

## SOMMAIRE

|                    |   |
|--------------------|---|
| INTRODUCTION ..... | 1 |
|--------------------|---|

### PREMIERE PARTIE: DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

|   |    |
|---|----|
| I. GENERALITES SUR LE VIRUS ET LA FIEVRE CHIKUNGUNYA..... | 4  |
| I. 1 LE VIRUS CHIKUNGUNYA.....                            | 4  |
| I.1.1 Classification .....                                | 4  |
| I.1.2 Structure et Organisation .....                     | 4  |
| I.1.2.1 L'enveloppe .....                                 | 5  |
| I.1.2.2 La nucléocapside .....                            | 5  |
| I.1.2.3 Le génome viral .....                             | 6  |
| I.1.3 Cycle cellulaire .....                              | 6  |
| I.2 LA FIEVRE CHIKUNGUNYA .....                           | 7  |
| I.2.1 Manifestations cliniques .....                      | 7  |
| I.2.2 Diagnostic, prévention, traitement .....            | 8  |
| I.2.2.1 Diagnostic .....                                  | 8  |
| I.2.2.1.1 L'isolement .....                               | 8  |
| I.2.2.1.2 Le diagnostic sérologique .....                 | 8  |
| I.2.2.1.3 Le diagnostic moléculaire .....                 | 9  |
| I.2.2.2 Prévention .....                                  | 9  |
| I.2.2.3 Traitement .....                                  | 10 |
| I.2.3 Epidémiologie .....                                 | 10 |
| I.2.3.1 Distribution géographique .....                   | 10 |
| I.2.3.2 Les épidémies .....                               | 12 |
| I.2.3.3 Cycle de transmission .....                       | 13 |
| II. LE VIRUS CHIKUNGUNYA AU SENEGAL .....                 | 15 |

### DEUXIEME PARTIE: MATERIEL ET METHODES D'ETUDE

|  |    |
|--|----|
| I. MATERIEL BIOLOGIQUE .....   | 19 |
| I. 1. Les souches virales .....                                      | 19 |
| I. 2. Les cellules .....   | 19 |
| II. METHODES D'ETUDE .....   | 21 |
| II. 1 Plan d'étude .....   | 21 |
| II. 2 Préparation de stock viral .....                               | 22 |
| II. 2. 1. Préparation de milieu de culture pour cellules AP 61 ..... | 22 |
| II. 2.1.1 Exemple pratique .....                                     | 23 |
| II. 2. 2 Culture cellulaire : type AP 61 .....                       | 23 |

|  |    |
|--|----|
| II. 2.2.1 Objectif .....   | 23 |
| II. 2.2.2 Mode opératoire .....  | 23 |
| II. 2. 3 Infection des cultures cellulaires .....                                    | 24 |
| II. 2.3.1 Mise en suspension des virus .....   | 24 |
| II. 2.3.2 Infection .....  | 24 |
| II. 2. 4 Immunofluorescence indirecte (IFI) .....                                    | 25 |
| II. 2.4.1 Principe .....   | 25 |
| II. 2.4.2 Mode opératoire .....  | 25 |
| II. 3 Extraction d'ARN à partir des surnageants viraux .....                         | 26 |
| II. 3.1 Principe .....   | 26 |
| II. 3.2 Mode opératoire .....  | 27 |
| II. 4 Choix des méthodes de RT-PCR .....   | 27 |
| II. 5 Transcription inverse (RT) et Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ..... | 28 |
| II. 5. 1 Transcription inverse (RT) .....  | 28 |
| II. 5.1.1 Principe .....   | 28 |
| II. 5.1.2 Mode opératoire .....  | 29 |
| II. 5. 2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) .....                            | 29 |
| II. 5.2.1 Principe .....   | 29 |
| II. 5.2.2 Mode opératoire .....  | 30 |
| II.2.6 Evaluation de la méthode RT-PCR .....   | 33 |
| II.2.6.1 Titrage des stocks viraux .....   | 33 |
| II. 2.6.1.1 But .....  | 33 |
| II. 2.6.1.2 Mode opératoire .....  | 33 |
| II.2.6.2 Détermination de la spécificité .....                                       | 35 |
| II.2.6.3 Détermination du seuil de détection .....                                   | 35 |
| II.2.6.4 Détermination de la répétabilité .....                                      | 36 |
| II.2.6.5 Mise au point de nouvelles amorces .....                                    | 36 |
| II.2.7 Etude de la variabilité moléculaire .....                                     | 36 |
| II.2.7.1 Séquençage .....  | 36 |
| II. 2.7.1.1 But .....  | 36 |
| II. 2.7.1.2 Purification des produits PCR .....                                      | 37 |
| II. 2.7.1.3 Analyse des séquences .....  | 37 |
| II.2.7. 2 Analyse phylogénétique .....   | 38 |

## **TROISIEME PARTIE: RESULTATS ET DISCUSSION**

|  |    |
|--|----|
| <b>I. RESULTATS</b> .....  | 40 |
| I.1 Titrage des stocks viraux .....                                    | 40 |
| I.2 Diagnostic par RT-PCR .....  | 40 |
| I.3 Evaluation de la RT-PCR .....                                      | 41 |
| I.3.1 Détermination de la spécificité .....                            | 41 |
| I.3.2 Mise au point de nouvelles amorces .....                         | 42 |
| I.3.3 Evaluation des amorces Chik 428S 17 et Chik 729C 17 .....        | 45 |
| I.3.3.1 Diagnostic RT-PCR .....  | 45 |
| I.3.3.2 Spécificité des amorces Chik 428S 17/Chik 729C 17 .....        | 46 |
| I.3.3.3 Seuil de détection des amorces Chik 428S 17/Chik 729C 17 ..... | 46 |
| I.4 Variabilité moléculaire .....                                      | 47 |
| I.4.1 Analyse des séquences .....                                      | 47 |
| I.4.2 Analyse phylogénétique .....                                     | 50 |
| <b>II. DISCUSSION</b> .....  | 52 |
| II.1. Diagnostic moléculaire .....                                     | 52 |
| II.2 Variabilité moléculaire .....                                     | 53 |
| <br><b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....                            | 54 |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....                               | 55 |

## ABREVIATIONS

|                  |  |
|------------------|--|
| ° C              | Degré celsius                            |
| ADN              | Acide désoxyribonucléique                |
| ADN <sub>C</sub> | Acide désoxyribonucléique complémentaire |
| AP 61            | <i>Aedes pseudoscutellaris</i> clone 61  |
| ARN              | Acide ribonucléique                      |
| CHIK             | Chikungunya                              |
| ECSA             | East Central South Africa                |
| ELISA            | Enzyme-linked immunosorbant assay        |
| IFI              | Immunofluorescence indirecte             |
| IgM              | Immunoglobuline M                        |
| IgG              | Immunoglobuline G                        |
| mn               | minute                                   |
| ml               | millilitre                               |
| OMS              | Organisation Mondiale de la Santé        |
| pb               | Paire de bases                           |
| PBS              | Phosphate Buffer Salt                    |
| PCR              | Polymerase Chain Reaction                |
| RT               | Reverse Transcriptase                    |
| UFP              | Unité Formant Plage                      |

## INTRODUCTION

La fièvre Chikungunya (CHIK) est une maladie virale transmise principalement par des moustiques du genre *Aedes* (Robinson., 1955 ; Jupp et MacIntosh., 1988). Récemment, cette maladie a connu une recrudescence dans le monde avec des épidémies notamment à l'île de La Réunion en 2005 avec 266 000 personnes infectées, en Inde avec 1 400 000 cas rapportés en 2006 (Pialoux *et al.*, 2007), en République Démocratique du Congo (Pastorino *et al.*, 2004), au Cameroun (Kuniholm *et al.*, 2006), au Gabon<sup>1</sup> et au Sénégal (Sall., données publiées).

Le virus CHIK circule en Afrique subsaharienne, en Asie et dans l'Océan indien. Il existe trois génotypes du virus CHIK: « ouest africain », « Afrique centrale, de l'est et du sud » (ECSA), et « asiatique » (Powers *et al.*, 2000 ; Schuffenecker *et al.*, 2006).

La maladie se manifeste par de la fièvre, des céphalées et surtout par des atteintes articulaires ou arthralgies qui peuvent persister des mois voire des années (Jupp et MacIntosh., 1988) d'où le caractère invalidant de la maladie qui peut dans certains cas devenir un réel problème de santé publique avec des répercussions socio-économiques importantes lorsqu'elle conduit à des absences ou hospitalisations massives ou quand elle a des incidences sur le secteur touristique.

La circulation active du virus CHIK au Sénégal et le contexte de recrudescence mondiale de cette infection notamment dans l'Océan indien, en Afrique centrale et en Asie (Inde, Indonésie...) impliquent qu'une stratégie de prévention et de contrôle efficace soit mise en place. Par conséquent, il est essentiel de disposer d'une approche et de méthodes de diagnostic performantes pour une identification précoce des foyers épidémiques. Dans un tel contexte, les méthodes moléculaires de diagnostic (*i.e.* RT-PCR classique, nichée ou en temps réel) peuvent jouer un rôle déterminant pour plusieurs raisons : i) elles permettent d'identifier les patients virémiques qui sont ceux qui transmettent l'infection ; ii) elles sont plus rapides et plus sensibles que l'isolement viral et donnent des informations assez similaires ; iii) elles sont complémentaires des méthodes sérologiques qui sont le plus souvent utilisées et permettent de les renforcer.

Cependant, les méthodes moléculaires actuellement utilisées ne tiennent pas assez compte des souches d'Afrique de l'ouest ou ont été insuffisamment évaluées pour cette zone géographique. Ainsi, parmi les méthodes disponibles actuellement (Pfeffer *et al.*, 1997-2002 ; Hasebe *et al.*, 2002 ; Pastorino *et al.*, 2004 ; ...), très peu de souches d'Afrique de l'ouest ont

---

<sup>1</sup> Ministère gabonais de la santé : [www.promedmail.org](http://www.promedmail.org); numéro d'archive 20070519.1591 dernière visite Décembre 2007

été évaluées. De plus, la variabilité moléculaire qui joue un rôle dans le développement de méthodes de diagnostic moléculaire a été peu étudiée pour les souches isolées en Afrique de l'ouest.

Dans ce mémoire de DEA, nous nous sommes fixés comme objectif principal d'améliorer et de développer le diagnostic moléculaire du virus CHIK au Sénégal et en Afrique de l'ouest et d'analyser sa variabilité moléculaire.

Ainsi les objectifs spécifiques suivants ont été retenus :

1. Evaluer les méthodes de diagnostic moléculaires actuellement disponibles sur les souches du Sénégal et de l'Afrique de l'ouest ;
2. Développer et évaluer une méthode de RT-PCR pour les souches de CHIK circulant en Afrique de l'ouest au cas où les méthodes existantes ne donneraient pas de résultats satisfaisants ;
3. Evaluer et analyser la variabilité moléculaire du virus CHIK en Afrique de l'ouest.

# **PREMIERE PARTIE : DONNES BIBLIOGRAPHIQUES**

## **I. GENERALITES SUR LE VIRUS ET LA FIEVRE CHIK**

Le mot « Chikungunya » est un terme issu d'un dialecte local swahili employé pour la première fois par les peuples de la province Sud du Tanganyika (Tanzanie) suite à une épidémie qui les a affectés en 1952-1953. Il signifie « courbé en avant » en raison de la posture adoptée par les malades (Jupp et MacIntosh., 1988).

Il s'agit d'une maladie due au virus CHIK isolé pour la première fois en 1953 au décours d'une épidémie de fièvre qui sévissait sur le plateau du Makonde dans la province de Newala au Tanganyika, l'actuelle Tanzanie (Robinson., 1955 ; Jupp et MacIntosh., 1988). Elle se manifeste par de la fièvre, des céphalées mais principalement par des atteintes articulaires ou arthralgies. Le virus est principalement transmis par des moustiques du genre *Aedes* (Jupp et MacIntosh., 1988). Il circule en Afrique, en Asie et dans l'Océan indien.

Avant 1952, il semble que des épidémies décrites dans la littérature aient pu être causées par le virus CHIK. Ainsi, Carey a émis l'hypothèse que certaines épidémies attribuées au virus de la dengue comme celles du Caire et Batavia-Jakarta en 1779, de Zanzibar en 1823 et 1870, de l'Inde en 1824-1825 et 1871-1872, de Hong Kong, de la Birmanie (actuel Myanmar) ou Madras en 1901-1902, étaient en fait des épidémies de CHIK (Carey *et al.*, 1969).

## **I. 1 LE VIRUS CHIKUNGUNYA**

### **I.1.1 Classification**

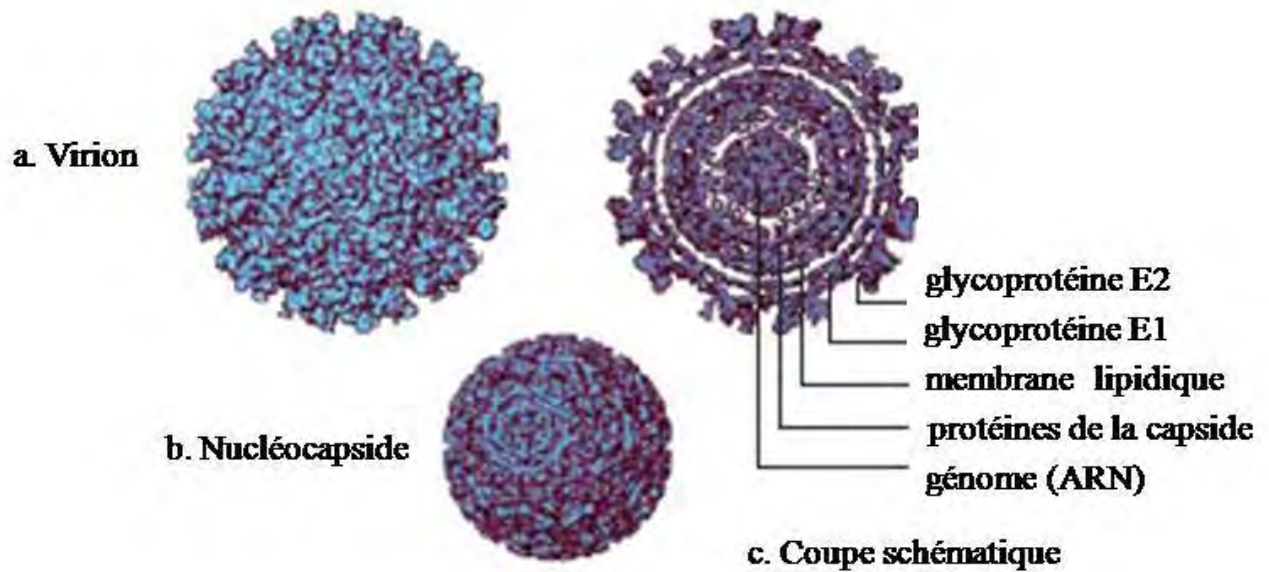
Le virus CHIK est un arbovirus de la famille des *Togaviridae* et du genre *Alphavirus* qui compte 28 membres dont certains provoquent des infections chez l'homme. Il s'agit des virus Chikungunya (CHIK), O'Nyong Nyong (ONN), Ross River (RR), Barmah Forest (BF), Sindbis (SIN) et Mayaro (MAY). Les alphavirus forment 7 complexes antigéniques, le virus CHIK appartenant au complexe Semliki Forest (Jupp et MacIntosh., 1988 ; Strauss et Strauss., 1994).

### **I.1.2 Structure et Organisation**

Le virus CHIK est enveloppé de 60-70 nm de diamètre dont le génome est un ARN simple brin à polarité positive. Il est sensible à la dessiccation et aux températures voisines de + 58°C (Zhang *et al.*, 2002).

Le virion est une particule sphérique composée de trois parties : l'enveloppe, la nucléocapside et le génome viral (figure 1).





**Figure1. Structure des Alphavirus**

a. Virion ; b. Nucléocapside ; c. Coupe schématique

#### **I.1.2.1 L'enveloppe**

Il s'agit d'une enveloppe lipoprotéique de forme sphérique, d'une épaisseur d'environ 4,8 nm et dérivée de la membrane cellulaire de la cellule hôte. Dans cette enveloppe, on note deux sous unités glycoprotéiques principales E1 et E2, une sous- unité E3 accessoire et la 6K. E1 et E2 sont toutes les deux glycosylées (Strauss et Strauss., 1994).

E1 est responsable de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule hôte (Mukhopadhyay *et al.*, 2006).

E2 est impliquée dans les mécanismes de fixation et de bourgeonnement du virus (Mukhopadhyay *et al.*, 2006).

E3 est associée au virus dans certains cas (Strauss et Strauss., 1994).

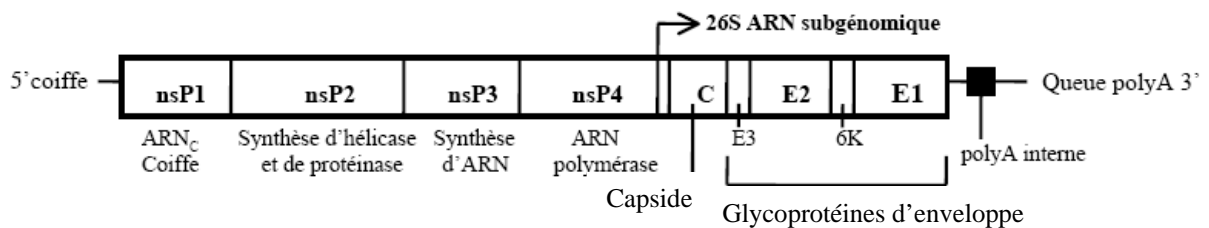
La 6K est impliquée dans l'assemblage des particules virales (Strauss et Strauss., 1994).

#### **I.1.2.2 La nucléocapside**

Elle est constituée de 240 monomères de la protéine de capsid d'un poids de 30 Kda, formant un complexe de forme icosaédrique enveloppant l'ARN viral (Strauss et Strauss., 1994).

### I.1.2.3 Le génome viral

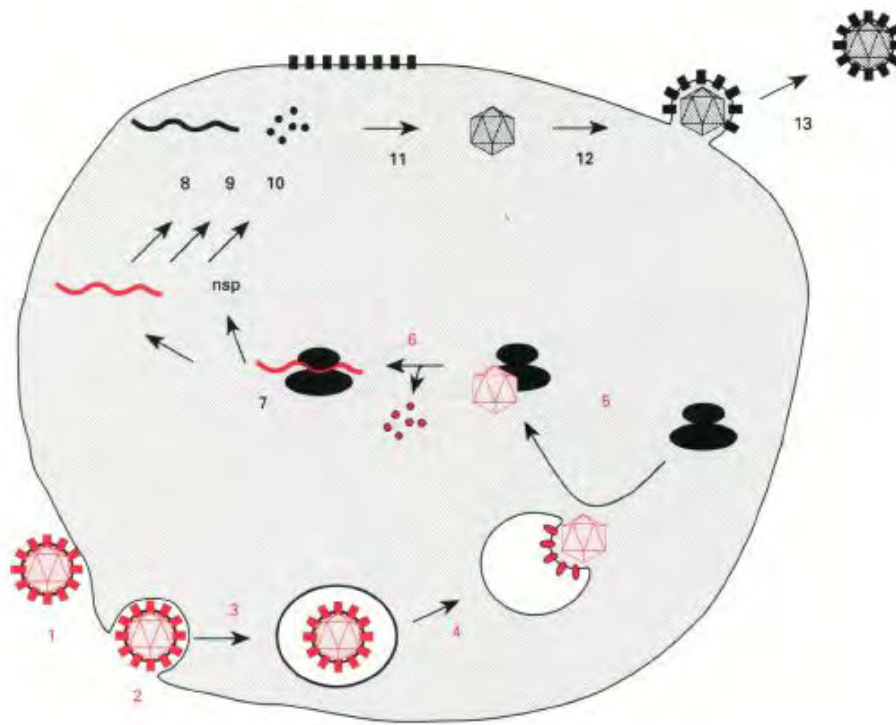
Le génome du virus CHIK est un un ARN simple brin d'environ 11 805 nucléotides avec une coiffe méthylée à l'extrémité 5' et une queue polyadénylée à l'extrémité 3'. Il est organisé en une région codante, subdivisée en deux parties codant respectivement pour les protéines non structurales (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) et structurales (C, E3, E2, 6K, E1) (Khan *et al.*, 2002) et flanquée d'une région 5' et 3' non codante (figure 2). Les protéines non structurales et structurales ainsi que leurs fonctions sont indiquées dans la figure 2.



**Figure 2. Organisation du génome des alphavirus**

### I.1.3 Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire du virus CHIK est présenté dans la figure 3. Le virus se fixe d'abord sur des récepteurs membranaires de la cellule hôte avant d'être internalisé par endocytose pour se retrouver dans le cytoplasme à l'intérieur d'une vacuole appelée endosome. Après fusion de l'enveloppe virale avec celle de l'endosome, la nucléocapside libérée s'associe aux ribosomes pour se décapsider et libérer l'ARN génomique dans le cytoplasme cellulaire. L'ARN génomique va servir de matrice pour la synthèse de l'ARN complémentaire (ARN<sub>C</sub> brin négatif) qui à son tour va être utilisée pour la synthèse d'ARN génomique (brin positif) et d'ARN subgénomique (brin positif) ou ARN 26S. Les ARN génomique et subgénomique nouvellement synthétisés vont permettre la synthèse des protéines non structurales et structurales (Lanzrein *et al.*, 1994) respectivement. Aussi ; l'ARN génomique sera encapsidé pour former de nouveaux virions.



**Figure 3. Cycle de réplication des alphavirus**

1 : fixation du virus sur les récepteurs membranaires de la cellule hôte ; 2 : internalisation par endocytose ; 3 : virus dans le cytoplasme cellulaire à l'intérieur d'un endosome ; 4 : fusion de l'enveloppe virale et libération du virus sans enveloppe ; 5 : association de la capside aux ribosomes ; 6 : décapsidation et libération du génome viral ; 7 : synthèse des protéines non structurales ; 8-10 : synthèse des protéines structurales ; 11 : assemblage ; 12-13 : bourgeonnement et libération des nouveaux virions.

## **I.2 LA FIEVRE CHIKUNGUNYA**

### **I.2.1 Manifestations cliniques**

Classiquement, les symptômes cliniques sont précédés d'une période d'incubation silencieuse, de 4 à 7 jours. Le début est brutal, associant une fièvre élevée, des céphalées, des dorsalgies, des myalgies et des arthralgies ; ces dernières peuvent être intenses touchant principalement les extrémités (chevilles, poignets, phalanges) (Pialoux *et al.*, 2006).

Ces atteintes articulaires peuvent persister pendant des mois ou même des années (Jupp et MacIntosh., 1988).

En Asie, d'où provient la majorité des informations cliniques, seules des formes bénignes ont été rapportées et aucun cas de décès n'a pu être imputé au virus CHIK. Lors de l'épidémie à l'île de la Réunion en 2005-2006, des formes cliniques rares ou jamais décrites ont été signalées. Il s'agit notamment d'atteintes neurologiques centrales, de cytolyses hépatiques, de

lymphopénies (diminution du nombre des lymphocytes dans le sang) profondes, de manifestations dermatologiques graves, et d'infections néonatales (Pialoux *et al.*, 2006).

## **I.2.2 Diagnostic, prévention, traitement**

### **I.2.2.1 Diagnostic**

Il existe différentes méthodes de diagnostic : l'isolement viral, le diagnostic sérologique et le diagnostic moléculaire.

#### **I.2.2.1.1 L'isolement**

On peut isoler le virus en infectant des lignées cellulaires continues (AP61, cellules Véro) par un échantillon de sérum ou plasma prélevé d'un patient infecté par le virus CHIK. La présence du virus pourra être révélée par l'existence d'effets cytopathiques ou par l'immunofluorescence indirecte.

L'isolement peut aussi se faire par inoculation intra - cérébrale du sérum ou plasma du patient à des souris nouveaux nés, suivie de l'identification par des techniques comme l'immunofluorescence indirecte, la fixation du complément ou de séroneutralisation (Digoutte *et al.*, 1992).

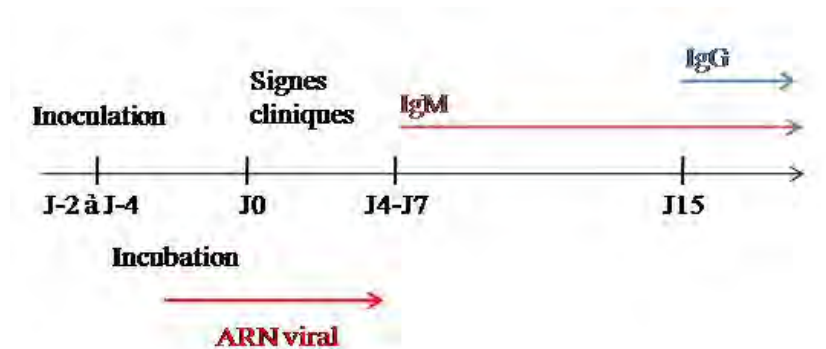
#### **I.2.2.1.2 Le diagnostic sérologique**

Il est basé sur la détection des anticorps IgM ou IgG dirigés contre le virus CHIK et présents dans le sang du patient. Il utilise une gamme de techniques classiques (inhibition de l'hémagglutination, fixation du complément, immunofluorescence, ELISA) (Pialoux *et al.*, 2006).

Les anticorps IgM sont mis en évidence par un prélèvement postérieur au cinquième jour et ils persistent pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois. Les anticorps IgG sont mis en évidence par la comparaison de deux prélèvements, un premier en phase aiguë et un deuxième en phase de convalescence et ils persistent pendant des années. La spécificité des tests ELISA pour la détection des anticorps IgM et IgG est limitée par le fait qu'il existe des réactions croisées avec les anticorps IgM dirigés contre les virus ONN et IGBO.

### I.2.2.1.3 Le diagnostic moléculaire

Ce diagnostic permet de détecter la présence du virus par amplification du génome viral en utilisant la RT-PCR. Depuis 1997, des techniques de RT-PCR existent pour la détection du virus CHIK (Pfeffer *et al.*, 1997-2002 ; Hasebe *et al.*, 2002). Cette méthode peut être décisive surtout au tout début de l'infection (début des symptômes jusqu'à 7 jours) période où les anticorps ne sont pas encore produits alors que le virus est présent (figure 4).



**Figure 4. Cinétique des marqueurs biologiques de l'infection par le virus CHIK chez l'homme**

### I.2.2.2 Prévention

Le virus CHIK induit une immunité protectrice de longue durée (Pialoux *et al.*, 2006) mais il n'existe pas actuellement de vaccin disponible. Quelques prototypes vaccinaux ont été évalués chez l'homme. Récemment, lors des essais menés par l'US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID) avec un vaccin expérimental ; il a été observé un taux d'anticorps neutralisants très satisfaisant (98% à j 28) et durable (85% à un an) et la survenue d'arthralgies chez 8% des volontaires (Edelman *et al.*, 2000). Ces essais vaccinaux américains ont été interrompus en 2003 mais la recherche vaccinale est entrain d'être relancée suite à l'épidémie de la Réunion (Edelman *et al.*, 2000 ; Pialoux *et al.*, 2006).

Les seules mesures de prévention actuelles sont la protection individuelle contre les piqûres de moustiques et la lutte anti-vectorielle. En ce qui concerne la prévention individuelle, elle passe par l'utilisation de moyens de protection physique : vêtements, moustiquaires, répulsifs (chimiques ou naturels). La lutte anti-vectorielle consiste principalement en la réduction du nombre de gîtes larvaires par suppression de tous les contenants potentiels d'eau stagnante à l'intérieur et à proximité des maisons. On peut aussi avoir recours à l'utilisation de larvicides

chimiques Themephos (Abate 500®) ou biologiques tels que le *Bacillus thuringiensis israelensis* ou des insecticides comme les pyréthrinoides (Pialoux *et al.*, 2006).

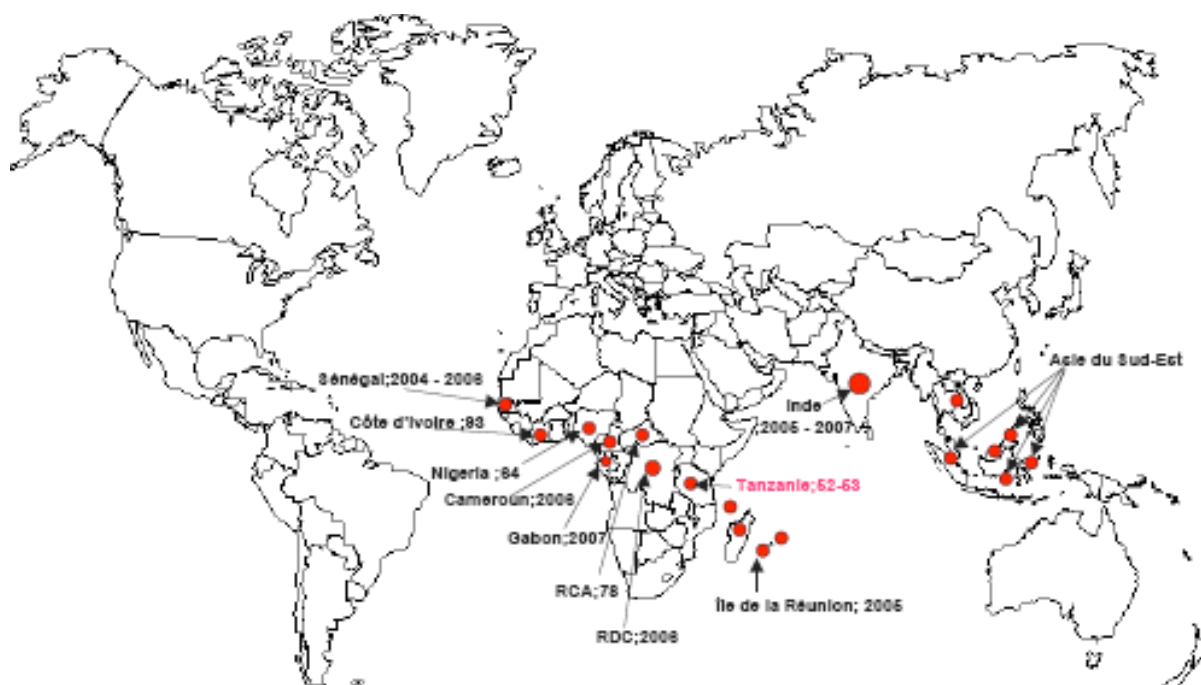
### I.2.2.3 Traitement

Il n'existe aucun traitement antiviral spécifique efficace à ce jour. Le traitement de la maladie est symptomatique et se fait par administration d'analgiques non salicylés dont le paracétamol en première intention et des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Pialoux *et al.*, 2006).

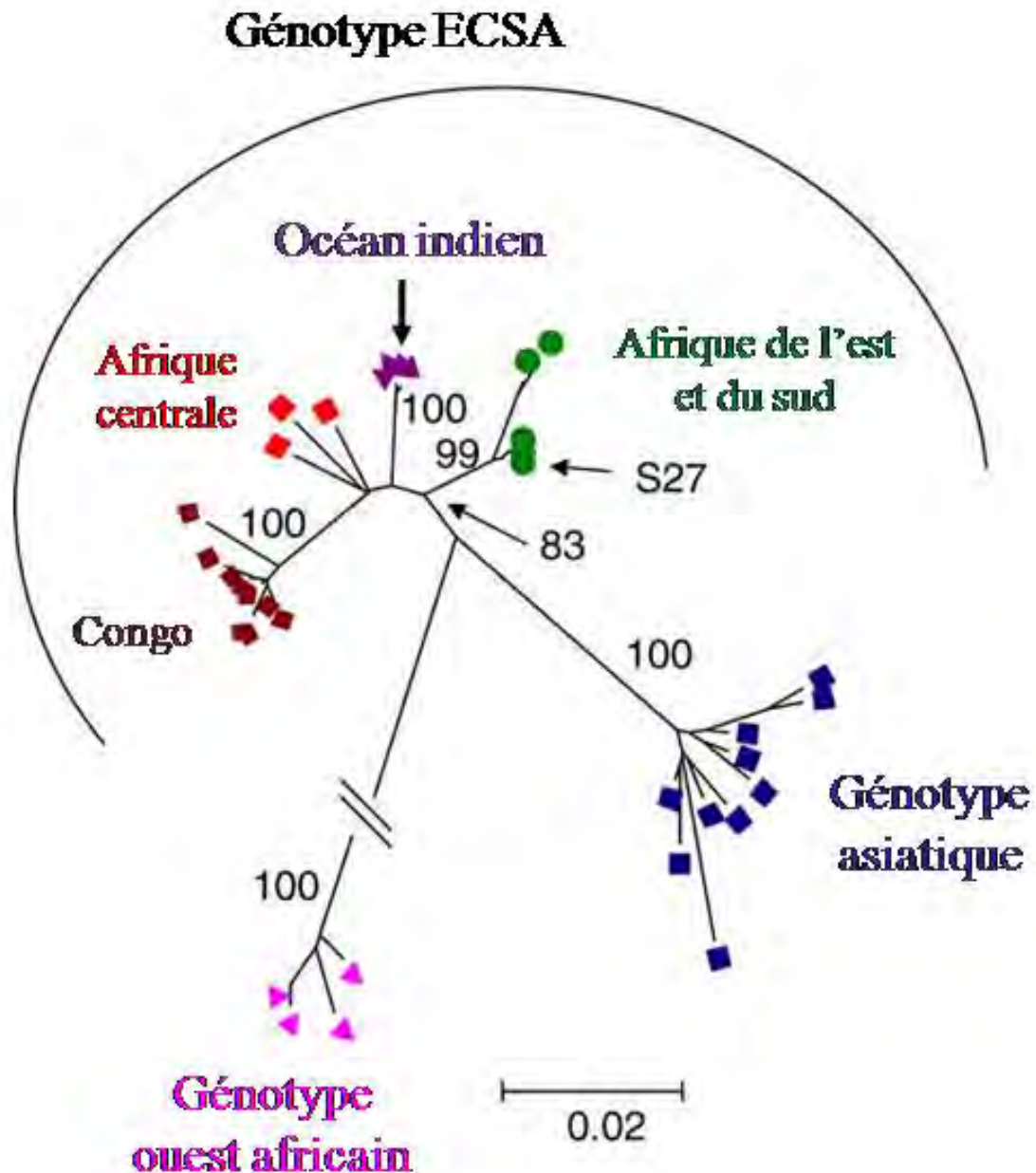
## I.2.3 Epidémiologie

### I.2.3.1 Distribution géographique

Le virus CHIK circule en Afrique subsaharienne, dans l'Océan indien et en Asie du sud-est (figure 5). Trois génotypes du virus CHIK sont connus : le génotype ouest africain, le génotype du groupe ECSA (Afrique centrale, de l'est et du sud), et le génotype asiatique (Powers *et al.*, 2000 ; Schuffenecker *et al.*, 2006) (figure 6).



**Figure 5. Distribution géographique du CHIK**



**Figure 6. Différents génotypes du virus CHIK**

(Schuffenecker *et al.*, 2006)

Des cas d'infections par le virus CHIK sont importés de zones où sévit le virus vers l'Europe (Allemagne, Italie, France,...) et l'Amérique (Etats Unis,...). En France par exemple, d'avril 2005 à juin 2006, 766 cas d'infections à virus CHIK ont été rapportés (Krastinova *et al.*, 2006) provenant majoritairement de la Réunion. La présence d'*Aedes albopictus* a été aussi signalée sur les côtes françaises méditerranéennes entre les villes de Menton et Bastia dans la région Corse (Krastinova *et al.*, 2006). L'Italie présente aussi la même situation avec une



centaine de cas apparus dans la région d'Emilia Romagna (nord-est) en août 2007 et confirmés par l'Istituto Superiore di Sanit E0-ISS (Rome) ; la présence du virus chez *Aedes albopictus* a été confirmée par RT-PCR<sup>2</sup>.

Ces cas importés et la présence d'un vecteur potentiel (*Aedes albopictus*) placent certains pays d'Europe et d'Amérique en situation de risque même si la capacité de ce moustique à transmettre le virus CHIK en Europe n'a pas encore été démontrée.

### **I.2.3.2 Les épidémies**

Le virus CHIK sévit sous deux formes : endémique et épidémique. La forme endémique est caractérisée par une grande variété d'espèces vectorielles et de réservoirs, une forte et durable transmission à des populations largement immunes, et la survenue de cas sporadiques ou de petites épidémies rurales. Ainsi, il n'est pas rare qu'une épidémie passe inaperçue, parce que la maladie est non ou peu symptomatique, ou non diagnostiquée, et qu'elle soit alors découverte de façon fortuite à l'occasion d'enquêtes sérologiques à propos d'une autre arbovirose (Thonnon *et al.*, 1999 ; Pialoux *et al.*, 2006).

La forme épidémique, généralement décrite en Asie est transmise par deux vecteurs principaux (*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*) à des populations à faible niveau d'immunité. Elle est caractérisée par des épidémies soudaines et massives, avec des taux d'attaque élevés (Pialoux *et al.*, 2006) ; près de 400 000 cas à Madras en Inde durant l'épidémie de 1964 (Jupp et MacIntosh., 1988). Des épidémies sont survenues dans les années 1960 en plusieurs foyers distincts urbains et ruraux suivies d'accalmies de 20-30 ans. Les villes de Bangkok, Jakarta, Calcutta ont été touchées massivement dans les années 1960. Entre 1999 et 2003, l'Indonésie a connu 25 épidémies (13 constatées à partir d'observations cliniques et 12 par des diagnostics sérologiques). Récemment le virus a touché 244 000 personnes sur l'île de La Réunion avant d'être introduit en Inde où les premiers cas sont apparus en décembre 2005 dans l'Etat d'Andhra Pradesh (sud est de l'Inde), puis entre février et octobre 2006, 1 360 000 cas suspects (sur une population d'environ 1,1 milliard d'habitants) sont apparus dans différentes localités avec des cas confirmés par un diagnostic. Le vecteur indexé dans cette épidémie est *Ae. aegypti* (Pialoux *et al.*, 2006-2007). A l'île de La Réunion, des chercheurs ont expliqué l'ampleur de cette épidémie par une mutation (A226V) qui a donné au virus une

---

<sup>2</sup> Ministère italien de la santé : <[http://www.ministerosalute.it/imgs/C\\_17\\_comunicati\\_1365\\_testo.rtf](http://www.ministerosalute.it/imgs/C_17_comunicati_1365_testo.rtf)>  
; promedmail.org ; numéro d'archive 20070902.2889 dernière visite Décembre 2007



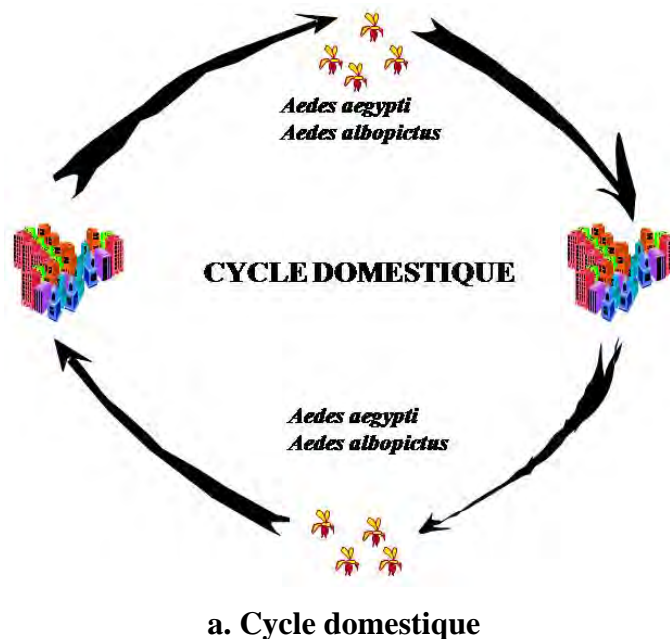
meilleure aptitude à se multiplier plus facilement chez *Aedes albopictus* (Schuffenecker *et al.*, 2006).

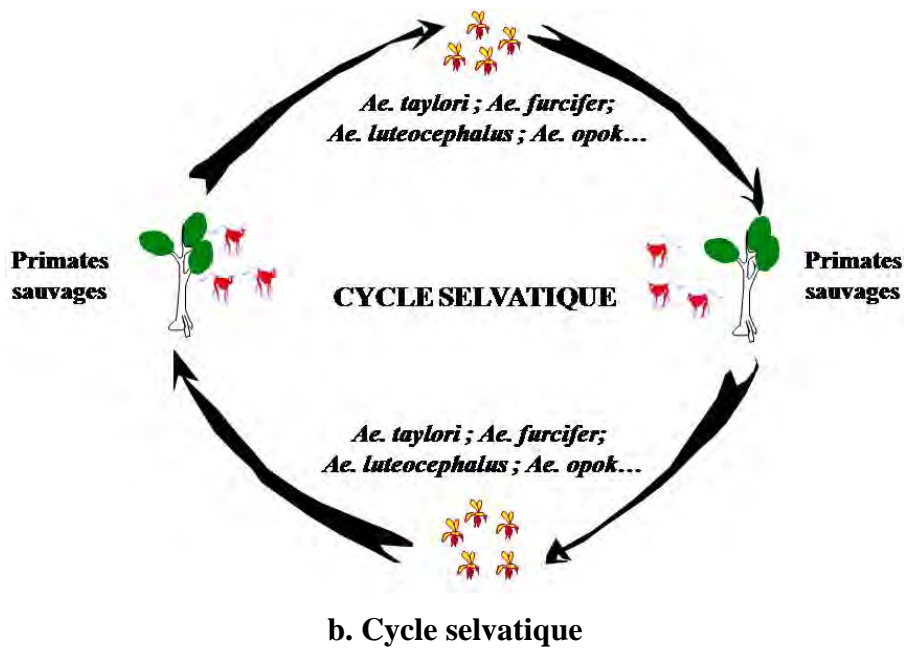
Le virus CHIK a une distribution tropicale. Les basses températures et l'absence de pluies sont les facteurs excluant la présence du virus dans les pays tempérés (Jupp et MacIntosh., 1988). Mais un haut niveau de développement économique ne met pas à l'abri de maladie vectorielle (comme la maladie CHIK) et peut même favoriser leur survenue par des modifications profondes de l'écosystème et de l'urbanisation (Pialoux *et al.*, 2006).

### I.2.3.3 Cycle de transmission

Des isollements viraux indiquent que les moustiques du genre *Aedes* notamment *Ae. furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus* sont les principaux vecteurs du virus (Jupp et MacIntosh., 1988 ; Diallo *et al.*, 1999).

Le virus circule dans la nature selon un cycle selvatique et un cycle domestique (figure7).





**Figures 7 : Cycles de transmission du virus CHIK**

Le cycle selvatique se déroule entre des singes (mais également des rongeurs, des oiseaux, des chauves-souris et d'autres vertébrés) et de multiples moustiques vecteurs et appartenant au sous genre *Stegomyia* : *Ae. africanus*, *Ae. opok*, *Ae. luteocephalus* (Jupp et MacIntosh., 1988 ; Khan *et al.*, 2002 ; Rohani *et al.*, 2005).

Le cycle domestique fait intervenir *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* (figures 8) et l'homme (Jupp et MacIntosh., 1988 ; Khan *et al.*, 2002 ; Rohani *et al.*, 2005). Ce cycle est généralement décrit en Asie (Diallo *et al.*, 1999 ; Laras *et al.*, 2005).

Des cas de transmission verticale n'ont pas été signalés dans la littérature (Diallo *et al.*, 1999).



**a. *Aedes albopictus***



**b. *Aedes aegypti***

**Figures 7 (a, b). Vecteurs domestiques du virus Chikungunya**

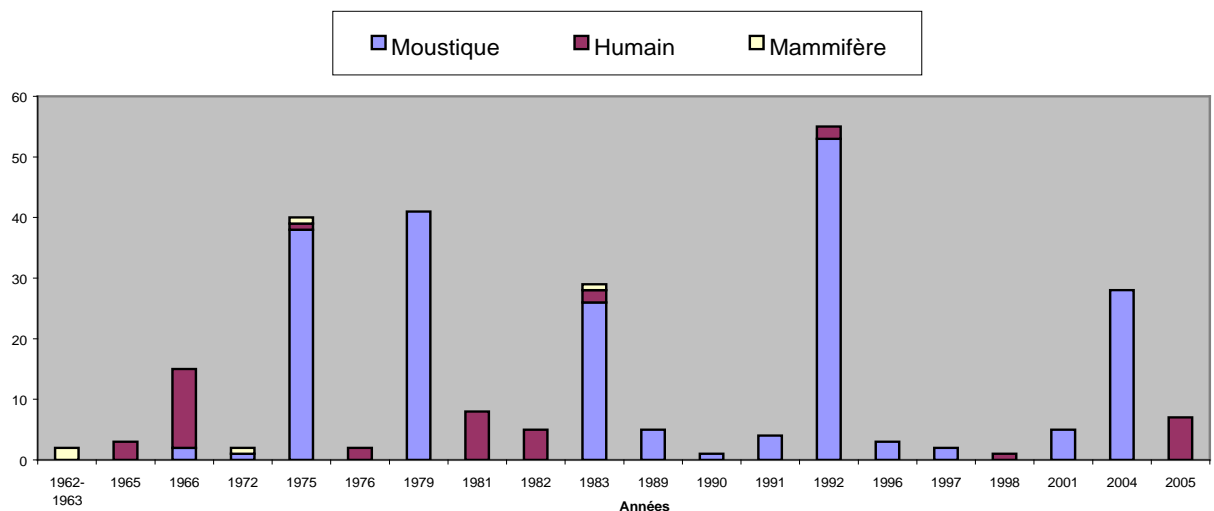
Chez les vertébrés autres que l'homme, des isollements viraux ont été faits à partir de moineaux, d'écureuils et de chauves souris. Cependant, le groupe de vertébré le plus

important impliqué dans le cycle de transmission est représenté par les primates sauvages (Jupp et MacIntosh., 1988).

Dans le cycle de transmission, la probabilité de survie du vecteur et le taux d'immunisation des vertébrés hôtes jouent un rôle important. Ainsi il est possible qu'une épidémie se termine sans qu'aucune mesure de contrôle vectoriel ne soit prise (Jupp et MacIntosh., 1988).

## II. LE VIRUS CHIKUNGUNYA AU SENEGAL

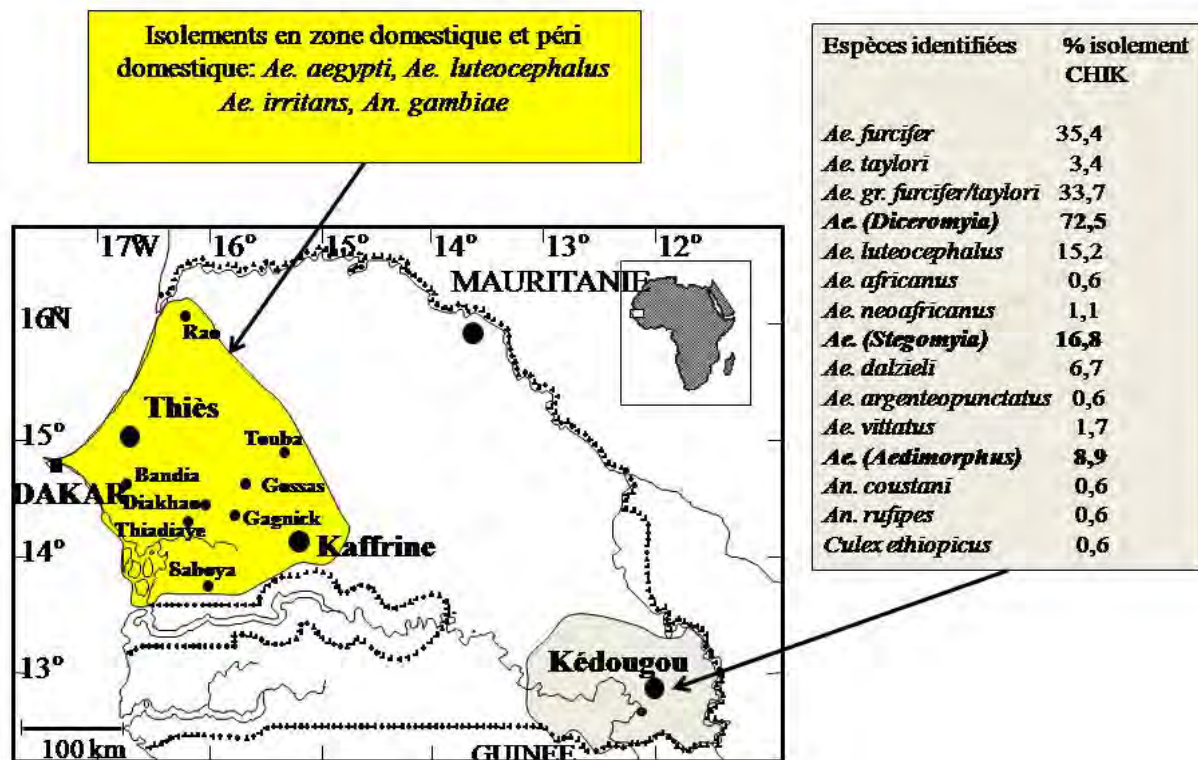
Au Sénégal, les premiers isollements du virus CHIK datent de 1962-1963 et ont été réalisés à partir de glandes salivaires de chauves-souris du genre *Scotophilus* capturées à Gagnick (près de Kaolack) en 1962 et à Rao (près de Saint-Louis) en 1963 (Bres *et al.*, 1963 ; Robin *et al.*, 1969). De 1962 à 2005, 259 souches ont été isolées (figure 9) dont 212 à Kédougou dans le cadre d'un programme de surveillance entomologique lancé en 1970 (Thonnon *et al.*, 1999 ; Diallo *et al.*, 1999). Cette surveillance se fait par des captures de moustiques au début, au milieu et à la fin de la saison des pluies et différents arbovirus notamment le virus amaril sont recherchés au niveau du centre collaborateur OMS pour la recherche sur les arbovirus (CRORA) (Digoutte *et al.*, 1992).



**Figure 9. Isolements du virus Chikungunya au Sénégal**

Au Sénégal, le virus CHIK a été isolé de plusieurs espèces de moustiques (figure 10). A Kédougou, en milieu selvatique, la majorité des isollements ont été faits à partir de 3 espèces:

*Ae. furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. luteocephalus* (figure 10). En milieu domestique, réalisés indiquent que *Ae. aegypti* est le principal vecteur du virus CHIK (Diallo *et al.*, 1999).



**Figure 10 : Circulation vectorielle du virus Chikungunya au Sénégal**

*Ae* : *Aedes* ; *An* : *Anopheles* (Diallo *et al.*, 1999)

Les vertébrés hôtes impliqués dans le cycle de transmission sont les singes (*Cercopithecus aethiops*, *Papio papio*, *Erythrocebus patas*) et l'homme. Le virus a été aussi isolé chez d'autres animaux comme les chauves-souris (*Scotophilus sp*), les rats palmistes (*Xerus erythropus*) et les galagos (*Galago senegalensis*), (Diallo *et al.*, 1999).

Trois épidémies ont été rapportées au Sénégal : en 1966, en 1982 et 1996 -1997 dans la partie occidentale du pays.

De septembre à novembre 1966 le virus CHIK s'est manifesté en divers endroits (Bandia, Rufisque, Mbouf-Mbalem, Ndiop, Ndofène, Bangadj, Galague N'Galagne) (Roche *et al.* 1966 ; données CRORA). A Rufisque, onze cas ont pu être identifiés et 4 souches du virus CHIK ont été isolées. Ces cas sont apparus aux mois d'octobre et de novembre 1966 à la fin de la saison des pluies. Du point de vue clinique, même si la plupart des infections ont été inapparentes ou mises sur le compte d'un paludisme ou d'une grippe, le syndrome algique et la fièvre ont été observés sur les 11 cas examinés.

De juillet à décembre 1982, une épidémie de CHIK a été observée dans l'ouest du Sénégal (Thiès, Thiadiaye, Touba,...). Sur 21 cas observés, les signes cliniques ont été marqués par de

la fièvre, des arthralgies et des céphalées. Treize souches ont été isolées à partir de prélèvements humains avant le troisième jour du début des signes de la maladie. (Saluzzo *et al.*, 1983).

En 1996 et 1997, deux autres épidémies du virus CHIK sont survenues respectivement à Kaffrine et à Niakhar (Thonnon *et al.*, 1999).

A Kaffrine, la recherche systématique d'anticorps IgM vis à vis d'arbovirus autres que le virus amaril a permis la découverte fortuite d'une circulation du virus CHIK. L'enquête sérologique a porté sur 447 sujets et a montré que l'épidémie de CHIK a affecté plus de sujets que celle du virus amaril (taux d'incidence de 35,3 % contre 21 % pour la fièvre jaune).

A Niakhar, trois cas groupés d'infection à virus CHIK chez des personnels de santé ont conduit à des enquêtes clinique et sérologique qui ont montré des infections à virus CHIK antérieures inapparentes (39,8 % de la population de Niakhar était immune avant mars 1997).

Entre 2004 et 2006, plusieurs cas humains de CHIK ont été rapportés au Sénégal. En 2004, des travailleurs du corps de la paix américain travaillant dans la région de Kédougou ont été infectés. Puis en 2005, des cas ont été rapportés parmi des militaires anglais en manœuvre à l'intérieur du pays au niveau des îles du Saloum (Sall., données non publiées). En octobre 2006, sept français ont été infectés après un séjour dans différentes localités à l'intérieur du pays (Thiès, Diourbel, Louga)<sup>3</sup>. Durant la même période, trois cas locaux ont été identifiés à Bambey dans le cadre de la surveillance de la fièvre jaune (Sall., données non publiées).

L'analyse de ces épidémies montre clairement une circulation active du virus CHIK au Sénégal et la difficulté à la mettre en évidence car des cas surviennent régulièrement mais passent inaperçus ou sont confondus avec des accès palustres. Ainsi, la circulation du virus au Sénégal est souvent mise en évidence lors de la recherche d'autres arbovirus en particulier lors des épidémies. Des études entomologique et épidémiologique plus étendues permettraient d'améliorer les connaissances sur ce virus.

---

<sup>3</sup> [www.promedmail.org](http://www.promedmail.org); numéro d'archive 20061117.3294 dernière visite Décembre 2007

## **DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES D'ETUDE**

## **I. MATERIEL BIOLOGIQUE**

### **I. 1. Les souches virales**

Les souches de CHIK utilisées dans ces travaux ont été fournies par le CRORA. Il s'agit de 43 souches couvrant une période de 43 ans (de 1962 à 2005) et isolées à partir de divers hôtes (chauve-souris, singe, moustique, homme) et de différents pays ou régions géographiques : 39 du Sénégal, 7 de la Côte d'Ivoire et 2 de la République de Centrafrique (tableau 1).

### **I. 2. Les cellules**

Les cellules utilisées pour la multiplication virale sont des lignées continues d'*Aedes pseudoscutellaris* clone 61 (AP 61) et de Vero (cellule de rein de singe) provenant de l'Institut Pasteur de Paris mais qui ont été originellement fournies par l'ATCC (American Type Culture Collection).

Tableau 1 : Souches de CHIK utilisées dans cette étude (suite page 21).

| Référence CRORA                             | Date et Lieu d'isolement | Date et Lieu de récolte         | Espèce d'origine           |
|---|--------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| <b>Dak Ar A 67</b>                          | ?                        | ?                               | ?                          |
| <b>Dak Ar D 30143</b>                       | Février 80 (IPD)         | Octobre 79 (Kédougou)           | <i>Aedes dalzieli</i>      |
| <b>CS 13 – 288</b>                          | Décembre 62 (IPD)        | Décembre 62 Gagnick (Kaolack)   | <i>Scotophilus sp</i>      |
| <b>SH 2833</b>                              | Novembre 66 (IPD)        | Novembre 66 (Rufisque)          | Humain                     |
| <b>SH 3010</b>                              | Novembre 65 (IPD)        | Novembre 65 (Demen Fandane)     | Humain                     |
| <b>SH 3012</b>                              | Novembre 66 (IPD)        | Novembre 66 (Ndofène)           | Humain                     |
| <b>SH 3013</b>                              | Novembre 66 (IPD)        | Novembre 66 (Bangadj)           | Humain                     |
| <b>SH 3014</b>                              | Novembre 66 (IPD)        | Novembre 66 (Galague N'galagne) | Humain                     |
| <b>SH 2834</b>                              | Novembre 66 (IPD)        | Novembre 66 (Dakar)             | Humain                     |
| <b>SH 2976</b>                              | Novembre 65 (IPD)        | Novembre 65 (Dakar)             | Humain                     |
| <b>SH 2893</b>                              | Novembre 66 (IPD)        | Novembre 66 (Dakar)             | Humain                     |
| <b>SH 3009</b>                              | Novembre 66 (IPD)        | Novembre 66 (Ndiop)             | Humain                     |
| <b>A 301</b><br><b>(An D CS 16 (D 301))</b> | Mars 63                  | Mars 63 (Rao)                   | Chiroptère                 |
| *   |                          |                                 |                            |
| <b>SH 2808</b>                              | Novembre 66 (IPD)        | Novembre 66 (Bandia)            | Humain                     |
| <b>SH 2892/3</b>                            | Novembre 66 (IPD)        | Novembre 66 (Rufisque)          | Humain                     |
| <b>SH 2898/3</b>                            | Novembre 66 (IPD)        | Novembre 66 (Rufisque)          | Humain                     |
| <b>Ar D 30022</b>                           | Février 80 (IPD)         | Octobre 79 (Kédougou)           | <i>Aedes luteocephalus</i> |
| <b>Ar D 30237</b>                           | Février 80 (IPD)         | Octobre 79 (Kédougou)           | <i>Aedes neoafricanus</i>  |
| <b>Dak Ar A 2657</b>                        | ?                        | ?                               | ?                          |
| <b>Dak Ar B 16678</b>                       | ?                        | ?                               | ?                          |
| <b>Dak HB 78</b>                            | Octobre 78 (IPB)         | Septembre 78 (Bangui)           | Humain                     |



Tableau 1 (suite et fin) : Souches de CHIK utilisées dans cette étude.

| Référence CRORA | Date et Lieu d'isolement | Date et Lieu de récolte | Espèce d'origine               |
|-----------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Ar D 93229      | Février 93 (IPD)         | Octobre 92(Kédougou)    | <i>Aedes dalzieli</i>          |
| Ar D 93311      | Février 93 (IPD)         | Octobre 92(Kédougou)    | <i>Aedes taylori</i>           |
| Ar D 92409      | Février 94 (IPD)         | Octobre 92(Kédougou)    | <i>Aedes furcifer</i>          |
| H D 103090      | Mars 93 (IPD)            | Octobre 92 (Dielmo)     | Humain                         |
| H D 103091      | Mars 93 (IPD)            | Octobre 92 (Dielmo)     | Humain                         |
| Ar A 30543      | Décembre 93 (IPA)        | Novembre 93 (CI)        | <i>Aedes opok</i>              |
| Ar A 30548      | Décembre 93 (IPA)        | Novembre 93 (CI)        | <i>Aedes africanus</i>         |
| Ar A 30556      | Décembre 93 (IPA)        | Novembre 93 (CI)        | <i>Cellia funestus</i>         |
| Ar A 30565      | Décembre 93 (IPA)        | Novembre 93 (CI)        | <i>Culex weschei</i>           |
| Ar D 120940     | Octobre 96 (IPD)         | Octobre 96(Kédougou)    | <i>Aedes luteocephalus</i>     |
| Ar D 122544     | Novembre 96 (IPD)        | Novembre96(Kaffrine)    | <i>Aedes aegypti</i>           |
| Ar D 128438     | Décembre 97 (IPD)        | Novembre97(Kédougou)    | <i>Aedes dalzieli</i>          |
| H D 131124      | Novembre 98 (IPD)        | Novembre 98 (Dakar)     | Humain                         |
| H A DK 001-99   | Novembre 99 (IPA)        | Septembre 99 (CI)       | Humain                         |
| Ar D 156076     | Novembre 01 (IPD)        | Septembre01(Kédougou)   | <i>Aedes argenteopunctatus</i> |
| Ar D 175374     | Novembre 04 (IPD)        | Août 04 (Kédougou)      | <i>Aedes taylori</i>           |
| Ar D 175381     | Novembre 04 (IPD)        | Août 04 (Kédougou)      | <i>Aedes luteocephalus</i>     |
| Ar D 175393     | Novembre 04 (IPD)        | Août 04 (Kédougou)      | <i>Aedes furcifer</i>          |
| H D 180738      | Novembre 05 (IPD)        | Octobre 05 (Dakar)      | Humain (Militaire anglais)     |
| H D 180739      | Novembre 05 (IPD)        | Octobre 05 (Dakar)      | Humain (Militaire anglais)     |
| H D 180760      | Novembre 05 (IPD)        | Octobre 05 (Dakar)      | Humain (Militaire anglais)     |
| H D 180761      | Novembre 05 (IPD)        | Octobre 05 (Dakar)      | Humain Militaire anglais)      |

Source : CRORA/IPD

## II. METHODES D'ETUDE

### II. 1 Plan d'étude

Des stocks viraux ont été préparés à partir des 43 souches listées. Les ARN viraux ont été extraits et quatre méthodes RT-PCR ciblant différentes régions du génome viral (nsP1 ou E1) ont été testées dont trois pour le diagnostic moléculaire (Pfeffer *et al.*, 1997 ; Hasebe *et al.*, 2002) et une pour le séquençage partiel de la glycoprotéine d'enveloppe E1 (Schuffenecker *et al.*, 2006). Pour les amorces ayant donné des résultats satisfaisants, la spécificité (capacité à détecter uniquement le virus CHIK par rapport aux autres alphavirus) et la limite minimale de détection ont été évaluées. En parallèle, la glycoprotéine d'enveloppe E1 des différentes

souches de CHIK a été partiellement séquencée afin d'analyser leur variabilité et éventuellement d'ajuster les amorces utilisées.

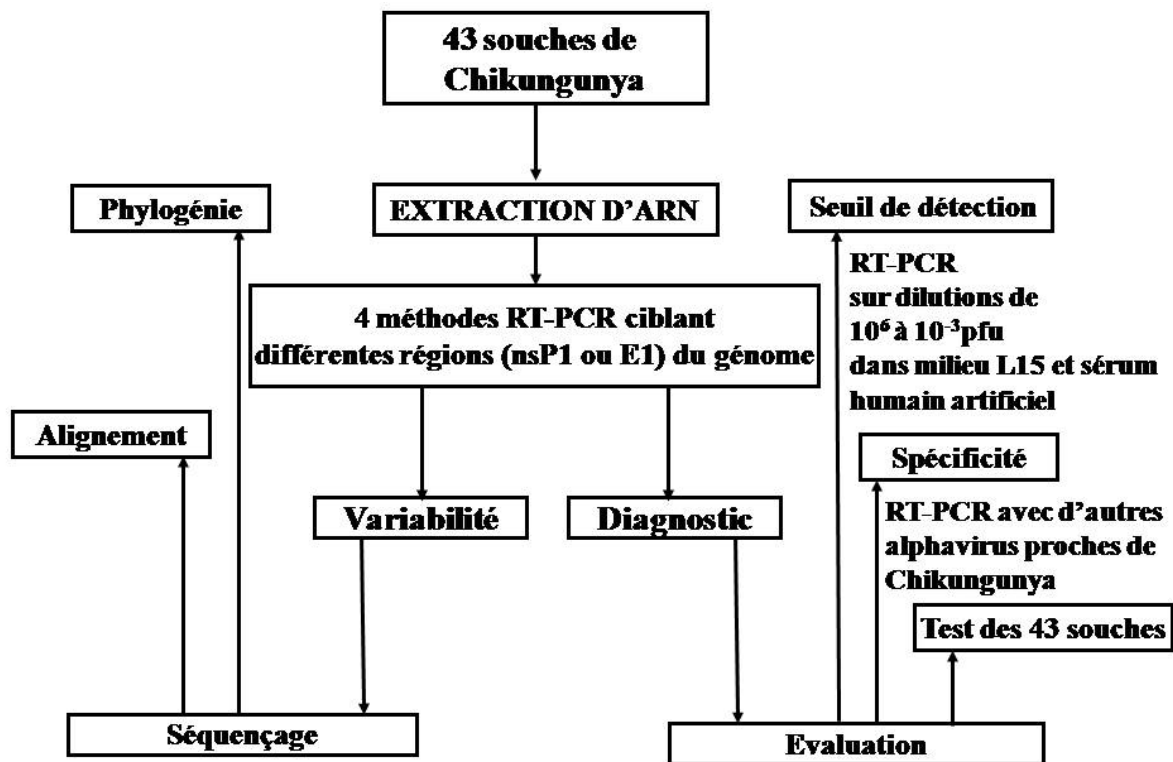


Figure 11. Plan d'étude

## II. 2 Préparation de stock viral

Cette étape permet une amplification d'une souche virale par multiplication sur des cellules AP 61 en culture. Avant d'être infectées, ces dernières sont entretenues par culture cellulaire dans un milieu de croissance pour disposer d'un stock suffisant de cellules AP 61.

### II. 2. 1. Préparation de milieu de culture pour cellules AP 61 (*Aedes pseudoscutellaris*)

Le milieu utilisé pour la culture de cellules AP 61 est le Leibovitz L15 (GIBCO<sup>®</sup>, USA) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (GIBCO<sup>™</sup>, USA), 10% de Bacto<sup>™</sup> Tryptose Phosphate Broth (USA), 1% d'antibiotiques (pénicilline-streptomycine, SIGMA<sup>®</sup> (USA)) et 0,05% d'antifongique, Fungizone (GIBCO<sup>™</sup>, UK).

Les volumes ont été prélevés à l'aide de pipettes sérologiques FALCON graduées en polystyrène et cotonnées à usage unique (1 ml, 5ml, 10ml, et 25ml). Le mélange est filtré à

travers une membrane de 0,2  $\mu\text{m}$  sous une pompe à vide et recueilli dans un flacon gradué SCHOTT en verre clair borosilicaté DURAN. Les milieux peuvent être conservés pendant plusieurs semaines à  $+4^{\circ}\text{C}$ .

### **II. 2.1.1 Exemple pratique : préparation de 500 ml à 10 % de sérum de veau fœtal**

On mélange : 50 ml de SVF ; 50 ml de Tryptose phosphate broth; 5 ml de Pénicilline-Streptomycine; 0,25 ml de Fungizone ; ensuite on complète avec du milieu Leibovitz L15, 500 ml dans ce cas précis. Le mélange ainsi obtenu est filtré et recueilli dans un flacon stérile. Ce milieu se conserve à  $+4^{\circ}\text{C}$ .

## **II. 2. 2 Culture cellulaire : type AP 61**

### **II.2.2.1 Objectif**

La culture cellulaire permet de disposer d'un stock de cellules qui pourront être utilisées pour la multiplication virale. On utilise du milieu de culture pour AP 61 à 10 % de sérum de veau fœtal, une boîte de cellules AP 61 confluyente et des boîtes de cultures cellulaires (NUNC<sup>TM</sup> Danemark) de 25  $\text{cm}^2$  stériles en polystyrène permettant de garantir une croissance, une adhérence optimale des cellules et une excellente transparence optique. Les volumes sont prélevés à l'aide de pipettes sérologiques FALCON graduées en polystyrène et cotonnées à usage unique (5 ml ; 1 ml). Des racleurs de cellules de 23 cm sont utilisés pour décoller le tapis cellulaire. Les cellules sont gardées dans une étuve réglée à  $+28^{\circ}\text{C}$  correspondant à la température de croissance optimale des cellules AP61.

### **II.2.2.2 Mode opératoire**

Le milieu de culture surnageant de la boîte de culture cellulaire AP61 confluyente est vidé. Cinq ml de milieu de culture à 10 % de SVF cellulaire sont ajoutés (pour les boîtes de 25  $\text{cm}^2$ ) avant de racleur le fond de la boîte à l'aide d'un racleur ce qui permet de décoller les cellules du fond de la boîte. Pour bien disperser les cellules, aspirer et refouler le milieu plus les cellules à l'aide d'une pipette (5 ml). Ce stade est important car si les cellules ne sont pas bien séparées, la subculture contiendra de nombreuses micro-colonies d'explants qui entraîneront ultérieurement la mort de la culture ou un ralentissement de la croissance du tapis cellulaire. Répartir cette suspension cellulaire dans des boîtes et les compléter avec du milieu de croissance selon la taille des boîtes. Elles sont ensuite incubées dans une étuve à  $28^{\circ}\text{C}$ .

**Remarque :**

Lorsque l'indicateur coloré (rouge de phénol) du milieu de croissance vire au jaune, il indique que le milieu est acide et qu'il est nécessaire de ramener le pH à 7,4 pour une croissance optimale des cellules. Il est important de marquer le nombre de passage subi par la lignée (augmenté d'une unité par passage) et la date sur les boîtes à l'aide d'un marqueur afin de pouvoir se débarrasser des cellules lorsqu'elles sont trop vieilles.

**II.2.3 Infection des cultures cellulaires**

Il s'agit d'infecter des cultures cellulaires par une suspension virale permettant ainsi au virus de se multiplier dans les cellules hôtes et obtenir d'importantes quantités de virus. Les virus peuvent être fournis sous forme d'ampoules lyophilisées ou d'extraits de cerveaux de souris. Ils doivent être remis en suspension dans un milieu (il peut s'agir du milieu utilisé pour la culture cellulaire ou du milieu Leibovitz L15 non supplémenté) afin de constituer la suspension virale nécessaire à l'infection.

**II.2.3.1 Mise en suspension des virus**

Pour les ampoules lyophilisées le col est nettoyé avec de l'éthanol, scié et cassé. 500 µl (ou 1 ml) du milieu préparé pour la mise en suspension sont ajoutés. La suspension virale ainsi obtenue est transférée dans des tubes Nunc de 1,8 ml (Cryo Tube™ Vials Danemark) (préalablement étiqueté et renseigné avec les informations correspondant au virus) et conservés à – 80 °C jusqu'à utilisation.

Pour l'extrait de cerveau, pilon et mortier sont utilisés pour bien écraser/broyer le cerveau de souris. On verse ensuite 1 ml de milieu de croissance sur le broyat obtenu ; après centrifugation à 10 000 tours/mn pendant 10 mn, le surnageant est recueilli dans des tubes Nunc de 1,8 ml qui sont conservés à – 80 °C.

**II. 2.3.2 Infection**

Des boîtes avec des tapis cellulaires à 80 % de confluence sont utilisées pour l'infection. Le milieu de culture surnageant est d'abord vidé (en évitant de toucher le tapis cellulaire) dans de l'eau de Javel. Puis, à l'aide d'une micropipette, 200 µl de suspension virale et 800 µl de milieu de culture sont mis en contact avec le tapis cellulaire. La boîte de culture cellulaire est

incubée à +28°C et agitée toutes les 10 mn pendant 1h afin de permettre la répartition homogène de l'inoculum et l'infection du tapis cellulaire. Après cette première incubation, 4 ml de milieu de croissance sont ajoutés et la boîte est de nouveau incubée dans une étuve à +28°C pendant 5 à 7 jours.

## II. 2. 4 Immunofluorescence indirecte (IFI)

### II.2.4.1 Principe

Cette méthode a pour but de révéler la présence d'antigènes viraux dans les cellules et évaluer la progression de l'infection du tapis cellulaire (*ie* la multiplication du virus). Cette révélation est faite par immunofluorescence indirecte, technique qui consiste à détecter un antigène viral dans un tapis cellulaire avec des anticorps spécifiques (AC1) et à révéler cette interaction par des anticorps fluorescents (AC2) dirigés contre ces anticorps (AC1). Le principe de l'immunofluorescence indirect est présenté dans la figure 12.

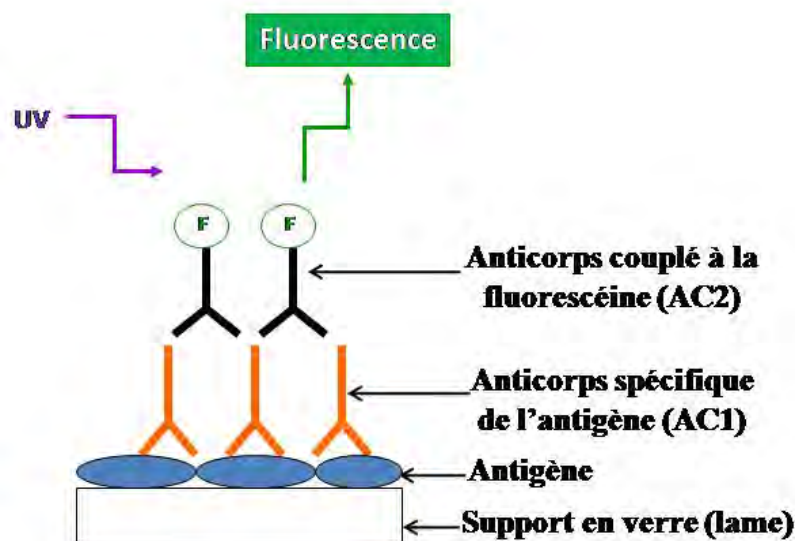


Figure 12 : Principe de l'immunofluorescence indirecte

### II.2.4.2 Mode opératoire

Après incubation (5 à 7 jours), racler sur une ligne le fond de la boîte de culture en aspirant à l'aide d'une pipette de manière à prélever des cellules et 1 ml de surnageant de culture. La suspension est transvasée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Cette suspension est centrifugée à 7500 tours/mn pendant 5 mn à +4 °C. Le surnageant est ensuite éliminé en laissant le culot.

Ce culot est ensuite repris dans 1 ml de PBS 1X et une goutte de cette suspension cellulaire est déposée en double sur une lame avec masque Téflon de 12 puits pour immunofluorescence. Des témoins négatifs (cellules de culture non infectée) sont également déposés sur la lame. Après séchage sous la hotte, les lames sont fixées pendant 10 mn dans de l'acétone froid à -20 °C. La lame est ensuite séchée sous la hotte. Chaque puits de la lame contenant des cellules est ensuite recouverte avec 15 µl de l'anticorps spécifique au virus CHIK (ascite hyperimmune de souris dirigée contre le virus CHIK MAF4 031536) dilué au 1/20 dans du PBS 1X puis incubée pendant 30 mn à +37 °C dans une chambre humide (boîte de Pétri tapissée de papier absorbant humidifié). Après rinçage au PBS 1X pour éliminer les anticorps non fixés et séchage, il est ajouté 15 µl d'anticorps anti-souris couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (BIO-RAD 0F 034F) dilués au 1/40 dans du bleu d'Evans (dilué au 1/100) puis incubé 30 mn à 37 °C dans une chambre humide. Après un nouveau rinçage pour éliminer l'excès d'anticorps secondaire et séchage, il est ajouté 15 µl de glycérol à 70 % (dans du PBS 1X) dans chaque puits contenant des cellules. Puis la lame est recouverte par une lamelle avant la lecture au microscope à lumière ultra-violet (UV).

Cette lecture au microscope à lumière ultra-violet (UV) révèle une certaine fluorescence (couleur verte ou jaune-vert) au niveau des cellules contenant des antigènes viraux. Une immunofluorescence est considérée comme positive lorsqu'au moins 70 % des cellules sont fluorescentes.

Le surnageant des boîtes qui ont été révélées positives à l'IFI (et qui contient du virus CHIK) est prélevé transvasé dans des tubes Falcon de 15 ml puis centrifugé à 10 000 tours/mn pendant 10 mn à + 4 °C pour se débarrasser des débris cellulaires. Le surnageant de chaque tube Falcon est prélevé (en évitant de toucher le fond du tube) et réparti en fractions à raison de 1 ml/tube Nunc de 1,8 ml. Chaque tube bien étiqueté avec les références de la souche correspondante est conservé à - 80 °C.

## **II. 3 Extraction d'ARN à partir des surnageants viraux**

### **II.3.1 Principe**

Les virus qu'ils soient enveloppés ou non, ont leur génome entouré par une capside de nature protéique. Il faut donc extraire ce génome afin de pouvoir le manipuler. La méthode employée consiste à détruire cette capside, l'ARN est ensuite retenu à travers une colonne de silice et après lavage pour le débarrasser des débris il est recueilli par élution dans un tampon.

L'extraction d'ARN se fait grâce à un kit d'extraction d'ARN Qiagen (Qiaamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit 250).

### **II.3.2 Mode opératoire**

100 µl de surnageant viral sont mélangés à 400 µl de tampon de lyse AVL (fourni dans le kit d'extraction). Le mélange surnageant viral-tampon de lyse est bien agité avant d'être incubé à température ambiante pendant 10 minutes. Après cette incubation, le mélange est centrifugé brièvement et 400 µl d'éthanol absolu sont ajoutés. Après agitation et une brève centrifugation, 500 µl du mélange surnageant viral-tampon AVL-éthanol sont déposés dans une colonne contenant de la silice et placé sur un tube collecteur puis centrifuger à 8000 tours/mn pendant 1 minute. Le liquide recueilli dans le tube collecteur est ensuite jeté et l'étape précédente reprise avec le reste du mélange. Ensuite, deux tampons de lavage (AW1 et AW2) sont successivement utilisés pour se débarrasser des impuretés, l'ARN étant retenu par la colonne de silice. Ainsi, 500 µl de tampon de lavage AW1 sont d'abord déposés dans la colonne qui est centrifugée à 8000 tours /mn pendant 1 minute. Le liquide du tube collecteur est jeté et 500 µl de tampon AW2 sont déposés dans la colonne qui est cette fois-ci centrifugée à 12 000 tours/mn pendant 3 minutes. La centrifugation est reprise à vide à 12 000 tours par minute pendant 1 minute afin de se débarrasser complètement de toute trace de tampon de lavage. La colonne est ensuite placée dans un tube Eppendorf propre de 1,5 ml et 50 µl de tampon d'élution AVE sont ajoutés. Après une incubation d'une minute à température ambiante (pour permettre à l'ARN de se dissoudre dans le tampon et « quitter » la silice), l'ARN est recueilli dans le tube Eppendorf par centrifugation à 8000 tours/mn pendant 1 minute et se conserve à – 20 °C ou – 80 °C.

## **II. 4 Choix des méthodes de RT-PCR**

Quatre méthodes de RT-PCR (Tableau 2) visant différentes zones du génome ont été évaluées : une méthode de diagnostic pour détecter l'ensemble des alphavirus (Pfeffer *et al.*, 1997), deux méthodes de détection du virus CHIK dans un contexte de circulation de la dengue (Hasebe *et al.*, 2002) et une méthode utilisée pour le séquençage de la E1 (Schuffenecker *et al.*, 2006).

**Tableau 2 : amorces utilisées dans cette étude**

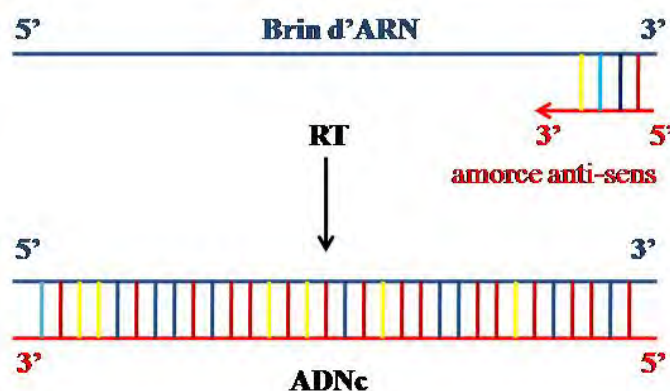
| Nom et séquences des amorces  | Position de l'amorce                | Gène amplifié | Taille du Fragment | Références                         |
|---|-------------------------------------|---------------|--------------------|------------------------------------|
| M2W : 5'YAGAGCDTTTTCGCAYSTRGCHW3'<br>cM3W : 5'ACATRAANKGNGTNGTRTCRAANCDAYCC 3'<br>M2W2 : 5'TGYCCNVTGMDNWSYVCNGARGAYCC3' | 164 – 186<br>568 – 597<br>288 – 313 | nsP1          | 434 pb<br>310 pb   | Pfeffer <i>et al.</i> , 1997       |
| nSP1-S : 5'TAGAGCAGGAAATTGATCCC3'<br>nSP1-C : 5'CTTTAATCGCCTGGTGGTAT3'  | 8 – 27<br>342 – 361                 | nsP1          | 354 pb             | Hasebe <i>et al.</i> , 2002        |
| E1-S : 5'TACCCATTCATGTGGGGC3'<br>E1-C : 5'GCCTTTGTACACCACGATT3'   | 10245 - 10262<br>10520 - 10538      | E1            | 294 pb             | Hasebe <i>et al.</i> , 2002        |
| 10145-F : 5'ACAAAACCGTCATCCCGTCTC3'<br>11158-R : 5'TGACTATGTGGTCCTTCGGAGG3'   | 10145 - 10165<br>11137 - 11158      | E1            | 1000 pb            | Schuffenecker <i>et al.</i> , 2006 |

## II. 5 Transcription inverse (RT) et Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

### II. 5. 1 Transcription inverse (RT)

#### II.5.1.1 Principe

Le virus CHIK est un virus à ARN simple brin. Il est donc nécessaire de le transformer en double brin (en préparant un ADN complémentaire ou ADNc) afin de pouvoir amplifier le génome par la méthode de PCR. La transcription inverse se fait en utilisant un kit AMV Reverse Transcriptase Promega (comprenant une enzyme (AMV RT Promega) et un tampon) (Tampon RT Promega), l'amorce anti-sens et un échantillon d'ARN (figure 13).



**Figure 13: Principe de la transcription inverse**



### II.5.1.2 Mode opératoire

Dix  $\mu\text{l}$  d'ARN et 1  $\mu\text{l}$  de l'amorce anti-sens sont mis dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Après agitation et une brève centrifugation l'ensemble est chauffé à 95 °C pendant 2 minutes pour permettre à l'ARN d'avoir une structure linéaire (c'est l'étape de dénaturation pour éviter les structures secondaires d'ARN). Après chauffage, le tube est immédiatement mis dans la glace pendant 5 minutes et 9  $\mu\text{l}$  d'un mélange de tampon RT, de Rnasin, de dNTPs, d'enzyme AMV RT et d'eau stérile (spécialement pour la biologie moléculaire) sont ajoutés à la première préparation (ARN et amorce anti-sens) selon les proportions indiquées dans le tableau 3.

**Tableau 3 : Mélange réactionnel d'une transcription inverse (RT)**

| Réactifs  | Concentration        | Volume pour 1 réaction |
|---|----------------------|------------------------|
| Tampon RT (Promega)                                     | 5x                   | 4 $\mu\text{l}$        |
| Rnasin (Promega)  | 40 u/ $\mu\text{l}$  | 0,2 $\mu\text{l}$      |
| dNTPs (Amersham Pharmacia)                              | 8 mM                 | 3,5 $\mu\text{l}$      |
| Enzyme AMV RT (Promega)                                 | 10 u / $\mu\text{l}$ | 0,5 $\mu\text{l}$      |
| Eau (Molecular Biology Grade, Brinkman Instruments USA) |                      | 0,8 $\mu\text{l}$      |
| Volume final  |                      | 9 $\mu\text{l}$        |

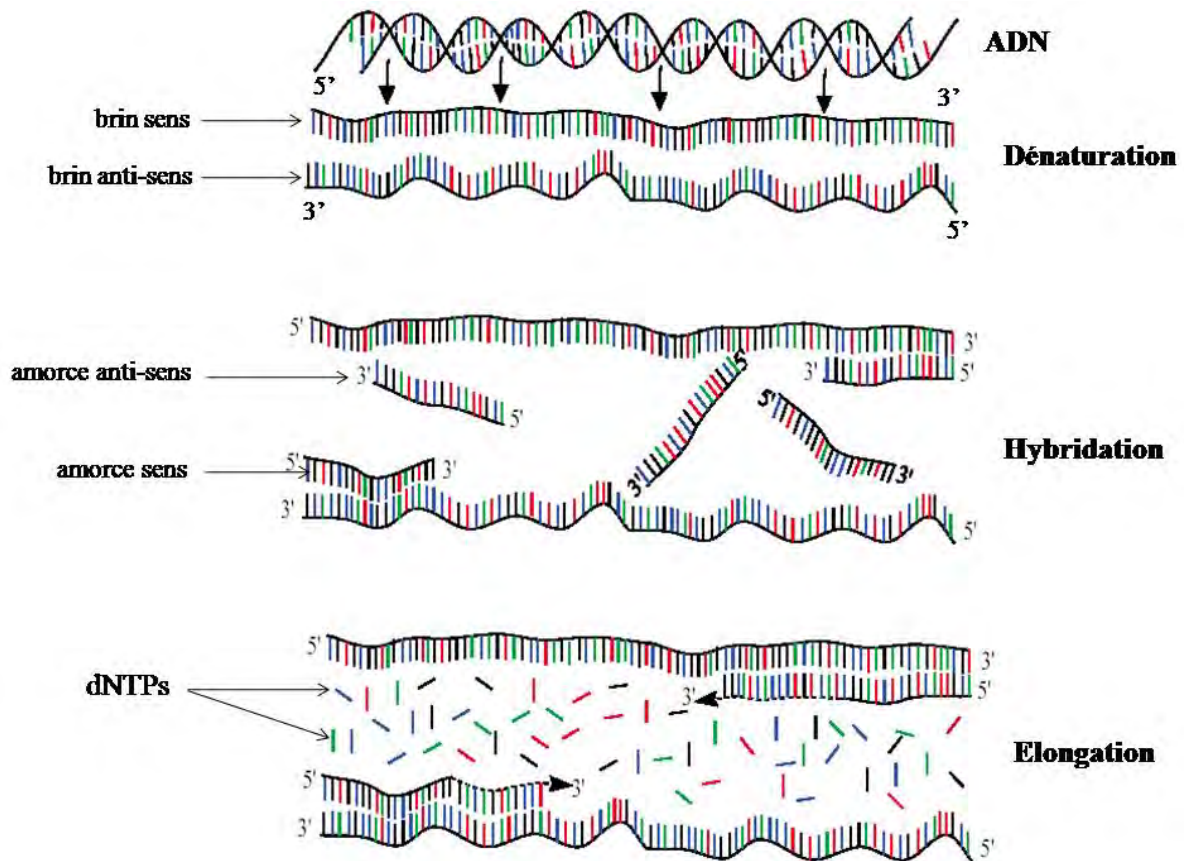
Après agitation et une brève centrifugation le mélange final est incubé à +42°C pendant 45 minutes dans un bain-marie. L'ADN<sub>C</sub> obtenu peut être conservé à – 20°C et est utilisé pour une réaction de polymérisation en chaîne.

## II. 5. 2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

### II.5.2.1 Principe

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier une zone spécifique de l'ADN en des milliers de copies. Un échantillon d'ADN sert de matrice de départ. La réaction démarre par une phase de dénaturation qui permet d'ouvrir le double brin d'ADN. Une phase d'hybridation permet aux amorces sens et anti-sens de se fixer respectivement sur le brin anti-

sens et le brin sens et enfin une phase d'élongation au cours de laquelle les nouveaux fragments d'ADN sont synthétisés par rajouts de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTPs) (figure 14).



**Figure 14 : Principe de la PCR**

### II.5.2.2 Mode opératoire

L'ADN<sub>C</sub> obtenu par transcription inverse sert de matrice de départ pour la réaction de polymérisation en chaîne. Ainsi, un mélange de 45 µl composé de tampon Taq (Promega), de dNTPs, de MgCl<sub>2</sub>, d'amorces, d'eau et d'une enzyme ADN polymérase (Taq DNA Polymerase) est ajouté aux 5 µl d'ADN<sub>C</sub> selon des proportions indiquées dans le tableau 4.

**Tableau 4 : Mélange réactionnel d'une PCR**

| Réactifs  | Concentration | Pour 1 réaction |
|---|---------------|-----------------|
| Tampon Taq (Promega)                                    | 10 x          | 5 µl            |
| dNTPs (Amersham Pharmacia)                              | 8 mM          | 5 µl            |
| M <sub>g</sub> Cl <sub>2</sub> (Promega)                | 25 mM         | 3 µl            |
| Amorce sens   | 100 ng/µl     | 5 µl            |
| Amorce anti-sens  | 100 ng/µl     | 5 µl            |
| Eau (Molecular Biology Grade, Brinkman Instruments USA) |               | 21,5 µl         |
| Enzyme Taq DNA Polymerase (Promega)                     | 5 u/µl        | 0,5 µl          |
| Volume final  |               | 45 µl           |

Le mélange PCR prêt, les tubes PCR (tubes 0,2 ml) contenant 45 µl de mélange PCR et 5 µl d'ADN<sub>C</sub> sont portés au niveau d'un thermocycleur (GenAmp® PCR System 9700). De plus pour chaque RT-PCR, il est systématiquement inclus au moins un témoin négatif (contenant de l'eau au lieu d'ADN<sub>C</sub>) et un témoin positif (ADN<sub>C</sub> préalablement testé et qui donne un résultat positif). La PCR est ensuite lancée à partir d'un programme de température qui varie suivant la méthode PCR qu'on a utilisé (tableaux 5 à 7).

**Tableau 5 : Méthode consensus pour le diagnostic des alphavirus (Pfeffer *et al.*, 1997)**

| Réaction              | Température (°C) | Temps       | Nombre de cycles |
|-----------------------|------------------|-------------|------------------|
| Dénaturation initiale | 94               | 2 minutes   | 1                |
|                       | 50               | 4 minutes   |                  |
|                       | 72               | 4 minutes   |                  |
| Dénaturation          | 94               | 20 secondes | 35               |
| Hybridation           | 50               | 30 secondes |                  |
| Elongation            | 72               | 60 secondes |                  |
| Elongation finale     | 72               | 10 minutes  | 1                |

**Tableau 6 : Méthode de diagnostic moléculaire de CHIK (Hasebe *et al.*, 2002)**

| Réaction              | Température (°C) | Temps       | Nombre de cycles |
|-----------------------|------------------|-------------|------------------|
| Dénaturation initiale | 94               | 4 minutes   | 1                |
| Dénaturation          | 94               | 30 secondes | 35               |
| Hybridation           | 54               | 30 secondes |                  |
| Elongation            | 72               | 30 secondes |                  |
| Elongation finale     | 72               | 5 minutes   | 1                |

**Tableau 7 : Méthode pour l'amplification de la E1 pour séquençage (Schuffenecker *et al.*, 2006)**

| Réaction              | Température (°C) | Temps      | Nombre de cycles |
|-----------------------|------------------|------------|------------------|
| Dénaturation initiale | 95               | 2 minutes  | 1                |
| Dénaturation          | 95               | 1 minute   | 40               |
| Hybridation           | 50               | 1 minute   |                  |
| Elongation            | 72               | 1 minute   |                  |
| Elongation finale     | 72               | 10 minutes | 1                |

La visualisation des produits d'amplification ou amplicons se fait par électrophorèse c'est-à-dire migration de l'ADN dans un gel d'agarose (à 1% ou 2 % selon la taille des fragments amplifiés) sous l'effet d'un champ électrique suivi d'une observation sous rayonnement ultra-violet grâce à l'agent intercalant (bromure d'éthidium) qui va s'insérer entre les plateaux des bases de l'ADN. Ce gel est préparé avec de la poudre d'agarose (Sigma) et une solution tampon TAE 1X (4,8 g Tris base, 1,14 ml acide acétique 99 %, 2 ml EDTA 0,5 M pH 8 complétés à 1 litre d'eau distillée) et quelques gouttes de bromure d'éthidium (BET). Il est déposé dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration TAE 1X. Dix µl de produits PCR associés à 2 µl de tampon de charge (0,25 % bleu de bromophénol, 0,25 % xylène cyanol, 30 % de glycérol dans de l'eau distillée) sont déposés dans les puits du gel. Un marqueur de poids moléculaire (HyperLadder I, Bioline) est déposé (12 µl) en parallèle et permet de connaître la taille des fragments migrés ainsi que leur quantité. La migration se fait sous l'effet d'un champ électrique entretenu par un générateur de courant sous un voltage de 100 volts pendant 45 minutes. A la fin de la migration, le gel est déposé sur une table munie d'une lampe ultra-violet et d'un appareil photographique. Les photos peuvent montrer des

bandes nettes ou des bandes nécessitant d'être purifiées avant une utilisation ultérieure comme dans le cas d'un séquençage.

## **II.2.6 Evaluation de la méthode RT-PCR**

L'évaluation et la validation de la méthode RT-PCR pour le diagnostic du virus CHIK est un processus incrémental qui consiste à : i) valider les amorces en s'assurant qu'elles permettent d'amplifier toutes les souches ouest africaines ; ii) déterminer le seuil de détection minimal de la méthode et s'assurer qu'il est compatible avec le niveau de virémie observé chez les patients infectés par le virus CHIK ; iii) évaluer la spécificité analytique.

### **II.2.6.1 Titrage des stocks viraux**

#### **II.2.6.1.1 But**

Le titrage d'une suspension virale a pour but de déterminer le nombre de particules virales infectieuses par unité de volume (le millilitre). La détermination du seuil de détection se fait à partir d'une suspension virale de titre connu.

Le titrage d'une suspension virale peut se faire par différentes méthodes. Dans ce travail, nous avons utilisé la méthode des plages (figure 15).

#### **II.2.6.1.2 Mode opératoire**

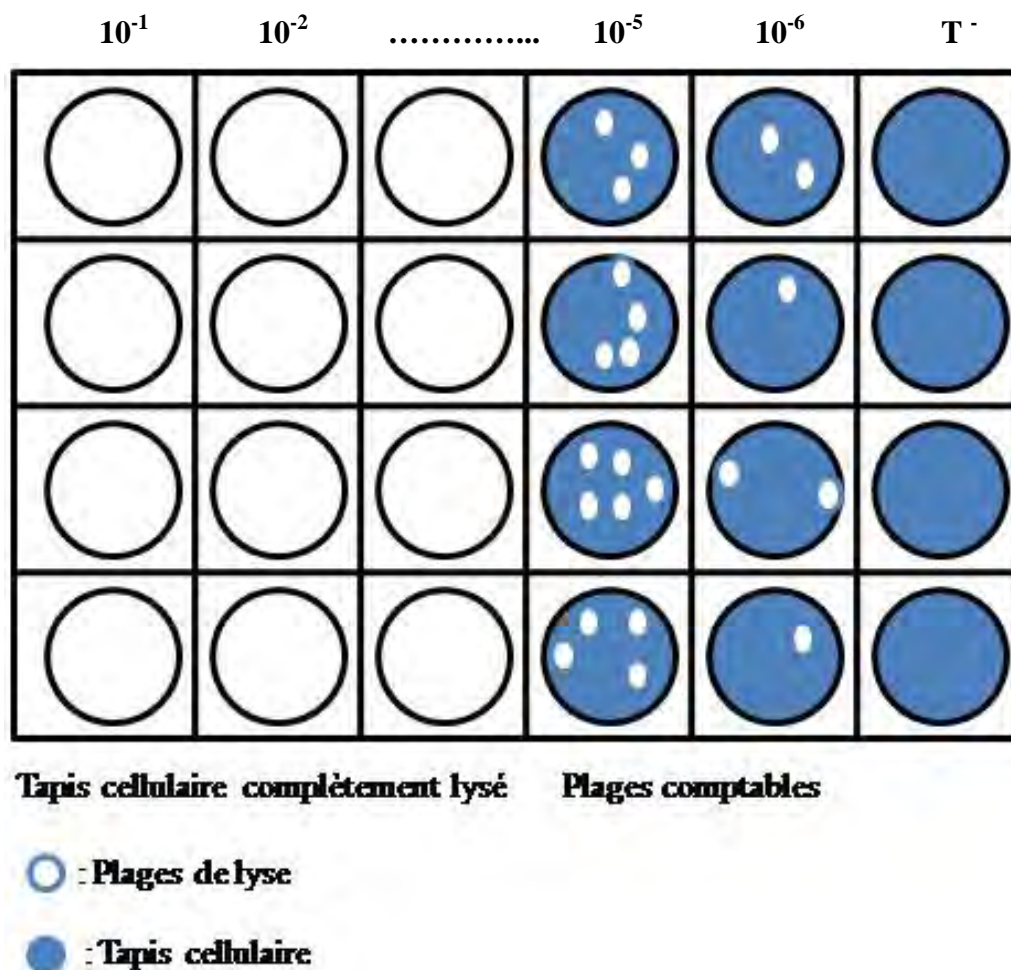
Des dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  de la suspension virale à titrer dans du milieu de culture L15 à 3% de SVF sont réalisées. Une plaque de 24 cupules (Nunc<sup>TM</sup>) est utilisée pour la manipulation. Dans chaque cupule, il est déposé 200 µl de L15 à 3% de SVF, 200 µl de la dilution de virus et 200 µl d'une suspension de cellules Véro (cellules de reins de singe) à  $1,2 \times 10^6$  cellules /ml. La plaque est ensuite scellée avec du scotch et incubée à +37°C pendant 3 heures pour permettre une bonne pénétration des virus dans les cellules Véro. Après incubation, 400 µl d'un milieu recouvrant composé de 50 % de CMC (Carboxymethyl cellulose) à 3,2 % (3,2 g de CMC pour 100 ml d'eau bi-distillée avant autoclavage) et de 50 % de L15 à 3 % SVF sont ajoutés et la plaque est à nouveau scellée pour une incubation de 4 jours à +37°C en évitant de déplacer la plaque car cela peut modifier l'aspect des plages. Quatre à 5 jours après, le milieu recouvrant est prélevé délicatement en évitant de toucher le tapis cellulaire avec le bout de la pipette et chaque cupule est lavée avec 0,5 ml de PBS 1X. Le PBS est ensuite retiré et

chaque cupule est remplie avec 0,5 ml de noir amido (noir amido 1 g, acide acétique 60 ml, acétate de sodium 13,6 g, complétés à 1000 ml) puis laissée à température ambiante pendant 30 minutes. Le noir amido est ensuite vidé en retournant la plaque au dessus d'un évier, elle est ensuite séchée à température ambiante. On identifie la cupule où les plages sont visibles et comptables, le titre sera déduit de la relation :

$$T = \text{moyenne du nombre de plages pour une dilution} \times 5^a \times \text{facteur de dilution}$$

a : le facteur 5 permet de ramener l'unité à UFP/ml puisque 200  $\mu$ l ont été utilisés

UFP : unité formant plaque.



T<sup>-</sup> : Témoin négatif

Figure 15 : Principe du titrage par la méthode des plages

### II.2.6.2 Détermination de la spécificité

L'objectif est de montrer que la méthode RT-PCR ne détecte que le virus CHIK et non les autres alphavirus proches de CHIK comme les virus O'Nyong Nyong, Igbo Ora, Babanki, Ndumu, Middelburg, Semliki Forest, Zingilamo, Ar V 9/71 (Viet Nam).

### II.2.6. 3 Détermination du seuil de détection

Des dilutions de 10 en 10 sont faites à partir d'un surnageant viral de titre connu jusqu'à la dilution  $10^{-3}$  aussi bien dans du milieu L15 que dans du sérum humain artificiel (NAT, Acrometrix). Les ARN viraux de ces dilutions sont extraits et des RT-PCR en une seule étape (c'est-à-dire RT et PCR en une seule étape) effectuées avec le kit Titan (Titan One Tube, Roche).

Un mélange réactionnel contenant certains composants du kit Titan, est préparé selon les proportions indiquées dans le tableau 8.

**Tableau 8 : Mélange réactionnel d'une RT-PCR en une seule étape**

| Réactifs                   | Concentration | Volume pour 1 réaction |
|----------------------------|---------------|------------------------|
| Tampon Titan (Roche)       | 5x            | 10 µl                  |
| dNTPs (Amersham Pharmacia) | 10 mM         | 4 µl                   |
| DTT (Roche)                | 100 Mm        | 2 µl                   |
| Amorce sens                | 100 ng / µl   | 5 µl                   |
| Amorce anti-sens           | 100 ng / µl   | 5 µl                   |
| Rnase (Promega)            | 40 u/ µl      | 0,2 µl                 |
| Enzymes Titan (Roche)      |               | 1 µl                   |
| Volume final               |               | 27,2 µl                |

22,8 µl d'ARN sont ajoutés à ce mélange et la RT-PCR est lancée selon le programme de température du tableau 9.

**Tableau 9 : RT-PCR en une seule étape (Pfeffer *et al.*, 2002)**

| Réaction              | Température (°C) | Temps       | Nombre de cycles |
|-----------------------|------------------|-------------|------------------|
| RT                    | 50               | 30 minutes  | 1                |
| Dénaturation initiale | 94               | 2 minutes   | 1                |
| Dénaturation          | 94               | 30 secondes | 35               |
| Hybridation           | 54               | 30 secondes |                  |
| Elongation            | 68               | 30 secondes |                  |
| Elongation finale     | 68               | 7 minutes   | 1                |

### **II.2.6.3 Détermination de la répétabilité**

La répétabilité permet d'apprécier les limites d'un résultat. Elle est réalisée en utilisant des échantillons manipulés dans les mêmes conditions. Dans le cadre de la détermination de la limite minimale de détection, une fois la limite connue l'échantillon correspondant est repris 10 fois en une seule manipulation et dans les mêmes conditions opératoires.

### **II.2.6.4 Mise au point de nouvelles amorces**

Au cas où les méthodes de RT-PCR évaluées ne donneraient pas de résultats satisfaisants, la mise au point de nouvelles amorces serait envisagée. Pour cela des alignements de séquences du virus CHIK sont réalisés à l'aide du logiciel Clustal w (Thompson *et al.*, 1994). Les séquences des amorces seront choisies au niveau de zones conservées. Elles seront ensuite analysées avec le logiciel Oligo 6 version 6.67 (Richlik., 2007).

## **II.2.7 Etude de la variabilité moléculaire**

Les protéines d'enveloppe virale sont impliquées dans les mécanismes de fixation et de pénétration dans les cellules hôtes. Aussi, elles varient souvent afin d'échapper au système immunitaire de leurs cellules hôtes. Nous nous sommes donc intéressés à l'analyse de la variabilité de l'une d'entre elles, la glycoprotéine d'enveloppe E1 pour affiner le diagnostic moléculaire par la mise au point de méthode RT-PCR pour les souches d'Afrique de l'ouest. Cette information sur la variabilité des souches pourra être utilisée pour comprendre la dynamique de circulation du virus CHIK en Afrique particulièrement au Sénégal. L'étude de la variabilité du CHIK implique le séquençage de la glycoprotéine E1 suivie de l'analyse phylogénétique puis de la construction d'arbres phylogénétiques.

### **II.2.7.1 Séquençage**

#### **II.2.7.1.1 But**

Le séquençage permet de connaître la succession des nucléotides sur une portion ou tout le génome. Dans le cadre de cette étude, il a concerné la glycoprotéine d'enveloppe E1 qui fait 1305 paires de bases (Khan *et al.*, 2002). Les amorces 10145 F et 11158 R (Schuffenecker *et al.*, 2006) ont été utilisées pour amplifier cette zone. Les fragments amplifiés ou amplicons



ont été envoyés à la société Génome Express (France) pour réaliser le séquençage. Ces produits peuvent être envoyés bruts ou bien purifiés en cas d'amplification non spécifique.

#### **II.2.7.1.2 Purification des amplicons**

Il s'agit de séparer les bandes parasites de la bande spécifique à séquencer. La purification a été faite en utilisant un kit de purification QIAquick® Gel Extraction (Qiagen). Les fragments amplifiés sont déposés dans un gel dont la concentration est compatible avec la taille des produits à purifier et migrés à 50 mV pendant le temps nécessaire pour la séparation des bandes (au moins 1 heure). Chaque bande correspondant à la bonne taille est découpée sous UV en évitant de prendre l'excès d'agarose. Les bandes sont déposées dans un tube Eppendorf 1,5 ml et pesée en évitant de dépasser les 400 mg auquel cas la bande d'agarose devra être répartie en deux tubes. Une solution de tampon QG est utilisée pour dissoudre les bandes contenant le fragment d'ADN selon la proportion 100 µl de tampon QG pour 100 mg de gel. Les tubes sont ensuite incubés à +50 °C pendant 10 mn jusqu'à dissolution complète du gel. Après dissolution, il faut vérifier que la mixture est de couleur jaune, si elle est orange ou violette ajouter 10 µl d'acétate de sodium (3 M pH 5) et agiter jusqu'à l'apparition de la couleur jaune. Si la taille des bandes est inférieure à 500 paires de bases ou supérieure à 4000 paires de bases, ajouter 100 µl d'isopropanol pour 100 mg de gel. 750 µl du mélange gel-tampon QG sont déposés dans une colonne QIAquick puis centrifugés à 8000 tours/mn pendant 1 mn. Le liquide du tube de collecte est éliminé et la colonne replacée dans le tube. Cette étape est reprise pour finir le mélange gel-tampon QG. 500 µl de tampon QG sont rajoutés dans la colonne et centrifugés à 8000 tours/mn pendant 1 mn. Les fragments d'ADN retenus par la colonne sont lavés en ajoutant 750 µl de tampon PE et centrifugés à 8000 tours/mn pendant 1 mn après une incubation de 2 à 5 mn. Le liquide du tube de collecte est éliminé et la colonne replacée dans le tube puis re-centrifugé à 13000 tours/mn pendant 1 mn. La colonne est placée dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml. Les fragments d'ADN sont élués en ajoutant 50 µl de tampon EB (10 mM Tris Cl ; pH 8,5) après une incubation d'une minute à température ambiante. L'ADN est ensuite recueilli par centrifugation à 8000 tours/mn pendant 1 mn.

### **II.2.7.1.3 Analyse des séquences**

Elle consiste à vérifier les séquences reçues avant de les valider. Une fois validées, les séquencées sont utilisées pour faire des alignements qui permettent d'apprécier les différences en nucléotides et en acides aminés entre les souches étudiées. Ce travail s'est fait en utilisant des logiciels de bioinformatique (DNA Strider version 1.3 (Dr Christian Marck, CEA ; France) ; Clustal w (Thompson *et al.*, 1994) ; Se-Al version 2.0 a11 (Andrew Rambaut, Université d'Oxford) ; BBEEdit version 6.1.2 (Bare Bones Software, Inc) ; Edit View version 1.0.1 (Applied Biosystems, 1996); ABITyper version 5.3).

### **II.2.7. 2 Analyse phylogénétique**

L'un des objectifs de ces travaux est de comprendre les modalités de circulation du virus CHIK en Afrique de l'ouest et d'établir les relations existant entre les différentes souches. A partir des alignements de séquences, des arbres phylogénétiques ont été construits avec les logiciels Clustal w et njplot (Perrière *et al.*, 1996). L'analyse de ces arbres phylogénétiques permet d'établir les relations entre les différentes souches circulant dans le monde.

## **TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION**

### **I. RESULTATS**

## I.1 Titrage des stocks viraux

Ce titrage a été réalisé avec la souche H D 180738. La coloration s'est faite 3 jours après infection. Le titre a été calculé à partir de la dilution  $10^{-5}$  qui a révélé après coloration 43 plages de lyse pour les 4 puits de la plaque soit une moyenne de 10,75 plages par puits. Le titre ainsi obtenu est de  $5,375 \times 10^6$  UFP/ml.

## I.2 Diagnostic par RT-PCR

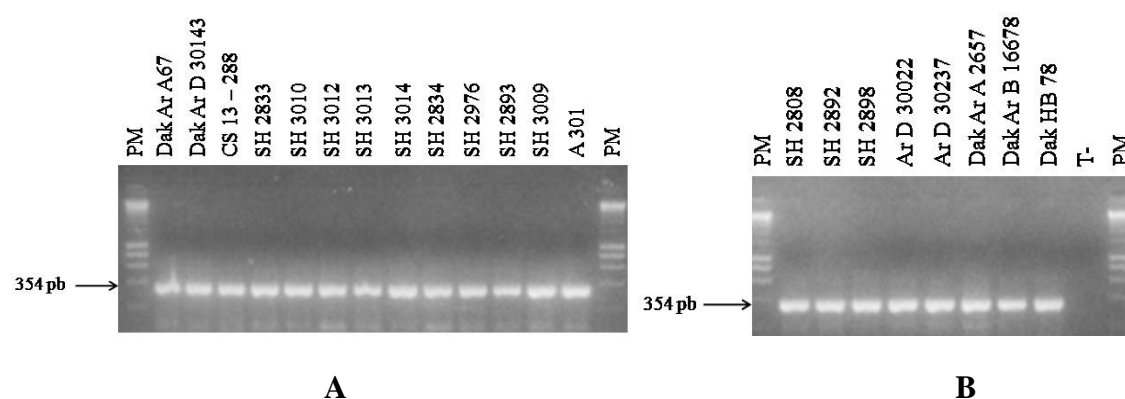
Quatre méthodes RT-PCR utilisant différents couples d'amorces (tableau 2) et ciblant différentes régions du génome (nsP1 ou E1) ont été testées. Le tableau 10 résume les résultats obtenus avec chacun de ces couples.

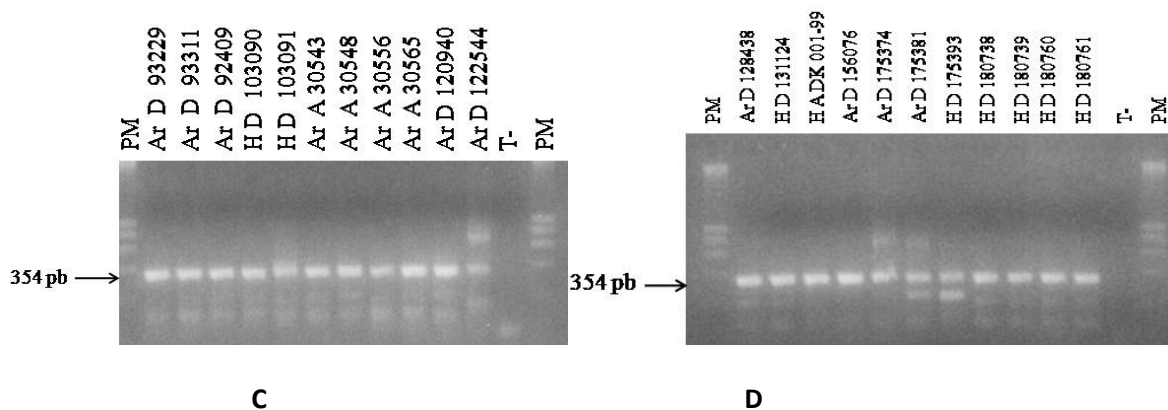
**Tableau 10 : Résultats du diagnostic moléculaire RT-PCR**

| Amorces                         | M2W/cM3W | Hasebe nsP1 | Hasebe E1 |
|---------------------------------|----------|-------------|-----------|
| Nombre de souches détectées     | 37*      | 43          | 42        |
| Nombre de souches non détectées | 5        | 0           | 1         |

\*: dont 4 après une PCR semi-nichée

Ces résultats montrent que seules les amorces nsP1-S (5'TAGAGCAGGAAATTGATCCC3') et nsP1-C (5'CTTTAATCGCCTGGTGGTAT3') (Hasebe *et al.*, 2002) ont pu détecter l'ensemble des 43 souches (figures 16).





**Figures 16 (A, B, C, D) : Détection des 43 souches étudiées par les amorces nsP1-S et nsP1-C (Hasebe *et al.*, 2002) PM : marqueur de taille moléculaire T - : témoin négatif**

### I.3 Evaluation de la RT-PCR

L'évaluation des amorces nsP1-S et nsP1-C (Hasebe *et al.*, 2002) se fait par la détermination de la spécificité et du seuil minimal de détection de ces amorces.

#### I.3.1 Détermination de la spécificité

L'objectif de cette partie est de vérifier que les amorces nsP1-S / nsP1-C (Hasebe *et al.*, 2002) ne détectent que le virus CHIK. Pour cela une des souches de CHIK (SH 2657) préalablement détectée par ces amorces et huit autres alphavirus (O'nyong nyong (ONN), Igbo Ora (IGBO), Zingilamo (ZIN), Middelburg (MID), Semliki Forest (SF), Babanki (BB), Ndumu (ND), Ar V 9/71) ont été testés.

Les résultats obtenus sont montrés dans la figure 17 et indiquent que les amorces nsP1-S / nsP1-C (Hasebe *et al.*, 2002) détectent aussi les virus ONN et IGBO avec des bandes de 400 pb alors que les souches de CHIK sont détectées à 354 bp.



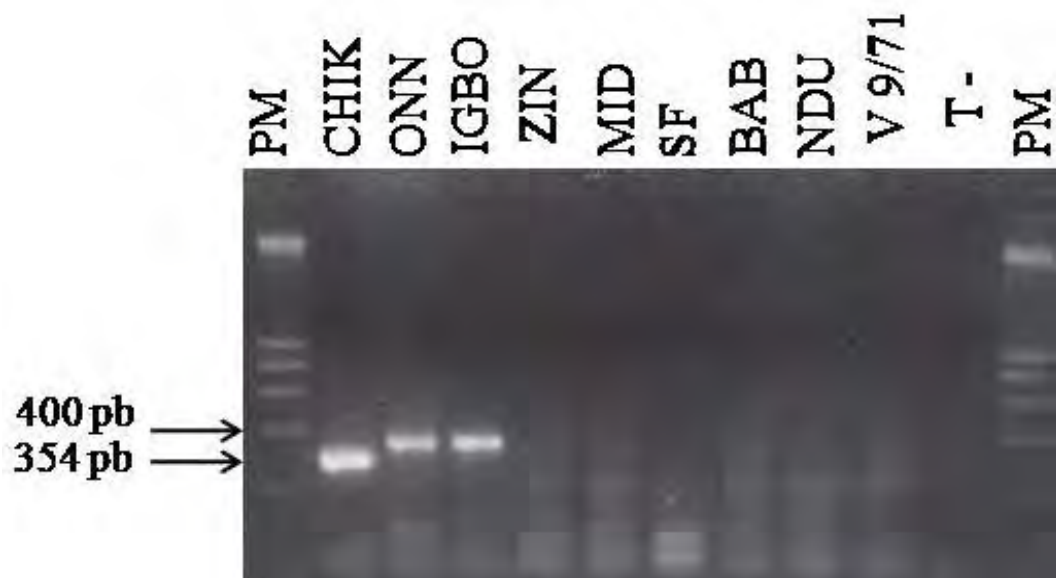


Figure 17 : Test de spécificité des amorces nsP1-S / nsP1-C

Cette situation nous a conduit à essayer de mettre au point de nouvelles amorces plus spécifiques du virus CHIK.

### I.3.2 Mise au point de nouvelles amorces

Un alignement a été réalisé à partir des 41 séquences obtenues et de 32 autres séquences de CHIK disponibles dans la base de données mondiale des séquences de micro-organismes, GenBank. Les amorces ont été choisies à des positions conservées (position 10691 pour l'amorce sens et 11008 pour l'amorce complémentaire par rapport à la souche S27 de référence du virus CHIK, figures 18 et 19) sur l'ensemble des 73 séquences alignées de CHIK mais non conservés pour les autres alphavirus aux positions clés pour l'amplification. Elles ont été analysées avec le logiciel Oligo 6 version 6.67 (Richlik., 2007). Les séquences de ces amorces déduites de l'alignement sont pour l'amorce sens : **Chik 428S17 : 5' ACT CTC AGG CAC CAT CT 3'** et pour l' amorce anti-sens **Chik 729C17 : 5' TRG TRA CGG CGT TGG TC 3'**.

|       |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 10684 | 10694 | 10704 | 10714 | 10724 | 10734 |
|       |       |       |       |       |       |
| 5'    |       | 3'    |       |       |       |

|                           |   |
|---------------------------|---|
| 'A67 '                    | GTACCATACT CTCAGGCACC ATCTGGCTTC AAGTATTGGC TGAAGGAACG AGGAGCATCG |
| 'ArD30143SN79 '           | .....   |
| 'CS13-288SN62 '           | ..G.....T.....T..A..A.....G..G...                                 |
| 'SH2833SN66 '             | .....   |
| 'SH3010SN65 '             | .....   |
| 'SH3012SN66 '             | .....   |
| 'SH3013SN66 '             | .....   |
| 'SH2834SN66 '             | .....   |
| 'SH2976SN65 '             | .....   |
| 'SH2893SN66 '             | .....   |
| 'SH3009SN66 '             | .....   |
| 'A301SN63 '               | ..G.....T.....T..A..A.....G..G...                                 |
| 'SH2892SN66 '             | .....   |
| 'ArD30022SN79 '           | .....   |
| 'ArD30237SN79 '           | .....   |
| 'ArA2657 '                | .....   |
| 'ArB16678 '               | ..G.....T.....A..A.....G..G...                                    |
| 'HB78RCA78 '              | ..G.....T.....A.....G..G...                                       |
| 'ArD93229SN92 '           | .....   |
| 'ArD120940SN96 '          | .....T.....   |
| 'ArD128438SN97 '          | .....   |
| 'HD131124SN98 '           | .....   |
| 'HA001-99CIV99 '          | ..G.....T.....T..A..A.....G..G...                                 |
| 'ArD156076SN2001 '        | ..G.....T.....T..A..A.....G..G...                                 |
| 'ArD175374SN2004 '        | ..G.....T.....T..A..A.....G..G...                                 |
| 'ArD175381SN2004 '        | ..G.....T.....T..A..A.....G..G...                                 |
| 'ArD175393SN2004 '        | ..G.....T.....T..A..A.....G..G...                                 |
| 'HD180738SN2005 '         | .....A.....   |
| 'HD180761SN2005 '         | .....A.....   |
| 'AF192906RCA '            | ..G.....T.....C.....A.....G..G...                                 |
| 'AY549583-RDC96 '         | ..G.....T.....A..A.....G..G...                                    |
| 'AF192903-AFSUD76 '       | ..G.....T.....C..T..A..A.....G..G...                              |
| 'AF192904-AFSUD76 '       | ..G.....T.....C..T..A..A.....G..G...                              |
| 'AF192905-TAN53 '         | ..G.....T.....T..A..A.....G..G...                                 |
| 'AY549576-RDC2000 '       | ..G.....T.....A..A.....G..G...                                    |
| 'AY549577-RDC2000 '       | ..G.....T.....A..A.....G..G...                                    |
| 'AY549579-RDC2000 '       | ..G.....T.....A..A.....G..G...                                    |
| 'AY549575-RDC2000 '       | ..G.....T.....A..A.....G..G...                                    |
| 'AY549578-RDC2000 '       | ..G.....T.....A..A.....G..G...                                    |
| 'AY549581-RDC2000 '       | ..G.....T.....A..A.....G..G...                                    |
| 'AY549582-RDC2000 '       | ..G.....T.....A..A.....G..G...                                    |
| 'AY549580-RDC2000 '       | ..G.....T.....A..A.....G..G...                                    |
| 'AY549584-RDC2000 '       | ..G.....T.....CT.....G..G...                                      |
| 'AF192896-Thailand88 '    | ..G..G.....A..A.....G..G...                                       |
| 'AF192899-Thailand78 '    | ..G..G.....A..A.....G..G...                                       |
| 'AF192894-Indonésie85 '   | ..G..G.....A..A.....G..G...                                       |
| 'AF192895-Philippines85 ' | ..G..G.....A..A.....G..G...                                       |
| 'AF192898-Thailand75 '    | ..G..G..T.....A..A.....G..G...                                    |
| 'AF192901-India63 '       | ..G..G.....A..A.....G..G...                                       |
| 'AF192902-India73 '       | ..G..G.....C.....A..A.....G..G...                                 |
| 'AF192897-Thailand95 '    | ..G..G.....A..A.....G..G...                                       |
| 'AF192900-Thailand96 '    | .....G..T.....A..A.....G..G...                                    |
| 'AF192892-AOF '           | .....   |
| 'AF192891-Sénégal66 '     | .....   |
| 'AM258990-IR2005 '        | ..G.....T.....A..A.....C..G..G...                                 |
| 'AM258991-IR2005 '        | ..G.....T.....A..A.....C..G..G...                                 |
| 'AM258992-IR2005 '        | ..G.....T.....A..A.....C..G..G...                                 |
| 'AM258993-IR2005 '        | ..G.....T.....A..A.....C..G..G...                                 |
| 'AM258994-IR2005 '        | ..G.....T.....A..A.....C..G..G...                                 |
| 'AM258995-IR2005 '        | ..G.....T.....A..A.....C..G..G...                                 |
| 'EF051584-CAM2006 '       | ..G.....G.....T..A..C..T.....G..G...                              |
| 'AF192889-ONN '           | ..G..T..T..C.....T..G.....T.....C.....C..A..AA...G.....A          |
| 'ArD122544SN96 '          | .....T.....   |
| 'ArA30565CI96 '           | .....   |
| 'ArA30548CI93 '           | .....   |
| 'ArA30543CI93 '           | .....   |
| 'HD103091SN93 '           | .....   |
| 'HD103090SN93 '           | .....   |
| 'ArD92409SN94 '           | .....   |
| 'ArD93311SN93 '           | .....   |
| 'SH2898SN66 '             | .....   |
| 'SH3014SN66 '             | .....   |
| 'HD180739SN2005 '         | .....A.....   |
| 'HD180760SN2005 '         | .....A.....   |
| AF079456ONN               | ..G..T.....C.....C..G.....T.....C.....C..A..AA...G.....A          |
| AF079457IGBO              | ..G..T..T..C.....T..G.....T.....C.....C..A..AA...G.....A          |

**Figure 18 : Position de l'amorce sens Chik 428S 17**

(en vert conservation de la position en extrémité 3' sur les 73 souches du virus CHIK, en jaune non conservation de cette position en extrémité 3'pour les virus ONN et IGBO)

|        |          |               |       |       |            |            |       |        |
|--------|----------|---------------|-------|-------|------------|------------|-------|--------|
|        | 10984    | 10994         | 11004 | 11014 | 11024      | 11034      |       |        |
|        |          |               |       |       |            |            |       |        |
| 'A67 ' | CATTCGAT | GA CCAACGCCGT | TACCA | TTCGA | GAAGCCGACG | TAGAAGTAGA | GGGGA | AACTCC |

[illegible]

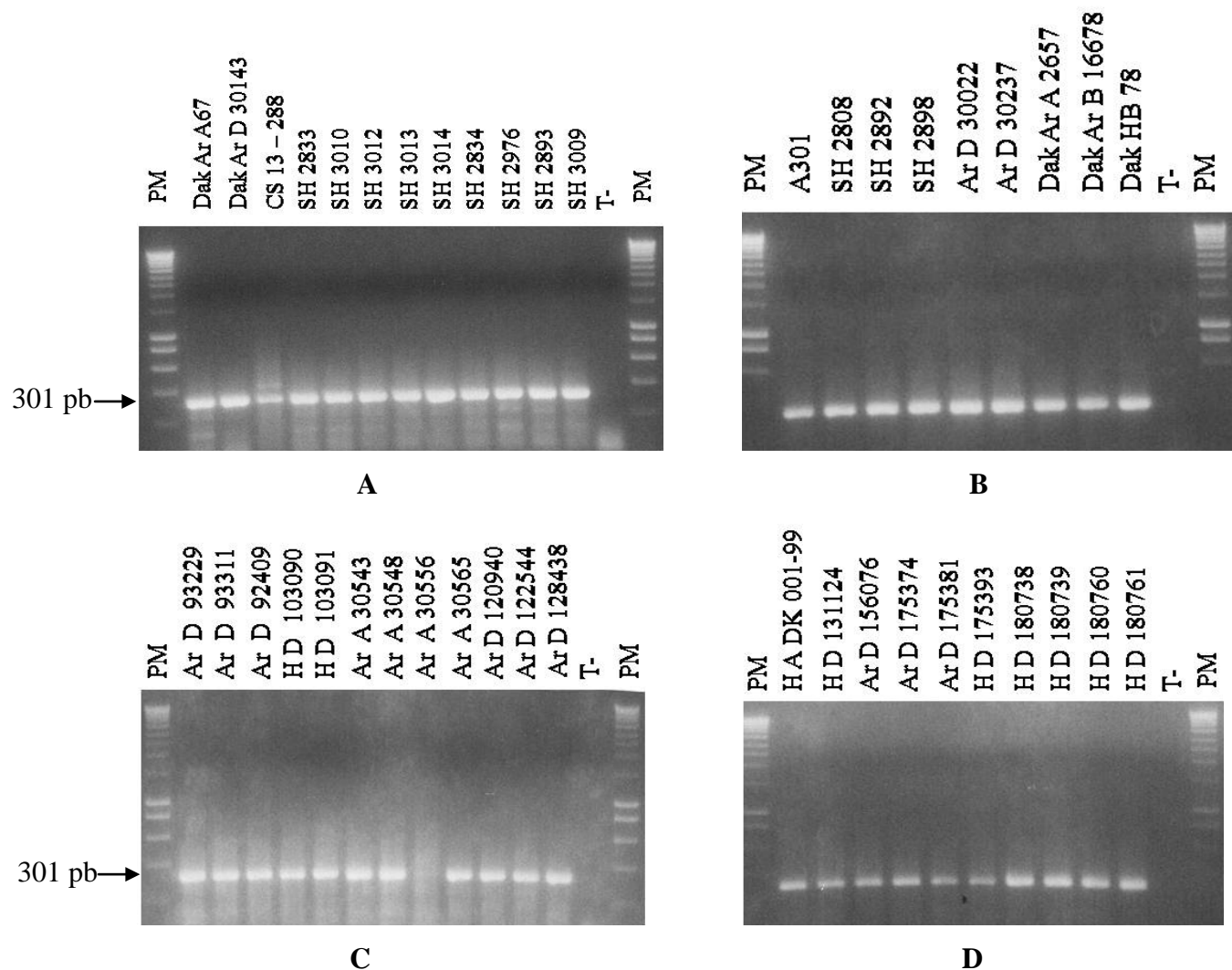
**Figure 19 : Position de l'amorce complémentaire Chik 729C 17**  
(vert conservation de la position en 5' sur les 73 souches du virus CHIK, en jaune non conservation de cette position en extrémité 5' pour les virus ONN et IGBO)

### I.3.3 Evaluation des amorces Chik 428S 17 et Chik 729C 17



### I.3.3.1 Diagnostic RT-PCR

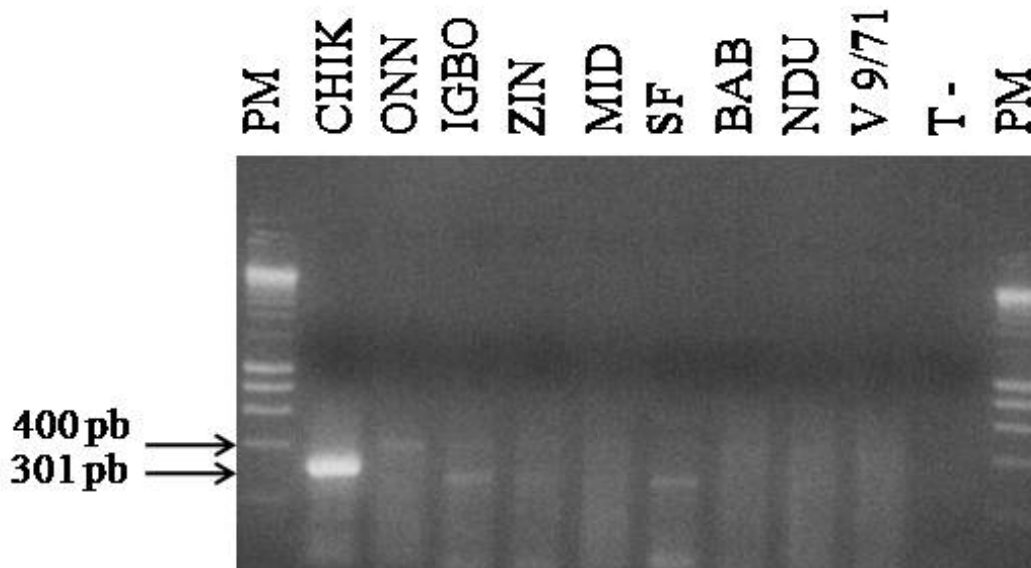
Les amorces Chik 428S 17/Chik 729C 17 ont été testées avec les 43 souches. Les résultats obtenus (figures 20) montrent qu'elles détectent toutes les souches avec néanmoins un signal plus faible avec la souche Ar A 30556.



Figures 20 (A, B, C, D) : Détection des 43 souches étudiées par les amorces Chik 428S17/Chik 729C17

### I.3.3.2 Détermination de la spécificité des amorces Chik 428S 17/Chik 729C 17

Huit alphavirus (ONN, IGBO, ZIN, MID, SF, BAB, NDU, Ar V 9/71) ont été testés avec les amorces Chik 428S 17/Chik 729C 17 qui montrent une meilleure spécificité par rapport aux amorces nsP1-S et nsP1-C.

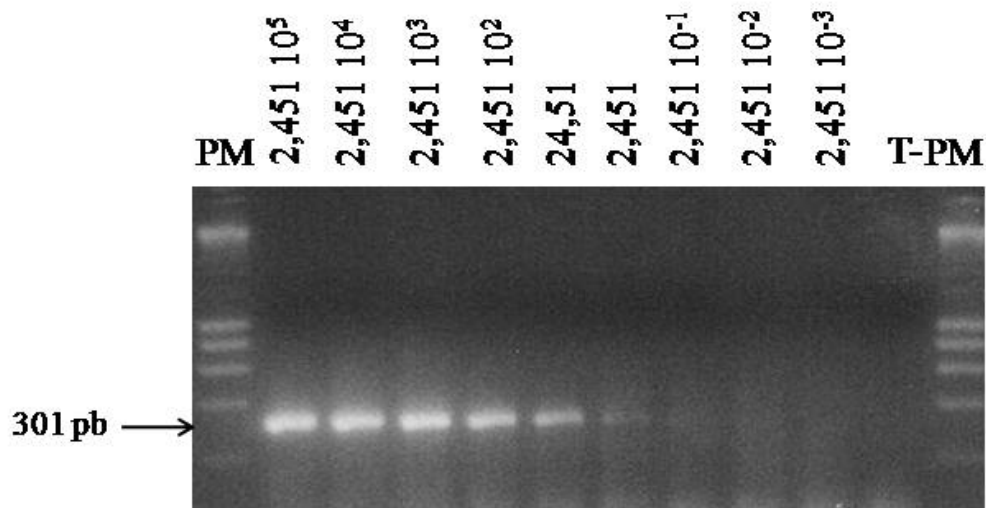


**Figure 21 : Test de spécificité des amorces Chik 428S 17/Chik 729C 17**

### **I.3.3.3 Détermination du seuil de détection des amorces Chik 428S 17/Chik 729C 17**

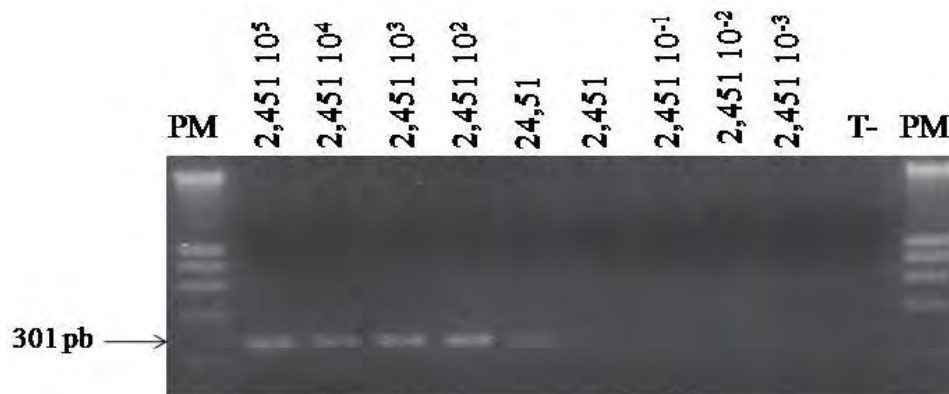
Des dilutions au dixième en série ont été effectuées à partir d'un échantillon de la souche HD 180738 de titre égal à  $5,375 \cdot 10^6$  UFP/ml aussi bien lorsqu'elle est diluée dans du milieu L15 que dans du sérum humain artificiel. Les titres des dilutions variant de  $2,451 \cdot 10^5$  UFP jusqu'à  $2,451 \cdot 10^{-3}$  UFP par prise d'essai c'est-à-dire sur les 22,8  $\mu$ l d'ARN utilisé pour la RT-PCR en une étape.

Dans du milieu L15, le virus a été détecté jusqu'à 2,451 UFP (figure 22) avec une performance de 90 % de répétabilité.



**Figure 22 : Limite de détection des amorces Chik 428S 17/Chik 729C 17 sur L15**

Sur sérum artificiel, les résultats obtenus montrent une détection jusqu'à 24,51 UFP (figure 23) avec une performance de 100 % en répétabilité.



**Figure 23 : Limite de détection des amorces Chik 428S 17/Chik 729C 17 sur sérum humain artificiel**

## **I.4 Variabilité moléculaire**

### **I.4.1 Analyse des séquences**

41 souches de CHIK ont pu être séquencées sur une zone de 785 nucléotides après amplification par les amorces 10145 F/11158 R (Schuffenecker *et al.*, 2006). L'analyse de ces souches a montré 0 à 18,7% de divergence entre séquences nucléotidiques. La traduction de chaque séquence a donné 262 acides aminés montrant 0 à 7,6% de divergence dans

l'ensemble. L'analyse des séquences d'acides aminés n'a pas révélé de mutation à la position 226 de la Glycoprotéine d'enveloppe E1 et qui se traduit par un remplacement de l'alanine en valine (A226V) observée sur certaines souches apparues lors de l'épidémie de 2005 à l'île de la Réunion. Les souches d'Afrique de l'ouest ont donc conservé leur Alanine en position 226 (figure 24).

|                                       | 1020         | 1030        | 1040        | 1050        | 1060              | 1070       |
|---------------------------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|------------|
|                                       |              |             |             |             |                   |            |
| 'A67 '                                | KDVYANTQLV   | LQRPAA      | AGTVH       | VPYSQAPSGF  | KYWLKERGAS        | LQHTAPFGCQ |
| 'ArD30143SN79A.dalzieli '             | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'CS13-288SN62Scotophilus'             | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| SH2833SN66Humain                      | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'SH3010SN65Humain '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'SH3012SN66Humain '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'SH3013SN66Humain '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'SH2834SN66Humain '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'SH2976SN65Humain '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'SH2893SN66Humain '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'SH3009SN66Humain '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'A301SN63Chauve-souris(Rao) '         | .....        | .....       | .....       | .....       | V.....            | .....M.    |
| 'SH2892SN66Humain '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'ArD30022SN79 '                       | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'ArD30237SN79A.luteocephalus '        | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'ArA2657 '                            | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'ArB16678 '                           | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'HB78RCA78Humain '                    | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'ArD93229SN92A.dalzieli '             | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'ArD120940SN96A.lutocephalus '        | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....I.    |
| 'ArD128438SN97A.dalzieli '            | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'HD131124SN98Humain '                 | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....I.    |
| 'HA001-99CIV99Humain '                | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'ArD156076SN2001A.argenteopunctatus ' | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'ArD175374SN2004A.taylori '           | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'ArD175381SN2004A.luteocephalus '     | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'ArD175393SN2004A.furcifer '          | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'HD180738SN2005Humain '               | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....I.    |
| 'HD180761SN2005Humain '               | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....I.    |
| 'AF192906RCA '                        | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AY549583-RDC96 '                     | .....A.....  | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AF192903-AFSUD76 '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'AF192904-AFSUD76 '                   | .....        | .....K..... | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'AF192905-TAN53 '                     | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'AY549576-RDC2000 '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AY549577-RDC2000 '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AY549579-RDC2000 '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AY549575-RDC2000 '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AY549578-RDC2000 '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AY549581-RDC2000 '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AY549582-RDC2000 '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AY549580-RDC2000 '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AY549584-RDC2000 '                   | .....        | .....       | .....G..... | .....C..... | .....             | .....      |
| 'AF192896-Thailand88 '                | E.....       | .....S..... | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'AF192899-Thailand78 '                | E.....       | .....S..... | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'AF192894-IndonŽsie85 '               | E.I.....     | .....S..... | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'AF192895-Philipines85 '              | E.....       | .....S..... | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'AF192898-Thailand75 '                | E.....       | .....S..... | .....       | .....       | .....R.....       | .....M.    |
| 'AF192901-India63 '                   | E.....       | .....S..... | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'AF192902-India73 '                   | E.....       | .....S..... | .....       | .....       | .....R.....S..... | .....M.    |
| 'AF192897-Thailand95 '                | E.....A..... | .....S..... | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'AF192900-Thailand96 '                | E.....       | .....S..... | .....       | .....       | .....             | .....M.    |
| 'AF192892-AOF '                       | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AF192891-SŽnŽgal66 '                 | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AM258990-IR2005 '                    | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AM258991-IR2005 '                    | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AM258992-IR2005 '                    | .....        | .....V..... | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AM258993-IR2005 '                    | .....        | .....V..... | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AM258994-IR2005 '                    | .....        | .....V..... | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'AM258995-IR2005 '                    | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'EF051584-CAM2006 '                   | .....G.....  | .....V..... | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'ArD122544SN96A.aegypti '             | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....I.    |
| 'ArA30565CI96Culex.weschei '          | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'ArA30548CI93A.africanus '            | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'ArA30543CI93A.opok '                 | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'HD103091SN93Humain '                 | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'HD103090SN93Humain '                 | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'ArD92409SN94A.furcifer '             | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'ArD93311SN93A.taylori '              | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'SH2898SN66Humain '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'SH3014SN66Humain '                   | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....      |
| 'HD180739SN2005Humain '               | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....I.    |
| 'HD180760SN2005Humain '               | .....        | .....       | .....       | .....       | .....             | .....I.    |

**Figure 24 : Analyse de l'acide aminé à la position 226 au niveau des souches de l'Afrique de l'ouest** (en rouge les souches ayant subi la mutation A226V ; en jaune les souches n'ayant pas subi la mutation).

#### **I.4.2 Analyse phylogénétique**

L'analyse de l'arbre phylogénétique (figure 25) a montré que les souches isolées en Afrique de l'ouest se regroupent en 2 lignées une incluant exclusivement des souches isolées en Afrique de l'ouest entre 1966 à 2005 (Afrique de l'ouest I) et une autre incluant des souches du génotype ECSA et du génotype Afrique de l'ouest (Afrique de l'ouest II) (figure 25).

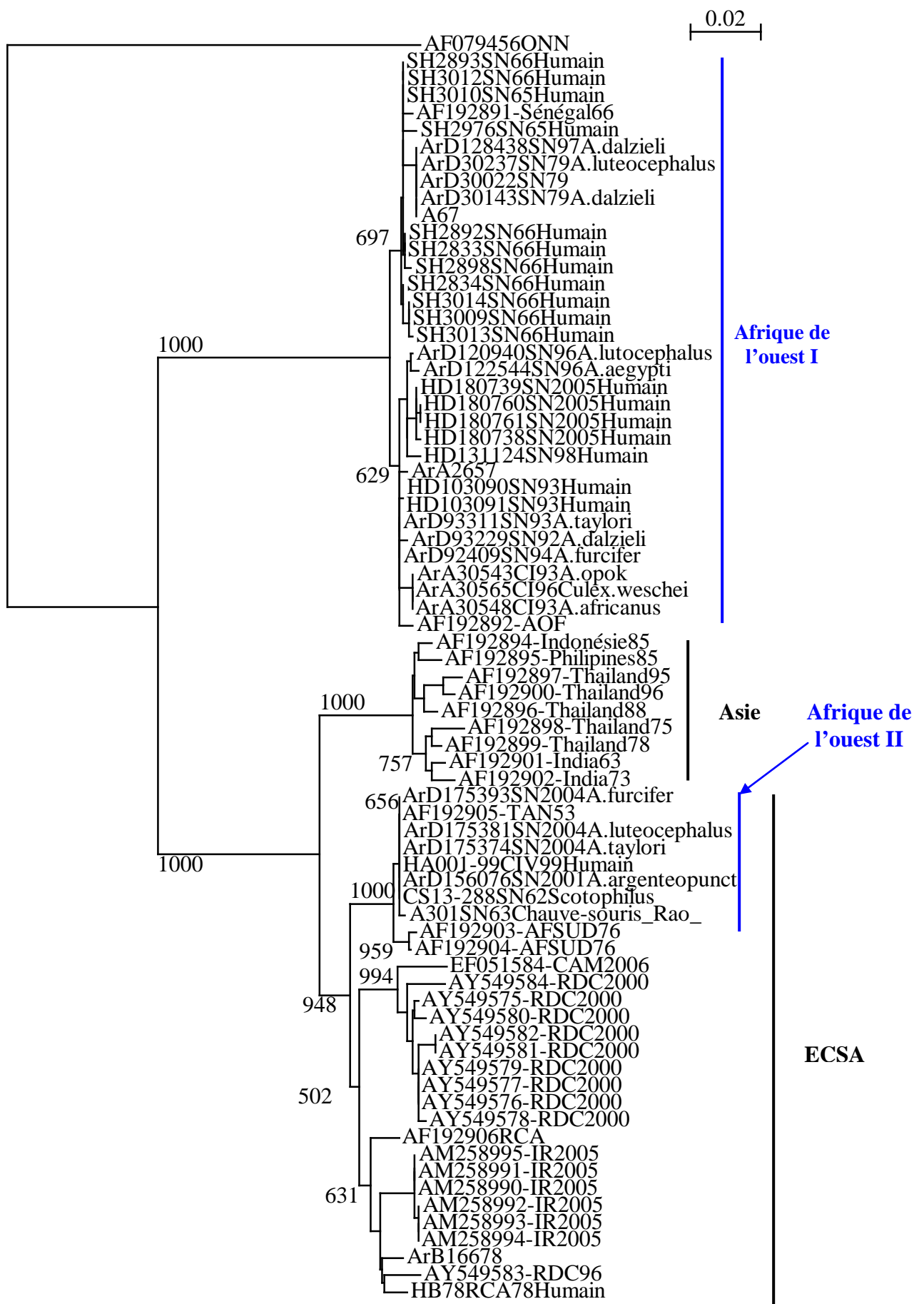


Figure 25 : Arbre phylogénétique des souches du virus Chikungunya

## II. DISCUSSION

### II.1. Diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire par RT-PCR des souches de CHIK circulant a été évalué lors de nos travaux. Différentes méthodes déjà développées pour le diagnostic de CHIK ont été testées. Les résultats obtenus ont montré qu'une de ces méthodes permet de détecter les 43 souches sélectionnées dans notre panel couvrant divers hôtes, pays, périodes et contextes épidémiologiques. L'évaluation de cette méthode a révélé qu'elle détecte deux autres alphavirus (O'nyong nyong et Igbo Ora) dont les fragments amplifiés sont à 400 bp alors que la bande spécifique du virus CHIK est à 354 bp.

Cette situation nous a conduit à développer une méthode qui serait plus spécifique du virus CHIK. Pour cela des amorces ont été choisies après alignement de 73 souches de CHIK. Ces amorces ont pu détecter l'ensemble des 43 souches et les tests de spécificité ont donné un meilleur résultat par rapport à celui obtenu par la méthode décrite par Hasebe *et al.*, 2002. En effet, de très faibles bandes (correspondant aux souches O'nyong nyong et Igbo Ora) apparaissent à 400 pb alors que la bande spécifique est à 301 pb.

La sensibilité de la méthode a été évaluée et les résultats obtenus montrent une détection jusqu'à 24,51 UFP/ml dans du milieu L15 alors que dans du sérum artificiel le seuil de détection est de 245,1 UFP/ml. Cette baisse pourrait être due à la différence de performance de l'extraction d'ARN dans du sérum et dans du milieu L15. Ces limites minimales de détection sont compatibles avec la virémie des patients infectés par CHIK qui tourne autour de  $10^5$  à  $10^7$  UFP (Sall., communication personnelle). La répétabilité est très intéressante car permet d'informer sur la robustesse des résultats et aide à fixer le seuil et les limites de la méthode s'il s'agit de faire un diagnostic.

Les résultats obtenus lors de nos travaux ont montré les limites de deux méthodes de diagnostic RT-PCR : une méthode spécifique des alphavirus (Pfeffer *et al.*, 1997) et une autre spécifique du virus CHIK mais qui a été évalué uniquement dans un contexte de circulation du virus de la dengue (Hasebe *et al.*, 2002). Il était donc intéressant de tester les souches de l'Afrique de l'ouest d'autant plus qu'elles n'avaient pas encore été évaluées. Ces résultats sont préliminaires et la méthode développée doit encore être retravaillée avant d'être validée. Elle permettrait alors de renforcer le diagnostic dans une zone de circulation active du virus CHIK de façon à mieux gérer des situations épidémiques en donnant des résultats rapides.



## II.2 Variabilité moléculaire

Le génotype ouest africain constitue l'un des trois génotypes déjà décrits (Powers *et al.*, 2000 ; Schuffenecker *et al.*, 2006). Cependant seules quelques souches d'Afrique de l'ouest ont fait l'objet de ces études. En disposant d'un panel de 43 souches, l'étude de leur variabilité moléculaire permettrait de mieux caractériser ce génotype ouest africain. Nous avons pu séquencer 41 souches dont les séquences d'une taille de 785 nucléotides montrent entre elles 0 à 18,7% de divergence en nucléotides et 0 à 7,6% de divergence en acides aminés. Leur analyse a aussi révélé l'absence de la mutation A226V.

Ces séquences permettront d'enrichir les banques de séquences sur le virus CHIK et d'étudier l'évolution du génotype ouest africain. Elles peuvent aussi être utilisées dans le développement d'outils de diagnostic moléculaire par la mise au point d'amorces dans des zones conservées. Les protéines d'enveloppe virale impliquées dans les mécanismes de fixation et de pénétration dans les cellules hôtes varient souvent afin d'échapper au système immunitaire de leurs cellules hôtes. La conservation de certaines zones codant pour ces glycoprotéines est un élément qui pourrait aider à affiner le diagnostic moléculaire par la mise au point de méthode RT-PCR spécifiques pour les souches de CHIK d'Afrique de l'ouest.

Du point de vue phylogénétique, nos résultats montrent une circulation de deux lignées : une qui est spécifique de l'Afrique de l'ouest (Afrique de l'ouest I) et une seconde plus proche du génotype ECSA (Afrique de l'ouest II). Celle-ci est constituée de souches cosmopolites, et pourrait s'expliquer par une introduction ancienne de souches du génotype ECSA puis leur maintien dans le temps ou par des introductions régulières de ces souches en Afrique de l'ouest.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de nos travaux, nous avons cherché à évaluer le diagnostic moléculaire du virus CHIK en Afrique de l'ouest en testant différentes méthodes déjà développées. Nous nous sommes aussi intéressés à l'étude de la variabilité moléculaire au niveau de la glycoprotéine d'enveloppe E1.

Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'une méthode considérée comme consensuelle des alphavirus ne détecte pas l'ensemble des souches étudiées. Par ailleurs une méthode considérée comme spécifique de CHIK détecte l'ensemble des souches mais aussi deux autres alphavirus (O'nyong nyong et Igbo Ora) et à des positions différentes. Suite à ces résultats, nous avons mis au point une méthode qui détecte l'ensemble des souches utilisées tout en étant plus spécifique que les méthodes de diagnostic moléculaire évaluées mais de très faibles bandes correspondant à ONN et IGBO apparaissent à des positions différentes de la bande spécifique du virus CHIK. Ces résultats préliminaires pourraient être améliorés sur la base de l'optimisation de la température ou des conditions de PCR (touch down, amélioration des concentrations des amorces compte tenu de la dégénérescence...).

Il serait aussi important de tester cette méthode sur des sérums de patients infectés et dont le statut sérologique est connu, afin de pouvoir faire des études comparatives.

L'étude de la variabilité moléculaire a montré la circulation de deux lignées du génotype ouest africain : une spécifique de l'Afrique de l'ouest (Afrique de l'ouest I) et une proche du groupe ECSA (Afrique de l'ouest II). L'hypothèse d'une introduction ancienne de souches du génotype ECSA puis de leur maintien dans le temps ou d'une introduction régulière de ces souches en Afrique de l'Ouest pourrait expliquer l'existence de cette lignée Afrique de l'ouest II. Pour trancher cette hypothèse le séquençage complet du génome et une analyse phylogénétique du flux des migrations de souches serait très utiles pour comprendre les modalités de dispersion et de circulation du virus CHIK en Afrique.

Nous avons aussi montré que les souches ouest africaines ne présentaient pas de mutation A226V.

En outre, les séquences dont nous disposons pourraient permettre d'envisager le développement d'une méthode de diagnostic moléculaire RT-PCR à temps réel.

L'étude de la variabilité moléculaire s'est faite sur des souches provenant majoritairement du Sénégal (34), de la Côte d'Ivoire (7) et de la République centrafricaine (2). Elle pourrait être étendue à des souches provenant d'autres pays (Nigéria, Togo,...) afin de conforter les résultats obtenus.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BLACKBURN, NK., BESSELAAR, TG., GIBSON, G., 1995 - Antigenic relationship between CHIK virus strains and o'nyong nyong virus using monoclonal antibodies. *Res Virol.*; **146** (1) : 69-73.

BRES, P., CHAMBON, L., PAPE, Y., MICHEL, R., 1963 – Isolement de plusieurs souches. *Bulletin de la Société Médicale d'Afrique Noire de Langue Française.*, **8** (6) : 710-712.

CAREY, DE., MYERS, RM., DERANITZ, CM., JADHYZ, M., REUBEN, R., 1969 The 1964 CHIK epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, **63** (4) : 434-445.

DIALLO, M., THONNON, J., TRAORE-LAMIZANA, M., FONTENILLE, D., 1999 - Vectors of CHIK virus in Senegal: current data and transmission cycles. *Am J Trop Med Hyg.*, **60** (2) : 281-286.

DIGOUTTE, JP., CALVO-WILSON, MA., MONDO, M., TRAORE-LAMIZANA, M., ADAM, F., 1992 - Continuous cell lines and immune ascitic fluid pools in arbovirus detection. *Res Virol.*, **143** (6) : 417-422.

DIGOUTTE, JP., SALAUN, JJ., ROBIN, Y., BRES, P., CAGNARD, VJM., 1980 - Les arboviroses mineures en Afrique Centrale et Occidentale. *Médecine tropicale.*, **40** (5) : 523-533.

EDELMAN, R., TACKET, CO., WASSERMAN, SS., BODISON, SA., PERRY, JG., MANGIAFICO, JA., 2000 - Phase II safety and immunogenicity study of live CHIK virus vaccine TSI-GSD-218. *Am J Trop Med Hyg.*, **62** (6) : 681-685.

HASEBE, F., PARQUET, MC., PANDEY, BD., MATHENGE, EG., MORITA, K., BALASUBRAMANIAM, V., SAAT, Z., YUSOP, A., SINNIHA, M., NATKUNAM, S., IGARASHI, A., 2002 - Combined detection and genotyping of CHIK virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol.*, **67** (3) : 370-374.

KHAN, AH., MORITA, K., PARQUET, MC., HASEBE, F., MATHENGE, EG., IGARASHI, A., 2002 - Complete nucleotide sequence of CHIK virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J Gen Virol.*, **83** (12) : 3075-3084.

KRASTINOVA, E., QUATRESOUS, I., TARANTOLA, A., 2006 - Imported cases of CHIK in metropolitan France: update to June 2006. *Euro Surveill.*, **11** (8) : E060824.1.

LANZREIN, M., SCHLEGEL, A., KEMPF, C., 1994 - Entry and uncoating of enveloped viruses. *Biochem. J.*, **302** : 313-320.

LARAS, K., SUKRI, NC., LARASATI, RP., BANGS, MJ., KOSIM, R., DJAUZI., WANDRA, T., MASTER, J., KOSASIH, H., HARTATI, S., BECKETT, C., SEDYANINGSIH, ER., BEECHAM, HJ 3<sup>rd</sup>., CORWIN, AL., 2005 - Tracking the re-emergence of epidemic CHIK virus in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **99** (2) : 128-141.

MOHAN, A., 2006 - CHIK fever: clinical manifestations & management. *Indian J Med Res.*, **124** (5) : 471-474.

JUPP, P.G., and MACINTOSH, B.M., CHIK virus disease. 1988 - Monath TP, ed. The arboviruses: epidemiology and ecology. *Volume II, CRC Press, Boca Raton, FL.*, 137–157.

MUKHOPADHYAY, S., ZHANG, W., GABLER, S., CHIPMAN, PR., STRAUSS, EG., STRAUSS, JH., BAKER, TS., KUHN, RJ., ROSSMANN, MG., 2006 - Mapping the structure and function of the E1 and E2 glycoproteins in alphaviruses. *Structure.*, **14** (1) : 63-73.

PASTORINO, B., BESSAUD, M., GRANDADAM, M., MURRI, S., TOLOU, HJ., PEYREFITTE, CN., 2004 - Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African CHIK viruses. *J Virol Methods.*, **124** (1-2) : 65-71.

PERRIERE, G., GOUY, M., 1996 - WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie.*, **78** (5) : 364-369.

PFEFFER, M., LINSEN, B., PARKE, MD., KINNEY, RM., 2002 - Specific detection of CHIK virus using a RT-PCR/nested PCR combination. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.*, **49** (1) : 49-54.

PFEFFER, M., PROEBSTER, B., KINNEY, RM., KAADEN, OR., 1997 - Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.*, **57** (6) : 709-718.

PIALOUX, G., GAUZERE, BA., JAUREGUIBERRY, S., STROBEL, M., 2007 - CHIK, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis.*, **7** (5) : 319-327.

PIALOUX, G., GAUZERE, BA., STROBEL, M., 2006 - CHIK virus infection: review through an epidemic. *Med Mal Infect.*, **36** (5) : 253-263.

POWERS, AM., BRAULT, AC., TESH, RB., WEAVER, SC., 2000 - Re-emergence of CHIK and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol.*, **81** (2) : 471-479.

ROBIN, Y., BRES, P., 1969 - Arboviruses in Senegal. Current status. *Bull Soc Med Afr Noire Lang Fr.*, **14** (4) : 722-728.

ROBINSON, MC., 1955- An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-1953. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, **49** : 28-32.

ROCHE, S., ROBIN, Y., 1967 - Human infections by CHIK virus in Rufisque (Senegal), October November, 1966. *Bull Soc Med Afr Noire Lang Fr.*, **12** (3) : 490-496.

ROHANI, A., YULFI, H., ZAMREE, I., LEE, HL., 2005 - Rapid detection of CHIK virus in laboratory infected *Aedes aegypti* by Reverse-Transcriptase- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Trop Biomed.*, **22** (2) : 149-154.

RYCHLIK, W., 2007 - OLIGO 7 primer analysis software. *Methods Mol Biol.*, **402** : 35-60.

SALUZZO, JF., CORNET, M., DIGOUTTE, JP., 1983 - Outbreak of a CHIK virus epidemic in western Senegal in 1982. *Dakar Med.*, **28** (3) : 497-500.

SCHUFFENECKER, I., ITEMAN, I., MICHAULT, A., MURRI, S., FRANGEUL, L., VANEY, MC., LAVENIR, R., PARDIGON, N., REYNES, JM., PETTINELLI, F., BISCORNET, L., DIANCOURT, L., MICHEL, S., DUQUERROY, S., GUIGON, G., FRENKIEL, MP., BREHIN, AC., CUBITO, N., DESPRES, P., KUNST, F., REY, FA., ZELLER, H., BRISSE, S., 2006 - Genome microevolution of CHIK viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.*, **3** (7) : e 263.

STRAUSS, J.H., and E.G. STRAUSS, E.G., 1994 - The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.*, **58** (3) 491-562.

THONNON, J., FONTENILLE, D., TALL, A., DIALLO, M., RENAUDINEAU, Y., BAUDEZ, B., RAPHENON, G., 1998 - Re-emergence of yellow fever in Senegal in 1995. *Am J Trop Med Hyg.*, **59** (1) : 108-114.

THOMPSON, JD., HIGGINS, DG., GIBSON, TJ., 1994 - CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22** (22) : 4673-4680.

THONNON, J., SPIEGEL, A., DIALLO, M., DIALLO, A., FONTENILLE, D., 1999 - CHIK virus outbreak in Senegal in 1996 and 1997. *Bull Soc Pathol Exot.*, **92** (2) : 79-82.

WEAVER, SC., BARRETT, AD., 2004 - Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol.*, **2** (10) : 789-801.

## **Résumé :**

La fièvre Chikungunya (CHIK) est une arbovirose transmise principalement par les moustiques du genre *Aedes*. Chez l'homme, l'infection provoque des atteintes articulaires ou arthralgies. L'agent responsable est un virus de la famille des *Togaviridae*, du genre *Alphavirus*. Le virus CHIK a connu une recrudescence ces 3 dernières années avec des épidémies à la Réunion, en Inde, au Cameroun, en République Démocratique du Congo, au Gabon.

Au Sénégal, le virus a été isolé pour la première fois en 1962 et a été à l'origine de plusieurs épidémies ou amplification en contexte selvatique dans différentes régions du pays notamment en 1966, 1982, 1996-7 et plus récemment, en 2004-2006. Cette situation nous a conduit à entreprendre sur les souches isolées en Afrique de l'Ouest des recherches visant à i) évaluer les méthodes de diagnostic moléculaires actuellement disponibles et ii) étudier la variabilité moléculaire du virus.

Pour ce faire, des stocks viraux ont été préparés pour 43 souches du virus Chikungunya d'origines géographiques et d'hôtes divers. Quatre méthodes de RT-PCR ont été testées sur ce panel de souches pour évaluer le diagnostic moléculaire et la glycoprotéine d'enveloppe E1 a été séquencée pour 41 d'entre elles afin d'analyser leur variabilité grâce aux méthodes de phylogénie.

Les résultats obtenus ont montré qu'une seule des méthodes testées, a pu détecter les 43 souches du virus CHIK mais qu'elle n'était pas spécifique. Par conséquent, nous avons mis au point une méthode plus spécifique du virus CHIK et dont les résultats préliminaires montrent une détection de l'ensemble des souches avec une limite de détection de 2,451 Unités Formant Plages (UFP) dans du milieu Leibovitz 15 et de 24,51 UFP dans du sérum humain artificiel. Le séquençage partiel de la glycoprotéine E1 a montré une circulation de deux lignées du virus CHIK. La première est spécifique de l'Afrique de l'ouest, alors que la seconde, plus « cosmopolite », est proche de souches d'Afrique de l'est, du sud et centrale.

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes notamment le développement de la RT-PCR à temps réel pour améliorer le diagnostic (spécificité, sensibilité et rapidité) mais aussi le séquençage complet du génome pour apporter plus d'informations sur les souches proches d'Afrique de l'Est.

**Mots clés :** Chikungunya, Arbovirose, Arthralgies, *Aedes*, diagnostic moléculaire, RT-PCR, variabilité moléculaire.