

## **CHAPITRE II : TRAVAIL EXPERIMENTAL**

### **PREMIERE PARTIE : MATERIEL ET METHODES**

#### **I. POPULATION D'ETUDE ET ECHANTILLONS**

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur les échantillons collectés entre 2012 et 2015. Les patients qui viennent se faire consulter dans les structures médicales (ou sites sentinelles) pour un syndrome grippal ont composé notre population d'étude. Le syndrome grippal étant défini comme une apparition brutale de fièvre ( $> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) avec toux ou mal de gorge, accompagnés au moins de l'un de ces signes cliniques : congestion nasale et myalgie. Au niveau des sites un personnel médical (médecin ou infirmier) est formé pour recueillir un prélèvement de type nasopharyngé à l'aide d'écouvillons. Ces derniers sont mis dans des tubes contenant un milieu de transport viral (MTV). Le conditionnement et l'envoi de ces échantillons au laboratoire sont faits à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Une fois au laboratoire ces échantillons sont répartis en différentes fractions aliquotes et stockés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'utilisation.

#### **II. EXTRACTION DES ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUES (ADN)**

Les ADN viraux sont extraits à partir de  $200\text{ }\mu\text{l}$  de chaque échantillon, en utilisant le PureLink<sup>R</sup> Viral RNA/DNA Mini Kit du fournisseur Invitrogen (California, USA) conformément au protocole du fabricant. Les acides nucléiques sont élués dans un volume de  $50\text{ }\mu\text{l}$  et gardés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **III. DETECTION DES ADENOVIRUS PAR LA RT-PCR EN TEMPS REEL**

La détection des adénovirus a été faite par la technique de la PCR en temps réel. La réaction PCR à temps réel a été faite en utilisant le kit Anyplex II RV16 du fournisseur Seegene. C'est un kit qui permet de détecter 16 différents virus respiratoires dans une seule réaction. La réaction se répartit en 2 panels (A et B). Les adénovirus sont détectés dans le panel A. Pour chaque panel le volume réactionnel se compose comme suit :

**Tableau III** : Réaction pour les panels A et B

4X RV16 buffer	2,5 µl
Anyplex PCR Master Mix	2,5 µl
Rnase-free Water	1 µl
cDNA	5 µl
Volume total	11 µl

#### IV. CARACTERISATION MOLECULAIRE DES ADENOVIRUS

La caractérisation moléculaire des AdV respiratoires a été faite par la technique de la PCR (Polymerase Chain Reaction) classique. La PCR cible un court fragment (380 pb) dans la région hexonique du génome. Les amorces Adeno 3 et Adeno 4 (tableau 4) et l'enzyme Phusion High Fidelity PCR Master Mix du fournisseur Biolabs ont été utilisées pour l'amplification de la cible. Parmi 5338 échantillons, nous en avons testés 150 pour cette présente étude. Nous avons choisi des échantillons positifs en Adénovirus en privilégiant ceux détectés au bout de 8 cycles de PCR en tenant compte des différentes périodes de circulation (pour une meilleure couverture temporelle). Ainsi les amplicons obtenus après PCR sont envoyés pour un séquençage afin de faire une analyse phylogénétique.

L'arbre phylogénétique a été construit grâce aux séquences nucléotidiques. Les séquences HAdV disponibles dans GenBank ont été utilisés en tant que génome de référence. La version MEGA 5 a été utilisé pour la construction de l'arbre phylogénétique basé sur la méthode de Neighbor-Joining (NJ) en utilisant le modèle à distance de deux des paramètres de Kimura, avec 1000 répliques bootstrap.

**Tableau IV**: Séquence des amorces utilisées pour la PCR Classique

Amorces	Tm	séquences	Position
<b>Adeno 3</b> (sens)	62,5 °C	5'-CCT TTG GCG CAT CCC ATT CT-3'	<b>687 - 706</b>
<b>Adeno 4</b> (anti sens)	62,7 °C	5'-GCG CTT GTC ATA GGT GCC CA-3'	<b>21825 - 21806</b>

Le mix réactionnel est le suivant :

Réactifs pour le mix	Pour 1 tube
Nuclease free DNA	15 µL
Primer Forward (10 µM)	2,5 µL
Primer Reverse (10 µM)	2,5 µL
2X Phusion Master Mix	25 µL
Template DNA	5 µL
Volume total	50 µL

Le programme utilisé avec le thermocycleur ([DNA Engine, Tetrad 2, Peltier Thermal Cycler](#), numéro de série : [AL103371, BioRad](#)) est le suivant :

ETAPE	TEMPERATURE	DUREE	CYCLES
Dénaturation initiale	98°C	30 secondes	1
Dénaturation	98°C	10 secondes	40
Hybridation des amorces	60°C	30 secondes	
Elongation	72°C	30 secondes	
Elongation terminale	72°C	10 minutes	1
Fin	4°C	indéterminée	

Chaque produit d'amplification (7µl de chaque échantillon) est visualisé sur un gel d'agarose à 2% par électrophorèse (migration à 100 volts pendant 50 mn). Le gel est coloré par une solution de bromure d'éthidium (BET) à une concentration de 0.5µg/ml puis visualisé sous ultra-violet (UV). Les échantillons qui apparaissent avec une bande nette sont considérés comme positifs et sont conservés à -20 °C. Ces produits PCR sont ensuite quantifiés au NanoDrop ([Thermo Scientific NanoDrop Lite Spectrophotometer, Madison, WI, Made in USA conforme to STD. UL61010-1 Cert. To CSA Std. C22.2#61010.1](#)) avant un envoi en séquençage.

Les séquences obtenues sont analysées avec les outils bioinformatiques BioEdit v7.0.5, GeneStudio v2.2.0.0 (pour les alignements) et Mega 5 (pour l'analyse phylogénétique).

## **DEUXIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION**

## I. RESULTATS

### 1. DONNEES DEMOGRAPHIQUES

Pendant ces 4 années consécutives de surveillance virologique 5338 échantillons ont été testés pour le diagnostic de différents virus respiratoires : 1212 (22.7%) en 2012, 1520 (28.5%) en 2013, 1930 (36.1%) en 2014 et 676 (12.7%) en 2015.

Les hommes représentent 2634 (49.3%), les femmes 2672 (50.1%), avec un ratio homme-femme de 0.99. Pour 32 (0.6%) patients, le sexe n'a pas été rapporté. L'âge des patients variait de 1 mois à 95 ans avec un âge moyen de 10 ans 5 mois et un âge médian de 4 ans. Au total, 2803 échantillons (52.5%) ont été obtenus auprès d'enfants de moins de cinq ans (1294 filles et 1509 garçons); 1911 échantillons (35.8%) sont constitués par des enfants et des adultes âgés de 5 à 50 ans (902 femmes et 1009 hommes); 142 échantillons (2.7%) d'adultes de plus de 50 ans. Pour 482 (9%) patients, l'âge n'a pas été rapportée.

Les symptômes cliniques les plus fréquents étaient la fièvre (98.5%; 5257/5338), la toux (85.3%; 4554/5338), la rhinite (54.7%; 2919/5338) et la pharyngite (50.1%; 2676/5338). D'autres symptômes respiratoires tels que des vomissements, la diarrhée ou des douleurs abdominales ont été observées chez certains patients mais à faible pourcentage.

Sur cette période de Janvier 2012 à Mai 2015, nous avons constaté que les enfants de moins de 5 ans représentaient les 2/3 des cas d'infection à AdV lors des consultations pour un syndrome grippal avec un pourcentage de 63% (1086/1723). Par rapport au nombre de détections d'AdV (1723), le sexe masculin était légèrement prédominant soit un sexe ratio de 1.03 (874/842) avec 7 cas de sexe non déterminé.

### 2. DETECTION

Sur les 5338 échantillons testés par la technique RT-PCR en temps réel 1723 échantillons étaient positifs pour les adénovirus, soit 32.3%. Parmi les 1723 positifs, le nombre de cas en mono-infection adénovirale était de 340 échantillons soit 19.7%. En effet plusieurs cas de co-détections ont été notés entre AdV/influenza (990 échantillons ; 57.5%), AdV/rhinovirus (542 échantillons ; 31.5%), AdV/VRS (242 échantillons ; 14%), AdV/entérovirus (360 échantillons ; 20.9%), AdV/bocavirus (135 échantillons ; 7.8%), AdV/MPV (59 échantillons ; 3.4%), AdV/coronavirus (96 échantillons ; 5.5%) (**tableau 5**). Par comparaison aux autres virus détectés

dans cette même étude, les adénovirus représentaient le 3<sup>e</sup> groupe de virus prédominants derrière les virus grippaux (50.8%) et les Picornaviridae respiratoires (41.7%).

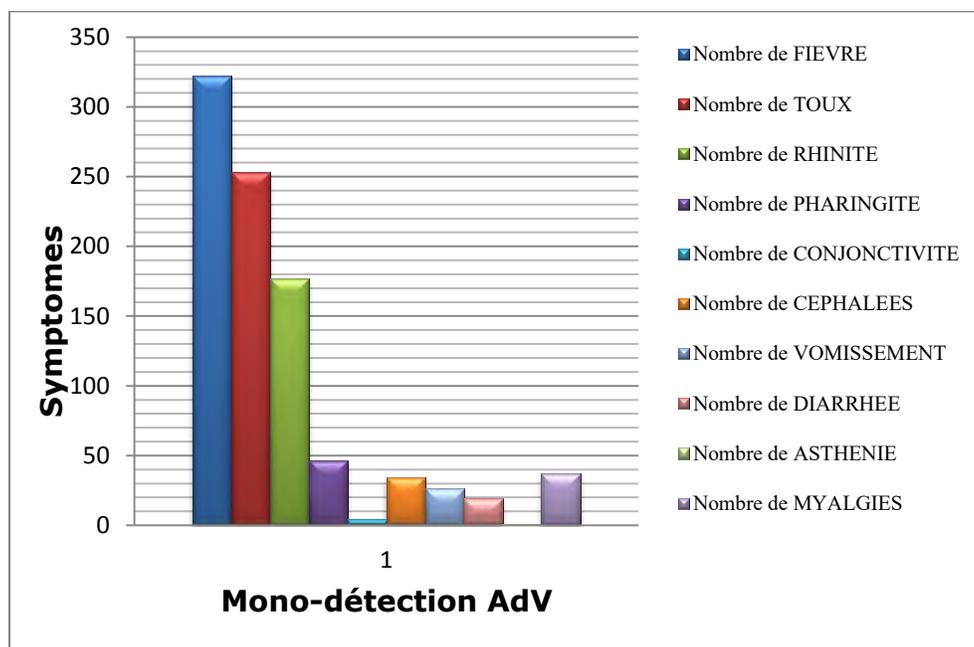
**Tableau V:** Nombre et pourcentage de co-détectons entre les AdV et les autres virus respiratoires

	Influenza.	Rhino.	VRS	Entero.	Boca.	Métapneumo.	Corona.
AdV	990	542	242	360	135	59	96
Taux (%)	57.5	31.5	14	20.9	7.8	3.4	5.5

### a. SYMPTOME DES MONO-INFECTIONS ADENOVIRUS

Les figures 7 et 8 montrent respectivement le pourcentage de signes cliniques pour les mono et de co-infections.

Chez les patients souffrants d'une mono infection à AdV, il est noté un taux important de fièvre (94.7%), de toux (74.4%), de rhinite (52.1%), de pharyngite (14%). D'autres signes comme les céphalées, les vomissements, les asthénies ont été notées avec des taux inférieures à 12 %.

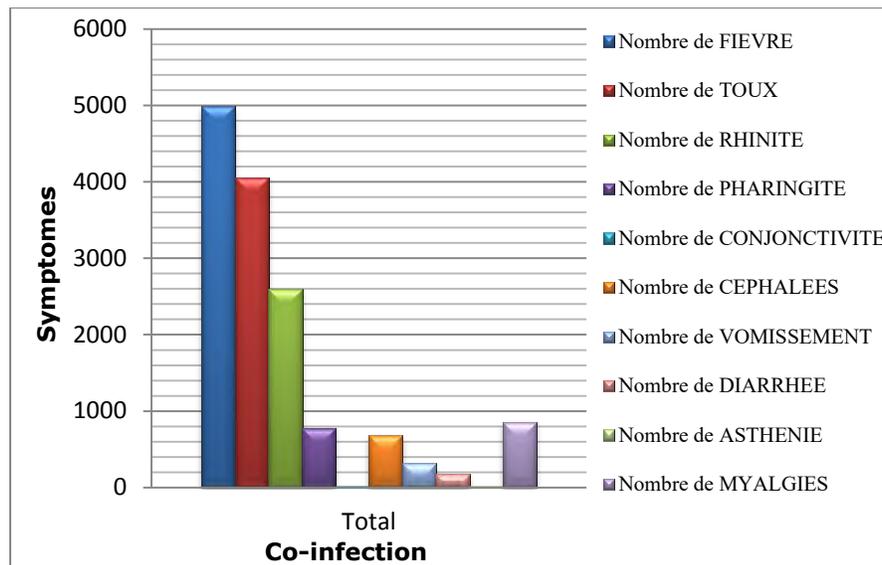


Total mono-infection AdV: 340

**Figure 7:** Signes cliniques chez les cas de mono-détection à AdV

### b. SYMPTOME DES CO-INFECTIONS

Pour les co-détections, les patients présentaient de la fièvre (93.5%), de la toux (76%), de la rhinite (48.7%), des myalgies (16%), de la pharyngite (14.5%).

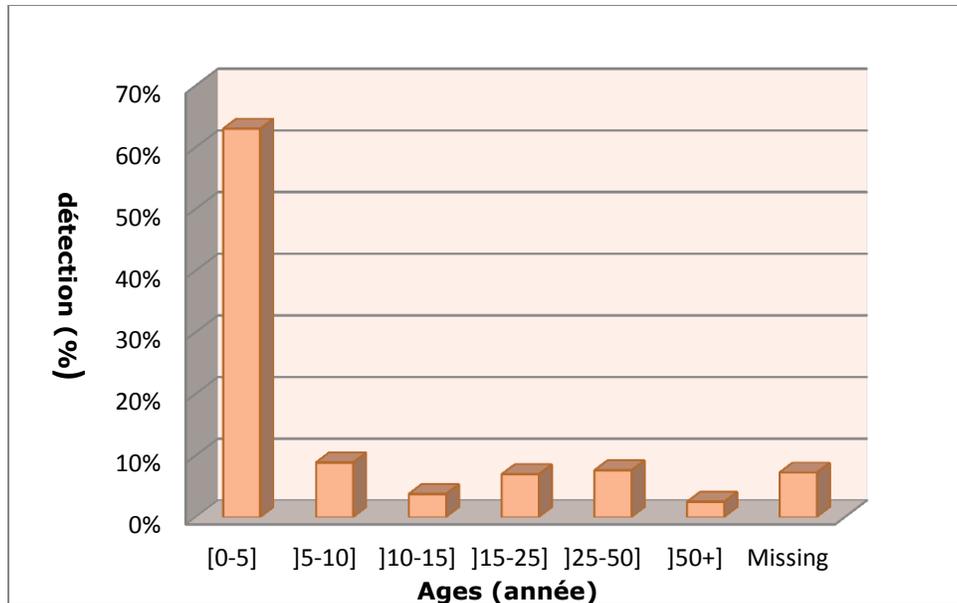


Total : 5338

**Figure 8:** Signes cliniques chez les cas en co-détection

### 3. REPARTITION SELON L'AGE DES PATIENTS

La répartition des cas positifs d'AdV respiratoires par tranche d'âge montre une nette différence. Les AdV sont identifiés majoritairement chez les enfants de 0 à 5 ans avec un taux de détection de 63% (1086/1723) suivis des classes d'âge ]5-10] avec 8.9% (153/1723), ]25-50] avec 7.6% (131/1723), ]15-25] avec 7% (120/1723) (figure 9). Chez les autres groupes, les taux de détection sont inférieurs à 4%.

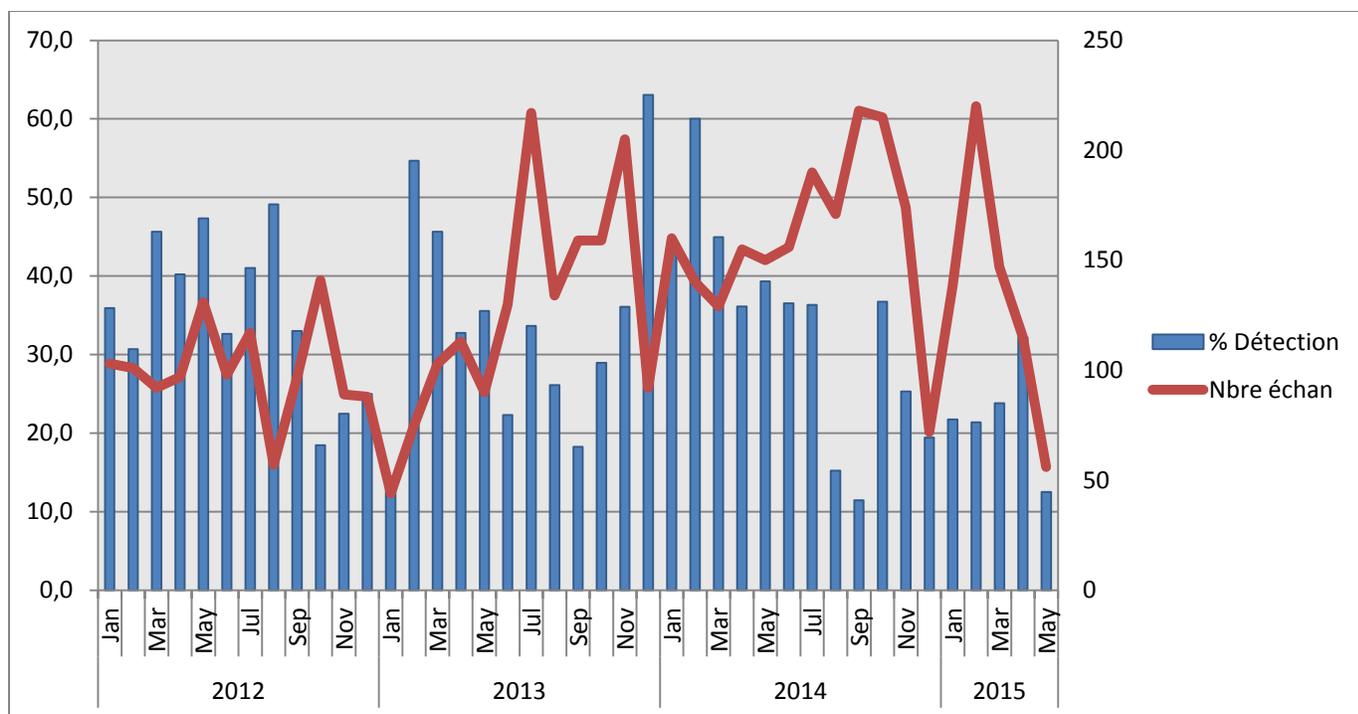


**Figure 9:** La répartition des cas positifs en AdV en fonction des tranches d'âge

#### 4. PROFILS DE CIRCULATION DES VIRUS

##### a. PROFIL DE CIRCULATION TEMPORELLE DES ADENOVIRUS

Les données obtenues au cours de ces 4 années de surveillance montrent une circulation assez régulière des AdV pendant toute l'année avec des pics. L'année 2012 montre un niveau de circulation important des AdV pendant toute l'année avec des pics de circulation autour des mois de Mai et Septembre ([figure 10](#)). Le niveau de circulation des AdV est beaucoup plus important entre 2013 et 2015 avec des pics d'intensité supérieure. Globalement nous observons une bonne circulation des adénovirus tout au long de l'année.

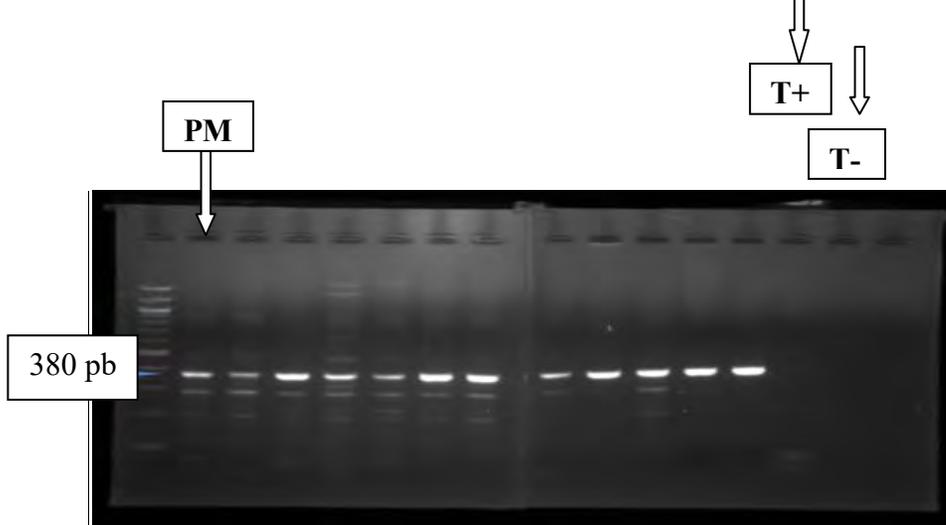


**Figure 10:** Répartition temporelle des adénovirus durant les années 2012, 2013, 2014 et 2015

### b. LA CARACTERISATION MOLECULAIRE DES ADENOVIRUS

Un total de 140 échantillons ont été sélectionnés (27 en 2012, 35 en 2013, 33 en 2014 et 45 en 2015) parmi lesquels 115 amplifications sont apparues positives (figure 11). Sur ces dernières, 66 amplicons ont été envoyés en séquençage. Nous avons obtenu 50 séquences exploitables dont 6 de 2012, 13 de 2013, 11 de 2014 et 20 de 2015. La taille des génomes varie de 26 à 45 kpb (elle est d'environ 36 kpb pour les adénovirus 2 et 5 humains).

Les analyses phylogénétiques montrent la présence de 3 types d'AdV au Sénégal (figure 12) : AdV-B, AdV-C et AdV-E. Le type C étant largement le plus représenté.



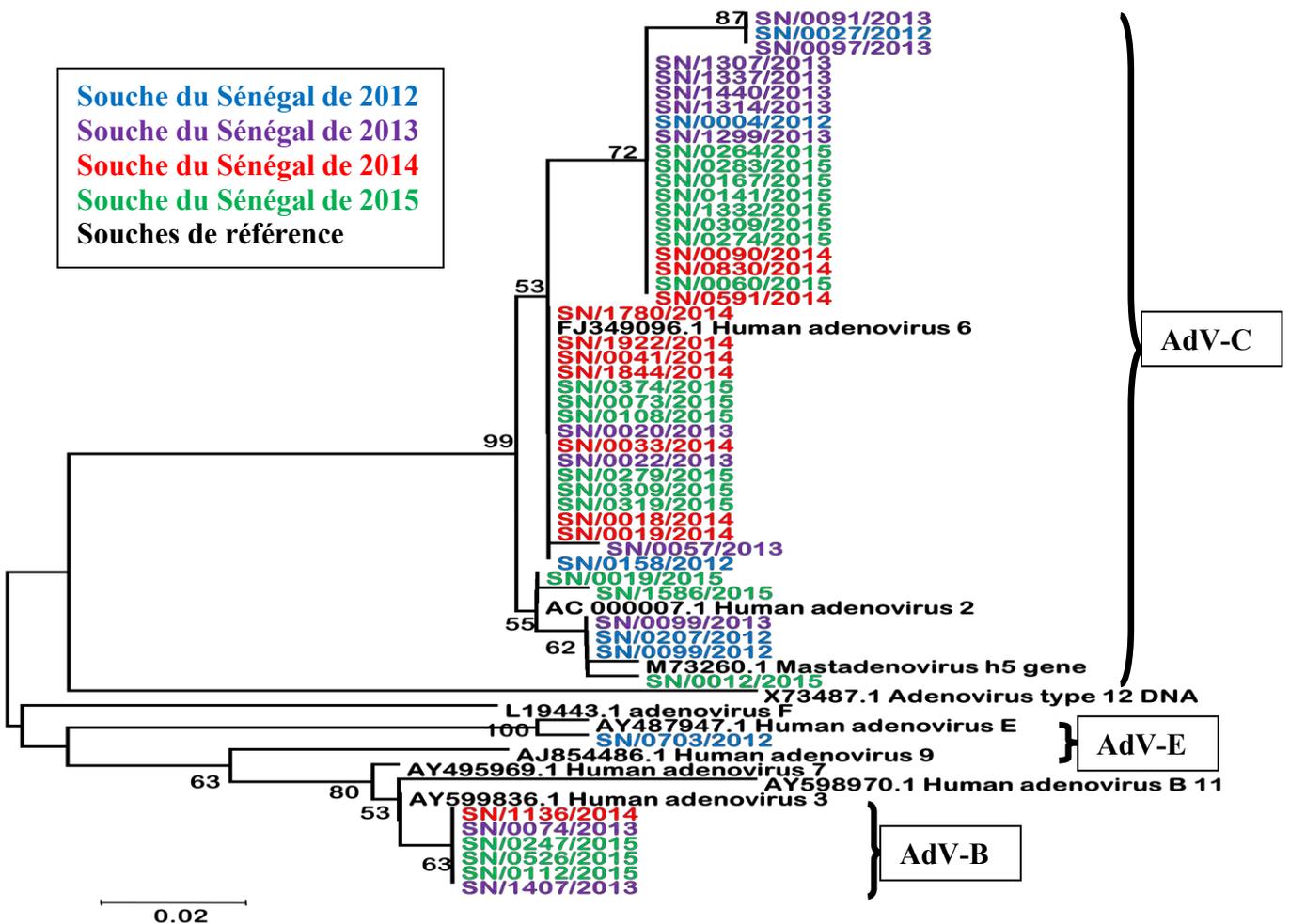
PM = Marqueur Moléculaire

Pb = Paire de base

T+ = Témoin positif

T- = Témoin négatif

**Figure 11** : Résultats de la migration par électrophorèse de 10 produits d'amplification d'AdV, la taille de l'amplicon attendu est de 380 pb.



**Figure 12:** Arbre phylogénétique basé sur le génome. Les couleurs désignent les séquences d'adénovirus détectés au Sénégal entre 2012-2015 ; en noir les souches de références.

## II. DISCUSSIONS

Le but de cette étude rétrospective est de mieux comprendre l'épidémiologie moléculaire et les caractéristiques des adénovirus chez les personnes souffrants de syndrome grippal au Sénégal entre 2012 et 2015. Au total 5338 échantillons ont été testés par la technique RT-PCR en temps réel dont 1211 (22.7%) de 2012, 1521 (28.5%) de 2013, 1930 (36.1%) de 2014 et 676 (12.7%) de 2015. Notre étude montre une circulation importante des AdV chez les personnes souffrantes du syndrome grippal au Sénégal avec un taux de détection global de 32.3% soit 1723. Ce taux est loin d'être négligeable car comparé à des études faites ailleurs dans le monde, il semble varier entre les pays. En effet [Breiman et al.](#), (2015) enregistrent un pourcentage plus faible, 20% au Kenya ; [Proenca-Modena et al.](#), en 2012 enregistrent 29.8% au Brésil ; [Calvo et al.](#), (2016), 15% en Espagne ; [Peng et al.](#), (2015), 14.3% en Chine et [Finianos et al.](#), (2016), 10% au Liban. Un pourcentage plus élevé, 50.8% a été rapporté par [Esposito et al.](#), (2016) dans une étude menée en Italie. Notre taux de détection adénovirale est néanmoins semblable à ce qui a été noté dans une étude menée sur des patients souffrant de syndrome grippaux en Alaska par [Singleton et al.](#), (2010) 30%. Cependant au-delà des facteurs géographiques et épidémiologiques, ces disparités peuvent être expliquées par la différence de sensibilité des méthodes de diagnostic. En intégrant les autres virus détectés, les données obtenues montrent que les virus grippaux représentent la première étiologie virale des cas de syndrome grippal avec un taux de 50.8% (2712 échantillons), suivis du groupe rhinovirus/entérovirus (41.7%), les adénovirus (32.3%) étant le 3<sup>e</sup> groupe viral. Cette valeur est supérieure à celles qui ont été rapportées dans la plupart des études.

Les signes cliniques sont notés dans des proportions similaires entre les cas de mono-infection et ceux de co-infections avec des différences peu significatives. Il n'existe pas de caractéristiques cliniques permettant de distinguer de manière significative les infections à AdV des autres virus respiratoires ([Julia et al.](#), 2012). Dans notre étude, en dehors de la fièvre qui est le premier critère d'inclusion, les signes les plus représentatifs sont la toux et la rhinite, présentes respectivement (74,4% et 52,1%) en mono-infection et (76% et 48,7%) en co-infection. Ainsi l'analyse a montré

que les symptômes ne permettent pas de distinguer les cas de mono-infections à AdV des cas de co-infections adénovirus et autres virus.

Les enfants de moins de 5 ans ont montré le taux de détection le plus élevé avec 63 %. Ce résultat concorde avec plusieurs autres études ([Robinson et al., 2007](#), [Lenaerts et al., 2008](#), [Flomenberg., 2009](#) et [Julia et al., 2012](#)) qui stipulent que les enfants sont particulièrement sujets aux infections à adénovirus avec des taux pouvant dépasser 60%. [Cooper et al., \(2000\)](#) ont montré que, tôt dans la vie, les enfants étaient infectés par les Adénovirus ; ce qui leur confère une immunité précoce à l'origine de la baisse des cas d'infection adénovirale chez les groupes plus âgés.

Notre étude montre que les AdV circulent tout au long de l'année mais leur niveau de circulation diffère d'une année à l'autre. L'évolution de ce virus se fait durant toute l'année, sur un fond endémique avec des pics épidémiques. Ce profil de circulation a été constaté par [Cooper et al., \(2000\)](#) en Angleterre.

Une étude en Chine montre que les AdV circulent beaucoup en été et en Automne, néanmoins ils étaient présents tout au long de l'année ([Liu et al., 2014](#)). [Selvaraju et al., \(2011\)](#) rapportent que l'infection à HAdV est plus fréquente au printemps au Brésil, en automne et en hiver en Israël et en hiver aux Etats-Unis. Ces différents résultats semblent montrer que les infections à AdV souvent liées à un sérotype donné, s'observent toute l'année avec une légère recrudescence saisonnière en fonction du contexte climatique.

Au cours des quatre années de surveillance, nous n'avons constaté aucune saisonnalité des infections à HAdV. Elles ne semblent pas être favorisées par la saison des pluies comme les virus grippaux, les rhinovirus ou virus respiratoire syncytial ([Niang et al., 2012](#) ; [Fall et al., 2016](#)). Cette absence de saisonnalité de l'infection HAdV a été décrite dans d'autres pays d'Amérique du Sud comme la Colombie ([Herrera-Rodriguez et al., 2007](#)), le Chili ([Palomino et al., 2004](#)), le Brésil ([Alonso et al., 2012](#)) et le Pérou aussi ([Julia et al., 2012](#)).

L'analyse phylogénique des AdV révèle la présence de 3 types au Sénégal : Adénovirus de type B, de type C et de type E. Sur la base des 50 échantillons qui ont été séquencés, les sérotypes 2, 5, 6 de l'espèce C (86%) sont les plus représentés, l'HAdV-B1 (type 3) avec 12 % et l'HAdV-E4, le seul membre avec 2% ont été enregistrés. Cette distribution corrobore avec le constat de [Tabain et al., \(2012\)](#) qui disait que le sous-groupe C était régulièrement associé à des cas d'infections respiratoires à Adénovirus. Les 3 types retrouvés au Sénégal ont été confirmés par les études de