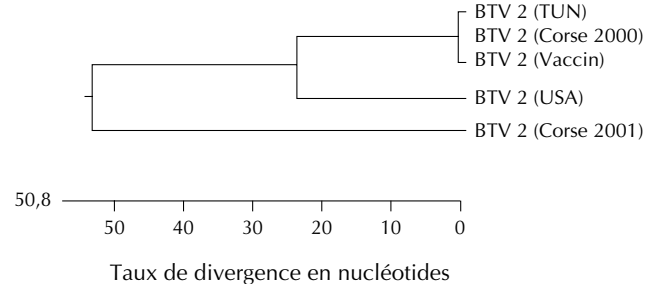


Figure 3 : arbre obtenu par comparaison des séquences nucléotidiques du segment génomique 2. Les comparaisons de séquences ont été réalisées à l'aide du logiciel DNA Star. Les numéros d'accès dans GenBank sont les suivants : BTV2 (TUN) : AF494094 ; BTV2 (Corse 2000) : AF356601 ; BTV2 (Vaccin) : AF481096 ; BTV2 (USA) : AY028211 ; BTV2 (Corse 2001) : AF530067.

du segment génomique 2 d'environ 1 500 pb, (M2 - MG1') qui a assuré l'amplification d'une partie génomique 2 000 pb du même segment, alors que la partie intermédiaire entre ces deux couples d'amorces a été amplifiée par (M5 - P5) qui a amplifié une région de 150 pb environ.

Les résultats de comparaison, qu'ils soient présentés en tableau (tableau VIII) ou sous forme d'arbre (figure 3), reflètent bien une grande parenté de la souche tunisienne avec la souche isolée en Corse en 2000 et la souche vaccinale. Le pourcentage de divergence a été plus élevé avec les autres souches provenant de Corse déclarées en 2001 et des souches trouvées aux États-Unis.

DISCUSSION

L'objectif du présent travail a été d'isoler et de caractériser le virus bluetongue circulant en Tunisie en décembre 1999. L'étude a été faite dans le but de comparer la souche virale tunisienne à la souche virale circulant en Corse en octobre 2000 et en 2001, et la souche vaccinale, et de préciser le lien entre ces souches.

La difficulté de collecter les échantillons et la faible durée de l'épizootie en Tunisie (décembre 99-mars 2000) explique le nombre relativement réduit des échantillons prélevés. L'étude expérimentale a permis d'isoler le virus, de déterminer le sérotype en cause et de réaliser une caractérisation moléculaire des isolats du virus détectés en Tunisie. De plus, une comparaison a été effectuée avec les souches trouvées en France en 2000 et 2001 ainsi qu'avec la souche vaccinale, ceci à partir du séquençage des trois segments génomiques : 2, 7 et 10.

Le séquençage a été ciblé sur trois segments génomiques pour différentes raisons. Le segment génomique 2, codant pour la protéine virale VP2, a été choisi comme cible pour différencier les 24 sérotypes entre eux (8, 15), puisque ce segment a la particularité de porter la spécificité de sérotype. Le séquençage de la VP2 a donc permis d'identifier le sérotype 2 de la souche virale tunisienne. Le segment génomique 7, qui code pour la protéine VP7, a été choisi comme cible pour l'amplification génique, car sa séquence nucléotidique est fortement conservée entre les 24 sérotypes (11, 12). En revanche, la séquence nucléotidique du segment 10, codant pour les protéines non structurales NS3/NS3A, est beaucoup moins conservée entre sérotypes (11), mais elle a permis de donner des informations complémentaires.

Dans un premier temps, des isolements sur œufs embryonnés suivis de passage en culture cellulaire ont permis d'isoler le virus à partir des différents extraits de rates et de sang total. L'extraction d'ARN, suivie de réactions de RT-PCR spécifiques de chaque segment génomique, a permis d'aboutir à des produits d'amplification utilisables en séquençage.

Le séquençage de chacun de ces segments a permis de déterminer les séquences nucléotidiques qui ont été enregistrées dans GenBank sous les numéros d'accès suivants : AF 494094 pour VP2, AF 469114 pour VP7 et AF 469115 pour NS3/NS3A.

L'alignement des différentes séquences des produits d'amplification a permis de détecter les divergences et les similitudes allant de 51 à 100 p. 100 entre les prélèvements de différentes origines présentées dans les tableaux VI à VIII. L'alignement des séquences a été fait grâce au logiciel DNA Star par la méthode Clustal.

La comparaison des séquences des isolats tunisiens prélevés entre 1999 et 2000 montre qu'il n'y a pas eu de mutations entre les séquences génomiques du virus et qu'il s'agissait de la même épizootie entre fin décembre 1999 et mars 2000 (19). Le typage par PCR a été utilisé sur une petite fraction des échantillons prélevés sur le terrain et reste à valider pour un grand nombre de prélèvements. Les résultats présentés en arbre pour la protéine NS3/NS3A (figure 1) correspondant au segment génomique 10 ont permis de mettre en évidence une origine proche de la souche tunisienne et de la souche corse de 2000. Cette origine très proche entre le virus *bluetongue* sérotype 2 tunisien et la souche virale corse de 2000 est également illustrée dans le cas de la VP2 (figure 2) et de la VP7 (figure 3).

Les résultats homogènes entre eux montrent donc bien une origine commune du virus *bluetongue* sérotype 2 isolé en Corse en 2000 et en Tunisie. Le transport et l'amplification par le vecteur n'ont pas semblé affecter les séquences génomiques du virus. Des études plus approfondies seraient toutefois nécessaires à plus grande échelle pour vérifier des recombinaisons potentielles où le vecteur *Culicoides* serait le responsable. Les travaux réalisés par Zientara et coll. (18), basés aussi bien sur la VP7 que sur la VP2, mettent en évidence l'origine commune probable du virus corse (épizootie octobre 2000) et le virus trouvé aux Etats-Unis, tandis que le virus trouvé en Corse en 2001 semble éloigné, du point de vue de la séquence génomique, du virus tunisien. Ceci peut être expliqué par

des mutations survenues au niveau de la séquence génomique du virus type 2 trouvé en Corse en 2001. Il y a eu une modification de la séquence génomique de celle-ci lors du transport par le vecteur. Malheureusement, le faible nombre de séquences disponibles quel que soit le segment génomique, notamment ceux de virus isolés à partir d'épizooties ayant sévi dans les pays méditerranéens, ne permet pas la construction d'arbres phylogénétiques très complets, particulièrement pour la VP2.

Le vaccin utilisé en Tunisie pour lutter contre cette épizootie semble très bien adapté puisque sa séquence nucléotidique est très voisine de celle du virus type 2 déclaré en Tunisie. Les travaux de biologie moléculaire de typage de virus sont très importants puisqu'ils permettront dans l'avenir proche de caractériser très rapidement la nature des virus impliqués dans les épizooties, que ce soient des épizooties de fièvre catarrhale du mouton ou de maladies hémorragiques des cervidés, l'exemple cité par Barnard et coll. (1) en étant la preuve.

■ CONCLUSION

La fièvre catarrhale ovine a été déclarée en Tunisie en décembre 1999. Des isolements sur œufs embryonnés et des passages sur culture ont permis d'isoler la souche virale. L'extraction d'ARN suivie de réaction de RT-PCR spécifique de VP2 a permis de mettre en évidence le sérotype 2 de la *bluetongue* comme virus responsable de l'épizootie déclarée en Tunisie en décembre 1999. Différents isolats prélevés à différentes dates entre décembre 1999 et mars 2000 permettent de conclure que peu de mutations au sein du génome du virus se sont produites et que le vecteur du genre *Culicoides* n'a apparemment pas modifié les séquences génomiques. Des études plus approfondies seraient toutefois nécessaires à plus grande échelle pour détecter des recombinaisons potentielles par le vecteur *Culicoides*.

La comparaison des trois segments génomiques 2, 7 et 10 avec les séquences trouvées en Corse en 2000, 2001, aux Etats-Unis et en Chine montre que les souches trouvées en Tunisie et en Corse en 2000 ont la même origine. La mise à disposition de séquences des trois différents segments génomiques étudiés (2, 7 et 10) de pays méditerranéens voisins permettrait d'apporter des informations complémentaires.

Remerciements

Ce travail a été financé par l'Institut français de coopération, l'ambassade de France à Tunis et le ministère tunisien de l'Agriculture. Les auteurs tiennent à remercier Mme F. Hammou et M. M.K. Ben Hamida pour leur assistance technique.

BIBLIOGRAPHIE

- BARNARD B.J.H., GERDES G.H., MEISWINKEL R., 1998. Some epidemiological and economic aspects of bluetongue-like disease in cattle in South Africa - 1995/96 and 1997. *Onderstepoort J. vet. Res.*, **65**: 145-151.
- DENNIS L., KNUDSON D.L., MONATH T.P., 1990. In: Fields B.N. Ed., *Bluetongue virus*, 2nd Edn, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, USA, p. 1654-1660.
- DULAC G.C., DUBUC C., MYERS D.J., AFSHAR A., TAYLOR E.A., 1989. Inclusion of bluetongue virus type 11 and epizootic haemorrhagic disease of deer type 2 for two consecutive years in the Okanagan Valley. *Can. vet. J.*, **30**: 351.

4. FUKUSHO A., YU Y., YAMAGUCHI Y., ROY P., 1989. Completion of the sequence of bluetongue virus serotype 10 by the characterization of a structural protein, VP6, and a non-structural protein, NS2. *J. gen. Virology*, **70**: 1677-1689.
5. HAMMAMI S., SEGHAIER C., HAMBLIN C., BEN SAID M.S., BAHRI S., 2001. Epizootie et zoonoses majeures, particularités de la fièvre catarrhale du mouton en Tunisie : Etude d'un foyer. *Bull. Epidémiol. Infect. vét.*, **18** : 1-8.
6. HUISMANS H., VAN DIJK A.A., ELS J.M., 1987. Uncoating of perennial bluetongue virus to core and sub particles in infected L cells. *Virology*, **157**: 180-188.
7. MELLOR P.S., BOORMAN J.P.T., BAYLIS M., 2000. *Culicoides* biting midges: Their role as arbovirus vectors. *Ann. Rev. Entomol.*, **45**: 307-340.
8. MERTENS P.P.C., SANGER D.V., 1985. Analysis of the terminal sequences of the genome segments of four Orbiviruses. *Virology*, **140**: 55-67.
9. OIE, 2000. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 4th Edn. www.oie.int/eng/norms/mmanual/A_00026.htm
10. QIN Q., TAI Z., WANG L., LUO Z., HU J., LIN H., 1996. Bluetongue epidemiological survey and virus isolation in Xinjiang, China. In: Bluetongue disease in Southeast Asia and the Pacific. Canberra, Australia, ACIAR, p. 67-71.
11. ROY P., GORMAN B.M., 1990. Bluetongue virus. Current topics. In: Microbiology and immunology, Vol. II. Heidelberg, Germany, Springer-Verlag, 200 p.
12. ROY P., 1992. Bluetongue virus protein. *J. Gen. Virol.*, **73**: 3051-3064.
13. SAILLEAU C., HAMBLIN C., PAWESKA J.T., ZIENTARA S., 2000. Identification and differentiation of the nine African horse virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. *J. Gen. Virol.*, **81**: 831-837.
14. VAN DIJK A.A., HUISMANS H., 1980. The in vitro activation and further characterization of the bluetongue virus associated transcriptase. *Virology*, **10**: 347-356.
15. VERWOERD D.W., ELS M.J., DE VILLIERS E.M., HUISMANS H., 1972. Structure of bluetongue virus capsid. *J. Virol.*, **10**: 783-794.
16. WADE-EVANS A.M., MERTENS P.P.C., BOSTOCK C.J., 1990. Development of the polymerase chain reaction for the detection of bluetongue virus in tissue samples. *J. Virol. Meth.*, **30**: 15-24.
17. ZIENTARA S., DE LA ROCQUE S., GOURREAU J.M., GREGORY M., DIALLO A., HENDRIKX P., LIBEAU G., SAILLEAU C., DELECOLLE J.C., 2000. La fièvre catarrhale ovine en Corse en 2000. *Epidémiol. Santé Anim.*, **38** : 133-144.
18. ZIENTARA S., SAILLEAU C., DAUPHIN G., ROQUIER C., REMOND E.M., LEBRETON F., HAMMOUMI S., DUBOIS E., AGIER C., MERLE G., BREARD E., 2002. Identification of bluetongue virus serotype 2 (Corsican strain) by reverse-transcriptase PCR reaction analysis of segment 2 of the genome. *Vet. Rec.*, **150**: 598-601.
19. ZIENTARA S., BREARD E., SAILLEAU C., COUPIER H., MURE-RAVAUD K., HAMMOUMI S., GICQUEL B., HAMBLIN C., DUBOURGET P., 2003. Comparison of genome segments 2, 7 and 10 of bluetongue viruses serotype 2 for differentiation between field isolates and the vaccine strain. *Vet. Res.*, **34**: 777-789.

Reçu le 24.10.2003, accepté le 11.06.2004

Summary

Ben Fredj S., Bréard E., Sailleau C., Zientara S., Zekri S., Boudabbous A., Hammami S. Incursion of Bluetongue in Tunisia: Molecular Characterization of Viral Strains

In December 1999, the bluetongue was declared in Tunisia. Other cases of the disease have also been reported in other countries in the Mediterranean basin. The aim of this work was to characterize viral isolates obtained during the epizootic, which occurred from December 1999 to March 2000, and to perform serotype determination. The three genomic segments, 2, 7 and 10, corresponding to the proteins VP2, VP7 and NS3/NS3A, were amplified by PCR and sequenced. Sequences of the various genomic segments obtained from Tunisian viral isolates were compared with the Corsican vaccinal and wild-type strain, as well as with other bluetongue virus strains published in GenBank. The results are presented in the form of phylogenetic trees and tables in which nucleotide sequences are compared, thus showing the common origin of the Tunisian viral strain (serotype 2) and the Corsican strain that was responsible for the October 2000 epizootic.

Key words: Sheep – Bluetongue virus – Molecular biology – Epidemiology – Nucleotide sequence – Genome – Mediterranean region – Tunisia.

Resumen

Ben Fredj S., Bréard E., Sailleau C., Zientara S., Zekri S., Boudabbous A., Hammami S. Incursión de la fiebre catarral en Túnez: caracterización molecular de los aislados virales

La fiebre catarral ovina fue declarada en Túnez en diciembre de 1999. Se han registrado también nuevos casos de fiebre catarral ovina en otros países de la cuenca mediterránea. El objetivo de este estudio consistió, inicialmente, en caracterizar los aislados virales procedentes de esta epizootia que azotó la zona de diciembre de 1999 a marzo de 2000 y, posteriormente, en determinar el origen del virus mediante filogenia molecular. Para lograr dicho objetivo, se procedió a la amplificación por PCR y a la secuenciación de los segmentos genómicos 2, 7 y 10 que correspondían, respectivamente, a las proteínas VP2, VP7 y NS3/NS3A. Se pudieron comparar secuencias de estos diferentes segmentos genómicos, procedentes de los aislamientos virales tunecinos, con la cepa viral salvaje y la cepa vacunal corsa así como con otras cepas virales de fiebre catarral ovina ya publicadas por el GenBank. Los resultados, presentados en forma de árboles filogenéticos y de tablas de comparaciones de secuencias nucleotídicas, permiten determinar el origen común de la cepa viral tunecina (serotipo 2) con la cepa viral corsa responsable de la epizootia de octubre de 2000.

Palabras clave: Ovino – Virus lengua azul – Biología molecular – Epidemiología – Secuencia nucleotídica – Genoma – Región mediterránea – Túnez.