

UNIVERSITE NAZI BONI
BOBO-DIOULASSO

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES
NATURELLES ET AGRONOMIQUES**



Année académique 2017 – 2018

THESE UNIQUE

Présentée et soutenue publiquement le **21 juin 2018**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université NAZI BONI de Bobo-Dioulasso

En

Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques

Spécialité : Bactériologie – Virologie

Par

Armel Moumouni SANOU

**Epidémiologie et caractérisation moléculaire des virus et bactéries
détectés dans les infections respiratoires aiguës chez les enfants
de moins de cinq ans au Burkina Faso.**

Directeur de thèse

M. Zékiba TARNAGDA

Directeur de Recherche, IRSS

Co-Directeurs

M. Macaire S. OUEDRAOGO

Professeur Titulaire, UNB

M. Hassanata MILLOGO

Maître de Recherche, IRSS

Président :

M. Lassana SANGARE, Professeur Titulaire, Université
Pr Joseph KI-ZERBO, Ouaga 1

Membres

M. Boubacar NACRO, Professeur Titulaire,
Université Pr Joseph KI-ZERBO, Ouaga 1

Mme Chantal SNOECK, Chercheur, Luxembourg
Institute of Health (LIH)

M. Abdoul Salam OUEDRAOGO, Professeur
Agrégé, Université Nazi BONI, Bobo-Dioulasso

M. Zékiba TARNAGDA, Directeur de Recherche,
Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS)

Dédicaces

Je dédie ce travail,

A mes parents : **Seydou** et **Suzanne**,

A mon épouse **Liliane** et à nos deux enfants : **Kanel** et **Ayden**,

A mes frères et sœurs : **Victoire**, **Sonia** et **Edouard**

Merci pour tout le soutien et tous vos encouragements qui m'ont permis de mener à bout ce travail.

Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien d'institutions et aux conseils de nombreuses personnes. Il est le fruit d'une collaboration internationale entre l'Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS)/Laboratoire National de Référence pour les Gripes et le « Luxembourg Institute of Health (LIH) » à travers le projet « MAE IV project » financé par le Ministère des affaires étrangères et européennes du Luxembourg.

Qu'il me soit permis de remercier :

Professeur Zékiba TARNAGDA, Directeur de Recherche en Microbiologie/Immunologie à l'IRSS, Chef de l'Unité des maladies à potentiel épidémique, maladies émergentes et zoonoses, responsable du LNR-G, Directeur Régional du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de l'Innovation (MESRSI), Directeur de cette thèse, mes sincères remerciements pour l'encadrement scientifique et pour la confiance que vous m'avez accordée depuis mon DEA jusqu'à la fin de ma thèse. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

Professeur Macaire S. OUEDRAOGO, Président de l'Université Nazi BONI, Professeur Titulaire en Médecine Interne, Co-directeur de cette thèse, vous m'avez fait confiance dès mon DEA. J'ai bénéficié de votre appui depuis lors, jusqu'à cette présente thèse. Votre énorme contribution à ma formation doctorale et votre soutien dans l'orientation par de précieux conseils, m'ont été très bénéfiques. Je vous suis très reconnaissant.

Clinical Virology group du Luxembourg Institute of Health : Professeur Claude P. Müller, Dr Judith Hubschen, Dr Chantal Snoeck, Dr Maude Pauly, Aurélie Sausy, Emilie Charpentier, Claire Dording, Ulla Muller et Carole Weis. Ce travail est le vôtre. Ma découverte du monde passionnant du savoir scientifique et mon envie pour la recherche ont été initiés grâce à votre rencontre. Merci de m'avoir fait confiance en finançant entièrement ce travail (Bourse, Inscription, Analyses biologiques, Voyages, ...). Votre disponibilité, votre soutien et votre culture scientifique m'ont été très précieux pour mener à bien ce travail. Je vous remercie très sincèrement.

Dr Hassanata MILLOGO, Maître de recherche en microbiologie, Co-directrice de cette thèse, vous nous faites l'honneur de nous accompagner dans notre carrière scientifique depuis quelques années maintenant. Je vous remercie aussi pour votre confiance, votre constante

disponibilité et votre écoute compréhensive. Votre énorme contribution à ma formation doctorale m'a été très bénéfique. Je vous suis très reconnaissant

Professeur Boubacar NACRO, Professeur titulaire de Pédiatrie à l'Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé (UFR/SDS), Université Ouaga 1 Pr Joseph KI-ZERBO, Chef du Département de la Pédiatrie au Centre Hospitalier Universitaire Souro Sanou (CHUSS), pour m'avoir facilité la collecte des échantillons et des données, pour vos conseils et votre disponibilité tout au long de ce travail.

À toute l'équipe du Laboratoire Nationale de Référence pour les Gripes: **Mme Assana KONE / CISSE, Mme Odile HATO, Dr Abdoul Kader ILBOUDO, Dr Tani SAGNA, Dr Dieudonné TIALLA, Dr Carine OUANDAOGO, Dr Eric KYERE, Dr Charles SOUGUE, Dr Daouda DIALLO, Dr Mohamed BELEM**, recevez l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir beaucoup aidé dans la partie terrain, analyses de laboratoire concernant ce travail.

Dr Augustin ZEBA, chercheur à l'IRSS, pour ses précieux conseils et sa disponibilité tout au long de ce travail.

Dr Dramane KANIA, Dr Adama SANOU, Dr Lissané KABORE, qui à travers de nombreux conseils et suggestions, ont beaucoup contribué à ma formation. Merci car vos conseils m'ont permis de finaliser ce travail.

À mes amis, camarades et collègues : **Tiéba MILLOGO, Seydou COULIBALY, Apollinaire TIAHOUN, Parfait OUATTARA, Dramane Oula OUATTARA, Inna TRAORE, Issiaka TRAORE, Salfou OUEDRAOGO, Aboubacar SANOU, Yacouba SOURABIE, Ibrahim SANGARE, Souleymane FOFANA, Achille NIKIEMA, Frédéric Dari DA**, je vous remercie pour votre soutien, vos conseils et l'accompagnement dont j'ai bénéficié.

Le Président, les rapporteurs et les membres du jury pour avoir accepté juger notre travail et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ce document.

Sommaire

Dédicaces	1
Remerciements	ii
Sommaire	iv
Liste des abréviations	vi
Liste des Figures.....	x
Liste des Tableaux.....	xi
Résumé	xii
Abstract	xiv
Liste des publications associées à cette thèse.....	xv
INTRODUCTION GENERALE.....	1
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
GENERALITES SUR LES INFECTIONS RESPIRATOIRES AIGUËS (IRA)	7
1. Généralités sur les IRA	7
2. Epidémiologie	9
3. Mode de transmission	10
4. Agents étiologiques.....	11
4.1. Virus	11
4.1.1. Virus Influenza	11
4.1.2. Virus respiratoire syntycial (VRS)	20
4.1.3. Métapneumovirus humain (HMPV).....	24
4.1.4. Virus parainfluenza (HPIV).....	27
4.1.5. Coronavirus (HCoV)	30
4.1.6. Rhinovirus (HRV)	36
4.1.7. Adénovirus (AdV)	38
4.1.8. Bocavirus humain (HBoV).....	42
4.2. Bactéries atypiques.....	43
4.2.1. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	43
4.2.2. <i>Chlamydia pneumoniae</i>	47
4.3. Autres pathogènes	49
5. Diagnostic biologique	51
5.1. Les types de prélèvement	51
5.2. Les méthodes diagnostiques.....	51

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET MEDTHODES	58
Chapitre 1 : Méthodologie de la revue systématique de la littérature	58
Chapitre 2 : Surveillance des infections respiratoires : design, analyses biologiques, analyses statistiques.....	60
I. Design de la surveillance.....	60
1. Cadre d'étude	60
2. Population d'étude – Définition de cas.....	62
3. Inclusion et collecte des données sociodémographiques et cliniques.....	62
4. Collecte et traitement des échantillons biologiques.....	62
II. Analyses biologiques	65
1. Extraction des acides nucléiques	65
2. Détection des virus influenza.....	65
3. Détection des autres virus respiratoires et des bactéries atypiques.....	66
4. Caractérisation moléculaire des virus influenza A, VRS et HRV	68
III. Analyses statistiques.....	70
IV. Considérations éthiques.....	71
TROISIEME PARTIE : RESULTATS	73
Chapitre 1 : Revue systématique de la littérature sur les étiologies des infections respiratoires en Afrique Sub-saharienne.....	73
Chapitre 2 : Virus influenza chez les enfants de moins de 5 ans au Burkina Faso : Epidémiologie et caractéristiques génétiques.....	84
Chapitre 3: Autres virus respiratoires : Epidémiologie et caractérisation moléculaire	96
Chapitre 4 : Epidémiologie des bactéries atypiques impliquées dans les infections respiratoires aigües	114
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE.....	118
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	127
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129

Liste des abréviations

% :	Pourcentage
°C :	Degré Celsius
µl :	Microlitre
µm :	Micromètre
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
ADNc :	Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
AdV :	Adénovirus
al. :	Collaborateurs
ARN :	Acide Ribonucléique
BoV :	Bocavirus
BPCO :	Bronchopneumopathie Chronique Obstructive
<i>C. pneumoniae</i> :	<i>Chlamydiae pneumoniae</i>
CA:	California
CDC :	Center for Diseases Control
CDV :	Cidofovir
CE :	Corps Élémentaire
CHUSS :	Centre Hospitalier Universitaire Souro Sanou
CMA:	Centre Médical avec Antenne Chirurgicale
CO₂ :	Dioxyde de Carbone
CSPS :	Centre de Santé et de Promotion Sociale
Ct :	Threshold Cycle
DAD :	Domage Alvéolaire Diffus
DEA :	Diplôme d'Etude Approfondie
ECP :	Effet Cytopathogène
EDS :	Enquête Démographique et de Santé
ELISA :	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EV-D68:	Entérovirus D68
F :	Glycoprotéine de Fusion
FS:	Formation Sanitaire
G :	Glycoprotéine d'Attachement
GISAID :	Global Initiative on Sharing All Influenza Data

<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HA ou H :	Hémagglutinine
HCoV :	Coronavirus Humain
HE :	Hémagglutinine Estérase
Hep-2:	Human epithelial cell line type 2
HMPV :	Métapneumovirus Humain
HN :	Hémagglutinine-Neuraminidase
HPeV :	Parechovirus Humain
HPIV :	Virus Parainfluenza Humain
HRV :	Rhinovirus Humain
IC :	Immuno-chromatographie
IDSA :	Infectious Diseases Society for America
IF :	Immunofluorescence
IgG:	Immunoglobuline G
IgM:	Immunoglobuline M
INSD:	Institut National de la Statistique et de la Démographie
IRA :	Infections Respiratoires Aigües
IRAS :	Infection Respiratoire Aigüe Sévère
IRSS :	Institut de Recherche en Sciences de la Santé
IST :	Infection Sexuellement Transmissible
IVC:	Influenza Virus C
<i>K. pneumoniae</i> :	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
kb :	Kilobase
kDa :	Kilodalton
L :	Polymérase L
LAMP:	Loop-mediated Isothermal Amplification
LIH :	Luxembourg Institute of Health
LNR-G :	Laboratoire National de Référence pour les Gripes
M :	Matrice
<i>M. genitalium</i> :	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>M. hominis</i> :	<i>Mycoplasma hominis</i>
<i>M. pneumoniae</i> :	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
MDCK:	Madin-Darby Canine Kidney

MS :	Ministère de la Santé
MEGA :	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MERS-CoV :	Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus
MESRSI :	Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de l'Innovation
MgCl₂ :	Chlorure de Magnésium
ml:	Millilitre
mM :	Milli molaire
NA ou N :	Neuraminidase
NASBA:	Nucleic Acid Sequence Based Amplification
nm:	Nanomètre
NS :	Non Structurale
nsp:	Protéine non structurale
OMA :	Otite Moyenne Aigüe
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
ORF :	Open Reading Frame
ORL :	Oto-Rhino Laryngologie
P :	Phosphoprotéine
pb:	Paire de base
PCR :	Polymerase Chain Reaction
pdm09:	Pandémique 2009
PEV:	Programme Elargi de Vaccination
PIB :	Produit Intérieur Brut
pp1ab :	Polyprotéine ab
PVVIH :	Personne Vivant avec le VIH
RGPH :	Recensement Général de la Population et de l'Habitation
RT :	Reverse Transcriptase
S:	Semaine
<i>S. aureus :</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae :</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SARS-CoV :	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus
SDRA :	Syndrome de Détresse Respiratoire Aigüe
SEP :	Sclérose en Plaque

SG :	Syndrome Grippal
SH :	Petite Protéine de Surface
T°:	Température
TBN :	Taux Brut de Natalité
<i>U. parvum :</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
<i>U. urealyticum :</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
UFR/SDS :	Unité de Formation et de Recherche en Sciences de la Santé
USA :	United States of America
UV :	Ultraviolet
VHC:	Virus de l'hépatite C
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VP :	Viral Protein
VRS :	Virus Respiratoire Syncytial
VTM:	Viral Transport Medium
WHO:	World Health Organization
α :	Alpha

Liste des Figures

Figure 1 : Structure du virus influenza	12
Figure 2 : Représentation schématique montrant l'émergence d'une nouvelle souche virale	14
Figure 3 : Réservoir des virus influenza	15
Figure 4 : Représentation schématique d'un virion du VRS et de la structure de son génome	21
Figure 5 : Représentation schématique d'un virion du HMPV et de la structure de son génome	25
Figure 6 : Représentation schématique d'un parainfluenza virus	38
Figure 7 : Arbre phylogénétique des Coronavirinae incluant 51 génomes complets, construit par la méthode du Neighbor-joining	32
Figure 8 : Représentation schématique d'un coronavirus	33
Figure 9 : Structure d'un virion d'Adénovirus	49
Figure 10 : Exemple d'un test rapide d'immunochromatographie	53
Figure 11 : Carte du Burkina Faso avec les sites d'études.	61
Figure 12 . : Technique de Prélèvement nasopharyngé.....	64
Figure 13 . : Milieu de prélèvement	64
Figure 14 : Technique d'aspiration nasopharyngée	64
Figure 15 : Exemple d'une Photo d'un gel d'électrophorèse d'amplicons destinés à être séquencés ..	69
Figure 16 : Séquenceur ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystem)	70
Figure 17 : Schémas de la procédure d'inclusion des articles	74
Figure 18 : Localisation des 26 études incluses	82
Figure 19 : Prévalence des types et sous-types des virus influenza par tranche d'âge chez les enfants atteints de SG.....	86
Figure 20 : Analyses phylogénétiques des séquences du gène HA des souches A /H1N1 pdm09.	88
Figure 21 : Analyses phylogénétiques des séquences du gène de l'hémagglutinine des souches A /H3N2.....	90
Figure 22 : Distribution mensuelle des virus influenza A et B en 2014 et 2015.....	92
Figure 23 : Prévalence des virus respiratoires détectés	97
Figure 24 : Distribution mensuelle des virus respiratoires détectés au cours de la période d'étude... ..	112
Figure 25 : Détection des virus respiratoires en fonction des saisons	105
Figure 26 : Analyse phylogénétique des séquences partielles du gène G du RSV-A.. ..	106
Figure 27 : Analyse phylogénétique des séquences partielles du gène G du RSV-B.	109
Figure 28 : Analyse phylogénétique de 207 pb de VP4 du groupe A de rhinovirus humains circulant au Burkina Faso en 2014 et 2015.....	112
Figure 29 : Analyse phylogénétique de 207 pb de VP4 des groupes B et C de rhinovirus humains circulant au Burkina Faso en 2014 et 2015.. ..	113

Liste des Tableaux

Tableau I: Comparaison des méthodes diagnostiques pour la détection des virus influenza .	18
Tableau II: Protocole d'amplification des virus influenza A et B	66
Tableau III: Caractéristiques des articles inclus dans la revue systématique	76
Tableau IV: Prévalences virale, bactérienne et parasitaire rapportées dans les études incluses dans la revue systématique de la littérature.	81
Tableau V: Caractéristiques démographiques des patients de l'étude, 2014 – 2015.	84
Tableau VI: Types and sous-types de virus influenza détectés dans la population d'étude, 2014-2015.	86
Tableau VII: Périodes de transmissions accrues des virus influenza au Burkina Faso, 2011-2016.	94
Tableau VIII: Caractéristiques sociodémographiques et cliniques de la population d'étude	96
Tableau IX: Distribution des virus détectés en fonction de l'âge et du cas clinique	99
Tableau X: Distribution des virus détectés en fonction des caractéristiques cliniques	101
Tableau XI: Coïnfection virale chez les patients atteints de SG ou d'IRAS	103
Tableau XII: Caractéristiques des enfants infectés par <i>M. pneumoniae</i> ou <i>C. pneumoniae</i>	115

Résumé

Les infections respiratoires aiguës (IRA) constituent un sérieux problème de santé publique dans le monde. Elles représentent l'une des principales causes de morbidité et de mortalité principalement chez les enfants de moins de cinq ans. Malgré leur lourd fardeau, peu de données existent sur leurs étiologies. La présente étude avait pour objectifs: (i) de déterminer les étiologies virales et bactériennes des syndromes grippaux (SG) et des infections respiratoires aiguës sévères (IRAS) chez les enfants d'âge \leq 5 ans au Burkina Faso, (ii) de décrire les caractéristiques génétiques des pathogènes fréquemment détectés chez ces enfants. De janvier 2014 à décembre 2015, des échantillons respiratoires ont été prélevés chez des patients atteints de SG ($n = 743$) et d'IRAS ($n = 181$) dans six centres de santé. Les virus influenza A et B ont été détectés par la RT-PCR en temps réel suivis du sous-typage. Les données de surveillance de FluNet et de cette étude ont été utilisées pour identifier les périodes de transmission accrue des virus influenza. De plus, un ensemble de spécimens choisis au hasard ($n = 584$) a été testé pour la présence de 14 autres virus respiratoires et de 2 bactéries atypiques par la PCR et la PCR multiplex. Les génotypes des virus influenza, du Rhinovirus (HRV) et du Virus Respiratoire Syncytial (VRS) ont été déterminés en effectuant des analyses phylogénétiques sur les séquences de leurs génomes. Les virus influenza A et B ont été détectés chez 15,1% (112/743) des cas de SG et 6,6% (12/181) des patients atteints d'IRAS. L'analyse phylogénétique des séquences du gène HA a révélé la circulation des clades 6C et 6B du virus influenza A/H1N1 pdm09 et des clades 3C.2a, 3C.3 et 3C.3a du virus A/H3N2 saisonnier, avec les lignées B/Yamagata et B/Victoria pour le virus influenza B. Les périodes de transmission des virus influenza ont varié d'une année à l'autre, mais la circulation était la plus élevée en janvier-mars et en septembre-octobre. Dans le sous-ensemble d'échantillons testés pour d'autres pathogènes, 373 échantillons (63,9%) ont été positifs pour au moins un virus. Les virus les plus prévalents ont été le HRV (29,8%), le VRS (13,0%), l'Adénovirus (AdV) (9,8%) et le Bocavirus (BoV) (8,2%), mais tous les virus étudiés ont été détectés dans au moins un échantillon, confirmant la variété des pathogènes impliqués dans les cas de SG et d'IRAS au Burkina Faso. *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae* ont été détectés dans 3 échantillons (0,5%) chacune. Des co-infections virales ont été retrouvées dans 83 cas (22,2%). La caractérisation moléculaire du VRS a permis d'identifier les génotypes ON1 et NA1 pour le VRS/A et les génotypes BA9 et SAB4 pour le VRS/B. Quant aux HRV, l'analyse phylogénétique a mis en exergue la co-circulation des trois groupes : HRV-A, HRV-B, HRV-C. L'analyse de la saisonnalité a montré que les infections à VRS se produisaient principalement pendant la saison des pluies (juin-septembre), contrairement aux infections par le parainfluenza virus HPIV, le virus influenza C (VIC) et l'AdV qui présentaient une prévalence plus élevée pendant la saison sèche (mars - mai). La majorité (855/924; 92,5%) des patients avaient reçu des antibiotiques avant la consultation médicale. Dans l'ensemble, nos données ont montré que le HRV, les virus influenza et le VRS étaient les principales causes d'infections respiratoires chez les enfants de moins de cinq ans au Burkina Faso. Ces résultats contribueront à une meilleure compréhension de l'épidémiologie des

pathogènes respiratoires et par conséquent au développement de stratégies de prévention efficaces et d'approches thérapeutiques ciblées.

Mots-clés: Burkina Faso, Enfants, SG, IRAS, Virus influenza, Autres pathogènes respiratoires, Bactéries atypiques.

Abstract

Acute respiratory infections are a serious public health problem in the world. They represent one of the main causes of morbidity and mortality mainly in children ≤ 5 years old. Despite their high burden in Burkina Faso, little is known about their cause. In this study, we (i) investigated the aetiology of influenza-like illness (ILI) and severe acute respiratory infection (SARI) in children under five years old in Burkina Faso, and (ii) described the genetic characteristics of common respiratory viruses circulating during the study period. From January 2014 to December 2015, respiratory specimens were collected among ILI (n=743) and SARI (n=181) patients in six healthcare centers. Influenza A and B viruses were detected by real-time RT-PCRs. Clade clustering of a subset of A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) strains was determined by performing phylogenetic analyses on the hemagglutinin gene sequences. Surveillance data from FluNet and this study were used to identify periods of increased influenza activity. Subsequently, a randomly selected set of specimens (n=584) were tested for the presence of 14 other respiratory viruses and 2 atypical bacteria by (RT-) PCRs. Genotyping of the common detected virus strains was done by nucleotide sequencing and phylogenetic analyses. Data were analysed to describe the frequency and seasonality of the pathogens. Influenza A and B viruses were detected in 15.1% (112/743) of ILI and 6.6% (12/181) of SARI patients. Phylogenetic analysis of the HA gene sequences revealed the circulation of A(H1N1) pdm09 virus clade 6B and clade 6C and A(H3N2) virus clades 3C.2 and 3C.3, together with B/Yamagata and B/Victoria lineages. Periods of increased influenza transmission varied between years, but overall circulation was highest in January-March and September-October, suggesting optimal seasonal vaccination in September. In the subset of samples tested for other pathogens, 373 (63.9%) specimens were positive for at least one virus. The most prevalent viruses were Human Rhinovirus (HRV) (29.8%); Respiratory Syncytial Virus (13.0%); Adenovirus (AdV) (9.8%) and Bocavirus (BoV) (8.2%), but all viruses investigated were detected in the sample set, confirming the variety of pathogens involved in ILI and SARI syndromes also in Burkina Faso. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* were found in 3 (0.5%) samples each. Viral co-infections were found in 83 cases (22.2%). Molecular characterization of RSV identified the ON1 and NA1 genotypes for RSV/A and the BA9 and BS4 genotypes for RSV/B. As for HRV, phylogenetic analysis showed the circulation of the three groups: HRV-A, HRV-B, HRV-C. Seasonality analysis showed that RSV infections occurred mainly during the raining season (June - September) in contrast to PIV, ICV and AdV that showed a higher prevalence during the dry season (March – May). The majority (855/924; 92.5%) of patients, had received antibiotics. Overall, our data showed that HRV, Influenza viruses and RSV were the major causes of respiratory infections in children under five years old in Burkina Faso. These findings contribute to a better understanding of the epidemiology of respiratory pathogens and thus to the development of effective prevention strategies and targeted therapeutic approaches.

Keywords: Burkina Faso, Children, ILI, SARI, Respiratory viruses, atypical bacteria

Liste des publications associées à cette thèse

(i) Articles publiés

Armél M. Sanou, Assana Cissé, Tieba Millogo, Tani Sagna, Dieudonné Tialla, Thelmas Williams, N Talla Nzussouo and Zekiba Tarnagda. Systematic Review of Articles on Etiologies of Acute Respiratory Infections in Children Aged Less Than Five Years in Sub-Saharan Africa, 2000-2015. *EC Microbiology* 3.6 (2016): 556-571.

Armél M. Sanou, Sampoko Carine M. Wandaogo, Armel Poda, Laure Tamini, Anselme E. Kyere, Tani Sagna, Macaire S Ouedraogo, Maude Pauly, Judith M. Hübschen, Claude P. Muller, Zekiba Tarnagda, Chantal J. Snoeck. Epidemiology and molecular characterization of influenza viruses in Burkina Faso, sub-Saharan Africa. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018 Jan 19. doi: 10.1111/irv.12539.

Zékiba Tarnagda, Issaka Yougbaré, Abdoul K. Ilboudo, Thérèse Kagoné, **Armél M. Sanou**, Assana Cissé, Isaïe Medah, Denis Yelbéogo, Ndahwouh Talla Nzussouo. Sentinel surveillance of influenza in Burkina Faso: identification of circulating strains during 2010 – 2012. *Influenza Other Respir Viruses*. 2014 Sep;8(5):524-9. doi: 10.1111/irv.12259.

(ii) Articles en préparation

Armél M. Sanou, Laure Tamini, Tani Sagna, Macaire S Ouedraogo, Maude Pauly, Judith M. Hübschen, Claude P. Muller, Chantal J. Snoeck, Zekiba Tarnagda. Epidemiologic and genetic diversity of respiratory viruses in children with Acute Respiratory Infections in Burkina Faso. (En préparation).

Armél M. Sanou, Chantal J. Snoeck, Tani Sagna, Macaire S Ouedraogo, Maude Pauly, Judith M. Hübschen, Claude P. Muller, Zekiba Tarnagda. Low prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children hospitalized for Acute Respiratory Infection in Burkina Faso. (A soumettre)

(iii) Communications scientifiques

Armél M Sanou, Assana Cissé, Tiéba R Millogo, Tani Sagna, Dieudonné Tialla, Thelma Williams, N. Talla Nzussouo, Zekiba Tarnagda (2016). Systematic review of articles on etiologies of acute respiratory infections in children under five years in Sub-Saharan Africa, 2000-2015, **The 6th African Network for Influenza Surveillance and Epidemiology Meeting, 9-11 March 2016, Kigali, Rwanda.**

Sanou M. Armel, Kyere P Anselme Eric, Poda Armel, Cissé Assana, Sagna Tani, Ouedraogo S Macaire, Medah Isaïe, Tarnagda Zekiba (2016). Influenza viruses in children with acute respiratory infections in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso: A one year prospective study, **The 6th African Network for Influenza Surveillance and Epidemiology Meeting, 9-11 March 2016, Kigali, Rwanda.**

Armél M. Sanou, Chantal J. Snoeck, Sampoko Carine M. Wandaogo, Armel Poda, Laure Tamini, Anselme E. Kyere, Tani Sagna, Macaire S Ouedraogo, Maude Pauly, Judith M. Hübschen, Claude P. Muller, Zekiba Tarnagda. Epidemiology and molecular characterization of viruses and atypical bacteria in children with respiratory infections in Burkina Faso, 2014-2015, **The 2nd International Meeting on Respiratory Pathogens, 7 - 9 March 2018, Singapore. (Accepted for Poster Presentation)**

Armél M. Sanou. Epidemiology and molecular characterization of respiratory pathogens in children under 5 years in Burkina Faso: the experience of following a PhD program in Africa. **PhD School of COST Action FA1207, 25-27th April 2016, Esch-sur-Alzette, Luxembourg**

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

Les infections respiratoires aiguës (IRA) sont des infections qui atteignent une partie quelconque de l'appareil respiratoire, à savoir le nez, les oreilles, la gorge, le larynx, la trachée, les bronches ou les bronchioles et les poumons (Simoes *et al.* 2006). Elles sont transmises par contact direct avec les sécrétions respiratoires des malades ou des porteurs asymptomatiques (Aubry et Gaüzère, 2016). En fonction du niveau d'atteinte de l'arbre respiratoire, on distingue les IRA hautes et les IRA basses. Les IRA hautes comprennent les rhinopharyngites, les angines, les sinusites, les otites, les laryngites. Quant aux IRA basses, elles sont représentées par la bronchite, la bronchiolite et la pneumonie (Shabir *et al.* 2006).

Les IRA constituent un sérieux problème de santé publique dans le monde, surtout dans les pays à ressources limitées (Nair *et al.* 2013). Elles représentent l'une des principales causes de morbidité, de fréquentation de centres de santé (consultation et hospitalisation) et de mortalité principalement chez les enfants de moins de cinq ans (Korsun *et al.* 2017). En 2015, les infections respiratoires basses étaient la troisième cause de mortalité dans le monde avec 3,19 millions de décès et la première cause de mortalité dans les pays à ressources limitées avec 84,9 décès pour 100 000 personnes (OMS, 2017). Toujours selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les IRA causent 1,9 à 2,2 millions de décès infantiles par an dans le monde, dont 70% de ces décès en Afrique Subsaharienne et en Asie du Sud-Est (Williams *et al.* 2002 ; Liu *et al.* 2012). En 2010, les IRA basses telles que la pneumonie et la bronchiolite ont causé, dans le monde, l'hospitalisation d'environ 12 millions d'enfants de moins de cinq ans avec environ 1,4 millions de décès (Liu *et al.* 2012). La grippe humaine ou influenza est une des pathologies logée dans le gros ensemble des IRA. Cette dernière, est une infection respiratoire aiguë d'origine virale, se caractérisant généralement par une atteinte des voies respiratoires hautes. En fonction des caractéristiques du virus et de l'hôte, elle peut se compliquer aboutissant à une pneumonie virale (OMS, 2016). De plus, chaque année, les épidémies de grippe sont responsables d'environ 3 à 5 millions de maladies graves, et 250 000 à 500 000 décès (OMS, 2016).

Sur le plan étiologique, les IRA peuvent être causées par des bactéries, des virus et des parasites, avec des manifestations cliniques similaires rendant ainsi une différenciation clinique de ces infections impossible. Ainsi, la détermination du profil microbiologique des IRA devient donc cruciale pour une meilleure prise en charge clinique des cas, pour une mise en place de stratégies préventives et thérapeutiques efficaces, pour une utilisation rationnelle des antibiotiques et

enfin pour une surveillance efficace. Les virus, considérés comme étant les agents majeurs des IRA chez les enfants sont associés, à environ 60% des cas d'IRA basses (Mäkelä et al. 1998 ; Alonso et al. 2012). Les virus influenza A et B, le Virus respiratoire syncytial (VRS), les Parainfluenzavirus humains type 1, 2 et 3 (HPIV1, HPIV2 et HPIV3), les Adénovirus (AdV), le rhinovirus (HRV), le Méta pneumovirus humain (HMPV) et le Bocavirus (HBoV) sont les plus fréquemment détectés (Viegas et al. 2004 ; Sung et al. 2011 ; Luksić et al. 2013). Cependant, il est à noter que bien que les virus soient impliqués dans une large proportion d'IRA chez les enfants, la coïnfection ou la surinfection par des bactéries n'est pas rare (Bezerra et al. 2011). Les bactéries fréquemment détectées chez les personnes atteintes d'IRA sont *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Les bactéries atypiques telles que *Chlamydiae pneumoniae* (*C. pneumoniae*) et *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*), ainsi que *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) sont également associées aux cas d'IRA mais à une moindre fréquence (Michelow et al. 2004 ; Bhuyan et al. 2017).

Ces dernières années, le développement des techniques de la biologie moléculaire (PCR en temps réel, PCR multiplex, séquençage à haut débit) a largement contribué à l'amélioration de la détection des pathogènes respiratoires (Rhedin et al. 2014 ; Krause et al. 2014). Les bactéries atypiques que sont *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* difficilement mises en évidence par la culture sont par contre aisément détectées par la PCR (del Valle-Mendoza et al. 2017). De plus, ce développement a permis la détection de nouveaux virus impliqués à des degrés divers dans les IRA chez les enfants, comme par exemple les Coronavirus NL63 et HKU1 (HCoV-NL63, HCoV-HKU1), le Parechovirus humain (HPeV), le Parainfluenza type 4 (HPIV4), le HBoV (Allander et al. 2005 ; Sloots et al. 2008 ; Ren et al. 2012). Egalement, avec l'avancée des méthodes diagnostiques, de nombreuses études ont été réalisées à travers le monde pour déterminer l'étiologie des infections respiratoires chez les enfants de moins de cinq ans. Dans la majorité des cas, ces études ont montré une prédominance virale et une circulation saisonnière des différents pathogènes (Feikin et al. 2013 ; Feng et al. 2014 ; Amer et al. 2015 ; Bénét et al. 2015 ; Ljubin-Sternak et al. 2016 ; Bhuyan et al. 2017). En outre de la prédominance virale, *S. pneumoniae* reste l'agent bactérien le plus fréquemment détecté (Bhuyan et al. 2017).

Au Burkina Faso, la situation sanitaire est caractérisée par un niveau de morbidité et de mortalité élevé imputable à plusieurs pathologies. L'état de santé de la population, précaire, est caractérisé par une multitude de pathologies liées à l'environnement, et dominées notamment

par les maladies infectieuses telles que le paludisme, les infections respiratoires et les maladies diarrhéiques, (MS, 2016). L'inaccessibilité à une bonne alimentation, aux conditions d'hygiène et d'assainissement adéquates sont des facteurs favorables à la prolifération des vecteurs et la transmission des maladies. De plus, l'insuffisance de ressources allouées aux activités de santé, un personnel de santé insuffisant, mal reparti et peu motivé, l'insuffisance des infrastructures et d'équipements, l'absence de système d'assurance maladie constituent des facteurs aggravant le mauvais état de santé des populations (MS, 2016).

Dans ce contexte, les infections respiratoires constituent la deuxième cause de consultation (4 360 541 consultations en 2016) dans les formations sanitaires et la quatrième cause de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans (312 décès en 2016) après le paludisme, les infections du nouveau-né et la malnutrition aigüe sévère au Burkina Faso (MS, 2016). Ceci illustre donc que les IRA représentent un sérieux problème de santé publique dans le pays.

Malgré le lourd fardeau que les infections respiratoires constituent pour notre système de santé, peu d'études se sont intéressées à leurs étiologies principalement chez les enfants de moins de cinq ans (Ouédraogo et *al.* 2014). Bien que nécessaires pour un suivi optimal des patients, le coût élevé des techniques de biologie moléculaire pour l'identification de (des) agent(s) impliqué(s) rend leur utilisation systématique utopique à l'heure actuelle, et ce d'autant plus dans les formations sanitaires des pays à ressources limitées. Cependant, les informations sur l'étiologie des infections respiratoires ainsi qu'une connaissance des souches virales impliquées dans les IRA circulant au Burkina Faso, inexistante pour le moment, seront essentielles pour l'amélioration des soins de santé à l'échelle nationale. En effet, le manque de données sur la circulation des pathogènes respiratoires dans le pays, la diversité des pathogènes impliqués, couplés aux coûts élevés des tests de diagnostic, ainsi que le manque de formation du personnel de la santé aboutissent à un traitement qui repose donc en partie sur une utilisation empirique des antibiotiques avec un risque élevé d'apparition des résistances. Dans le but de combler ce manque d'information, cette étude prospective a été réalisée durant deux années dans plusieurs formations sanitaires du Burkina Faso. Avant sa mise en œuvre, nous avons décidé d'avoir une vue d'ensemble sur les étiologies des IRA chez les enfants de moins de cinq ans en Afrique Sub-Saharienne à travers une revue systématique de la littérature portant sur des données publiées ou non entre 2000 et 2015. Cet exercice nous a permis d'identifier les lacunes de connaissance dans le domaine et de justifier la nécessité de la mise en œuvre de notre étude.

L'objectif général de ce travail était d'étudier l'épidémiologie et la diversité génétique des virus et bactéries impliqués dans les infections respiratoires aiguës chez les enfants de moins de cinq ans au Burkina Faso.

Plus spécifiquement, ce travail avait pour objectifs :

- 1) d'établir un état des lieux sur les étiologies des IRA chez les enfants de moins de cinq ans en Afrique sub-saharienne à travers une revue systématique de la littérature portant sur des données publiées ou non entre 2000 et 2015,
- 2) de déterminer les étiologies virales et bactériennes chez les enfants de moins de cinq ans atteints de syndrome grippal (SG) et d'infection respiratoire aiguë sévère (IRAS) au Burkina Faso ;
- 3) d'étudier les caractéristiques sociodémographiques des patients et les aspects épidémiologiques de la circulation des différents pathogènes identifiés ;
- 4) de déterminer la diversité génétique des virus et bactéries identifiés chez ces enfants.

Ce document est constitué de 4 grandes parties.

- La première partie du document porte sur la synthèse bibliographique et aborde les généralités sur les IRA.
- La deuxième partie du document présente le matériel et les méthodes de l'étude. Elle est subdivisée en deux chapitres :
 - le premier chapitre décrit la méthodologie de la revue systématique de la littérature ;
 - le deuxième chapitre se focalise sur le design de la surveillance, les analyses biologiques réalisées, les analyses statistiques menées ainsi que les aspects éthiques de l'étude.
- La troisième partie du document présente les résultats de nos travaux en quatre chapitres :
 - le premier chapitre présente les résultats de la revue de la littérature ;
 - le deuxième chapitre porte sur l'épidémiologie et les caractéristiques génétiques des virus influenza A et B chez les enfants de moins de 5 ans au Burkina Faso atteints de SG et d'IRAS ;

- le troisième chapitre décrit l'épidémiologie et les caractéristiques moléculaires des autres virus respiratoires associés à ces infections respiratoires ;
- le quatrième chapitre aborde l'épidémiologie des bactéries atypiques que sont *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* associées aux SG et aux IRAS.
- La quatrième partie du document présente la discussion générale sur l'ensemble du document.

Une introduction générale justifiant la mise en œuvre de cette étude ainsi qu'une conclusion générale faisant la synthèse globale des travaux et des perspectives de recherche sont situées respectivement au début et à la fin du document.

**PREMIERE PARTIE : SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

GENERALITES SUR LES INFECTIONS RESPIRATOIRES AIGUËS (IRA)

1. Généralités sur les IRA

L'appareil respiratoire est constitué des voies nasales, de la trachée et des deux poumons. Le rôle de ces derniers est de fournir de l'oxygène à notre organisme, tout en évacuant le dioxyde de carbone. Les poumons sont localisés dans le thorax de part et d'autre du cœur.

Un poumon est divisé en plusieurs lobes, séparés les uns des autres par des cloisons appelées scissures. On compte trois lobes pour le poumon droit et deux pour le gauche. Chaque lobe contient les bronches, elles mêmes constituées d'alvéoles (petites poches) reliées entre elles par les bronchioles. Les bronches sont connectées à la trachée.

Au cours de la respiration, l'air arrive donc par la trachée, passe dans les bronches puis les bronchioles et enfin les alvéoles. Une fois dans les alvéoles, le dioxygène contenu dans l'air inspiré traverse leur paroi pour aller dans le sang et être distribué à tout l'organisme. Dans le sens inverse, c'est le dioxyde de carbone qui circule, évacué par les cellules de l'organisme, il repasse via les alvéoles puis les bronches pour s'échapper de la trachée par la bouche et le nez. On parle alors d'expiration.

Ainsi, une infection est dite « respiratoire » lorsqu'elle atteint l'une des structures composant le système respiratoire, à savoir le nez, les oreilles, la gorge, le larynx, la trachée, les bronches ou les poumons. En fonction du niveau d'atteinte du système respiratoire, on distingue deux types d'infections respiratoires aiguës : celles des voies aériennes supérieures et celles des voies respiratoires basses.

Les infections des voies respiratoires supérieures

La **rhinopharyngite** couramment appelée rhume est une infection virale sans gravité de la muqueuse tapissant l'intérieur du nez et le pharynx. C'est l'infection la plus répandue chez l'enfant. Elle se traduit par une fièvre modérée, des douleurs au niveau de la gorge, une obstruction nasale avec des sécrétions claires au début qui deviennent épaisses et jaunâtres. Les muqueuses du nez et de la gorge sont congestionnées et on peut sentir à la palpation des adénopathies ou « ganglions » cervicaux. La rhinopharyngite guérit spontanément en une

dizaine de jours. Cependant, l'association virus-bactérie est fréquente et des complications bactériennes peuvent survenir.

Une **angine** est une inflammation des amygdales, d'origine virale (majoritairement) ou bactérienne. On parle souvent d'angine rouge ou blanche en fonction de l'aspect des amygdales. La maladie est le plus souvent bénigne et se traduit par de la fièvre et un mal de gorge entraînant des difficultés pour avaler. D'autres symptômes comme un rhume ou une toux peuvent être associés.

Une **otite** moyenne aiguë (OMA) est une infection se développant au niveau de l'oreille moyenne. C'est l'infection bactérienne la plus fréquente chez l'enfant. Chaque année, elle touche près de 20% des enfants. L'infection peut être causée soit par une bactérie dans 60 à 70% des cas, soit par un virus.

Une **sinusite** est une inflammation des sinus de la face provoquée par un virus ou une bactérie. Les sinus sont de petites cavités creusées dans les os de la face débouchant sur les cavités nasales. Leur rôle est de produire le mucus évacué par les fosses nasales (ou narines). Ce mucus contient des substances antivirales et antibactériennes permettant de lutter contre les infections. L'infection est généralement consécutive à une rhinopharyngite et touche plus volontiers le sinus maxillaire (localisé au niveau des pommettes du visage). Les autres sinus (frontal, éthmoïdal et sphénoïdal) sont rarement concernés mais présentent plus de risque de complications.

Une **laryngite** est une inflammation du larynx provoquée le plus souvent par un virus. C'est une infection très fréquente en automne et en hiver. Elle fait généralement suite à une rhinopharyngite. Les symptômes s'installent progressivement : voix enrouée, toux, difficultés respiratoires.

Les infections des voies respiratoires inférieures

Une **bronchite** est une infection des bronches essentiellement d'origine virale. Elle se manifeste généralement à la suite d'un rhume ou d'une rhino-pharyngite. Elle débute par une toux sèche se transformant par la suite en tout grasse. Cette infection peut guérir spontanément en quelques jours.

Une **bronchiolite** est une infection des petites bronches ou bronchioles généralement provoquée par le Virus Respiratoire Syncytial (VRS). Elle est fréquente chez les nourrissons de moins de 2 ans. En effet, chaque année près de 30% des moins de 2 ans sont concernés. L'infection débute généralement par un simple rhume avec une légère fièvre. Une toux sèche apparaît progressivement associée à une gêne respiratoire se traduisant par une respiration rapide et sifflante.

Une **pneumonie** se manifeste le plus souvent par une fièvre importante associée à une toux, des douleurs thoraciques et un essoufflement. Une radiographie pulmonaire permet de confirmer le diagnostic. En général, la pneumonie évolue vers la guérison mais les complications (septicémie, abcès pulmonaire, pleurésie) restent possibles et nécessitent une hospitalisation.

2. Epidémiologie

Les infections respiratoires sont extrêmement fréquentes chez l'homme. Elles sont observées principalement pendant la saison froide et se manifestent surtout aux âges extrêmes de la vie ou chez des sujets immunodéficients ou fragilisés. Les IRA constituent un sérieux problème de santé publique dans le monde, surtout dans les pays à ressources limitées (Nair et *al.* 2013). Elles représentent l'une des principales causes de morbidité, de fréquentation de centres de santé (consultation et hospitalisation) et de mortalité principalement chez les enfants de moins de cinq ans (Neli et *al.* 2017). En 2015, les infections respiratoires basses étaient la troisième cause de mortalité dans le monde avec 3,19 millions de décès et la première cause de mortalité dans les pays à ressources limitées avec 84,9 décès pour 100 000 personnes (OMS, 2017). Toujours selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les IRA causent 1,9 à 2,2 millions de décès infantiles par an dans le monde, dont 70% de ces décès en Afrique Subsaharienne et en Asie du Sud-Est (Williams et *al.* 2002 ; Liu et *al.* 2012). En 2010, les IRA basses telles que la pneumonie et la bronchiolite ont causé, dans le monde, l'hospitalisation d'environ 12 millions d'enfants de moins de cinq ans avec environ 1,4 millions de décès (Liu et *al.* 2012). La grippe qui est un sous ensemble des infections respiratoires aiguës cause chaque année environ 3 à 5 millions de maladies graves, et 250 000 à 500 000 décès (OMS, 2016).

Le risque de développer une IRA et son degré de sévérité sont associés à :

- ✚ des facteurs saisonniers et climatiques (saison froide et saison des pluies dans les pays du Sud), influence directe du climat (température ambiante, teneur en eau de l'atmosphère) et indirecte (mode de vie, promiscuité),
- ✚ l'environnement: surpeuplement, pollution de l'air ambiant (tabagisme, fumées domestiques: feux de cuisine, chauffage au bois ou aux bouses),
- ✚ l'âge: le risque de décès le plus élevé est chez le nourrisson de 1 à 3 mois,
- ✚ la prématurité,
- ✚ l'état nutritionnel: arrêt de l'allaitement maternel, malnutrition protéino énergétique,
- ✚ un déficit immunologique congénital ou acquis (infection à VIH/Sida),
- ✚ un bas niveau d'éducation du père et de la mère,
- ✚ un bas niveau socioéconomique du pays.

3. Mode de transmission

La transmission des pathogènes respiratoires se fait par voie aérienne via les gouttelettes ou les aérosols émis lors d'une toux ou d'un éternuement d'une personne infectée (Pica et Bouvier, 2012). On distingue principalement deux modes de transmission : la transmission directe et la transmission indirecte.

La transmission directe consiste au transfert de pathogènes respiratoires d'une personne infectée à une personne bien portante sans l'intervention d'un objet intermédiaire. Cette transmission peut se faire au contact des mains (personne infectée – personne non infectée) ou directement par inhalation des gouttelettes ou aérosols émis par le malade (Pica et Bouvier, 2012).

Quant à la transmission indirecte, elle fait appel à un objet intermédiaire appelé fomite. La personne bien portante s'infecte en ayant un contact de la main avec l'objet ou une surface préalablement contaminée par la personne infectée (Pica et Bouvier, 2012).

Les particules respiratoires émises par les patients sont de taille très variable. Les particules expulsées peuvent être réparties en deux catégories, selon leur mode de déplacement : les « gouttelettes » et les « aérosols ». Les gouttelettes sont des particules dont le diamètre aérodynamique moyen est supérieur à environ 100 µm et sont principalement affectées par la gravité. Leur rayon d'action pour la transmission de l'infection est très proche du point de départ : généralement moins d'un mètre. Les particules inhalables sont celles dont le diamètre

aérodynamique se situe généralement dans l'intervalle allant de 0,1 à 100 µm. Selon leur taille et leur forme, elles peuvent rester dans l'air entre quelques secondes et plusieurs jours. L'endroit où les particules se déposent dans les voies respiratoires de l'hôte potentiel dépend principalement de leur taille. Les particules inhalables se répartissent en trois catégories de taille, qui ont chacune un comportement différent pour ce qui est de l'endroit où elles se déposent. Le diamètre des particules d'échelle nasopharyngienne se situe approximativement entre 20 et 100 µm. Ces particules ont tendance à n'atteindre que les voies respiratoires supérieures. Les particules d'échelle trachéobronchique ont un diamètre se situant approximativement entre 10 et 20 µm. Elles parviennent à se déposer jusque dans la région trachéobronchique. Les particules d'échelle alvéolaire ont un diamètre approximatif de moins de 10 µm. Ce sont les seules particules qui sont en mesure d'atteindre la région alvéolaire, mais elles peuvent se déposer n'importe où dans les voies respiratoires.

4. Agents étiologiques

4.1. Virus

4.1.1. Virus Influenza

Caractéristiques virologiques

Les virus influenza sont les principaux agents étiologiques de la grippe. Ils appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae* et sont divisés en 3 types nommés A, B et C. Les types A et B causent généralement des épidémies saisonnières et sont le plus souvent associés à des taux élevés d'hospitalisation et de décès. Quant au virus influenza C, il est responsable d'infections modérées (OMS, 2016) et semble moins soumis à un phénomène saisonnier. Les virus influenza sont des virus enveloppés, à ARN segmenté, de polarité positive. Le génome viral des types A et B possède 8 gènes qui codent pour 10 protéines parmi lesquels nous avons les protéines de surface : l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA) (Palese et al. 2007). La HA facilite l'attachement du virus aux récepteurs (acide sialique α -2,6 chez l'homme) des cellules de l'hôte. Ces récepteurs sont prédominants au niveau des voies respiratoires hautes de l'homme. La NA facilite la libération des nouveaux virions en clivant la liaison avec les récepteurs (Paules et ksubbarao, 2017). Le virus influenza C possède 7 gènes qui codent pour 9 protéines. Le virus influenza A est subdivisé en sous-types sur la base du caractère antigénique des deux protéines de surfaces. A ce jour, 16 sous-types de HA (H1 à H16) et 9 sous-types de NA (N1 à N9) ont été identifiés chez les oiseaux et 2 autres additionnels de HA (H17 et H18) et de NA (N10 et N11) ont été identifiés chez les chauves-souris (Paules et ksubbarao, 2017). Parmi ces sous-

types identifiés chez les oiseaux, certains peuvent infecter les mammifères dont l'espèce humaine. Au cours du siècle dernier, seuls les sous-types A/H1N1, A/H1N2, A/H2N2 et A/H3N2 ont circulé chez les humains (Peteranderl et *al.* 2016). Il n'existe pas de réservoir animal pour le virus influenza B, mais deux lignages distincts sur le plan antigénique nommés B/Victoria et B/Yamagata ont été identifiés (Paules et ksubbarao, 2017).

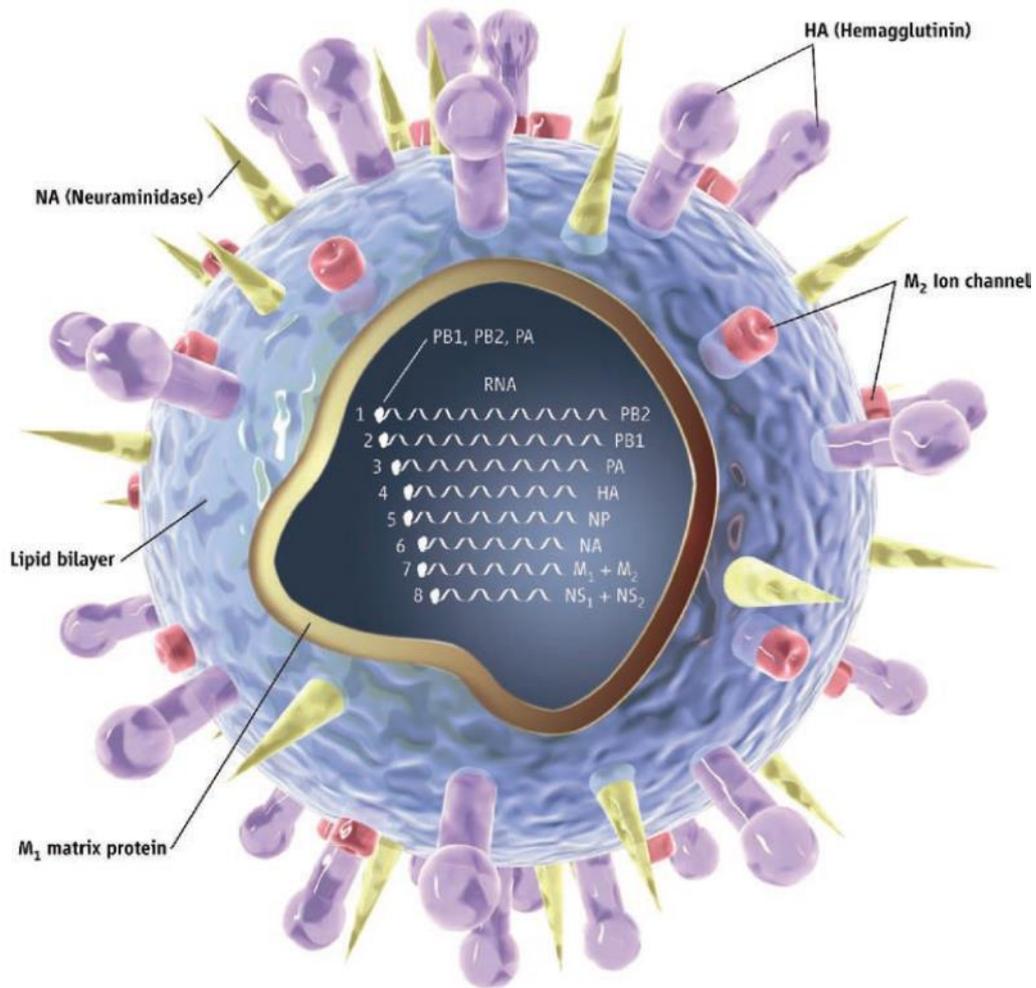


Figure 1 : Structure du virus influenza (WHO, 2011)

La caractéristique fondamentale des virus influenza est leur capacité à opérer des changements antigéniques qui se produisent de deux manières (Peteranderl et *al.* 2016):

La dérive antigénique ou le « antigenic drift » : c'est un processus par lequel des changements progressifs et continus s'opèrent au niveau de HA et de la NA des virus influenza A et B. Il en résulte alors une accumulation de mutations sur les gènes codant pour ces deux protéines durant la phase de réplication virale provoquant l'apparition de nouvelles souches virales. L'émergence de ces nouvelles souches neutralisées de manière sub-optimale par les anticorps nécessite alors la mise à jour du vaccin antigrippal. Cette dérive antigénique concourt chaque année à la réapparition, d'une nouvelle épidémie de grippe.

La cassure antigénique ou le « antigenic shift » : en plus de la dérive antigénique, le virus influenza A peut subir un changement brutal et plus sévère. Alors que la dérive antigénique se produit continuellement, la cassure antigénique se produit peu fréquemment et de manière imprévisible. Le virus nouvellement généré possède de nouvelles propriétés antigéniques non ou très peu reconnues par les anticorps générés par les contacts précédents avec des souches saisonnières. Si la nouvelle souche est capable d'infecter l'espèce humaine et d'assurer une transmission interhumaine soutenue, alors elle se propagera dans le monde entier, provoquant ainsi une pandémie.

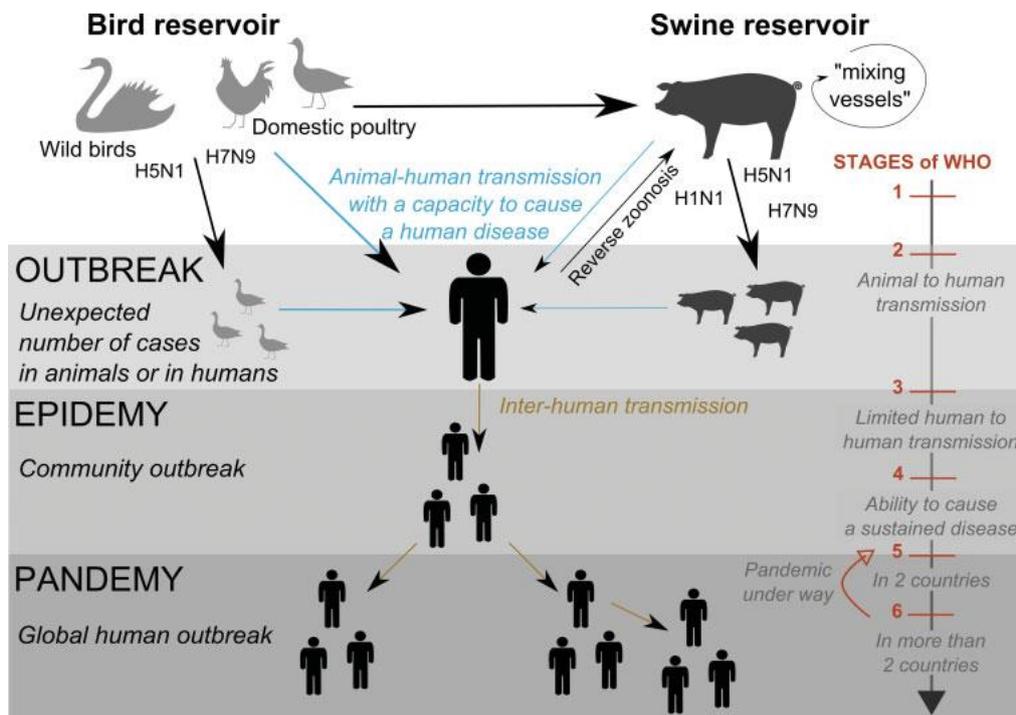


Figure 2 : Représentation schématique montrant l'émergence d'une nouvelle souche virale (Peteranderl et al. 2016)

Réservoir des virus influenza

Les oiseaux aquatiques sauvages sont considérés comme étant les hôtes naturels des virus influenza A. En raison de sa susceptibilité aux virus influenza d'origine humaine et d'origine aviaire, le porc a été impliqué comme hôte intermédiaire à l'émergence de nouvelles souches virales à potentiel pandémique (Kim et al. 2016). La transmission directe des virus influenza des oiseaux (H5N1, H9N2, H7N9) à l'homme est moins fréquente mais peut être fatale (jusqu'à 60% de mortalité) quand elle survient.

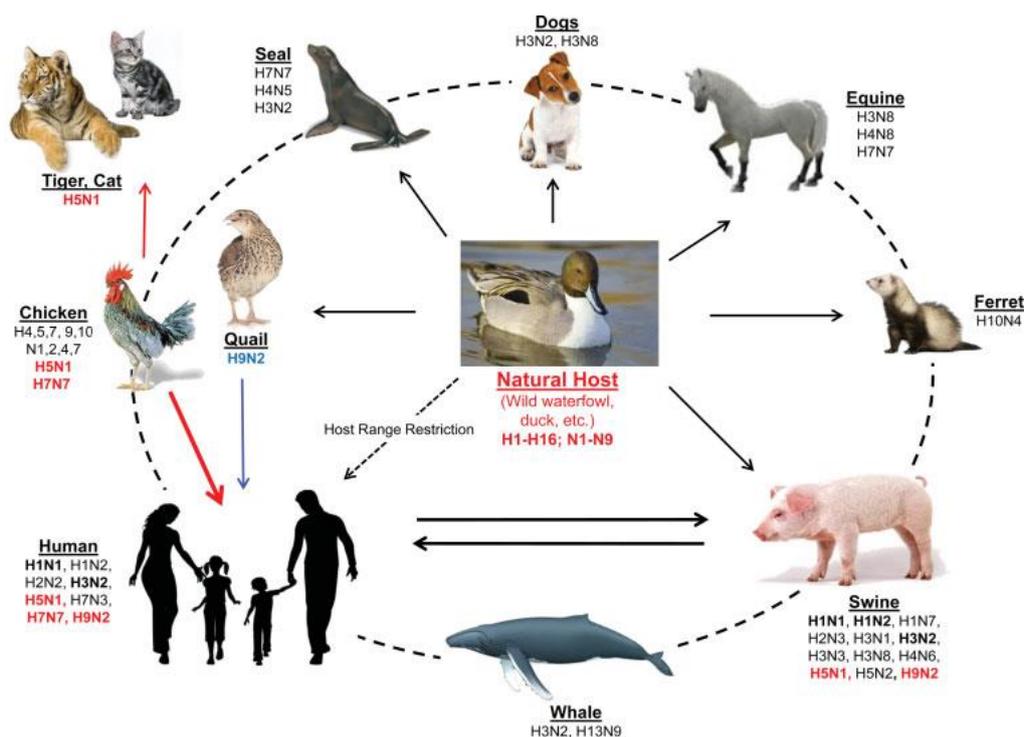


Figure 3: Réservoir des virus influenza (Kim et al. 2016)

Manifestations cliniques

Les virus influenza A, B et C sont responsables de la grippe. En fonction des caractéristiques de l'hôte et du virus, la grippe peut être asymptomatique, ou donner des symptômes plus ou moins graves, pouvant aller jusqu'à ceux d'une pneumonie virale potentiellement létale (Peteranderl et al. 2016). Les symptômes apparaissent soudainement après une période d'incubation de 1-2 jours et sont caractérisés par une fièvre brutale (pouvant atteindre 41°C le premier jour), une toux sèche, des maux de gorge, un écoulement nasal, des frissons, des maux de tête qui peuvent être accompagnés de myalgies, de malaise et d'anorexie (Peteranderl et al. 2016). Des symptômes oculaires peuvent également être présents et comprennent la photophobie, la conjonctivite et la douleur aux mouvements des yeux. Dans 25% des cas, des râles diffus sont constatés à l'auscultation des poumons. La fièvre et les symptômes non respiratoires durent généralement 3 jours mais peuvent persister jusqu'à 8 jours. La toux peut persister jusqu'à deux semaines après la résolution de la fièvre. Les manifestations cliniques de la grippe chez l'enfant peuvent différer de celles chez l'adulte. La température est généralement plus élevée chez l'enfant et les myalgies sont plus sévères. La laryngotracheobronchite (croup), la bronchiolite et la bronchite peuvent également se produire

chez l'enfant. Les symptômes gastro-intestinaux tels que la diarrhée, les vomissements sont notés à une fréquence plus élevée chez les enfants que chez l'adulte (Paules et ksubbarao, 2017).

La pneumonie virale est la principale complication et survient dans environ 10% des cas. Elle se développe très rapidement dans les 2 à 3 jours de l'infection. Un œdème pulmonaire massif et une insuffisance respiratoire aiguë conduisent habituellement au décès du patient en quelques jours (Paules et ksubbarao, 2017). Une pneumonie bactérienne de surinfection est la cause des trois quarts des décès par la grippe, les germes fréquemment isolés sont *S. pneumoniae*, *S. aureus* et *H. influenzae* (Rothberg et al. 2008).

En plus des complications pulmonaires, des complications extra-pulmonaires ont été notées. La myosite et la rhabdomyolyse se produisent rarement, avec une gravité variable. Une insuffisance rénale peut survenir et persister pendant 4 à 6 semaines. Des complications cardiaques comprennent la myocardite, la péricardite et l'exacerbation d'une maladie cardiaque sous-jacente. La grippe a également été associée à des manifestations neurologiques comme le syndrome de Reyes, l'encéphalomyélite, le syndrome de Guillain-Barré et la méningite aseptique (Paules et ksubbarao, 2017).

Population à risque

Les complications des infections aux virus influenza surviennent en particulier chez les personnes ayant un système immunitaire immature, affaibli ou altéré. Des taux de mortalité élevés sont observés chez les enfants de moins de deux ans et les personnes âgées de plus de 65 ans lors des épidémies de grippe saisonnière (Uyeki, 2017). Aussi, la présence de comorbidités comme les maladies respiratoires chroniques, rénales, hématologiques, neurologiques ou cardiovasculaires, le diabète et l'obésité sont en faveur de la survenue des complications voire de décès (Peteranderl et al. 2016). L'immunodépression, la grossesse, et la susceptibilité génétique seraient également associées à un risque élevé d'hospitalisation en soin intensif et au décès (Memoli et al. 2014).

Diagnostic biologique

La détection des virus influenza doit se faire le plus tôt possible, c'est-à-dire au début des symptômes où l'excrétion virale est très élevée. Les prélèvements de choix pour la détection virale comprennent les écouvillonnages nasopharyngés, les lavages nasaux et les aspirations nasopharyngées. Les échantillons des voies respiratoires inférieures comme le lavage broncho-alvéolaire sont plus indiqués chez les personnes atteintes de pneumonie (Uyeki, 2017). Les méthodes diagnostiques recommandées comprennent la culture virale, la détection d'antigène

et la détection de l'acide nucléique. Les sensibilités, les avantages et les inconvénients des différentes méthodes sont résumés dans le tableau ci-dessous (**Tableau I**). Les tests sérologiques sont plus recommandés pour les enquêtes épidémiologiques.

Tableau I: Comparaison des méthodes diagnostiques pour la détection des virus influenza (Uyeki, 2017).

Méthode diagnostiques	Sensibilité	Durée du test	Avantages	Inconvénients
Culture virale	100%	3 – 10 jours	Très bonnes sensibilité et spécificité; Virus disponibles pour la caractérisation ; Capacité à trouver de nouvelles souches virales ;	Une mauvaise qualité de l'échantillon pourrait affecter le rendement; Les résultats non disponibles à temps pour une prise de décision clinique; Temps de travail long; Un laboratoire spécialisé est requis.
Culture virale rapide	70 – 90%	1 – 3 jours	Plus rapide que la culture virale traditionnelle; Nécessite également moins d'expertise ;	Moins sensible que la culture virale traditionnelle; Peut manquer des virus divergents de la grippe; Nécessite un laboratoire spécialisé ;
Immunofluorescence directe	70 – 90%	1 – 4 heures	Rapide; Peut identifier d'autres agents pathogènes; Permet d'évaluer la qualité de l'échantillon ;	La Sensibilité et la spécificité dépendent de l'expertise du technicien; Matériel spécialisé requis; Pas de virus disponible pour caractérisation antigénique
Immunochromatographie	59 – 93%	< 30 min	Aucun équipement spécialisé ou compétences techniques requises; Transport spécial de spécimen non requis; Résultats rapides	Méthode moins sensible; Le virus n'est pas disponible pour la caractérisation antigénique ;
RT-PCR	100%	1 – 4 heures	Très bonnes sensibilité et spécificité; La qualité et la manipulation des échantillons ont moins d'impact sur la sensibilité; Le typage, sous-typage et séquençage sont possibles; Peut-être combinée avec la technologie multiplex ;	Coûteux; Matériel spécialisé et personnel qualifié requis; contamination croisée; Pourrait manquer des souches divergentes ;

Traitement et Prévention

Quatre classes de médicaments antiviraux sont approuvées pour le traitement de la grippe dans plusieurs pays: les adamantanes, les inhibiteurs de la neuraminidase, les inhibiteurs de la fusion membranaire et les inhibiteurs de l'ARN-polymérase ARN dépendant (Paules et ksubbarao, 2017). Parmi ceux-ci, seuls les dérivés d'adamantane et les inhibiteurs de la neuraminidase sont autorisés à être utilisés dans l'Union européenne et aux États-Unis (CDC, 2016). Les dérivés d'adamantane comprennent l'amantadine et la rimantadine, qui inhibent le canal ionique de la matrice 2 du virus influenza A, mais pas du virus influenza B. Cependant leur utilisation n'est plus recommandée à cause de la résistance observée chez les virus influenza A responsables des épidémies saisonnières. Les inhibiteurs de la NA inhibent la fonction de la NA des virus influenza A et B. Ces molécules interagissent avec le site catalytique et inhibent puissamment l'activité sialidase de la NA, diminuant la capacité des virions néoformés à se détacher de la cellule puis à diffuser à travers le mucus des voies riches en sialoglycoconjugués (Paules et ksubbarao, 2017). Au cours de la saison grippale 2015-16, l'oseltamivir oral et le zanamivir inhalé ont été recommandés pour être utilisés dans l'Union européenne et aux États-Unis (CDC, 2016). Le Pérémivir intraveineux est également recommandé pour être utilisé aux États-Unis, et le zanamivir par voie intraveineuse est disponible pour les patients présentant une infection sévère. La prophylaxie est recommandée chez les individus non vaccinés à haut risque de développer des complications après exposition aux virus et pour contrôler les épidémies dans un contexte institutionnel. Le traitement de la grippe est indiqué chez les patients admis à l'hôpital avec une grippe suspectée ou confirmée et chez les personnes à risque de développer des complications liées à la grippe (CDC, 2016).

La méthode la plus efficace pour la prévention et le contrôle de l'infection grippale est la vaccination. Chaque année, l'OMS formule des recommandations sur la composition des vaccins contre la grippe saisonnière sur la base de la surveillance de laboratoire. Ce processus se produit deux fois l'an, en février pour l'hémisphère nord et en septembre pour l'hémisphère sud (Houser et Subbarao, 2015). Les vaccins disponibles contiennent des antigènes des sous-types A/H1N1, A/H3N2 avec la lignée prédominante du virus influenza B (trivalent) ou les deux lignées (quadrivalent) (Paules et ksubbarao, 2017). La vaccination est généralement recommandée non seulement pour les patients avec des comorbidités préexistantes ou à risque élevé d'exposition, mais aussi à l'ensemble de la population (6 mois ou plus âgés) non seulement pour limiter le risque individuel d'infection, mais aussi pour améliorer l'immunité de groupe et limiter la probabilité de réassortiment (Houser et Subbarao, 2015).

4.1.2. Virus respiratoire syncytial (VRS)

Le VRS a été découvert en 1956 chez le Chimpanzé et isolé en 1957 par Chanock Robert chez deux enfants présentant l'un une bronchiolite, l'autre une pneumonie (Chanock et *al.* 1957). Son nom se rapporte aux larges syncytia qu'il produit dans les cultures cellulaires. Il est considéré comme étant l'un des principaux agents des IRA surtout chez les enfants de moins de 5 ans.

Caractéristiques virologiques

Le VRS appartient à l'ordre des *Mononegavirales*, à la famille des *Pneumoviridae* et au genre *Orthopneumovirus* (Hacking et Hull, 2002). C'est un virus à ARN, enveloppé, pléiomorphe de 100 à 350 nm. L'ARN viral, d'environ 15,2 kb est non segmenté, de polarité négative et situé à l'intérieur de la particule virale. Il est constitué de 10 gènes et code pour 11 protéines : les protéines structurales de surface (la protéine d'attachement G, la protéine de fusion F et la petite protéine hydrophobe SH), les protéines structurales internes (la Matrice M et la Nucléoprotéine N), la Polymérase L, la Phosphoprotéine P, les protéines non structurales impliquées dans l'évasion à la réponse immunitaire (NS-1 et NS-2) et la protéine de régulation M2. Deux sous types de VRS (VRS/A et VRS/B) ont été identifiés sur la base des caractères antigéniques (Anderson et *al.* 1985). Le séquençage du génome viral a permis d'identifier les souches virales qui circulent dans le monde. A ce jour, 14 génotypes (GA1 à GA7, SAA1, CB-A, NA1 to NA4 et ON1) pour le VRS/A et 23 génotypes (GB1-GB4, SAB1-SAB4, URU1, URU2, BA1-BA12 et THB) pour le VRS/B ont été identifiés (Griffiths et *al.* 2017).

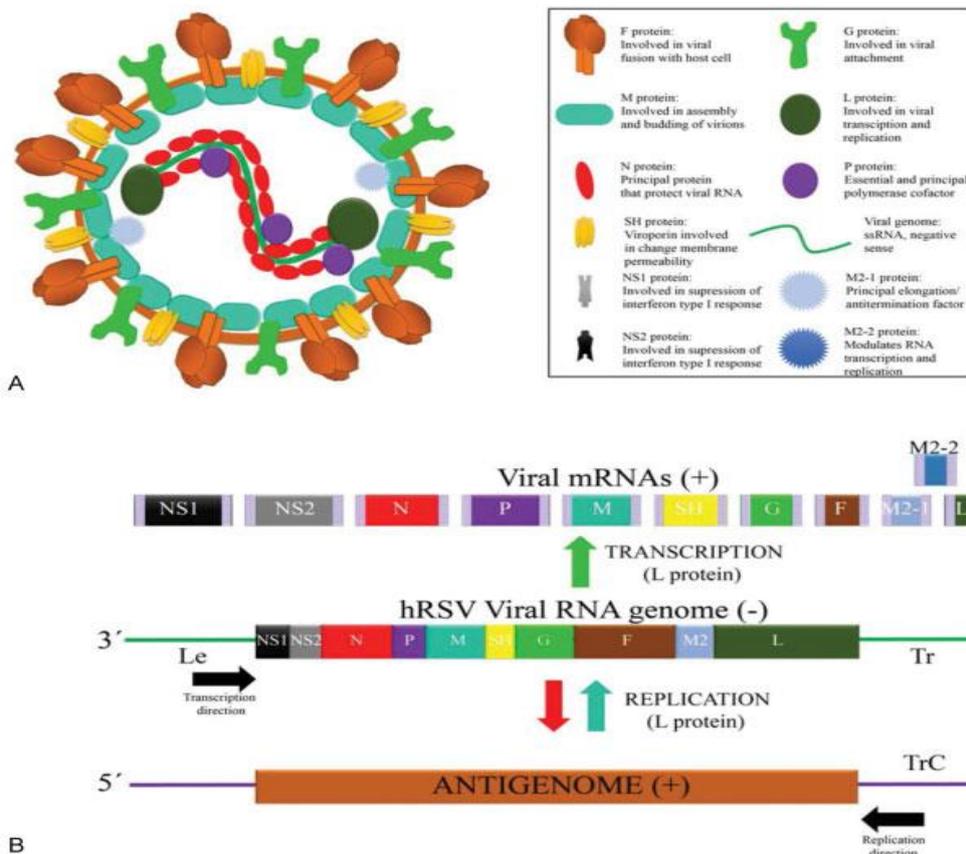


Figure 4: Représentation schématique d'un virion du VRS et de la structure de son génome (Bohmwald et al. 2016)

Epidémiologie

Le VRS est l'un des principaux agents étiologiques des infections respiratoires aiguës dans le monde. Il est associé à des taux élevés d'hospitalisation et de mortalité chez les enfants (Bohmwald et al. 2016). C'est un virus ubiquitaire avec une large capacité de diffusion. Les anticorps anti-VRS sont détectables chez environ 87% des enfants de 18 mois et chez 100% des enfants de plus de 3 ans (Collins et Graham, 2008). Les infections à VRS sont responsables d'environ 200 000 décès par an dans le monde chez les enfants de moins de cinq ans (Nair et al. 2010). Ces infections sont particulièrement sévères dans certains groupes à risque avec une mortalité plus élevée. Ce sont : les prématurés, surtout ceux atteints d'une maladie pulmonaire chronique, les immunodéprimés et aussi les enfants atteints de pathologies neuromusculaires.

Dans les régions tempérées, les infections à VRS évoluent sous forme d'épidémies hivernales annuelles. Les cas initiaux apparaissent en octobre ou novembre. L'épidémie atteint son pic en décembre ou janvier, pendant environ 4 semaines, et s'étend sur une durée moyenne de 3 à 5 mois (Freymuth, 2004). De rares infections à VRS s'observent au printemps ou en été, avec une

expression clinique équivalente à celle de l'atteinte hivernale (Freymuth, 2004). Les infections humaines à VRS sont répandues sur tous les continents. Dans les régions tropicales ou subtropicales, l'infection peut être endémique ou plus souvent, l'épidémie coïncide avec la saison des pluies (Griffiths et *al.* 2017).

Au cours des épidémies à VRS, la diffusion du virus dans la population est très large : 44 % des familles peuvent être touchées par ce virus, et 45 % de leurs membres infectés. Vingt pour cent des enfants d'âge scolaire et 3 à 5 % des adultes sains sont ainsi régulièrement réinfectés par le VRS (Freymuth, 2004). Ces réinfections jouent un rôle essentiel dans la diffusion du virus de sujet à sujet, et dans la genèse des épidémies. Elles sont huit fois sur dix cliniquement muettes, sinon elles provoquent une infection banale des voies aériennes supérieures. Pour le VRS, il n'y a pas de variabilité équivalente à celle observée avec les virus influenza, l'épidémie est surtout déterminée par la présence constante de jeunes enfants réceptifs et la mauvaise qualité de leur immunisation naturelle.

Manifestations cliniques

Dans les infections respiratoires aiguës hautes, les manifestations cliniques des infections à VRS sont caractérisées par une toux, un écoulement nasal, souvent de la fièvre. Ces signes se retrouvent également dans les cas d'infections respiratoires aiguës basses. En plus de ces signes, on peut citer : une congestion nasale, une tachypnée, une difficulté respiratoire, un wheezing, une cyanose et des râles sibilants. Chez les nourrissons, une léthargie et une déshydratation sont souvent constatées (Lanari et *al.* 2014).

Diagnostic biologique

Les méthodes diagnostiques du VRS comprennent : la culture cellulaire, l'immunofluorescence (IF), l'immunochromatographie (IC), l'ELISA et la RT-PCR. La sensibilité et la spécificité de ces méthodes sont influencées par plusieurs facteurs tels que la qualité du prélèvement, les conditions de transports, l'expérience du technicien, la population, la période de l'année (Griffiths et *al.* 2017).

La culture cellulaire reste la technique de référence surtout pour la caractérisation des souches virales. Elle est plus utilisée dans les centres de recherche car longue à réaliser (environ 5 à 10 jours), très coûteuse et nécessite une manipulation appropriée des échantillons (Leruez-Ville, 2007).

La sérologie est uniquement utilisée dans le cadre des investigations épidémiologiques. Sa sensibilité est très faible, environ 10 à 30% des patients avec une confirmation d'infection à VRS ont une sérologie positive (Bohmwald et *al.* 2016).

L'IF et IC sont les techniques les plus utilisées dans les formations sanitaires pour le diagnostic des infections à VRS parce qu'elles sont rapides (30 min à 2 heures) et facile à réaliser (Griffiths et *al.* 2017). Cependant, les tests rapides présentent de faibles performances analytiques rendant leur utilisation non recommandée en période de faible circulation du virus (Rabon-Stith et *al.* 2013).

La RT-PCR est le nouveau gold standard pour la détection du VRS. Elle est rapide, automatique avec de bonnes performances analytiques. Les inconvénients de la RT-PCR sont le coût élevé et l'interprétation clinique (de-Paris et *al.* 2012). En effet, le VRS peut être présent dans les voies respiratoires jusqu'à 4 semaines après la disparition des symptômes.

Prévention et traitement

Actuellement il n'existe aucun vaccin contre le VRS mais plusieurs vaccins candidats sont en phase préclinique et clinique. De plus, plusieurs arguments supportent la faisabilité d'un vaccin contre le VRS (Griffiths et *al.* 2017) : (i) c'est une infection très fréquente durant la première année de vie, (ii) les infections à VRS sont récurrentes toute la vie mais les cas sévères sont moindres chez les grands enfants et les adultes signifiant ainsi une maturation du système immunitaire avec l'âge, enfin (iii) une diminution de l'incidence des infections à VRS est constatée durant la période néonatale suggérant ainsi une protection conférée par les anticorps maternels anti-VRS. Les vaccins en développement comprennent des vaccins vivant atténués, les vaccins viraux, les vaccins recombinants, Aussi, une stratégie promettante serait la protection du nouveau-né par la vaccination de la femme enceinte. Les anticorps développés par la femme enceinte seront transférés via le placenta chez le nouveau-né (Griffiths et *al.* 2017).

Le traitement des cas d'infections à VRS est plus basé sur le traitement des symptômes respiratoires. A ce jour, seuls deux antiviraux contre le VRS sont disponibles, le palivizumab pour la prévention et la ribavirine pour le traitement (Griffiths et *al.* 2017).

La ribavirine est le seul antiviral ayant une licence pour le traitement actif des infections à VRS. C'est un analogue de la guanosine et est utilisée sous la forme aérosol. L'administration de la ribavirine est indiquée chez les patients à risque. Plusieurs études ont montré que l'utilisation de la ribavirine diminuait la durée d'hospitalisation et le aussi la durée de sécrétion du virus

(Smith et *al.* 1991). Cependant, les effets tératogènes et les contre-indications dans les maladies cardiovasculaires limitent son utilisation (Van Vlierbergh et *al.* 2001).

Le palivizumab contient des anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre la protéine de fusion F du VRS. Il peut être administré par voie intramusculaire ou intraveineuse. Le palivizumab est surtout utilisé en traitement prophylactique chez les prématurés et les nouveau-nés avec des pathologies cardio-pulmonaires (Griffiths et *al.* 2017).

4.1.3. Métapneumovirus humain (HMPV)

Caractéristiques virologiques

Le HMPV a été caractérisé pour la première fois en 2001 par l'équipe du Pr Albert Osterhaus chez des enfants hospitalisés atteints d'IRAS (van den Hoogen et *al.* 2001). C'est un virus enveloppé, à ARN appartenant à la famille des *Paramyxoviridae*, à la sous-famille des *Pneumovirinae* et au genre *Metapneumovirus* (Esposito et Mastrolia, 2016). Le HMPV est un virus pléiomorphe d'environ 150 à 600 nm de diamètre, se présentant généralement sous forme sphérique mais aussi sous la forme de particules filamenteuse. L'enveloppe, de nature lipidique contient les trois glycoprotéines de surface F, SH et G qui forment des spicules de 13 à 17 nm. Le génome du HMPV est constitué d'un ARN de polarité négative d'une taille d'environ 13 kDa. L'ARN viral est associé à la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P, la polymérase L et aux facteurs M2-1 et M2-2 pour former la nucléocapside de symétrie hélicoïdale (Freymuth et *al.* 2008). L'analyse génétique du HMPV a permis d'identifier deux groupes majeurs (A et B) et quatre sous-groupes (A1, A2, B1 et B2), basés principalement sur la variabilité de séquence des glycoprotéines de surface d'attachement (G) et de fusion (F) (van den Hoogen et *al.* 2004). Des études ont également suggéré l'existence de sous-groupes supplémentaires A2a et A2b (Esposito et Mastrolia, 2016).

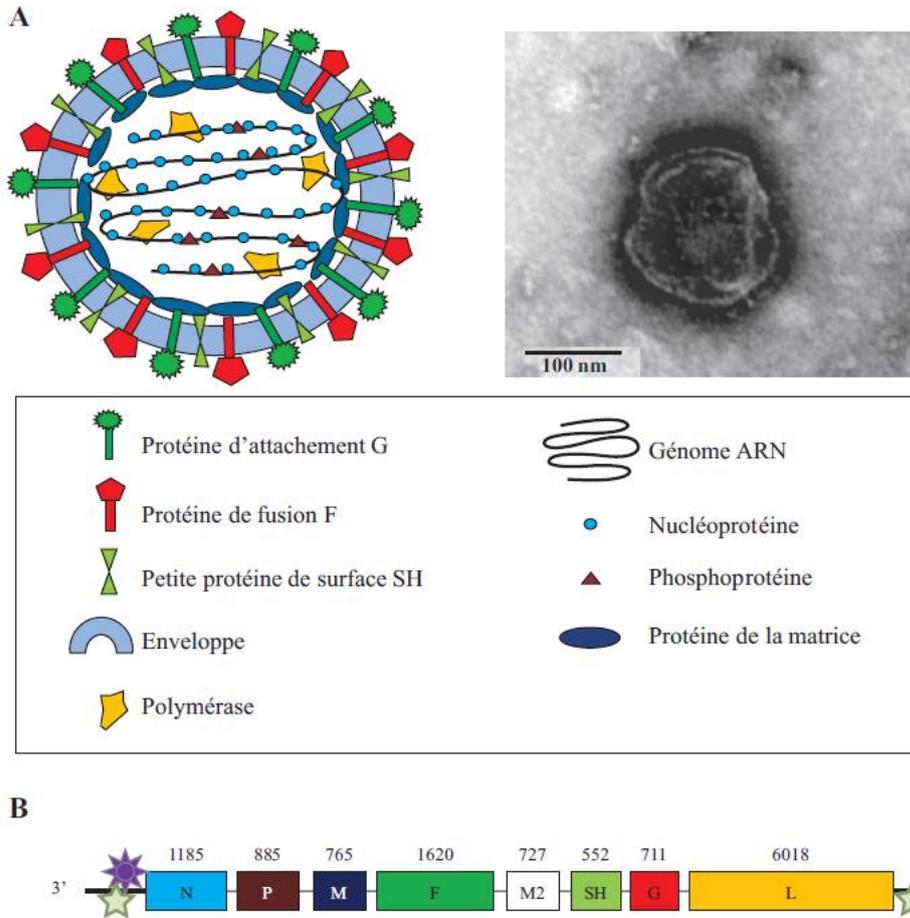


Figure 5: Représentation schématique d'un virion du HMPV et de la structure de son génome (Feuillet et *al.* 2011)

Epidémiologie

Depuis sa description initiale en 2001, le HMPV a été détecté dans de très nombreux pays sur tous les continents. Des études de séroprévalence ont relevé la présence d'anticorps anti-HMPV dans des échantillons obtenus en 1958, suggérant que le virus a circulé depuis au moins 50 ans (van den Hoogen et *al.* 2001). Les infections à HMPV sont observées toute l'année. Dans les régions tempérées où la saisonnalité a été étudiée, un pic est observé pendant la saison hivernale de décembre à février (Boivin et *al.* 2002). Le HMPV se transmet probablement via les gouttelettes infectées. La période d'incubation du virus varie entre 4 et 6 jours et son excrétion s'étale sur une période de 2 à 14 jours (Panda et *al.* 2014). Le HMPV est responsable d'environ 7-19% des cas d'IRA chez les enfants hospitalisés ou non (Edwards et *al.* 2013). Le taux de détection est plus élevé chez les enfants que chez l'adulte. En effet les infections à HMPV se produisent généralement pendant l'enfance avec une susceptibilité plus accrue chez les enfants

de moins de 2 ans. De plus, les études de séroprévalence ont révélé que plus de 90% des enfants de moins de 5 ans ont déjà été infectés par le HMPV (Williams et *al.* 2004). Actuellement, aucun consensus ne se dégage sur les relations potentielles entre la virulence et les génotypes viraux. Quelques différences ont en effet été rapportées entre les deux génotypes de HMPV. L'infection due au génotype A serait plus fréquente chez le jeune enfant de moins de trois ans, et le génotype B plus fréquemment isolé chez l'adulte (Boivin et *al.* 2003). En revanche, il n'y aurait pas de différence dans la gravité de l'infection par l'un ou l'autre des génotypes de HMPV.

Manifestations cliniques

Le HMPV cible préférentiellement les cellules ciliées des voies respiratoires et provoque une variété de signes cliniques (Esposito et Mastrolia, 2016). L'infection à HMPV est difficilement distinguable des infections causées par d'autres virus respiratoires, en particulier RSV. Les infections à HMPV des voies respiratoires hautes sont caractérisées par une rhinite, une pharyngite, une conjonctivite et/ou une otite moyenne aiguë (OMA). La durée des symptômes est généralement inférieure à une semaine (Williams et *al.* 2006). L'atteinte des voies respiratoires basses par le HMPV nécessite fréquemment une hospitalisation. Il a été rapporté que 10% des hospitalisations chez les enfants sont attribuables aux infections par le HMPV. Les manifestations cliniques incluent : la tachypnée, la fièvre, la toux, l'hypoxie, une respiration sifflante et des anomalies radiographiques. Certains signes tels que les convulsions, les éruptions cutanées, la diarrhée, les vomissements et une altération de la fonction hépatique ont été associés aux infections à HMPV.

Diagnostic

Le diagnostic virologique de l'infection à HMPV peut être fait par isolement en culture, par la détection de l'ARN par RT-PCR ou par la technique d'immunofluorescence (Freymuth et *al.* 2008). La croissance du HMPV en culture de cellules est très difficile. Elle est très lente et l'apparition d'un effet cytopathogène (ECP) inconstante. Les lésions cellulaires n'apparaissent pas avant la deuxième ou la troisième semaine de culture et nécessitent souvent des passages à l'aveugle. Les images de l'ECP sont peu spécifiques et varient selon les souches (Freymuth et *al.* 2008). De plus, peu de lignées cellulaires permettent l'isolement du virus.

La recherche de l'ARN du HMPV par RT-PCR est la méthode de choix pour détecter une infection à HMPV. Elle est spécifique, sensible et plus rapide. La plupart des protocoles décrits dans la littérature amplifient des séquences des gènes L, N et F. Le gène N est généralement

ciblé pour pouvoir détecter les quatre sous-groupes de HMPV puisqu'il est hautement conservé entre les différentes souches (Maertzdorf et *al.* 2004).

Il est aussi possible d'effectuer des tests de reconnaissance par immunofluorescence directe en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre les protéines virales (Esposito et Mastrolia, 2016). Cette technique est également utilisée en routine même si elle est moins sensible que la RT-PCR.

Prévention et traitement

Aujourd'hui, il n'existe aucun traitement antiviral ni vaccins spécifiques approuvés dans la prise en charge des infections à HMPV. Cependant, il a été démontré que la ribavirine et des immunoglobulines polyclonales anti-VRS avaient la même activité antivirale *in vitro* sur le HMPV que sur le VRS (Wyde et *al.* 2003). Cette activité suggère que ces molécules puissent être proposées dans d'éventuelles atteintes respiratoires sévères à HMPV.

Depuis la découverte du métapneumovirus, plusieurs équipes ont cherché à développer une solution vaccinale spécifique au HMPV en utilisant des virus inactivés, des virus vivants atténués, des protéines recombinantes ou encore de l'ADN codant (Esposito et Mastrolia, 2016). La principale difficulté rencontrée dans le développement de vaccin contre HMPV est la difficulté à induire une réponse immunitaire forte et surtout durable. De plus, les populations les plus à risque de développer une infection grave au HMPV tels que les prématurés et les immunodéprimés sont malheureusement les moins aptes à développer une réponse immunitaire adéquate. Malgré tout, ces essais représentent néanmoins des pistes vaccinales intéressantes et nécessitent d'être approfondies.

4.1.4. Virus parainfluenza (HPIV)

Les HPIV ont été isolés pour la première fois en 1955 chez des enfants atteints de « croup » (Chanock, 1956). Ils sont responsables d'IRA des voies hautes chez l'enfant et l'adulte, des IRA des voies basses chez les enfants de moins de cinq ans, les personnes de troisième âge et les adultes immunodéprimés (Fry et *al.* 2006).

Caractéristiques virologiques

Les HPIV sont des virus à ARN monocaténaire et enveloppés. Ils appartiennent à la famille des *Paramyxoviridae*. Les HPIV comprennent 4 sérotypes majeurs notés HPIV1 à HPIV4, ce dernier est subdivisé en 2 sous-types : HPIV4a et HPIV4b. HPIV1 et HPIV3 appartiennent au

genre *Respirovirus* et le genre *Rubulavirus* inclus HPIV2 et HPIV4. Les HPIV sont des virus pléomorphes d'environ 150 à 400 µm de diamètre. Ils contiennent un simple brin d'ARN, de polarité négative qui code pour 6 protéines essentielles : la nucléocapside NP, la phosphoprotéine P, la matrice M, la glycoprotéine de fusion F, l'hémagglutinine - neuraminidase (HN) et l'ARN polymérase L (Branche et Falsey, 2016).

Les glycoprotéines HN et F sont des protéines de surface qui favorisent l'attachement du virus sur la surface des cellules épithéliales de l'hôte (Moscona, 2005). La glycoprotéine (HN) facilite également la libération de nouveaux virions de la cellule en clivant le résidu d'acide sialique. Ces deux protéines sont les cibles majeures pour les anticorps neutralisants. Les ARN de HPIV1 et HPIV3 codent pour la protéine C et HPIV2 pour la protéine V. Les deux protéines suppriment la réponse immunitaire de l'hôte en diminuant l'activité de l'interféron de type 1 (Branche et Falsey, 2016).

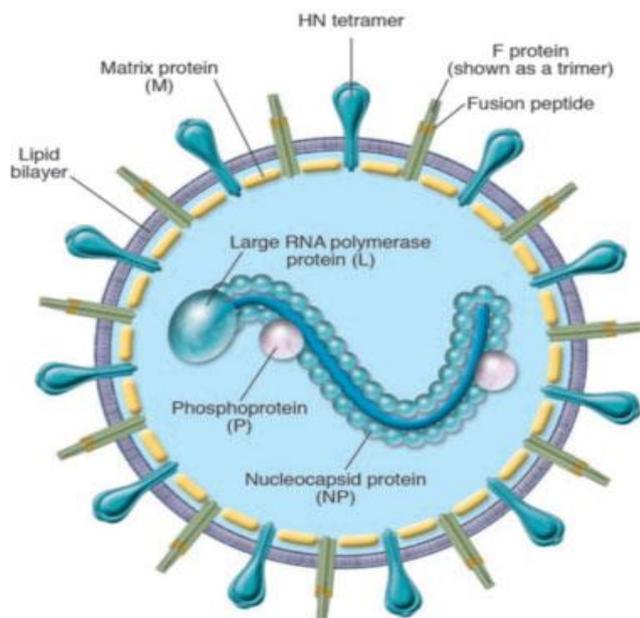


Figure 6: Représentation schématique d'un parainfluenza virus (Moscona, 2005)

Epidémiologie

Les HIPV se transmettent par contact direct entre personnes (Ansari et *al.* 1991). Ce sont des virus ubiquitaires et causent des infections avec des variations saisonnières. Les données sur la saisonnalité des infections à HPIV sont disponibles pour l'hémisphère nord mais absents dans les régions tropicales et subtropicales (Chew et *al.* 1998).

Ainsi, les infections à HPIV1 se produisent généralement en automne et en hiver. Pendant ces épidémies environ 18 000 à 35 000 enfants de moins de 5 ans sont hospitalisés aux Etats-Unis (Denny et *al.* 1983). La majorité de ces infections se produisent chez les enfants âgés de 7 à 36 mois avec un pic chez les enfants de 24 à 36 mois (Branche et Falsey, 2016).

Les infections à HPIV2 sont fréquentes en automne mais peuvent se produire toute l'année. Ces infections sont fréquentes chez les enfants de moins de 5 ans avec un pic chez ceux âgés de 1 à 2 ans et sont responsables d'environ 6 000 hospitalisations d'enfants chaque année aux Etats-Unis (Branche et Falsey, 2016).

Les infections à HPIV3 sont fréquentes pendant la première année de vie et causent principalement les bronchiolites et des pneumonies. Le HPIV3 est considéré comme étant le second agent viral responsable des infections des voies respiratoires basses chez les nourrissons et les enfants après le VRS (Fry et *al.* 2006). Environ 18 000 enfants sont hospitalisés chaque année à USA à cause des infections dues au HPIV3. Les épidémies sont enregistrées généralement au printemps et en été mais les infections à HPIV3 se produisent toute l'année. Durant les périodes de faibles transmissions, les personnes avec une déficience immunitaire et /ou une pathologie chronique sont les plus infectées (Branche et Falsey, 2016).

Il existe moins de données sur l'épidémiologie des infections à HPIV4. Les infections à HPIV4 sont moins sévères et l'atteinte concerne les voies respiratoires hautes (Branche et Falsey, 2016).

Manifestations cliniques

Les HPIV sont associés à la fois aux infections respiratoires des voies hautes et basses chez les enfants et les adultes. Le spectre des infections à HPIV comprend généralement l'otite moyenne, la pharyngite, la conjonctivite, le croup, la trachéobronchite et la pneumonie. Des manifestations respiratoires peu communes comme l'apnée, la bradycardie, la parotidite et le syndrome de détresse respiratoire peuvent être associées (Branche et Falsey, 2016). Bien que les HPIV infectent principalement les tissus respiratoires, l'infection disséminée a été décrite provoquant une variété de maladies affectant d'autres organes. Ainsi on peut distinguer des atteintes neurologiques, rénales, et les maladies rhumatologiques (Branche et Falsey, 2016). Le HPIV3 est plus fréquemment associé aux infections respiratoires basses que les autres sérotypes provoquant ainsi une bronchiolite et une pneumonie chez les nourrissons et les enfants. Les infections à HPIV4 sont le plus souvent associées à une atteinte des voies respiratoires hautes. (Counihan et *al.* 2001)

Diagnostic

Les HPIV peuvent être détectés par différentes techniques que sont : la culture cellulaire, l'IF, la RT-PCR et la technique ELISA.

La culture virale a longtemps été considérée comme le gold standard pour le diagnostic des HPIV. Cependant son coût élevé, la nécessité d'un personnel qualifié et aussi sa durée de réalisation (5 à 14 jours) limitent son utilisation en diagnostic clinique (Branche et Falsey, 2016).

L'IF peut être réalisée pour les HPIV1 à HPIV3 avec des sensibilités comprises entre 63% et 95%. Cependant les anticorps anti-HPIV4 ne sont pas disponibles (Leland et Ginocchio, 2007).

La RT-PCR est l'outil diagnostic de choix pour la détection des HPIV à cause de la rapidité de réalisation et des bonnes performances analytiques qu'il présente (Hirsch et *al.* 2013). Bien que la RT-PCR ait montré une sensibilité analytique nettement supérieure aux autres techniques, le coût et la nécessité d'un personnel qualifié limite son utilisation dans les hôpitaux du sud.

La sérologie est rarement utilisée en pratique clinique.

Prévention et traitement

Actuellement, il n'existe aucun traitement antiviral ayant une efficacité prouvée sur les infections à HPIV. Le traitement est généralement symptomatique (Branche et Falsey, 2016). La ribavirine est active sur les HPIV *in vitro* mais son utilisation en clinique n'est pas validée (Gilbert et Knight, 1986). Plusieurs nouveaux médicaments sont en développement et semblent prometteurs dans le traitement des infections graves chez les patients immunodéprimés (Triana-Baltzer et *al.* 2011). Aussi, il n'existe aucun vaccin ayant une licence à ce jour pour la prévention des infections à HPIV. Les recherches sont focalisées actuellement sur le HPIV3 qui est la principale cause des infections sévères chez les nourrissons et chez les personnes âgées (Branche et Falsey, 2016).

4.1.5. Coronavirus (HCoV)

Les HCoV sont à l'origine d'infections respiratoires plus ou moins sévères selon la population étudiée. À ce jour, six HCoV humains sont décrits. Parmi eux, deux coronavirus dits « classiques », les HCoV-OC43 et -229E ont été identifiés dans les années 1960 (Hamre et *al.* 1967 ; McIntosh et *al.* 1967). Les deux HCoV-NL63 et -HKU1, sont dits « nouveaux » car ils ont été identifiés plus récemment, au début des années 2000 (van der Hoek et *al.* 2004 ; Woo

et *al.* 2005). Ces HCoV sont généralement associés à des infections respiratoires peu sévères. Ils sont à distinguer des deux HCoV émergents, le SARS-CoV (Severe acute respiratory syndrome coronavirus) et le MERS-CoV (Middle-East respiratory syndrome coronavirus), qui sont les seuls à être associés à un syndrome de détresse respiratoire aigüe ou SDRA (Peiris et *al.* 2004 ; Zaki et *al.* 2012).

Les HCoV appartiennent à l'ordre des *Nidovirales*, à la famille des *Coronaviridae* et à la sous-famille des *Coronavirinae*. Les HCoV infectent de nombreuses espèces mammifères et aviaires. Selon la taxonomie actuelle, les *Coronavirinae* sont subdivisés en quatre genres nommés *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* et *Deltacoronavirus*. Les HCoV-229E et -NL63 appartiennent au genre *Alphacoronavirus*. Les quatre autres coronavirus humains appartiennent au genre *Betacoronavirus* qui est lui-même subdivisé en quatre clades nommés A, B, C et D (Kin et Vabret, 2016). Les HCoV-HKU1 et -OC43 sont inclus dans le clade A, le SARS-CoV et le MERS-CoV appartiennent aux clades B et C respectivement.

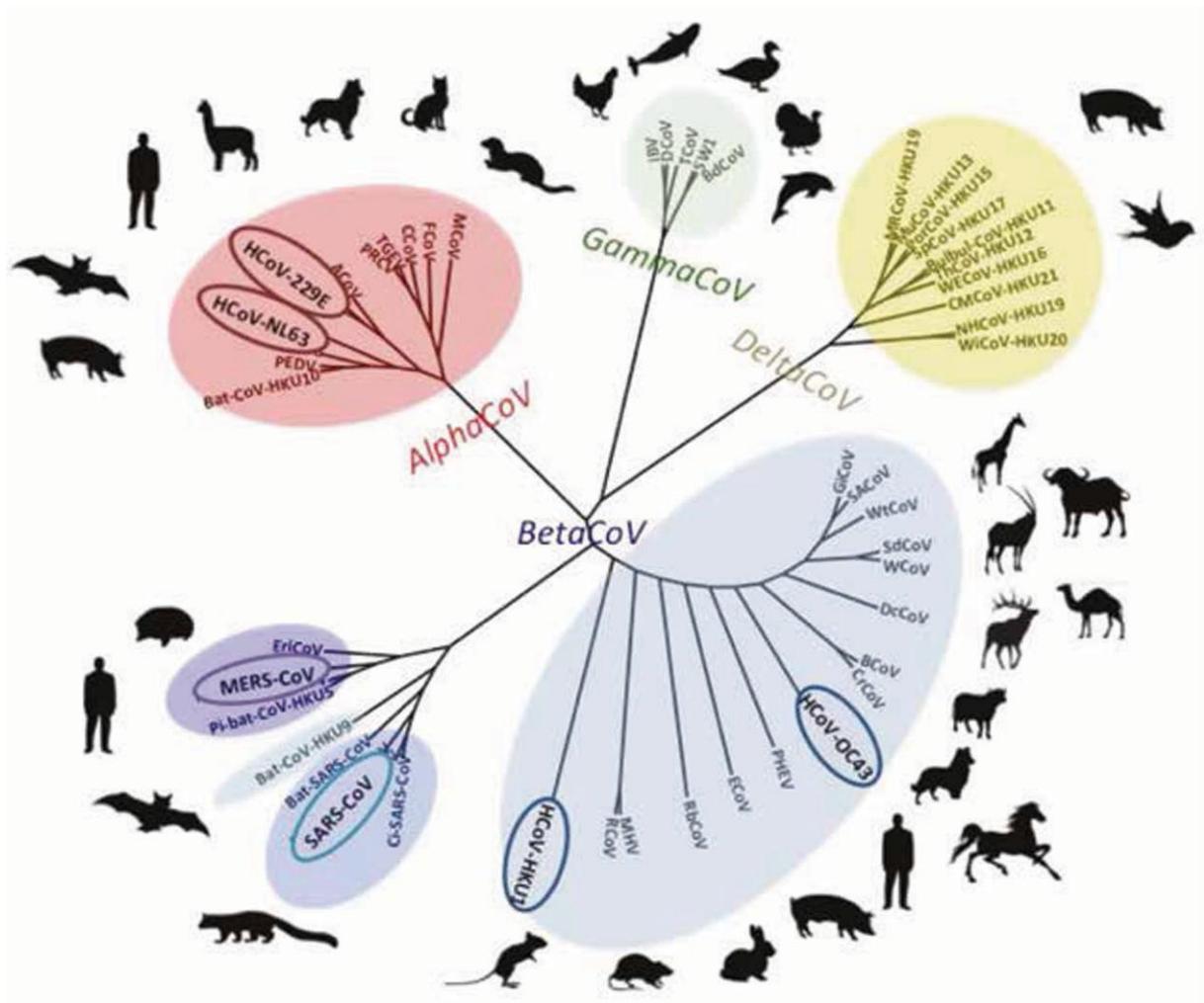


Figure 7: Arbre phylogénétique des Coronavirinae incluant 51 génomes complets, construit par la méthode du Neighbor-joining (MEGA6) (Kin et Vabret, 2016)

Caractéristiques virologiques

Les HCoV sont des virus enveloppés pléomorphes dont la taille varie de 80 à 200 nm. L'observation en microscopie électronique permet de distinguer des protéines de surface S ou Spike d'environ 20 nm à la surface du virion. Celles-ci sont ancrées dans la membrane virale et confère au coronavirus son aspect de couronne. C'est cet aspect particulier qui est à l'origine du nom de ce virus, le terme « *corona* » signifiant « *couronne* » en latin. En plus de la protéine S, la particule virale est constituée par trois autres protéines structurales : la protéine de la nucléocapside N, la protéine de membrane ou matrice M et la protéine d'enveloppe E. De plus, une cinquième protéine structurale, l'hémagglutinine estérase HE est retrouvée chez les *Betacoronavirus* de clade A (Siddell et *al.* 1982). Les HCoV sont caractérisés par un génome ARN positif simple brin, non segmenté et polyadénylé d'une taille d'environ 30 kb. Ce sont les plus grands génomes de virus ARN répertoriés à ce jour (Kin et Vabret, 2016). Les deux-tiers

du génome, soit environ 18 à 20 kb, sont constitués par deux cadres de lecture ouverts nommés ORF1a et ORF1b (Siddell et *al.* 1982). L'ORF1ab, correspondant à la fusion des ORF1a et ORF1b, permet la traduction d'une polyprotéine nommée pp1ab grâce à un nœud de phase efficace à 25 % (Brierley et *al.* 1987). Cette polyprotéine est ensuite clivée par des protéases virales en 16 protéines non structurales nommées nsp1 à nsp16. Elles sont impliquées dans le complexe de réplication et de transcription des HCoV. Le tiers du génome des coronavirus est constitué par au moins quatre cadres de lecture ouverts codant les protéines structurales S, E, M et N. Les *Betacoronavirus* de clade A (dont HCoV-OC43 et -HKU1) contiennent un cinquième gène codant une protéine structurale, l'hémagglutinine estérase (HE). De plus, les différents génomes de HCoV se distinguent entre eux par la présence ou non d'ORF putatifs supplémentaires codant des protéines accessoires (Sidell, 1995).

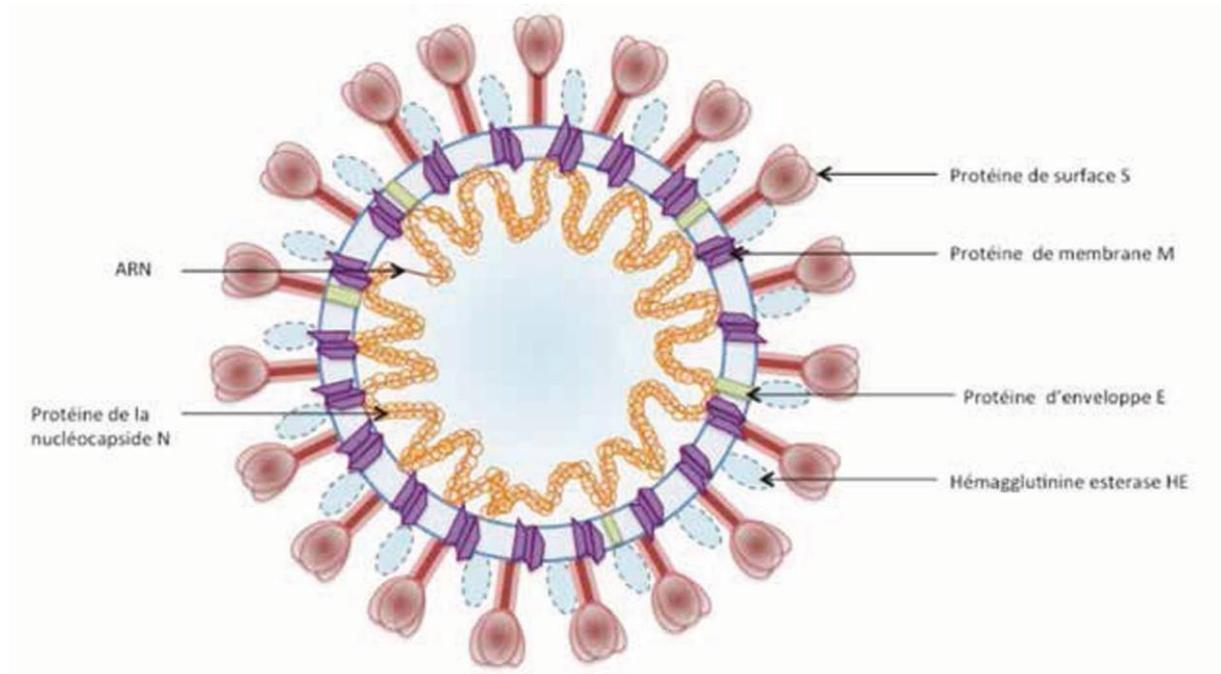


Figure 8: Représentation schématique d'un coronavirus (Kin et Vabret, 2016)

Epidémiologie

Les HCoV ont une circulation hivernale. Ils sont à l'origine d'infections respiratoires modérées dans la population générale. Cependant, les infections peuvent être plus sévères dans les populations susceptibles. Notamment, les HCoV sont impliqués dans 2 à 7 % des hospitalisations consécutives à une infection respiratoire, en particulier chez les enfants et les personnes âgées ou immunodéprimées. De ce fait, ils appartiennent au panel de virus respiratoires recherchés lors des diagnostics de routine des infections respiratoires par des outils

de biologie moléculaire. Ces HCoV dits circulants sont à distinguer des deux coronavirus émergents, le SARS-CoV et le MERS-CoV qui sont associés à des pathologies respiratoires plus sévères. Ils se distinguent des autres HCoV par leur potentiel épidémique plus élevé, leur impact sanitaire plus important et leur mode de circulation atypique. À l'instar des paramyxovirus et des virus Influenza, les coronavirus doivent être surveillés pour leur risque d'émergence dans la population humaine à partir d'un réservoir animal.

Les durées d'incubation des infections à coronavirus humains sont courtes : de l'ordre de trois jours pour les CoV classiques, et de deux à dix jours pour le SARS-CoV. Les durées d'excrétion virale dans les voies respiratoires sont moins bien connues, l'ARN des HCoV classiques est détectable pendant environ 14 jours dans les voies respiratoires.

La transmission des HCoV se fait principalement de façon directe par les gouttelettes de sécrétions oropharyngées dispersées par la toux d'une personne infectée et symptomatique.

Manifestations cliniques

Les HCoV classiques (HCoV-OC43, HCoV- 229E) et nouveaux (HCoV-HKU1, HCoV-NL63) sont généralement associés à des infections peu sévères des voies respiratoires hautes. Les infections à HCoV sont caractérisées par des symptômes non spécifiques et variables selon les patients. Dans la population générale, l'infection à HCoV est le plus souvent associée à une rhinite ou une rhinopharyngite plus ou moins symptomatique (Walsh et *al.* 2013). Lorsque l'infection est symptomatique, les signes cliniques les plus souvent décrits sont la fièvre, la toux, des myalgies et une congestion nasale. Les pathologies induites par les différents HCoV sont similaires et le tableau clinique seul ne permet pas de les distinguer entre eux ou vis-à-vis d'autres virus respiratoires. Chez les personnes âgées, les jeunes enfants et les patients immunodéprimés, des infections du tractus respiratoire plus sévères voire fatales peuvent être observées (Jean et *al.* 2013 ; Gerna et *al.* 2007). Lors d'une infection à HCoV, une pathologie entérique modérée (gastro-entérite, diarrhée) est parfois observée en plus de la pathologie respiratoire. À ce jour, il n'est pas encore clairement défini si l'atteinte entérique est une conséquence indirecte de l'infection ou si les HCoV ont un tropisme entérique avéré (Cabeça et *al.* 2013). Les HCoV ont à plusieurs reprises été incriminés dans des atteintes neurologiques. Plusieurs études déjà anciennes tendent notamment à les associer à la sclérose en plaque (SEP) (Tanaka et *al.* 1976 ; Salmi et *al.* 1982). Ces données suggèrent un potentiel neuroinvasif de ces HCoV, mais leur implication dans le développement de pathologies neurologiques est débattue.

Le SARS-CoV est caractérisé par une période d'incubation de 2 à 14 jours. Les premiers symptômes observés sont une forte fièvre, supérieure à 38 °C, ainsi qu'un syndrome respiratoire modéré. Des toux, des maux de tête ou de gorge et un état de fatigue général ont également été rapportés chez certains patients. En quelques jours, les symptômes évoluent, provoquant un syndrome de détresse respiratoire aiguë pouvant nécessiter une aide respiratoire chez les patients les plus susceptibles (Kin et Vabret, 2016). Lors de l'infection par le SARS-CoV, les leucocytes neutrophiles et les macrophages s'infiltrent dans les poumons et initient une réponse inflammatoire. Le niveau de cytokines pro-inflammatoires augmente, tandis qu'une lymphopénie est observée. Ces phénomènes sont à l'origine des altérations qui se produisent dans les poumons, notamment, d'un dommage alvéolaire diffus (DAD). Parallèlement, une formation de membranes hyalines et d'oedèmes est observée. Ces altérations morphologiques ont pour conséquence une hypoxie. Dans un second temps, le DAD est associé à une hyperplasie des pneumocytes de type II et à une métaplasie squameuse, ces deux caractéristiques étant révélatrices d'un processus de cicatrisation des poumons. L'aggravation de ces altérations histologiques peut entraîner une pneumonie sévère et le décès du patient. À la radiographie, une condensation uni- ou bilatérale des poumons est observée.

Le MERS-CoV est à l'origine d'une pathologie respiratoire sévère. Les premiers symptômes observés sont un état pseudo-grippal accompagné de fièvre et d'une toux non productive. L'aggravation des symptômes entraîne un syndrome de détresse respiratoire aiguë et une hypoxie, nécessitant souvent une assistance respiratoire. Les patients âgés, immunodéprimés ou présentant une comorbidité (diabète de type 2, hypertension artérielle, insuffisance rénale chronique, obésité, etc.) sont plus susceptibles de développer une pathologie respiratoire sévère et de succomber à l'infection par le MERS-CoV. Le décès fait suite à une insuffisance respiratoire pouvant être associée à une défaillance multi-organe. Des cas de défaillances rénales associées à la défaillance respiratoire ont été décrits (Ng *et al.* 2015).

Diagnostic biologique

Le diagnostic des infections à HCoV est réalisé par des techniques de RT-PCR sur des prélèvements respiratoires. Les premières techniques de détection des HCoV par RT-PCR remontent aux années 1990. Elles étaient cependant peu utilisées du fait de leur coût élevé. De plus, les HCoV n'étaient pas recherchés en routine car leur impact était considéré comme négligeable (Kin et Vabret, 2016). Du fait de son caractère conservé au sein d'une même espèce de HCoV, le gène N était alors la cible privilégiée pour la détection des HCoV (Hiscox *et al.* 2001). Cependant, d'autres RT-PCR plus récentes ciblant le gène M pour les mêmes raisons

ont été développées (Vijgen et al. 2005, Vabret et al. 2001). Ces techniques moléculaires se sont avérées plus rapides, plus sensibles et plus spécifiques. Egalement, les RT-PCR en temps-réel et les PCR multiplex, permettant la détection simultanée des quatre HCoV-OC43, -NL63, -HKU1 et -229E, sont de plus en plus répandues (Gaunt et al. 2010).

Quant aux techniques de sérologies, elles sont largement utilisées en épidémiologie pour étudier l'impact et la diffusion de ces virus.

4.1.6. Rhinovirus (HRV)

Les HRV sont responsables d'environ 50% des cas de rhume. Ils sont responsables également d'IRA des voies respiratoires hautes mais peuvent causer des atteintes des voies basses chez les personnes immunodéprimées ou avec des maladies cardio-pulmonaires chroniques (Greenberg, 2011).

Caractéristiques virologiques

Les HRV appartiennent à l'ordre des *Picornavirales*, à la famille de *Picornaviridae* et au genre *Enterovirus*. Ce sont des virus à ARN d'environ 7200 nucléotides, simple brin, de polarité positive et avec une capsidie à symétrie icosaédrique. Ce sont des virus nus, donc très résistants dans le milieu extérieur. La capsidie est constituée de 4 protéines : VP1, VP2, VP3 et VP4. Les protéines VP1, VP2 et VP3 sont responsables de la diversité antigénique et de la réponse immunitaire de l'hôte. Le VP4 est situé à l'intérieur de la capsidie et ancre l'ARN viral à la capsidie. A ce jour, 3 espèces de HRV nommées HRV-A, HRV-B et HRV-C ont été caractérisées par le séquençage du génome viral. Les sérotypes, au nombre de 167 se différencient par la nature des acides aminés au niveau des 4 protéines de capsides (Greenberg, 2016).

Epidémiologie

Les HRV sont des virus ubiquitaires circulant presque toute l'année. La plupart des patients infectés sont asymptomatiques ou présentent des symptômes bénins mais ces virus sont également fréquemment détectés chez les personnes atteintes d'otite, de bronchiolite, de pneumonie (To et al. 2017). Les patients avec une infection sévère à HRV sont le plus souvent immunodéprimés ou sont atteints d'une maladie chronique. Aussi, les patients atteints d'asthme sont susceptibles de faire des infections sévères à HRV (Greenberg, 2016). Plusieurs études ont révélé que les épisodes de respiration sifflante ou les infections des voies respiratoires basses

étaient plus fréquentes chez les patients infectés par le HRV-C que le HRV-A ou HRV-B (Piralla et *al.* 2009 ; Lau et *al.* 2009). Cependant, d'autres études n'ont relevé aucun lien entre le type d'espèce et la sévérité clinique (Xiao et *al.* 2015 ; Chen et *al.* 2015).

Dans les régions tempérées, le pic des infections à HRV est atteint en début d'automne et au printemps. Cette saisonnalité est similaire à celle des régions subtropicales (Greenberg, 2016).

La plupart des infections à HRV sont acquises dans la communauté. Cependant, plusieurs épidémies nosocomiales ou institutionnelles ont été signalées et ont touché les patients et le personnel (Mubareka et *al.* 2013 ; Reese et *al.* 2016). Etant non enveloppé, les HRV sont résistants à l'alcool et aux autres désinfectants. Ils peuvent être détectés sur des surfaces environnementales pendant une longue période (Winther et *al.* 2007).

Manifestations cliniques

Les HRV sont les principaux agents du rhume. Les symptômes cliniques généralement rencontrés peuvent être causés par de nombreux virus respiratoires et des bactéries atypiques. Ce sont : la rhinorrhée, la congestion nasale, les maux de gorge et la toux (To et *al.* 2017). En dehors du rhume, les HRV sont impliqués dans la survenue des otites moyennes et des rhinosinuites (Cho et *al.* 2013). L'atteinte des voies respiratoires basses est de plus en plus reconnue. Les HRV sont de plus en plus détectés chez les patients atteints de bronchiolite et de pneumonie (Jain et *al.* 2015). Ils peuvent également prédisposer à une pneumonie bactérienne secondaire (Greenberg, 2016). Les HRV ont également été associés à une aggravation des maladies pulmonaires chroniques comme l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), la bronchectasie, la bronchiolite oblitérante (George et *al.* 2014). Des complications extra pulmonaires au cours des infections sévères à HRV ont également été décrites. Ce sont les œdèmes pulmonaires, l'acidose diabétique et le coma hyperosmolaire (To et *al.* 2016).

Diagnostic biologique

La culture virale est utile pour la détection du HRV mais est peu utilisée à cause de sa faible sensibilité. Avec le développement de techniques de biologie moléculaire, la capacité à détecter les virus respiratoires a considérablement augmenté. Ainsi, la détection des HRV dans les échantillons respiratoires a été améliorée par la RT-PCR. Plusieurs études ont révélé une sensibilité accrue de la RT-PCR par rapport à la culture virale (To et *al.* 2017). Les tests sérologiques sont disponibles mais ne sont utiles que pour les études épidémiologiques.

Prévention et traitement

Aucun antiviral n'a été approuvé à ce jour pour le traitement des infections à HRV. Le traitement est purement symptomatique. De plus, à cause des nombreux sérotypes et des anticorps neutralisant spécifiques du sérotype, le développement d'un vaccin est jugé inopportun (To et *al.* 2017). Cependant, des études récentes sur un modèle de souris ont montré une réaction croisée d'anticorps neutralisant dirigés contre le VP1, donnant ainsi une base pour le développement efficace de vaccins (Glanville et *al.* 2013). Des études futures devront confirmer ces observations préliminaires.

4.1.7. Adénovirus (AdV)

Les AdV ont été décrits pour la première fois en 1953 par deux groupes de chercheurs qui travaillaient sur l'étiologie des infections respiratoires aiguës (Knipe et Howley, 2013). Les deux virus isolés ont été alors nommés adénovirus en rapport avec le tissu adénoïde dans lequel ils ont été retrouvés (Enders et *al.* 1956).

Caractéristiques virologiques

L'AdV est un virus à ADN double brin appartenant à la famille des *Adenoviridae* et au genre *Mastadenovirus*. C'est un virus ubiquitaire, non enveloppé dont la taille varie de 70 à 100 nm et avec un génome d'environ 36 kDa (Lu et *al.* 2006). A ce jour, 51 sérotypes ont été décrits sur la base des caractères antigéniques et plus de 70 génotypes ont été décrits et classés en 7 espèces : HAdV-A à HAdV-G sur la base de leur capacité à agglutiner les érythrocytes (Knipe et Howley, 2013; Jina Lee et *al.* 2010). Les espèces A, B, C, D, E et F circulent globalement et ont été impliquées dans des épidémies chez l'homme (Lynch et Kajon, 2016).

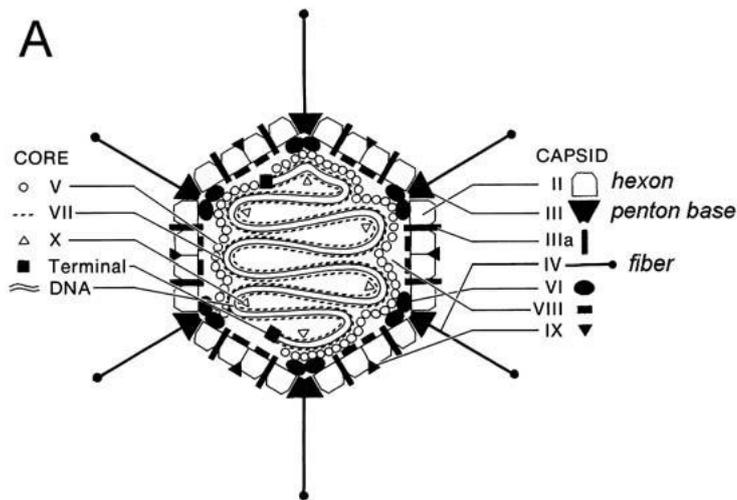


Figure 9 : Structure d'un virion d'Adénovirus (Rux et Burnett, 2004)

Epidémiologie

Les AdV sont responsables d'IRA fébriles, de conjonctivites, de gastroentérites ou maladies diarrhéiques (Filho et *al.* 2007 ; Ishiko et *al.* 2009 ; Lynch et Kajon, 2016). Ils causent également des infections sévères chez les personnes immunodéprimées (Kojaoghlanian et *al.* 2003). Les épidémies surviennent le plus souvent en hiver mais les infections se produisent tout au long de l'année sans une saisonnalité bien définie (Ison et *al.* 2006). L'infection peut résulter de l'exposition aux personnes infectées (inhalation de gouttelettes aérosolées, inoculation conjonctivale, propagation oro-fécale), d'acquisition provenant de sources exogènes (oreillers, draps, casiers, pistolets), ou de réactivation (Lynch et *al.* 2011). La période d'incubation varie de 2 à 14 jours. De plus, les AdV peuvent rester sous forme latente pendant plusieurs années dans le tissu lymphoïde (Kojaoghlanian et *al.* 2003), dans le parenchyme rénal (Bil-Lula et *al.* 2010) ou dans d'autres tissus. La réactivation survient généralement chez les personnes sévèrement immunodéprimées (Kojaoghlanian et *al.* 2003). Le portage asymptomatique des AdV peut persister pendant des semaines ou des mois (Lee et *al.* 2010). Les épidémies peuvent se propager rapidement parmi les populations fermées telles les hôpitaux, les centres de formation professionnelle, les écoles, etc. (Lynch et Kajon, 2016). Dans ces milieux, les mesures de contrôle sont essentielles pour limiter la circulation du virus.

Manifestations cliniques

+ Infections du tractus respiratoire

Les AdV sont responsables d'environ 5-10% d'IRA chez les enfants et de 1-7% chez les adultes (Lee et *al.* 2010). Les symptômes typiques d'une IRA aux AdV comprennent la fièvre, la toux, la pharyngite et les maux de gorge (Chang et *al.* 2008). Une pneumonie peut survenir chez les enfants et les nouveaux nés dans 20% des cas mais cette manifestation est rare chez les adultes immunocompétents (Sanchez et *al.* 1997). Chez les personnes immunodéprimées, une pneumonie sévère peut survenir dans environ 10-30% de cas avec un taux de mortalité excédant les 50% (Kim et *al.* 2007). Les AdV ont la capacité d'établir une infection latente ou persistante dans les voies respiratoires provoquant ainsi une inflammation chronique. Cette inflammation favoriserait la survenue d'infections bactériennes (Wurzel et *al.* 2014). Les sérotypes 1-5, 7, 14 et 21 ont été associés à une broncheectasie chez les enfants et à des BPCO chez les adultes (Lynch et Kajon, 2016). Ces différentes données suggèrent que les AdV ne constituent pas de simples pathogènes commensaux des voies respiratoires, mais peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse des maladies chroniques.

+ Infections oculaires

Les infections oculaires dues aux AdV comprennent : la kératoconjonctivite, la fièvre pharyngo-conjonctivale et la conjonctivite non spécifique (Hamada et *al.* 2008). Les sérotypes 8, 19 et 37 sont les plus fréquemment associés aux épidémies de conjonctivite mais non exclusivement. D'autres sérotypes tels les AdV-3, 4, 7, 11 et 14 peuvent également provoquer une conjonctivite (Tabbara et *al.* 2010).

+ Gastroentérites

Les AdV peuvent causer des infections gastro-intestinales principalement chez les jeunes enfants bien que le premier site d'infection soit le tractus respiratoire (Chang et *al.* 2008). Certains sérotypes notamment les AdV 40 et 41 ont une affinité pour le tractus gastro-intestinal avec des symptômes prédominants de gastroentérites (Madisch et *al.* 2006). Les rares complications comprennent la colite hémorragique, les hépatites, la cholécystite, la pancréatite et les infections disséminées (Lynch et Kajon, 2016)

+ Infection du tractus urinaire

Les AdV peuvent causer une infection des voies urinaires en particulier chez les personnes ayant subies une transplantation d'organe (Yokose et *al.* 2009). Les manifestations

comprennent le plus souvent : la dysurie, l'hématurie, la cystite hémorragique et un dysfonctionnement rénal (Lachiewicz et *al.* 2014). Les sérotypes 3, 7, 11, 21, 34 et 35 ont été associés à la cystite hémorragique. L'urétrite à AdV a également été décrite (Lachiewicz et *al.* 2014).

Rares infections

De rares manifestations dues aux AdV ont été décrites et comprennent : l'encéphalite aigüe, la méningite, la cardiomyopathie, le syndrome mononucléosidique et la dysplasie pulmonaire (Lynch et Kajon, 2016).

Populations à risque

En raison du manque de maturité du système immunitaire, les enfants de moins de 5 ans constituent un groupe vulnérable pour les infections à AdV (Chang et *al.* 2008). Aussi, les adultes vivant dans des milieux fermés tels que les recrues militaires représentent également un groupe à risque (Sanchez et *al.* 2001). Les infections les plus sévères surviennent le plus souvent chez les personnes ayant un trouble du système immunitaire. On peut citer les PVVIH, les receveurs de greffe d'organes, les personnes bénéficiant d'un traitement immunosuppresseurs.

Diagnostic biologique

Les AdV virus peuvent être détectés dans des spécimens cliniques provenant des sites infectés par les techniques suivantes : l'immunofluorescence, la PCR et la culture virale (Lee et *al.* 2010). La culture virale constitue la technique de référence. Cependant elle est longue (environ 28 jours) et peu sensible surtout pour la détection des AdV dans le sang. Quant à la PCR, elle est très sensible et peut détecter les AdV dans presque tous les spécimens cliniques (Lee et *al.* 2010). La détermination des sérotypes via la neutralisation est très laborieuse. La PCR ciblant les régions hypervariables du gène hexon permet l'identification des sérotypes et des espèces (Sarantis et *al.* 2004). Les tests sérologiques peuvent être utiles pour les investigations épidémiologiques.

Prévention et traitement

Il existe un vaccin oral développé en 1971 pour l'armée américaine qui protège contre les sérotypes 4 et 7. Ce vaccin développe également une protection croisée contre les sérotypes 3 et 14 (Russell et *al.* 2006). A ce jour, aucun antiviral n'a été approuvé pour le traitement des infections à AdV. Parmi les antiviraux disponibles, seule la cidofovir (CDV), un analogue nucléotidique qui inhibe l'ADN polymérase a présenté une meilleure activité *in vitro* contre

l'AdV (Naesens et al. 2005) et constitue donc le traitement de choix des infections à AdV. La CDV est administrée par voie intraveineuse, et est généralement bien tolérée mais des effets indésirables tels la néphrotoxicité et l'uvéïte peuvent survenir (Ison et al. 2006).

4.1.8. Bocavirus humain (HBoV)

Le HBoV a été découvert en 2005 par Tobias Allander et ses collaborateurs dans les sécrétions respiratoires de sujets présentant une atteinte respiratoire aiguë grâce à l'utilisation de techniques moléculaires (Allander et al. 2005).

Caractéristiques Virologiques

Le HBoV est un virus à ADN non enveloppé, à capsidre icosaédrique, et d'environ 25 nm de diamètre. Il appartient à la famille des *Parvoviridae*, à la Sous-famille *Parvovirinae* et au genre *Bocaparvovirus*. Il possède un ADN monocaténaire d'environ 5,3 kb avec trois cadres de lecture chevauchantes qui encodent pour deux protéines non structurales (NS1 et NP1) et deux protéines de capsides (VP1 et VP2). Quatre génotypes nommés de 1 à 4 (HBoV 1-4) ont été décrits à ce jour (Cotmore et al. 2014).

Epidémiologie

Le HBoV est un virus cosmopolite comme en témoigne sa détection dans de nombreux pays depuis sa découverte (Foulongne et Secundy, 2009). Plusieurs travaux ont démontré que le HBoV est un agent fréquemment détecté dans les prélèvements respiratoires avec une prévalence allant de 5 à 10 % chez de jeunes enfants avec une infection respiratoire (Catalano-Pons et al. 2009). C'est un virus fréquemment détecté en coinfection et cela dans des proportions souvent importantes (environ 50%) (Jartti et al. 2012). Le HBoV peut être détecté tout au long de l'année avec toutefois un pic de décembre à février. Les investigations sérologiques ont révélé la présence d'anticorps chez environ 40% des enfants âgés de 18 à 23 mois et chez presque 100% des enfants de plus de 2 ans (Endo et al. 2007). La présence de HBoV est presque inexistante chez les enfants de moins de 5 mois suggérant une protection par les anticorps maternels (Catalano-Pons et al. 2009). Des études également ont rapporté la présence de HBoV dans les selles d'enfants présentant une gastroentérite sans que son rôle dans la survenue des pathologies digestives ne soit clairement établi (Lee et al. 2007 ; Lau et al. 2007).

Manifestations cliniques

Il est cliniquement impossible de distinguer les infections à HBoV des infections dues aux autres virus respiratoires. Les tableaux cliniques associés à l'infection par le HBoV sont d'intensité variable, allant de l'atteinte respiratoire mineure à la bronchiolite sévère ou la pneumopathie. Les signes cliniques les plus fréquemment observés sont : une toux quasi constante, la fièvre, une rhinorrhée. La dyspnée, les sifflements et la détresse respiratoire sont également des signes fréquemment observés (Catalano-Pons et *al.* 2009). Des signes digestifs tels que la diarrhée et les vomissements sont aussi très souvent décrits chez les enfants infectés par le HBoV (Arnold et *al.* 2006). Enfin, le rôle du HBoV dans l'exacerbation des crises d'asthme a également été évoqué dans plusieurs études (Allander et *al.* 2007 ; Gendrel et *al.* 2007).

Diagnostic biologique

Le diagnostic d'une infection à HBoV repose sur la détection de l'ADN viral dans les prélèvements par les techniques de diagnostic moléculaire. La plupart des laboratoires utilisent la PCR conventionnelle ou la PCR à temps réel ciblant les gènes NP1, NS1 ou VP1/2 (Catalano-Pons et *al.* 2009). Cependant une des limites de la PCR, est sa positivité chez les patients ne présentant plus de symptômes rendant ainsi l'interprétation très délicate.

Prévention et traitement

Il n'existe aucun traitement spécifique approuvé à ce jour contre les infections à HBoV (Jartti et *al.* 2012). Seul un traitement symptomatique est administré dans les cas sévères et ce traitement est similaire dans le cas de la prise en charge des autres infections des voies respiratoires. De plus, il n'existe aucun vaccin rendant ainsi la prévention et le contrôle des infections à BoV très difficile.

4.2. Bactéries atypiques

4.2.1. *Mycoplasma pneumoniae*

Cinq espèces de mycoplasmes sont pathogènes pour l'homme. Trois d'entre elles appartiennent au genre *Mycoplasma* (*M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*), deux au genre *Ureaplasma* (*U. urealyticum* et *U. parvum*).

Les mycoplasmes ont été isolés pour la première fois en 1898 grâce aux travaux de Nocard et Roux. En 1944, Eaton, isole l'agent d'Eaton qui deviendra par la suite *M. pneumoniae* (Eaton et al. 1944). Longtemps considéré comme étant un virus, ce n'est qu'en 1968, que son caractère bactérien fut prouvé par sa culture sur un milieu artificiel acellulaire (Atkinson et al. 2008).

Caractéristique bactériologiques

M. pneumoniae appartient à la classe des *Mollicutes* (de mollis cutis : peau molle), à l'ordre des *Mycoplasmatales*, à la famille des *Mycoplasmataceae* et au genre *Mycoplasma*. Sa caractéristique principale est l'absence de paroi d'où un aspect polymorphe (coccoïdes ou filamenteux). Il n'est pas colorable par le Gram et présente une insensibilité totale aux bêtalactamines. C'est une petite bactérie sphérique d'environ 150 – 200 nm de diamètre. Sa membrane cytoplasmique présente une structure trilamélaire contenant des glycolipides, des glycoprotéines et des stérols qui assurent sa fluidité. Son cytoplasme contient un génome réduit (environ 816 kb) et un ribosome non perceptible au microscope optique. *M. pneumoniae* possède un organe de cytoadhérence appelé protéine P1 situé au niveau de la position terminale, le Tip (Atkinson et al. 2008).

Bactérie fragile, *M. pneumoniae* est cultivable en milieu acellulaire. Elle exige des milieux complexes enrichis en sérum, souvent rendus sélectifs par la présence de la pénicilline à laquelle elle est insensible. L'isolement se fait entre 35°C et 37°C sous 5°C de CO₂. Elle est très sensible aux variations du pH et tire son énergie de la fermentation du glucose. *M. pneumoniae* donne en culture de très petites colonies, visibles à la loupe binoculaire, ayant un aspect en œuf sur le plat. L'identification se fait sur la base de ses propriétés métaboliques que sont : la fermentation du glucose, l'hydrolyse de l'arginine ou de l'urée, l'hémadsorption sur les hématies de cobayes (Bébéar, 2008).

Epidémiologie

M. pneumoniae colonise les voies respiratoires hautes et basses et a un pouvoir pathogène certain. Il est fréquemment rencontré chez les enfants à l'âge scolaire, entre 5 ans et 15 ans, et est incriminé dans près d'un tiers des pneumonies acquises (Bébéar, 2008). C'est une bactérie qui se transmet de manière aéroportée de personne à personne par de grosses gouttelettes de salive. La période d'incubation est plutôt longue (environ 3 semaines). *M. pneumoniae* provoque des infections respiratoires, le plus souvent bénignes, se manifestant à l'état endémique avec de petites poussées épidémiques tous les 4 à 7 ans. Leur fréquence réelle est mal connue (Bébéar, 2008). Il est également important de noter que le portage asymptomatique

de cette bactérie dans les voies respiratoires hautes existe. En effet, une étude hollandaise a montré sur la base de prélèvements pharyngés et nasaux analysés par PCR, qu'il n'y avait pas de différence significative de la prévalence de *M. pneumoniae* entre un groupe d'enfants asymptomatiques et un deuxième groupe d'enfants atteints d'une infection respiratoire. Ce portage peut être prolongé jusqu'à 4 mois.

Manifestations cliniques

La plupart des infections à *M. pneumoniae* sont asymptomatiques. Lorsqu'elles sont symptomatiques, les signes cliniques peuvent être tant pulmonaires qu'extra-pulmonaires (Atkinson et al. 2008). On retrouve tout d'abord des signes généraux tels que des pics fébriles peu élevés, une sensation de mal-être général, des myalgies ou des céphalées.

Une atteinte de la sphère oto-rhino-laryngologie (ORL) est fréquemment observée avec la présence d'une pharyngite, d'une rhinorrhée et d'otalgies. Une myringite bulleuse peut également être présente.

Les symptômes pulmonaires regroupent la toux, généralement peu ou non productive et prolongée, les douleurs thoraciques, les sifflements ou la dyspnée. A l'auscultation pulmonaire, des râles crépitants ou bronchiques ainsi que des sibilances peuvent être entendus.

Un éventuel lien entre les infections à *M. pneumoniae* et l'augmentation de l'incidence d'asthme chez les patients infectés par ce germe est suggéré dans la littérature, sans toutefois qu'il soit affirmé (Atkinson et al. 2008).

Les symptômes extra-pulmonaires se manifestent suite à la dissémination du germe ou par des réactions immunitaires. Sur le plan cutané, peuvent apparaître des lésions telles qu'un érythème maculo-papulaire ou des lésions vésiculaires et urticariennes. Dans de plus rares situations, un syndrome de Stevens-Johnson peut compliquer l'infection. Les infections à *M. pneumoniae* peuvent également causer, dans 0,1 % des cas, des affections du système nerveux central, telles que des encéphalites, des méningites aseptiques, des neuropathies périphériques, des myélites transverses, des cérébellites ou encore un syndrome de Guillain-Barré (Atkinson et al. 2008).

Enfin, d'autres affections et symptômes peuvent être observés tels qu'une pancréatite, des diarrhées, des arthralgies, des troubles du rythme cardiaque ou des signes de glomérulonéphrites, mais ceci est beaucoup plus rare.

Diagnostic biologique

Le diagnostic de *M. pneumoniae* peut être fait aussi bien par la culture, la sérologie et la PCR. Le diagnostic est réservé aux formes sévères ou aux enquêtes épidémiologiques (Bébéar, 2008). *M. pneumoniae* peut être mis en évidence dans des prélèvements de gorge, des aspirations nasopharyngées chez l'enfant, des lavages bronchoalvéolaires (formes sévères). Les expectorations ne sont pas adaptées.

La culture, longue (6 à 21 jours) et difficile, est rarement pratiquée. Les milieux utilisés sont complexes, renfermant 20% de sérum, de l'extrait de levure et sont rendus sélectifs par addition d'une bêtalactamine et éventuellement d'autres inhibiteurs. L'incubation a lieu à 37°C, de préférence sous CO₂ (Bébéar, 2008).

La PCR présente une haute spécificité et sensibilité pour le *M. pneumoniae*. Elle permet d'obtenir des résultats très rapides. Cependant, elle ne permet pas de différencier un portage asymptomatique d'une infection à *M. pneumoniae*.

La sérologie à la recherche d'une infection à *M. pneumoniae* peut revenir positive après 7 à 9 jours d'infection pour les IgM et dès deux semaines pour les IgG. Le diagnostic sera confirmé sur un deuxième échantillon, recueilli un mois après le premier, permettant d'objectiver une quadruple augmentation du taux d'immunoglobulines. Un prélèvement unique ne peut donc pas confirmer, à lui seul, le diagnostic d'une infection à *M. pneumoniae*.

Mycoplasma pneumoniae et antibiotiques

Les mycoplasmes ont des caractéristiques naturelles expliquant leur résistance intrinsèque à certaines familles d'antibiotiques comme les bêtalactamines et les glycopeptides. Les antibiotiques potentiellement actifs sont les tétracyclines, les fluoroquinolones, les macrolides et apparentés (Bébéar et al. 2007). Les macrolides et apparentés sont les antibiotiques de choix pour le traitement des infections respiratoires à *M. pneumoniae* touchant principalement l'enfant (Waites et Talkington, 2004). La sensibilité aux antibiotiques de *M. pneumoniae* est exceptionnellement recherchée. En France, de très rares cas de résistance acquise aux macrolides ont été décrits. Cependant, une surveillance reste nécessaire à cause des récentes publications faisant état d'une augmentation de la fréquence des souches de *M. pneumoniae* résistantes aux macrolides (Bébéar et al. 2007).

4.2.2. *Chlamydia pneumoniae*

C. pneumoniae est un autre type de bactérie dite atypique qui infecte les voies respiratoires de l'enfant, quoique moins fréquemment que *M. pneumoniae*, avec la même transmission strictement interhumaine par gouttelettes de salive aéroportées. Elle a été découverte en 1986 par Grayston (Grayston et al. 1986). Il existe plusieurs types de *Chlamydia*. La souche la plus fréquemment impliquée dans les pneumonies chez l'enfant est *C. pneumoniae*.

Caractéristiques bactériologiques

Les Chlamydia sont des Eubactéries à parasitisme intracellulaire obligatoire. Elles appartiennent à l'ordre des *Chlamydiales*, à la famille des *Chlamydiaceae* et au genre *Chlamydia* (Barbeyrac et Bébéar, 1997). *C. pneumoniae* existe sous deux formes : le corps élémentaire (CE) et le corps réticulé (CR). Le CE est une petite sphère de 200 à 400 nm de diamètre. Il est limité par une paroi rigide et épaisse dont la caractéristique remarquable est l'absence de peptidoglycane. La paroi du CE est constituée de deux membranes : la membrane interne qui joue le rôle de membrane cytoplasmique et la membrane externe, constituée de protéines riches en cystéine (Raulston, 1995 ; Barbeyrac et al. 2006). Ces protéines assurent la rigidité de la paroi ainsi que la résistance du CE au transit extracellulaire. Le CR est de plus grande taille que le CE avec environ 1000 nm de diamètre et sa membrane est plus fluide que celle du CE.

Epidémiologie

Avec une transmission interhumaine via les sécrétions respiratoires, les infections à *C. pneumoniae* sont de répartition mondiale (Barbeyrac et al. 2006). Des études séroépidémiologiques ont montré des variations en fonction de l'âge. La prévalence est basse chez les enfants de moins de 5 ans avec un pic de séroconversion entre 5 et 14 ans. L'incidence exacte de l'infection à *C. pneumoniae* est difficile à préciser. Elles représenteraient 5 à 10% des infections en milieu hospitalier.

Manifestations cliniques

Les infections respiratoires à *C. pneumoniae* sont très souvent asymptomatiques. Lorsqu'elles sont symptomatiques, elles apparaissent en fin d'hiver ou au début du printemps et la période d'incubation est longue (environ 21 jours). Les infections à *C. pneumoniae* peuvent être hautes ou basses, telles qu'une sinusite, une pharyngite, une otite, une bronchite ou enfin une pneumonie atypique. Les épisodes sont de courte durée, atteignant typiquement les enfants en

âge scolaire (5 à 15 ans), mais aussi les adultes et les personnes âgées. L'immunité n'est généralement pas persistante.

Cliniquement, les pneumonies dues à *C. pneumoniae* sont difficiles à distinguer des autres pneumonies atypiques ou virales. Les manifestations cliniques se développent insidieusement. Elles sont caractérisées par une fièvre peu élevée les premiers jours, diminuant après la première semaine. Les patients présentent fréquemment des malaises, des myalgies, des céphalées et une angine, ou plus typiquement une laryngite ou une sinusite. La toux, peu ou non productive, peut durer entre 2 à 6 semaines. À l'auscultation pulmonaire, il faut rechercher des râles crépitants et des ronchis, ainsi que des sibilances. Ces infections à *C. pneumoniae* peuvent parfois être sévères, voire fatales.

Les infections à *C. pneumoniae* sont responsables d'à peu près 20 % des épisodes de syndrome thoracique aigu chez les enfants atteints de drépanocytose. Ces infections à *C. pneumoniae* sont associées à une hypoxie sévère.

Il est à noter qu'une association entre les infections pulmonaires à *Chlamydia* et l'hyperréactivité bronchique des voies aériennes a été mise en évidence.

Tout comme le *M. pneumoniae*, le *C. pneumoniae* semble être responsable de manifestations extra pulmonaires telles que la méningoencéphalite, le syndrome de Guillain-Barré, l'arthrite, la péricardite et la myocardite. Cependant, son rôle n'a pas été confirmé par les études cas-témoins.

Diagnostic biologique

Le diagnostic fiable de l'infection à *C. pneumoniae* reste difficile en raison du manque de tests diagnostiques standardisés disponibles dans le commerce. Actuellement les méthodes disponibles sont la culture, souvent non concluante, la sérologie et la PCR, les deux dernières étant le plus souvent utilisées.

Le sérodiagnostic des infections à *C. pneumoniae* par l'immunofluorescence (IF) est considéré par le Center for Disease Control (CDC) et l'Infectious Diseases Society of America (IDSA) comme le " gold standard ". Les critères de l'infection incluent soit un titre d'IgM seul $\geq 1:16$, soit une quadruple augmentation du titre d'IgG.

La PCR permet la détection rapide et sensible de *C. pneumoniae*. Cependant son application est difficile à interpréter.

Traitement des infections à *C. pneumoniae*

Un pourcentage élevé d'enfants infectés présentera une résolution spontanée des symptômes. *C. pneumoniae* est sensible aux macrolides, aux tétracyclines et à la plupart des fluoroquinolones (hormis la ciprofloxacine). L'efficacité de l'antibiothérapie dans le traitement des infections respiratoires basses à *C. pneumoniae* est difficile à démontrer puisqu'il est compliqué d'obtenir la preuve de l'infection car il existe des cas de portage asymptomatique et de résolution spontanée. A ce jour, l'information concernant les résistances des *C. pneumoniae* à l'antibiothérapie reste limitée.

4.3. Autres pathogènes

Streptococcus pneumoniae : *S. pneumoniae* se présente sous forme de diplocoques à Gram positif, lancéolés, accolés par leur côté pointu, formant un chiffre 8. Dans les produits pathologiques, les pneumocoques pathogènes sont entourés d'une capsule bien visible. Elle appartient à la famille des *Streptococcaceae* et au genre *Streptococcus*. Elle est une bactérie aérobie-anaérobie facultative et ne possède pas de catalase. *S. pneumoniae* provoque des maladies telles que la septicémie, la méningite et la pneumonie. Elle est l'une des plus nombreuses bactéries observées dans les pneumonies acquises dans la communauté, ce qui représente jusqu'à 25% de ces infections. C'est également l'un des deux premiers isolats trouvés dans les infections de l'oreille et l'otite moyenne. Le pneumocoque est également présent comme commensal des voies respiratoires chez 5 à 10 % des individus normaux, généralement en petit nombre.

Staphylococcus aureus : *S. aureus* se présente sous forme de coque en amas (grappe de raisins). C'est une bactérie à Gram positif et catalase (+). Elle appartient à la famille des *Staphylococcaceae* et au genre *Staphylococcus* et est fréquemment rencontrée dans le nez, la gorge et la peau. Elle fait partie de la flore humaine normale, environ 30% de la population est colonisée de façon persistante. *S. aureus* est une des principales causes d'infections nosocomiales. C'est la cause la plus fréquente d'infections de plaies chirurgicales qui peuvent conduire à une bactériémie. Dans la communauté, *S. aureus* demeure une cause importante d'infections cutanées et tissulaires moues, d'infections respiratoires et d'endocardites infectieuses.

Klebsiella pneumoniae : C'est un bacille immobile, à Gram négatif, et encapsulé. *K. pneumoniae* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et au genre *Klebsiella*. Elle est

responsable des pathologies les plus courantes des voies respiratoires ou urinaires. *K. pneumoniae* a également été incriminée dans les infections nosocomiales.

Moraxella catarrhalis : C'est un diplocoque non mobile, aérobic, à Gram négatif et à oxydase (+). C'est une cause importante d'otite moyenne chez les enfants et d'infections des voies respiratoires chez les personnes âgées. Chez les personnes immunodéprimées, la bactérie peut causer une variété d'infections graves telles la pneumonie, l'endocardite, la septicémie et la méningite.

Haemophilus influenzae b : C'est une bactérie à Gram négatif, immobile, en forme de tige. Elle est responsable de bactériémie, de pneumonie et de méningite bactérienne aiguë. De plus, elle peut être à l'origine de cellulite, d'ostéomyélite, d'épiglottite et d'arthrite infectieuse.

Pneumocystis jirovecii : Champignon du genre *Pneumocystis*, c'est l'un des nombreux organismes connus pour causer des infections opportunistes mortelles chez des patients immunodéprimés dans le monde entier. Les symptômes comprennent la fièvre, la toux, l'essoufflement et la perte de poids. Dans un petit nombre de cas, le *Pneumocystis* peut envahir d'autres organes viscéraux, tels que le foie, la rate et le rein.

Bordetella pertussis : C'est un coccobacillus Gram négatif, aérobic stricte, du genre *Bordetella*. C'est l'agent causal de la coqueluche. L'infection se produit principalement chez les enfants de moins de 1 an lorsqu'ils ne sont pas immunisés. Les symptômes sont semblables à ceux du rhume: écoulement nasal, éternuement, toux légère et fièvre modérée. Il est à noter l'existence d'un vaccin.

Parechovirus (HPeV) : Les HPeV sont des virus à RNA de polarité positive. Ils appartiennent à la famille des *Picornaviridae* et au genre *Parechovirus*. On distingue deux espèces : HPeV-A et HPeV-B. Ils sont fréquents chez les jeunes enfants et sont associés à des maladies des voies respiratoires supérieures et inférieures. Ils sont aussi incriminés dans les gastroentérites légères et, moins fréquemment, les méningites et les septicémies néonatales.

Enterovirus D68 (EV-D68) : L'EV-D68 est un membre de l'espèce Enterovirus D (EV-D) qui appartient au genre *Enterovirus* et à la famille des *Picornaviridae*. Il a été isolé pour la première fois chez les enfants hospitalisés atteints d'infections des voies respiratoires basses en Californie, États-Unis, en 1962. Depuis lors, sa détection a été rarement signalée jusqu'au début des années 2000 où plusieurs études ont commencé à rapporter des cas de EV-D68, par exemple

chez les enfants hospitalisés avec des infections respiratoires aiguës graves aux Philippines en 2008-2009.

5. Diagnostic biologique

5.1. Les types de prélèvement

La collecte d'un échantillon adéquat est fondamentale pour la détection correcte des pathogènes respiratoires (Leruez-Ville, 2007). L'échantillon doit être collecté le plus tôt possible en présence des signes cliniques évocateurs. Il doit être stocké dans des conditions adéquates (à +4°C) ou acheminé directement au laboratoire dans des glacières isothermes. La période de collecte, le temps mis pour acheminer l'échantillon au laboratoire et les conditions de conservation sont cruciaux pour la détection des pathogènes (Heikkinen et *al.* 2001). Cela est d'autant vrai pour l'isolement du virus et aussi pour la détection des virus à ARN par la méthode moléculaire.

En fonction du site de prélèvement, on distingue :

- les prélèvements des voies respiratoires hautes : l'écouvillonnage nasal, l'écouvillonnage nasopharyngé, l'aspiration nasopharyngée, le lavage nasal.
- les prélèvements des voies respiratoires basses : le lavage bronchoalvéolaire, l'aspiration trachéale, et l'expectoration. Le risque de contamination par la salive est très élevé dans le cas de la collecte d'une expectoration.

Les prélèvements une fois obtenus, doivent être immédiatement placés dans un milieu de transport viral (VTM) s'ils sont destinés à la recherche des virus respiratoires et des bactéries.

5.2. Les méthodes diagnostiques

L'isolement viral sur culture cellulaire

C'est la technique de diagnostic la plus longue et la plus coûteuse. Elle consiste à inoculer les prélèvements respiratoires sur une nappe cellulaire et à guetter l'apparition d'un ECP lié à la multiplication virale (Leruez-Ville, 2007). Cet effet survient plusieurs jours voire plusieurs semaines après l'inoculation et retarde d'autant le diagnostic. Chaque virus ayant un tropisme cellulaire propre, il n'y a pas de système de culture universel et le laboratoire doit entretenir plusieurs lignées pour obtenir la multiplication d'un grand nombre de virus. Par exemple, les virus grippaux se multiplient sur cellules MDCK (rein de chien), les VRS et les adénovirus se

multiplient sur des fibroblastes embryonnaires de poumon d'origine humaine, les virus parainfluenza sur les cellules en lignée Hep-2. Par ailleurs, pour obtenir une bonne sensibilité avec la culture cellulaire, le prélèvement respiratoire doit être acheminé rapidement au laboratoire ou prélevé dans un milieu de transport pour éviter que les virus ne soient inactivés. Malgré sa complexité, la culture cellulaire est longtemps restée la méthode de diagnostic de référence des infections respiratoires virales et les performances des autres outils diagnostiques ont été évaluées par comparaison avec cette technique.

La détection directe des Antigènes

Les techniques de diagnostic des infections respiratoires reposent sur la mise en évidence des protéines virales directement dans les prélèvements. L'avantage majeur de ces techniques par rapport à la culture cellulaire est qu'elles peuvent être pratiquées sur un prélèvement dans lequel les virus sont inactivés, il y a donc moins de contrainte dans les délais d'acheminement au laboratoire (Kuroiwa et *al.* 2004).

Deux types de techniques sont très utilisés :

- **l'immunofluorescence directe** qui consiste à détecter la présence d'antigènes viraux dans les prélèvements à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques liés à la fluorescéine (Leruez-Ville, 2007). Dans cette technique, les cellules respiratoires récupérées après centrifugation du prélèvement sont déposées dans les différentes cupules d'une lame, puis les anticorps monoclonaux spécifiques des virus respiratoires recherchés sont déposés sur ces cupules. Des inclusions vertes sont retrouvées dans les cellules infectées lors de la lecture des lames au microscope à fluorescence. Cette technique doit être réalisée par un technicien expérimenté, car la lecture des lames est souvent délicate, implique l'utilisation d'un microscope à fluorescence et reste réservée aux laboratoires spécialisés. La sensibilité de la technique d'immunofluorescence directe est généralement un peu inférieure à celle de la culture cellulaire.

- **l'immunochromatographie sur membrane** consiste à détecter la présence d'antigènes viraux à l'aide d'anticorps spécifiques (anti-VRS ou antigrippaux) adsorbés sur la membrane (Slinger et *al.* 2004). L'industriel prépare des bandelettes sur lesquelles est préabsorbé un anticorps monoclonal spécifique du virus recherché, cet anticorps est marqué par une enzyme. Le prélèvement respiratoire est mélangé par le manipulateur à quelques gouttes d'un tampon de lyse fourni dans la trousse diagnostic, ce tampon permet de détruire les cellules respiratoires

et de libérer les antigènes viraux. Le mélange est déposé sur la bandelette ainsi que le substrat de l'enzyme. Lorsque le virus est présent dans le prélèvement, un complexe antigène-anticorps se forme et une bande colorée liée à la réaction enzyme-substrat apparaît sur la bandelette. Ces tests rapides permettent d'obtenir un résultat en 10 à 30 minutes et peuvent être pratiqués par un expérimentateur non spécialisé au laboratoire de biologie médicale ou directement au cabinet médical (« doctor-test »).

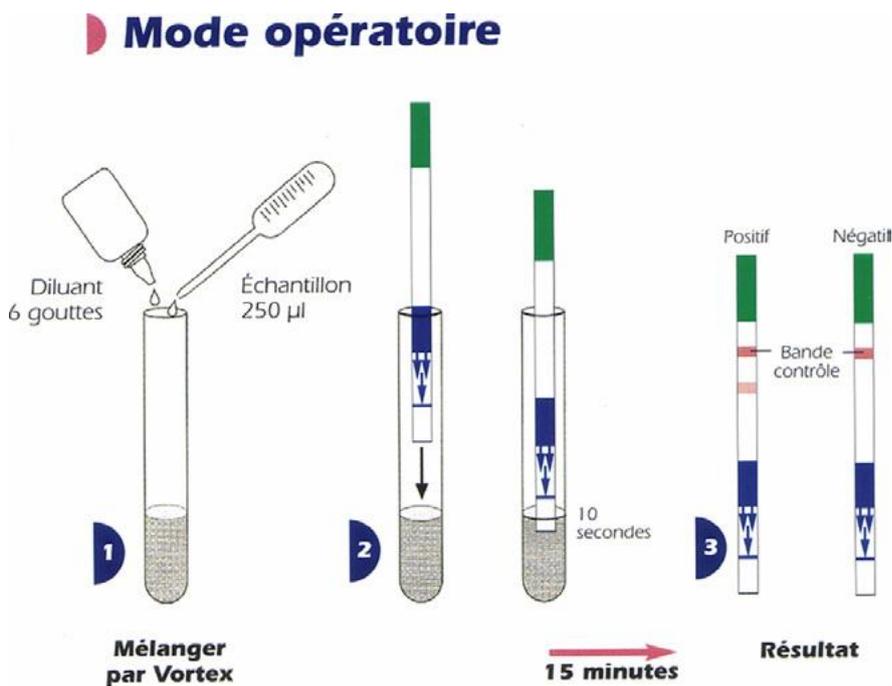


Figure 10: Exemple d'un test rapide d'immunochromatographie (M. Leruez-Ville, 2007)

La biologie moléculaire

Plusieurs méthodes d'amplification des acides nucléiques ont été développées ces dernières années et sont largement utilisées pour la détection des pathogènes respiratoires. Ce sont : la PCR conventionnelle, la PCR en temps réel, la PCR multiplex. Ces méthodes permettent une détection rapide des pathogènes et possèdent de bonnes performances analytiques (bonne sensibilité et une bonne spécificité). Aussi, durant cette dernière décennie, de nouvelles méthodes d'amplification sont largement utilisées pour le diagnostic. Ces méthodes sont rapides et simples à réaliser. Ce sont la nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) et la (Loop-mediated isothermal Amplification (LAMP).

La PCR conventionnelle

La PCR consiste à copier un segment du génome à l'aide d'amorces spécifiques. Les amorces s'hybrident avec la séquence nucléotidique homologue et l'enzyme la Taq polymérase qui est présente dans le milieu réactionnel recopie le fragment d'ADN, des étapes d'hybridation et d'amplification sont répétées de 30 à 40 fois ce qui permet d'obtenir de très nombreuses copies du segment nucléotidique cible. Dans une seconde étape, la présence des produits de PCR est visualisée le plus souvent sur un gel de polyacrylamide ou d'agarose. Ces techniques de PCR sont très sensibles mais il existe un risque de faux positifs par contamination des échantillons, notamment au niveau de la deuxième étape de révélation (Weinberg et *al.* 2004). En effet, à cette étape, lors de l'ouverture des tubes qui contiennent une très grande quantité de produits de PCR (jusqu'à plusieurs millions), des microaérosols de produits de PCR se produisent et la pièce peut être contaminée.

La PCR en temps réel

Récemment, une nouvelle technologie : la PCR en temps réel a révolutionné le diagnostic virologique. La technique de PCR temps réel consiste à réaliser une PCR en une seule étape en utilisant dans le milieu réactionnel à la fois des amorces permettant l'amplification mais aussi une sonde permettant la détection des produits de PCR au fur et à mesure de leur apparition. La sonde est marquée par un fluorochrome et une émission de fluorescence a lieu lorsque la sonde s'hybride avec l'ADN cible présent dans l'échantillon. L'émission de fluorescence est détectée à chaque cycle de PCR par la machine de PCR en temps réel ; la quantité de fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de cible présente dans l'échantillon. Cette technologie a un triple avantage par rapport à la technique de PCR conventionnelle : elle évite les contaminations puisque le tube contenant les produits de PCR n'a pas besoin d'être ouvert, elle est quantitative et elle est très facilement automatisable.

La PCR multiplex

On peut par ailleurs réaliser des PCR dites multiplexes c'est-à-dire que dans un même tube plusieurs génomes viraux sont détectés grâce à la présence d'un mélange d'amorces et de sondes spécifiques de plusieurs virus.

La sensibilité des techniques de PCR est bien supérieure à celle de la culture cellulaire, en effet la PCR permet d'identifier plus du double d'infections respiratoires virales par rapport à la culture. Cependant, en raison de cette grande sensibilité des techniques de PCR, certains ont discuté la valeur d'une PCR positive, notamment en posant la question d'un possible portage de virus dans le tractus respiratoire ne reflétant pas une infection active.

La technique des puces à ADN

Cette technique repose sur l'utilisation de « puces » ou « chips » qui sont des cartes contenant une membrane sur laquelle sont déposées des sondes à ADN spécifiques des micro-organismes recherchés (Leruez-Ville, 2007). On peut déposer sur une puce de très nombreuses sondes marquées (jusqu'à plusieurs milliers). Une lyse et une extraction des acides nucléiques sont réalisées à partir de l'échantillon biologique à analyser. Les acides nucléiques extraits sont ensuite déposés sur la puce, une hybridation a lieu entre le génome viral et l'ADN de la sonde spécifique prédéposée sur la membrane de la chip. La présence de l'hybridation est révélée après lecture informatisée de la puce. Cette technologie est très prometteuse, elle permettrait en effet de rechercher en une seule analyse la présence de l'ensemble des micro-organismes connus pour être responsables de pathologie respiratoire en utilisant une puce comprenant des sondes spécifiques de chacun de ces micro-organismes. Actuellement, la réalisation de puces est très onéreuse et leur utilisation en diagnostic médical n'est pas validée mais cette technologie semble promise à un bel avenir.

NASBA

La technique NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) est une technique isotherme d'amplification d'ARN inspirée du processus transcriptionnel observé chez les virus et les cellules (Chan et Fox, 1999). Un ARN cible est recopié en son ADN complémentaire à l'aide d'une transcriptase inverse. Une RNase H permet l'élimination de l'ARN, puis l'ADNc est transcrit en ARN à l'aide d'une ARN polymérase. Ce processus aboutit en quelques cycles à une amplification d'environ 100 fois la quantité d'ARN présente dans l'échantillon. Cette méthode peut être rendue quantitative par l'introduction de contrôles internes dans l'échantillon. Le fait qu'elle soit isotherme la rend plus économique que la PCR classique (Deiman et *al.* 2002). Elle est actuellement appliquée au diagnostic de certains virus comme le VIH ou le VHC.

LAMP

La technique d'amplification isothermale LAMP (Loop-mediated isothermal Amplification) permet de réaliser une amplification de l'ADN à une température constante de 65°C (Notomi et *al.* 2000). On peut amplifier l'ADN sans équipement de biologie moléculaire, sans extraction et certains protocoles permettent le diagnostic au champ avec un simple bain-marie. Publiée en

2000 par Notomi, la technique a été jusqu'alors essentiellement appliquée pour la détection ou le typage de pathogènes en médecine, en médecine vétérinaire, en alimentation et en phytopathologie. L'accroissement du rythme des protocoles publiés, la mise sur le marché de kits commerciaux et d'équipements spécifiques laissent entrevoir un développement rapide de cette technique pour de nombreux utilisateurs ainsi qu'une diversification de ses applications.

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET MEDTHODES

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

Chapitre 1 : Méthodologie de la revue systématique de la littérature

Avant la mise en œuvre de la surveillance, une revue systématique de la littérature portant sur des données publiées ou non entre 2000 et 2015 a été menée afin d'avoir une vue d'ensemble sur les étiologies des IRA chez les enfants de moins de cinq ans en Afrique sub-saharienne. Pour mener à bien cette revue, différentes étapes ont été adoptées.

Stratégie de recherche et critères d'inclusion

Les recherches ont été conduites dans les bases de données que sont Pubmed, Web of Sciences et Google scholar en utilisant une combinaison de mots-clés: « *etiology* », « *acute respiratory infections* », « *upper respiratory infections* », « *lower respiratory infections* », « *pneumonia* », « *influenza-like illness* » et « *children and africa* ». La recherche a concerné les études publiées en Anglais ou en Français, publiées entre le 1^{er} janvier 2000 et le 30 septembre 2015, et portant sur les enfants de moins de cinq ans atteints d'IRA en Afrique Sub-Saharienne. Les données des études relatives à la population générale ou aux enfants de moins de 5 ans souffrant d'infections respiratoires chroniques ont été exclues de cette revue de la littérature. La recherche bibliographique a aussi porté sur les données non publiées et non en ligne au Burkina Faso (thèses d'exercice en médecine et en pharmacie, thèses uniques en biologie, rapports, revue sciences et techniques du CNRST). Elle a été conduite dans un premier temps par un auteur qui a identifié les articles potentiels en se basant sur les critères d'inclusion. Dans un second temps, deux auteurs ont parcouru les articles proposés afin de décider de leur inclusion finale dans l'étude. En cas de divergence entre les deux auteurs, il a été fait appel à un troisième auteur pour trouver un consensus.

Extraction des données

Les données ont été extraites à l'aide d'un tableau Excel et portaient sur : les *noms des auteurs*, *l'année de publication* de l'article, le *pays* et le *cadre d'étude*, la *période de l'étude*, la *conception de l'étude*, la *population cible*, la *taille de l'échantillon*, la *définition des cas*, les *spécimens prélevés et analysés*, les *techniques d'analyses biologiques*, les *pathogènes recherchés et détectés*. L'extraction a été faite par un auteur et vérifiée par un second. Un appel à un troisième auteur était effectué en cas de divergence.

Synthèse des données

Etant donné la diversité des types d'études inclus dans cette revue (étude descriptive, étude analytique), nous avons jugé plus approprié de faire une synthèse des données plutôt qu'une méta-analyse. Les données ainsi extraites ont été synthétisées afin d'avoir les informations utiles.

Chapitre 2 : Surveillance des infections respiratoires : design, analyses biologiques, analyses statistiques.

A l'issue de la revue systématique de la littérature, une surveillance sentinelle a été mise en œuvre afin d'étudier l'épidémiologie et la diversité génétique des virus et bactéries impliqués dans les infections respiratoires aiguës chez les enfants de moins de cinq ans au Burkina Faso.

I. Design de la surveillance

1. Cadre d'étude

L'étude a été menée au Burkina Faso. C'est un pays enclavé, situé au cœur de l'Afrique occidentale avec une superficie de 272 967,47 Km². Il partage ses frontières avec six pays qui sont le Mali au Nord et à l'Ouest, le Niger à l'Est, le Bénin, le Togo, le Ghana et la Côte d'Ivoire au Sud. Le Burkina Faso est un pays tropical avec un climat de type soudanien au sud et sahélien au nord. On y distingue une saison pluvieuse de courte durée, de 3 à 4 mois (juin à septembre) et une saison sèche de 8 à 9 mois (octobre à mai). Le Burkina Faso est subdivisé en 13 régions. Sa population est estimée à 19 034 397 habitants en 2016 (INSD, 2010). Elle est en majorité jeune avec plus de la moitié ayant moins de 17 ans. Les femmes représentent 51,7% de la population. Selon le Recensement général de la population et de l'habitation (RGPH 2006), environ 77,3% de la population vivent en milieu rural. L'agriculture étant la principale activité (INSD, 2010). Le taux brut de natalité (TBN) est de 41,2‰ et le taux global de fécondité générale est de 206‰ (INSD, 2010). L'Indice Synthétique de Fécondité est de 5,4 enfants par femme selon l'Enquête Démographie et Santé (MS, 2015). Le taux d'accroissement naturel est de 3,1% (RGPH, 2006). L'espérance de vie à la naissance est de 56,7 ans en moyenne. Les femmes vivent plus longtemps (57,5 ans) que les hommes (55,8 ans). Le taux de mortalité générale est de 11,8‰. Le taux de mortalité infantile (mortalité des enfants de moins d'un an) est passé de 81‰ en 2003 à 65‰ en 2010 (INSD, 2010).

Le Burkina Faso est un pays à faible revenu avec un PIB par habitant de 622,0 USD en 2012. Près de 40% de la population vivaient en dessous du seuil de pauvreté en 2014. Le pays était classé 183/188 selon le programme de développement des Nations Unies avec un indice de développement humain à 0,402 en 2015. Cet état de pauvreté se caractérise par un accès limité aux services de santé de base et un taux élevé de malnutrition. Le système de santé est organisé

en 13 régions sanitaires opérationnalisées par 70 districts sanitaires. Le ratio médecin-patient en 2016 était de 1: 15 836 (MS, 2016). Les maladies prioritaires comprennent le paludisme, les infections respiratoires aiguës, la malnutrition, les maladies diarrhéiques, le VIH/SIDA, les IST, la tuberculose, la lèpre et les maladies tropicales négligées. En outre, le pays est le lieu de survenue de plusieurs épidémies (méningite, rougeole, dengue).

C'est dans ce cadre, qu'une surveillance sentinelle des syndromes grippaux (SG) et des infections respiratoires aiguës sévères (IRAS) a été établie dans des formations sanitaires des villes de Ouagadougou et de Bobo-Dioulasso entre janvier 2014 et décembre 2015. A sa première année de mise en œuvre, la surveillance portait uniquement sur les SG et concernait les centres de santé suivants : le Centre de Santé et de Promotion Sociale (CSPS) d'Accart-Ville, le CSPS de Colsama, la Clinique Léila et l'Hôpital de District de Do. Toutes ces formations sanitaires sont localisées à Bobo-Dioulasso. En Janvier 2015, la surveillance fut étendue au Centre Hospitalier Universitaire Sanou Souro (CHUSS) de Bobo-Dioulasso et à l'hôpital du District de Bogodogo situé à Ouagadougou. Elle a porté sur les IRAS et les SG. Tous ces centres de santé ont été choisis sur la base des critères suivants : l'accessibilité géographique, la fréquentation du centre de santé, la présence de personnel qualifié et la disponibilité de réfrigérateur pour la conservation des échantillons biologiques.

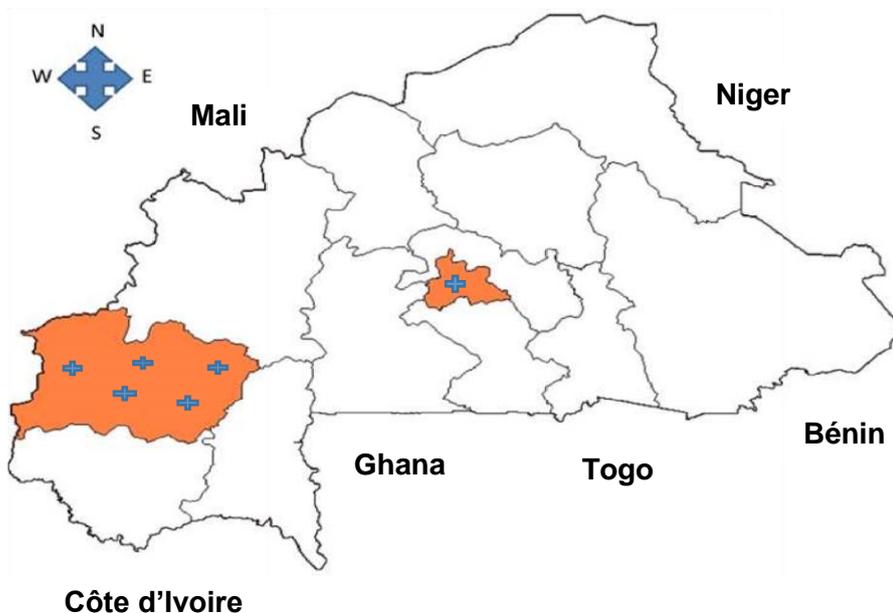


Figure 11: Carte du Burkina Faso avec les sites d'études.

2. Population d'étude – Définition de cas.

Etaient concernés par la surveillance, les enfants de moins de 5 ans reçus au cours de la période d'étude en consultation curative pour un SG ou hospitalisés pour une IRAS. Pour mener à bien cette étude, la définition de cas de l'OMS d'un SG et d'une IRAS a été adoptée.

Cas de SG : « un patient avec une fièvre ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) ou une histoire de fièvre, une toux et/ou un mal de gorge, avec un début des symptômes au cours des 10 jours précédents ».

Cas d'IRAS : « un patient hospitalisé avec une fièvre $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ou un antécédent de fièvre, une toux et/ou une difficulté respiratoire, et un des signes de danger suivants : incapacité de boire ou de téter, vomissement, convulsion, léthargie ou inconscience, tirage intercostal ou stridor chez l'enfant calme avec un début des symptômes au cours des 10 jours précédents ».

3. Inclusion et collecte des données sociodémographiques et cliniques

Au niveau de chaque site sentinelle, ont été inclus dans notre étude uniquement les enfants âgés de moins de cinq ans répondant à la définition de cas, et chez qui nous avons obtenus :

- le consentement éclairé de participation d'un des parents ou du représentant légal de l'enfant,
- un échantillon biologique adéquat (un écouvillonnage nasopharyngé ou une aspiration nasopharyngée).

L'identification et l'inclusion des cas étaient assurées par des médecins et des infirmiers préalablement formés à l'identification des cas, aux prélèvements et ayant pris connaissance du protocole de recherche. Tous les enfants souffrant de SG ou d'IRAS se présentant dans l'une des formations sanitaires au cours de la période d'étude étaient éligibles.

Chez chaque patient, les données sociodémographiques et cliniques ont été recueillies à l'aide d'un questionnaire structuré (**Annexe 1**). Les données collectées comprenaient des informations sur : le sexe, l'âge, les antécédents médicaux, la date d'apparition des symptômes, la date de prélèvement, les signes cliniques, le traitement et l'issue du malade.

4. Collecte et traitement des échantillons biologiques

Un écouvillonnage nasopharyngé à l'aide d'un écouvillon velouteux à tige flexible et une aspiration nasopharyngée à l'aide d'un cathéter stérile à succion flexible monté sur un appareil à succion intermittente ont été réalisés respectivement chez chaque enfant atteint de SG et

d'IRAS. Les prélèvements obtenus étaient immédiatement placés dans un milieu de transport viral (MTV) de 3 ml (VTM, Copan, Italie), agités doucement par un mouvement circulaire, étiquetés et conservés à + 4°C avant d'être acheminés au Laboratoire National de Référence pour les Gripes (LNR-G). Pour les cas de SG, les échantillons étaient collectés du lundi au jeudi et acheminés deux fois par semaine (mardi et jeudi). Par contre, pour les cas d'IRAS, la collecte n'a pas été restreinte et l'acheminement des échantillons avait lieu tous les deux jours.

Les échantillons étaient acheminés au Laboratoire tout en maintenant la chaîne de froid à l'aide d'une glacière isotherme et des pains de glace.

Au laboratoire, les échantillons étaient aliquotés sous une hotte à flux laminaire (niveau de sécurité 2) dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml et conservés à – 80°C en attendant les analyses. Pour chaque échantillon, 3 aliquots ont été réalisés.

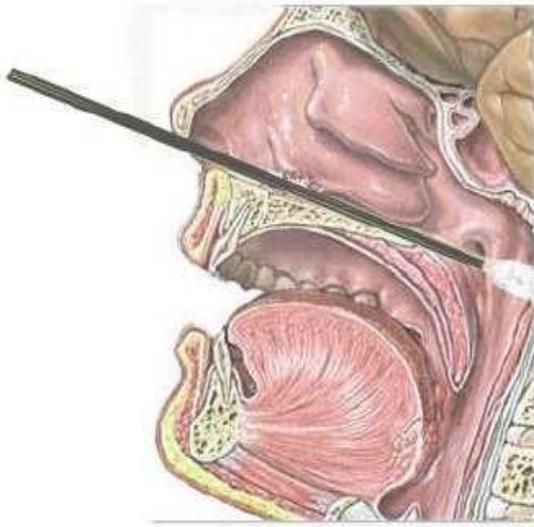


Figure 12. Technique de Prélèvement nasopharyngé



Figure 13. Milieu de prélèvement

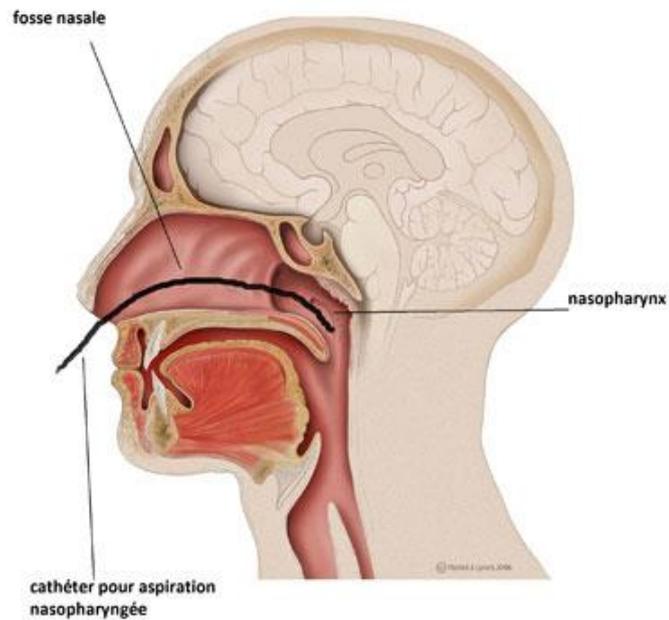


Figure 11 : Technique d'aspiration nasopharyngée (<http://www.sosinf.jpg>)

II. Analyses biologiques

1. Extraction des acides nucléiques

Les acides nucléiques viraux (ARN et ADN viral) ont été extraits dans 140 µL d'échantillon à l'aide du Kit QIAamp Viral RNA Mini (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) suivant les instructions du fabricant (**Annexe 2**). Un éluat de 60 µL d'ARN/ADN a été recueilli dans un tube stérile et utilisé directement pour la recherche des virus influenza. Cette étape a été réalisée au Laboratoire de Virologie du LNR-G à l'IRSS, Bobo-Dioulasso.

2. Détection des virus influenza

Les virus influenza A et B ont été recherchés par la RT-PCR en temps réel à l'aide du Kit CDC Human Influenza Virus Real Time RT-PCR Diagnostic Panel (CDC, Atlanta, États-Unis). La PCR a été réalisée sur un mélange réactionnel dont le volume final était de 25µL. Les différents composants ainsi que leur concentration étaient : 5µL d'ARN extrait, 12,5µL de Invitrogen SuperScript™ One-Step RT-PCR buffer 5x, 0,5µL de Invitrogen One-step RT-PCR Enzyme, 0,5µL de chaque amorce (concentration 10mM), et 5,5µL d'eau moléculaire. L'amplification a été réalisée selon le programme ci-dessous (**Tableau II**). La machine ABI 7500 Fast de Applied Biosystem (Etats-Unis) a été utilisée pour l'amplification et la durée moyenne de cette étape était de 1h 40 min. Sur les échantillons positifs aux virus influenza A et B, une nouvelle RT-PCR en temps réel était effectuée dans le but d'identifier les sous-types du virus Influenza A et le lignage génotypique du virus influenza B. Pour le virus influenza A, les sous types recherchés étaient : A/H1N1 saisonnier, A/H1N1 pandémique/2009 (pdm09), A/H3N2 saisonnier, A/H5N1 et A/H7N9. Pour le virus influenza B, la RT-PCR différenciait les lignées B/Yamagata et B/Victoria. Le volume final du mélange réactionnel sur lequel la PCR a été effectuée était de 25 µL. La composition du mélange était la suivante : 5µL d'ARN extrait, 12,5µL de Invitrogen SuperScript™ One-Step RT-PCR buffer 5x, 0,5µL de Invitrogen One-step RT-PCR Enzyme, 0,5µL de chaque amorce (concentration 10mM) et 5,5µL d'eau moléculaire. Tous les résultats obtenus ont été analysés et interprétés en fonction de l'allure de la courbe et du cycle threshold (Ct). Pour toutes les réactions, des contrôles positifs et négatifs appropriés ont été utilisés afin d'assurer la validité des résultats.

Tableau II: Protocole d'amplification des virus influenza A et B

Etape de la réaction	Température	Durée
Transcription inverse	50°C	30 min
Inactivation de la Transcriptase inverse /Activation de la Taq polymérase	95°C	02 min
PCR amplification (45 cycles)		
Dénaturation	95°C	15 s
Hybridation des amorces	55°C	30 s
Elongation finale	72°C	10 min

3. Détection des autres virus respiratoires et des bactéries atypiques

La présence des autres virus respiratoires et les bactéries atypiques a été recherchée sur les aspirations nasopharyngées provenant des cas d'IRAS et des échantillons provenant des cas de SG sélectionnés aléatoirement. Pour raison budgétaire, une partie des échantillons a été sélectionnée pour la recherche des autres pathogènes respiratoires. Une deuxième extraction des acides nucléiques a été faite au Laboratoire de Virologie de l'IRSS à partir d'un autre aliquot des échantillons originaux. Les extraits ont été conservés au congélateur – 80°C avant d'être acheminés à l'Infectious Diseases Research Unit du Luxembourg Institute of Health (LIH) où la recherche des virus respiratoires et des bactéries atypiques a été réalisée.

Détection des virus respiratoires

Au total 14 virus ont été détectés par la RT-PCR conventionnelle multiplex. Cette méthode, préalablement décrite par Buecher et *al.* (2010) permet de détecter plusieurs virus dans un seul mélange réactionnel. Cinq (05) PCR multiplex ont été utilisées et ont permis la détection des virus suivants : Multiplex 1: RSV, HMPV ; Multiplex 2: PIV1, PIV2, PIV3, PIV4; Multiplex 3 : HRV, Influenza C ; Multiplex 4: HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-E229 ; Multiplex 5 : AdV, BoV.

Pour les multiplex 1 à 4, la réaction se faisait en une seule étape (One-step) combinant la phase de Reverse Transcriptase et d'amplification à l'aide du kit One-step RT-PCR de Qiagen. Pour

ces 4 PCRs, le volume final du mélange réactionnel était de 30 µL et comprenait : 3µL d'ARN extrait, 6 µL de Qiagen One-Step RT-PCR buffer 5x, 1,2 µL de 10 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTP), 1 µL de Qiagen One-step RT-PCR Enzyme mix, 1,44 µL de chaque amorce (concentration 10mM, Eurogentec, Belgique), 3,6 µL de Qiagen One-Step RT-PCR kit Q solution, 0,3 µL de RNase out (Life Technologies) et de l'eau moléculaire pour compléter le volume du mélange réactionnel à 30 µl.

En ce qui concerne la Multiplex 5, l'étape de RT était inexistante car utilisée pour la détection des virus à ADN (AdV, BoV). Le volume final du mélange réactionnel était de 25 µL et se composait comme suit : 2,5 µL d'ADN extrait, 2,5 µL de PCR Buffer 10x, 0,5 µL de dNTP (Life Technologies), 1,25 µL de MgCl₂ (concentration 50 mM, Life Technologies), 1 µL de chaque amorce (concentration 10 mM), 0,5 µL de Taq DNA polymérase (concentration 0,1U/µL, Life Technologies).

Par rapport à toutes les PCR multiplex, l'amplification a été réalisée sur des thermocycler Eppendorf. Pour chaque réaction, des contrôles positifs et négatifs ont été utilisés. La composition de chaque mélange réactionnel, les protocoles d'amplifications ainsi que les amorces utilisées sont décrites en annexe (Annexe 3).

Les produits d'amplification de chaque PCR multiplex ont été analysés après une électrophorèse sur gel d'agarose (1,5%) suivie de la lecture du gel sous une lumière ultraviolette (UV) après coloration au Syber safe® (Life Technologies).

Détection des bactéries atypiques

Les échantillons ont également été utilisés pour la recherche des bactéries atypiques que sont *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae*. Ces bactéries ont été détectées par des techniques de PCR en temps réel précédemment décrites par Tondella et *al.* 2002 et Winchell et *al.* 2008. Le volume final du mélange sur lequel la PCR a été réalisée était de 25 µL. Pour *M. pneumoniae*, le mélange était composé de : 6,0 µL d'eau moléculaire, 12,5 µL de Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,70 µL de chaque amorce, 0,10 µL de la sonde et 5 µL d'ADN extrait. Pour *C. pneumoniae*, on avait : 6,9 µL d'eau moléculaire, 12,5 µL de Taqman Universal PCR Master Mix, 0,25 µL de chaque amorce, 0,125 µL de sonde et aussi 5 µL d'ADN extrait. L'amplification a été réalisée sur des thermocycleurs en temps réel CFX 96 Touch™, Biorad. La composition de chaque mélange réactionnel ainsi que les protocoles d'amplification sont décrits en annexe (**Annexe 4**).

4. Caractérisation moléculaire des virus influenza A, VRS et HRV

Afin de déterminer le type de génotype qui circule au Burkina Faso, trois virus ont été séquencés. Il s'agit du virus influenza A, du VRS et du HRV. Ces virus ont été choisis sur la base de leur prévalence élevée chez les enfants atteints de SG ou d'IRAS.

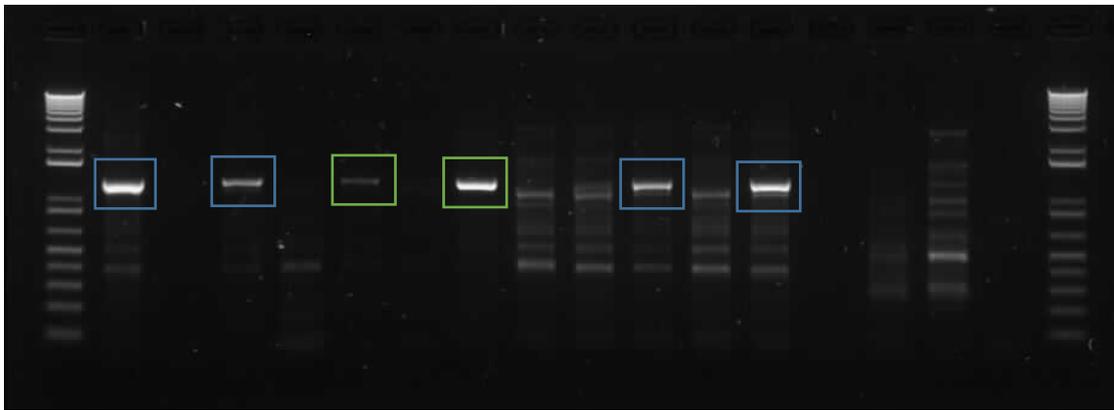
La caractérisation moléculaire du virus influenza A a consisté au séquençage complet du gène de l'hémagglutinine (HA) suivi de l'analyse phylogénétique. Elle a porté sur les échantillons avec une charge virale jugée suffisante pour l'obtention de séquences de qualité, soit les échantillons positifs ayant un $Ct \leq 30$. Une transcription inverse (RT) utilisant une amorce spécifique du virus influenza A a dans un premier temps été réalisée pour la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène complet HA des virus influenza A/H1N1 pdm09 et A/H3N2 saisonnier (Hoffmann et *al.* 2001). L'ADNc obtenu a été dilué au 1/5ème puis amplifié en utilisant une PCR conventionnelle nichée. La composition des mélanges réactionnels, les protocoles d'amplifications ainsi que les amorces utilisées au cours de la RT et de la PCR nichée sont décrites en annexe (**Annexe 5**). Le protocole de purification des amplicons est également décrit en annexe (**Annexe 6**).

La caractérisation moléculaire du VRS a consisté à l'amplification et au séquençage du gène G. L'amplification du gène G a été effectuée en utilisant une PCR nichée précédemment décrite par Agoti et *al.* 2012. La composition des mélanges réactionnels, les protocoles d'amplification ainsi que les amorces utilisées sont décrites en annexe (**Annexe 7**).

Pour la caractérisation moléculaire du HRV, les produits de la PCR de détection amplifiant le gène VP4/VP2/5'NC ont directement été purifiés sur colonne (JetQuick PCR purification spin kit) avant d'être séquencés.

Tous les amplicons ont été visualisés sur gel d'agarose (1,5%) sous une lumière ultraviolette (UV) après coloration au Syber safe® (Life Technologies) (**Figure 15**). Les amplicons spécifiques ont été purifiés à l'aide du kit de purification sur colonne JetQuick PCR purification spin kit (Genomed, Loehne, Germany). Les amplicons pour lesquels d'autres fragments d'ADN non spécifiques étaient présents ont été déposés sur gels, les bandes spécifiques extraites et purifiées avec le kit QIAquick gel extraction (Qiagen). Le séquençage des extraits purifiés a été réalisé sur le Séquenceur ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystem) à l'aide du kit Big Dye Terminator version 3.1 (Life Technologies) (**Figure 16**). Les mêmes amorces ont été utilisées pour l'amplification et pour la réaction de séquençage (Protocole de séquençage en annexe).

Les séquences des souches influenza A obtenues ont été soumises à GISAID sous les identifiants suivants : EPI1020018-EPI1020021, EPI1020030, EPI1020039, EPI1020048-EPI1020063, EPI1020088-EPI1020108. Les séquences des souches influenza H1 et H3 ont été alignées avec des séquences de référence définies par le Centre collaborateur OMS de référence et de recherche sur la grippe, à Londres, ainsi que des souches représentatives des clades d'intérêt. Toutes les séquences ont été extraites de la base de données GISAID (<http://www.gisaid.org>). Celles du VRS et du HRV ont été alignées avec d'autres séquences extraites de GenBank représentant les géotypes de ces virus respectifs. Les analyses phylogénétiques ont été réalisées avec le logiciel MEGA6 en utilisant le meilleur modèle de substitution pour chaque alignement.



Extraction sur gel

Extraction sur colonne

Figure 15: Exemple d'une Photo d'un gel d'électrophorèse d'amplicons destinés à être séquencés et sélection de la méthode de purification.



Figure 126: Séquenceur ABI PRISM 3130 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystem)

III. Analyses statistiques

Virus influenza

Les analyses statistiques (test de Chi-carré, test de Mann-Whitney et le z test pour de faibles proportions) ont été effectuées à l'aide de SigmaPlot version 12.0 (San Jose, CA, USA). Les valeurs de $p \leq 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

L'activité grippale a été mesurée comme la proportion de cas positifs par mois. Les périodes d'activité accrue ont été définies comme des périodes d'au moins deux mois avec une activité grippale dépassant la proportion médiane annuelle des cas positifs, séparés par au moins un mois avec une activité grippale inférieure à la proportion médiane annuelle (approche CDC10). Les données de surveillance de la grippe du Burkina Faso ont été extraites de la base de données FluNet (http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/en/) en nombre hebdomadaire et agrégées par mois (années 2011-2013, 2016). Étant donné que certains des résultats obtenus à partir de 2014 générés par cette étude ont été soumis à FluNet alors que les données FluNet de 2015 sont à peine existantes, les tendances pour 2014 et 2015 ont été évaluées en fonction des données générées dans cette étude. Pour 2014-2015, les pics saisonniers de la transmission de la grippe ont été définis comme la semaine avec le plus grand nombre de cas grippaux positifs pendant la période d'activité accrue.

Autres virus respiratoires et bactéries atypiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel STATA SE version 14.0 (Texas, USA). Les proportions ont été comparées à l'aide des tests exacts du Chi-carré et de Fisher pour les variables catégorielles. La régression logistique a été utilisée pour déterminer les associations entre les virus et les caractéristiques sociodémographiques et cliniques des sujets. La signification statistique a été définie comme $p \leq 0,05$.

IV. Considérations éthiques

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique du Centre Muraz (N/Réf. 17-2013/CE-CM du 20/06/2013) avant sa mise en œuvre (**Annexe 8**). Elle a été exécutée dans le strict respect des bonnes pratiques de recherche clinique et biologique en accord avec la déclaration d'Helsinki. Les échantillons collectés étaient bien étiquetés (numéro d'identification, date et site de prélèvement) et l'identité des patients était gardée en toute confidentialité. L'accès aux données était réservé uniquement aux investigateurs de l'étude. Les patients n'ont été inclus dans l'étude qu'après avoir obtenu le consentement éclairé de participation soit d'un des parents, soit du représentant légal de l'enfant. Les résultats des tests ont été remis aux responsables des services cliniques dès que disponibles. Une fiche d'information était disponible pour tous les participants. Au cas où un patient devait se déplacer pour un complément d'information dans le cadre des besoins de l'étude (exemple : convocation par les investigateurs de l'étude), ses frais de transport étaient intégralement remboursés.

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

Chapitre 1 : Revue systématique de la littérature sur les étiologies des infections respiratoires en Afrique Sub-saharienne

Ces résultats ont fait l'objet d'un article, "**Systematic Review of Articles on Etiologies of Acute Respiratory Infections in Children Aged Less Than Five Years in Sub-Saharan Africa, 2000-2015**" publié dans le journal EC Microbiology 3.6 (2016) :556-576.

Ci-dessous, sont présentés les résultats de la revue systématique de la littérature sur les étiologies des infections respiratoires en Afrique Sub-saharienne avant la mise en œuvre de la surveillance. Cet exercice nous a permis d'identifier les lacunes de connaissance dans le domaine et de justifier la nécessité de la mise en œuvre de cette étude.

Revue de la littérature

Au total, 1781 articles, ont été identifiés dans les différentes bases de données. Après vérification des titres et résumés, 1706 articles n'ont pas été retenus. L'évaluation complète de l'article a donc concerné les 75 articles restants ainsi que 3 articles supplémentaires identifiés dans les listes de références des 75 articles précédents. A l'issue de cette étape, 49 autres articles ont été exclus car ne respectant pas les critères d'inclusion, laissant ainsi 29 articles pour la revue finale.

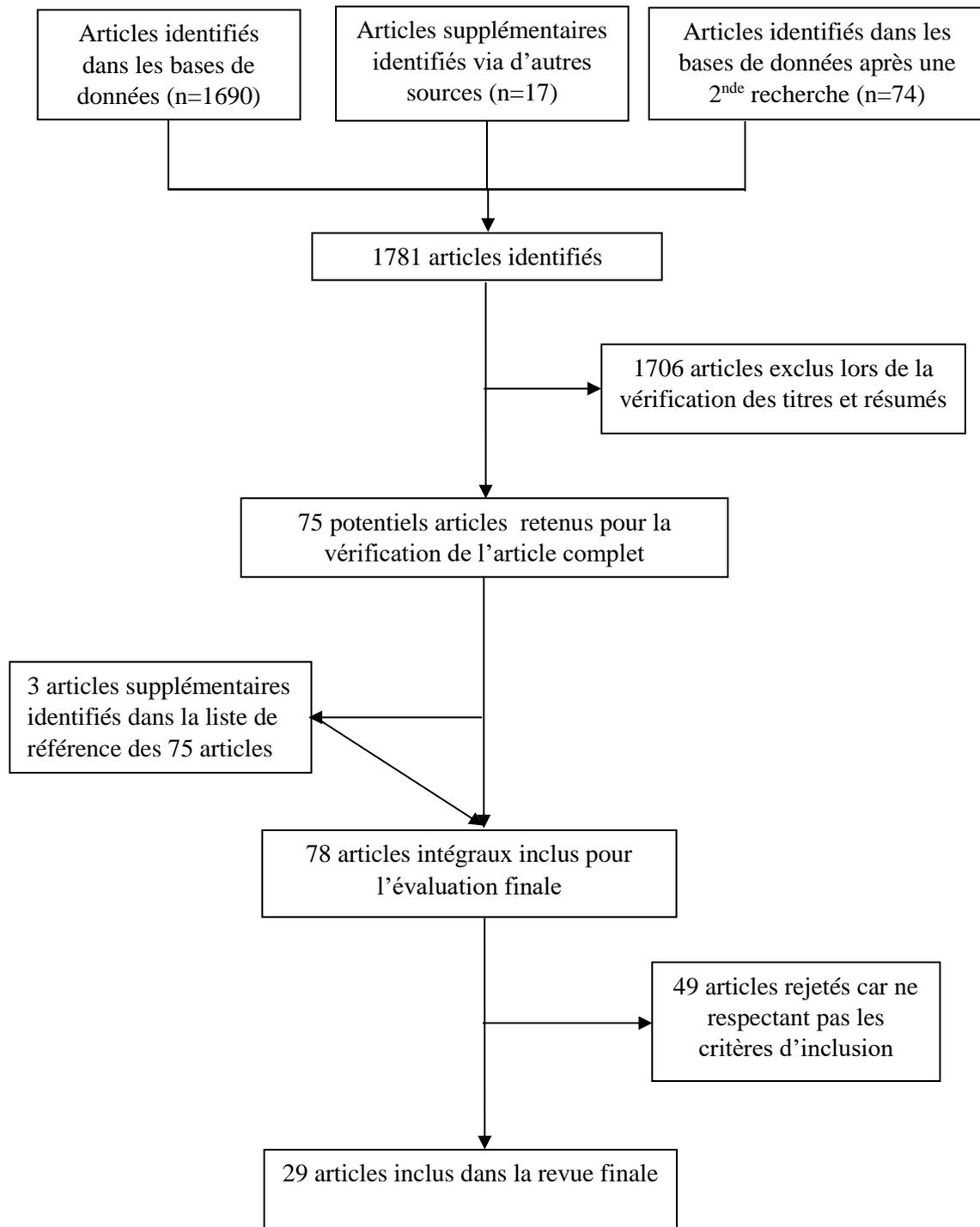


Figure 137 : Schémas de la procédure d'inclusion des articles

Caractéristiques des articles

Au total, 29 articles ont été inclus dans cette revue. La taille d'échantillon des études variait de 23 à 8 723 patients. Les études ont été réalisées dans 13 pays d'Afrique Sub-Saharienne : 8 en Afrique du Sud, 5 au Kenya, 3 au Mozambique, 2 en Gambie, Ghana et Ouganda, et 1 au Burkina Faso, Botswana, Cameroun, Gabon, Nigéria, Sénégal et Tanzanie (**Figure 12**). On dénombrait 24 (82,7%) études transversales et 5 (17,3%) études cas-témoins. Les prélèvements respiratoires étaient les plus utilisés pour la détection des agents pathogènes et comprenaient soit un écouvillonnage nasal, soit un écouvillonnage oropharyngé, soit un écouvillonnage nasopharyngé, soit une aspiration nasopharyngée, soit une aspiration trachéale ou un lavage broncho-alvéolaire. La PCR était la technique la plus utilisée pour la détection des virus respiratoires. Quant aux bactéries, elles étaient principalement détectées par la culture. Les caractéristiques des articles inclus dans la revue sont resumées dans le **Tableau III**.

Tableau III: Caractéristiques des articles inclus dans la revue

	Design	Age	Taille d'échantillon	Cas clinique	Echantillons analysés	Méthodes diagnostiques	Pathogènes détectés
<u>Afrique Centrale</u>							
Franceville – Oyem – Koulamoutou , Gabon, 2010 – 2011 (Sonia EL and al.)	Etude transversale	0 – 4 ans	810	SG	Ecouvillonnage nasal	RT-PCR multiplex en temps réel	AdV (17, 5%); EV (14, 7%); RSV (13, 5%); AH1N1 pdm09 (6,8%); PIV3 (7,2%); Inf. B (5, 1%); HCoV-OC43 (4, 1%); PIV1 (3,6%); PIV4 (3, 2%); PIV2 (2, 8%); HMPV (1, 8%); HCoV-NL63 (1, 5%); HCoV-HKU1 (1, 2%); HCoV-229E (0, 7%); HPeV (0, 6%);
Yaounde – Douala- Fouban- Bfoussam- Bandjoun- Garoua, Cameroon; 2009 (Njouom R and al.)	Etude transversale	0 – 4 ans	250	SG	Ecouvillonnage nasal et/ou nasopharyngé	RT-PCR multiplex	HRV (25,6%); Influenza A (18,4%); PIV (12,0%); RSV (10,4%).
<u>Afrique de l'Est</u>							
Kilimanjoaro CMC, Tanzania; urban; 2003 (Uriyo J and al.)	Etude transversale	2 – 60 mois	72	Pneumonie sévère	Expectorant	PCR – Culture	<i>S. pneumoniae</i> (63,9%); <i>P. jiroveci</i> (2,8%); <i>M. tuberculosis</i> 1/72 (1,4%)
Nairobi, Kenya; urban; 2002 – 2003 (Bii CC and al.)	Etude transversale	≤ 23 mois	60	Pneumonie sévère	Expectorant	IF – Culture	<i>P. jirovecii</i> 13%; <i>K. pneumoniae</i> 43%; <i>S. aureus</i> 13%; <i>E. coli</i> 18%; <i>P. aeruginosa</i> 3%; <i>H. influenzae</i> 3%; <i>S. pneumoniae</i> 5%. <i>C. albicans</i> 45%; <i>C. tropicalis</i> 7%; <i>C. glabrata</i> 5%.
Mulago Hospital, Kampala, Uganda; urban; 2001 (Sabrina BK and al.)	Etude transversale	2 – 60 mois	121	Pneumonie sévère	Expectorant	IF	<i>P. carinii</i> (16,5%)
Kenyatta National Hospital, Nairobi, Kenya; urban; 2000	Etude transversale	7 – 30 jours	50	Pneumonie	Aspiration nasopharyngée	Enzyme Immunoassay (EIA)	<i>C. pneumonia</i> (51%)

(Were FN and al.)							
Mbagathi District Hospital, Nairobi, Kenya; urban; 2002 (Bii CC and al.)	Etude transversale	≤ 59 mois		Pneumonie	Aspiration nasopharyngée	RT – PCR, Culture	<i>M. pneumoniae</i> 33,7%; <i>S. pneumoniae</i> 26%; <i>K. pneumoniae</i> (1%); <i>S. aureus</i> 3%; <i>E. coli</i> 2%; PIV 5%; <i>Salmonella</i> 1%; AdV 4%; RSV 22%; <i>Candida spp</i> 13%.
Mulago Hospital, Kampala, Uganda; urban; 2005 – 2006 (Nantanda R and al.)	Etude transversale	2 – 59 mois	157	Pneumonie sévère	Sang - Expectorat	Culture	<i>S. aureus</i> 42,9%; <i>S. pneumoniae</i> 33,3%; <i>H. influenzae</i> 9,5%; <i>Klebsiella spp</i> 9,5%; <i>S. enteridis</i> 4,8%.
Lwak Hospital, Nyanza, Kenya; rural; 2007 – 2010 (Daniel RF and al.)	Etude cas-témoin	≤ 59 mois	2973	SARI	Sang – Ecouvillonnage nasopharyngé et oropharyngé	RT-PCR en temps réel - Culture	Influenza A 6,6%; Influenza B 1,2%; RSV 22%; AdV 16%; PIV1 1,0%; PIV2 3,2%; PIV3 6,1%; HMPV 5,1%; RV/EV 50%; Parechovirus 1,5%; <i>M. pneumoniae</i> 1,5%; <i>S. pneumoniae</i> 0,7%; <i>H. influenzae</i> 0,1%; <i>Non typhi salmonella</i> 1,9%.
Kilifi District, Kenya; rural; 2010 (Hammit LL and al.)	Etude cas-témoins	1 – 59 mois	810	Pneumonie sévère – Pneumonie très sévère	Sang – Expectorat - Ecouvillonnage nasopharyngé et oropharyngé	RT-PCR multiplex en temps réel, Culture, ELISA	RSV 26,5%; AdV 4,8%; RV 22,9%; PIV1 1,1%; PIV2 0,6%; PIV3 5,8%; PIV4 1,4%; Influenza A 0,9%; Influenza B 0,3%; Influenza C 0,4%; HCoV-229E 2,1%; HCoV-OC43 2,7%; HCoV-NL63 0,5%; HMPV 3,1%; <i>M. pneumoniae</i> 0,4%;
<u>Afrique Australe</u>							
Cape Town, South Africa; urban; 1995 – 1996 (Hussey GD and al.)	Etude transversale	≤ 2 ans	1288	IRAS	Aspiration nasopharyngée	EIA, Culture virale	RSV IAE 16,4%; Viral culture: RSV 11,7%; AdV 3,7%; PIV3 2,5%; Influenza B 0,6%
Soweto, South Africa; urban; 1997 – 1999 (Madhi S and al)	Etude transversale	≤ 59 mois	142	IRAS	Aspiration nasopharyngée	IF	PIV1 22,6%; PIV 3 75,8%

Pretoria, South Africa; urban; 1994 – 1995 (Delpont SD and al.)	Etude transversale	≤ 59 mois	23	Pneumonie sévère	Sang – Aspiration trachéale et nasopharyngée	Culture, IF	RSV 20,4%; <i>K. pneumoniae</i> 21,73%
CWM Children’s Hospital, Cape Town, South Africa; urban; 2003 – 2004 (Heidi S.)	Etude transversale	13 jours - 5 ans	1055	IRAS	Aspiration trachéale – Lavage bronchoalvéolaire	Culture virale – IF - RT-PCR	CMV 15, 0%; AdV 6,2%; RSV 4%; PIV3 3,0%; Influenza A 0,76%; PIV1 0,57%; PIV2 0,38%; Influenza B 0,09%; HCoV-NL 63 0,85%.
CWM Children’s Hospital, Cape Town, South Africa; urban; 1998 (Zar HJ and al.)	Etude transversale	2 – 23 mois	151	Pneumonie	Sang – Expectorat – Bronchoalvéolaire – Aspiration nasopharyngée – Lavage gastrique	Culture, IF	<i>P. carinii</i> 9,9%; <i>S. aureus</i> 15,0%; <i>K. pneumoniae</i> 10,9%; <i>H. influenzae</i> 8,8%; <i>P. aeruginosa</i> 8,2%; <i>M. tuberculosis</i> 7,4%; <i>M. catarrhalis</i> 2,7%; <i>S. pneumoniae</i> 1,4%; CMV 14,3%
Manhiça District Hospital, Mozambique; 1999 – 2000 (Cristina O’CG and al., 2011)	Etude transversale	≤ 12 mois	333	ARI	Aspiration nasopharyngée	RT-PCR multiplex	RV 26%; Influenza A 12,31%; Influenza B 3,0%; AdV 14%; HMPV 7%; PIV1 0,6%; PIV2 1,2%; PIV3 2,7%; PIV4 0,3%; EV 3%.
Manhiça District Hospital, Mozambique; 2006 – 2007 (Cristina O’CG and al., 2011)	Etude transversale	≤ 59 mois	807	Pneumonie	Sang – Aspiration nasopharyngée	RT-PCR multiplex, Culture	HRV 41%; AdV 21%; RSV 11%; HMPV 8%; Influenza A 4,4%; Influenza B 3,8%; PIV1 0,6%; PIV2 2,10%; PIV3 1,5%; PIV4 2,3%; EV 4%. <i>S. pneumoniae</i> 29%; <i>S. aureus</i> 11%; <i>H. influenzae b</i> 29%.
Pretoria, South Africa; urban; 2006 – 2007 (Marietjie V and al.)	Etude cas-témoin	≤ 59 mois	610	ARI	Aspiration nasopharyngée	RT-PCR multiplex en temps réel, RT-PCR nichée, IF	RSV 30,1%; PIV1 1,0%; PIV2 1,2%; PIV3 7,8%; Influenza A 3,4%; Influenza B 1,6%; AdV 5,7%; CMV 0,3%; HMPV 4,8%;

South Africa; urban, semi-urban and rural; 2009 – 2010 (Cherly C and al.)	Etude transversale	≤ 59 mois	8723	IRAS	Sang – Aspiration nasopharyngée	RT-PCR	<p>HCoV-NL63 2,1%; HCoV-OC43 1,8%; HCoV-229E 0,3%; HCoV-HKU1 0,2%; RV 33,0%; WU 6, 8%; KI 1,0%.</p> <p>HRV 37%; RSV 26%; AdV 26%; EV 10%; Influenza 7%; HMPV 6%; PIV1 2%; PIV2 1,3%; PIV3 6%, <i>S. pneumoniae</i> 4%</p>
--	--------------------	-----------	------	------	---------------------------------------	--------	---

Afrique de l'Ouest							
Ouagadougou, Burkina Faso; 2010 – 2011 (Ouédraogo S and al.)	Etude transversale	0 – 3 ans	209	IRAS	Aspiration nasopharyngée	IF, Culture, RT-PCR multiplex	AdV 1%; Influenza A 3,8%; PIV2; 0,5%; RSV 9,1%; HMPV 0,5%; EV 12,4%; HRV 35,4%. <i>S. aureus</i> 42, 4%; <i>K. pneumonia</i> 30, 3%; <i>S. pneumoniae</i> 27,7%.
Agogo, Ghana; rural; 2007 – 2009 (Norbert G and al.)	Etude transversale	2 – 60 mois	948	Pneumonie	Sang	Culture	<i>S. typhi</i> 2,3%; <i>S. pneumoniae</i> 4,6%; <i>S. aureus</i> 2,9%; <i>Klebsiella spp</i> 1,2%;
Gambia; rural and urban; 2007 – 2009 (Stephen RC and al.)	Etude transversale	2 – 59 mois	55	Pneumonie sévère	Liquide pleural	RT-PCR, Culture	<i>S. pneumoniae</i> 91%; <i>H. influenzae</i> 23%; <i>S. aureus</i> 6%; <i>K. ssp</i> 4%; BoV 4%; RSV 4%; AdV 4%; EV B 2%; HCoV HKU1 2%; Influenza C 2%; CMV 2%.
Komfo Anokye Hospital, Ghana; 2008 (Kwofie T and al.)	Etude transversale	≤ 59 mois	128	IRAS	Ecouvillonnage nasal – Sang	RT-PCR en temps réel, Culture	RSV 14.1%; AdV 10%; PIV 7, 8%; Influenza B 0, 8%. <i>S. aureus</i> 7, 8%; <i>K. species</i> 1, 5%.
Dielmo-Ndiop, Senegal; 2007 (Mbayame NN and al.)	Etude transversale	≤ 59 mois	82	ARI	Ecouvillonnage nasopharyngé	Multiplex RT-PCR, Viral culture	Influenza A 29,1%; Influenza B 12,7%; Influenza C 3,7%; RSV 23,6%; PIV 3,5%; HCoV 229E 3,7%; HCoV NL63 7,2%; RV 14,6%; BoV 1, 8%.
MRC Hospital, Faraja, Gambia; 2005 (Martin WW and al.)	Etude cas-témoin	≤ 59 mois	649	IRAS	Aspiration nasopharyngée	RT-PCR, Immunofluoresce, viral culture	<i>C. pneumoniae</i> 9.24%, RSV 8.47%, PIV 6.47%, Influenza A 8%, Influenza B 3.7%, AdV 9.9%
University College Hospital, Ibadan, Nigeria; (Johnson AW and al.)	Etude transversale	≤ 59 mois	419	Pneumonie	Sang	IF, Culture	<i>S. aureus</i> 37,3%; <i>Klebsiella species</i> 15,3%; <i>S. pneumoniae</i> 5,1%; RSV 30,4%; PIV3 19,5%; Influenza A 17,3%.

Pathogènes détectés

Vingt-trois (23) et 19 études ont rapporté respectivement des données sur la prévalence des virus et des bactéries/parasites. Ces prévalences varient d'une étude à une autre et sont résumées dans le tableau ci-dessous (**Tableau IV**).

Tableau IV: Prévalences virale, bactérienne et parasitaire rapportées dans les études incluses dans la revue systématique de la littérature.

Pathogènes	Intervalle de prévalence (%)	Nombre d'étude
Virus		
VRS	(4,0 – 35,0)	20
PIV1	(0,6 – 22,6)	20
PIV2	(0,4 – 3,2)	
PIV3	(1,5 – 75,8)	
PIV4	(0,3 – 3,2)	
Virus Influenza (A et B)	(0,8 – 29,1)	19
AdV	(1,0 – 26,0)	16
HRV	(9,5 – 41,0)	13
HMPV	(0,5 – 11,0)	11
EV	(2,2 – 14,7)	8
HCoV	(0,3 – 3,7)	7
HBoV	(1,8 – 11,2)	3
CMV	(14,3 – 15,0)	2
Bactérie/Parasites		
<i>S. pneumoniae</i>	(0,7 – 91,0)	13
<i>S. aureus</i>	(0,9 – 42,9)	11
<i>Klebsiella spp</i>	(1,0 – 42,9)	10
<i>H. influenzae</i>	(0,1 – 29,0)	7
<i>P. jiroveci</i>	(9,9 – 16,5)	5
<i>Salmonella spp</i>	(0,8 – 9,2)	5
<i>C. pneumoniae</i>	(9,4 – 51,0)	2
<i>Candida spp</i>	(13,0 – 45,0)	2
<i>P. aeruginosa</i>	(3,0 – 8,2)	2
<i>M. tuberculosis</i>	(1,4 – 7,4)	2
<i>E.coli</i>	(2 – 18)	2

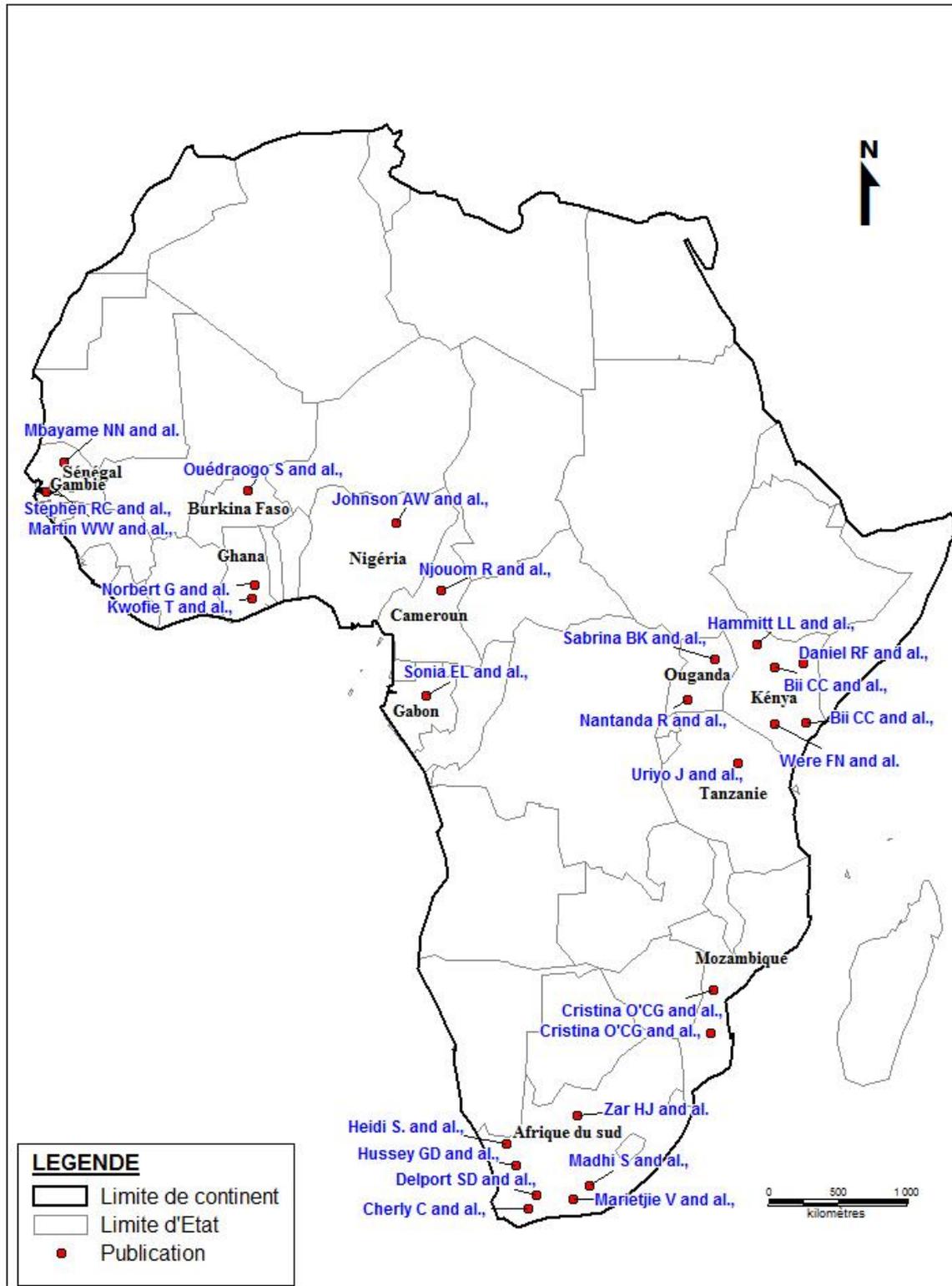


Figure 148 : Localisation des 26 études incluses

Chapitre 2 : Virus influenza chez les enfants de moins de 5 ans au Burkina Faso : Epidémiologie et caractéristiques génétiques

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un article, Article 2 "**Epidemiology and molecular characterization of influenza viruses in Burkina Faso, Sub-Saharan Africa**" publié dans la revue *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2018 Jan 19. doi: 10.1111/irv.12539.

Le Burkina Faso a établi une surveillance sentinelle des SG à travers son laboratoire nationale de référence pour les gripes (LNR-G) en 2010. La mise en place de cette surveillance fait suite à la grippe pandémique (A/H1N1 pdm09) de 2009. Les résultats préliminaires de cette surveillance rapportés par Tarnagda et *al.* 2014, montraient une prévalence de 6,6% pour les virus influenza A et B dans la population générale. A notre connaissance, seule une étude au Burkina Faso s'est intéressée à l'épidémiologie des virus influenza chez les enfants de moins de 5 ans (Ouédraogo et *al.* 2014) qui constituent un groupe vulnérable. En outre, aucune étude n'a rapporté des données sur les caractéristiques génétiques des virus influenza circulant au Burkina. Aussi, leur saisonnalité n'est pas clairement établie dans nos pays d'où la difficulté de mettre en place des mesures préventives efficaces.

Pour combler ce manque d'informations, une surveillance sentinelle des SG et des IRAS chez les enfants de moins de 5 ans a été conduite dans six (06) formations sanitaires du Burkina Faso de Janvier 2014 à Décembre 2015.

Caractéristiques sociodémographiques

Au total 924 enfants dont 743 (80,4%) atteints de SG et 181 d'IRAS (19,6%) ont été enrôlés au cours de cette surveillance. Parmi eux, 518 (56,1%) étaient de sexe masculin et plus de la moitié (50,1%) avait un âge ≤ 1 ans. L'âge moyen des patients était de 17,8 mois. La répartition des patients par tranche d'âge se présentait comme suit : 0-6 mois : 236 (25,5%) patients ; 7-24 mois : 488 (52,8%) ; 24-60 mois : 200 (21,6%).

Presque tous les patients (8/924, 92,5%) ont reçu un traitement antibiotique. Les antibiotiques principalement administrés étaient les β -lactames et les sulfamides. Tous les cas d'IRAS positifs aux virus influenza ont reçu une antibiothérapie. Les caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude sont résumées dans le **Tableau V**.

Tableau II: Caractéristiques démographiques des patients de l'étude, 2014 – 2015.

Variable	Patients SG n = 743	Patients IRAS n = 181	Total N = 924
Sexe			
Masculin	406	112	518
Féminin	337	69	406
Tranche d'âge (en mois)			
0-6	171	65	236
7-24	400	88	488
25-60	172	28	200
Formation sanitaire (FS)			
Accart-ville ^a	221	-	221
Colsama ^a	267	-	267
Do ^a	65	-	65
Leila ^a	78	-	78
CHUSS ^a	-	151	151
Bogodogo ^b	112	30	142
Antibiothérapie	706	158	864

^a FS située à Bobo-Dioulasso

^b FS située à Ouagadougou

Prévalence virale et facteurs associés

Les virus influenza A et B ont été détectés chez 13,1% (124/924) des patients avec une prédominance du virus influenza A (81/124 ; 65,3%). Le sous-typage de ce virus a montré la circulation de 2 sous-types durant la période de surveillance. Ce sont : A/H3N2 saisonnier (56/81 ; 69,1%) et le A/H1N1 pdm09 (25/81 ; 30,9%). Quant au virus influenza B, le lignage a mis en évidence le B/Victoria (15/43 ; 34,9%) et le B/Yamagata (14/43 ; 32,6%). Aucun cas de coinfection entre les virus influenza A et B n'a été détecté (**Tableau VI**).

Les virus influenza A et B étaient majoritairement détectés chez les enfants avec un SG (112/743 ; 15,1%) que chez ceux souffrant d'IRAS (12/181 ; 6,6%). Chez les enfants souffrant de SG, le taux de détection des virus influenza augmentait avec l'âge (**Figure 17**). En effet, les enfants de 0-6 mois (7/171 ; 4,1%) étaient significativement moins infectés que ceux de 7-24 mois (55/400, 13,8%, $p=0,001$) et ceux de 25-60 mois (50/172 ; 29,1%, $p<0,001$). Cette association n'a pu être faite chez les enfants souffrant d'IRAS à cause du faible nombre de positifs.

Tableau III: Types and sous-types de virus influenza détectés dans la population d'étude, 2014-2015.

Influenza (sous)type	SG	SG	IRAS	Total (%)
	2014	2015	2015	
Influenza A	56	18	7	81 (65.3)
A/H1N1pdm09	13	10	2	25 (30.9)
A/H3N2	43	8	5	56 (69.1)
Influenza B	27	11	5	43 (34.7)
B/Victoria	15	0	0	15 (34.9)
B/Yamagata	2	8	4	14 (32.6)
B/non typé	10	3	1	14 (32.6)
Total	83	29	12	124

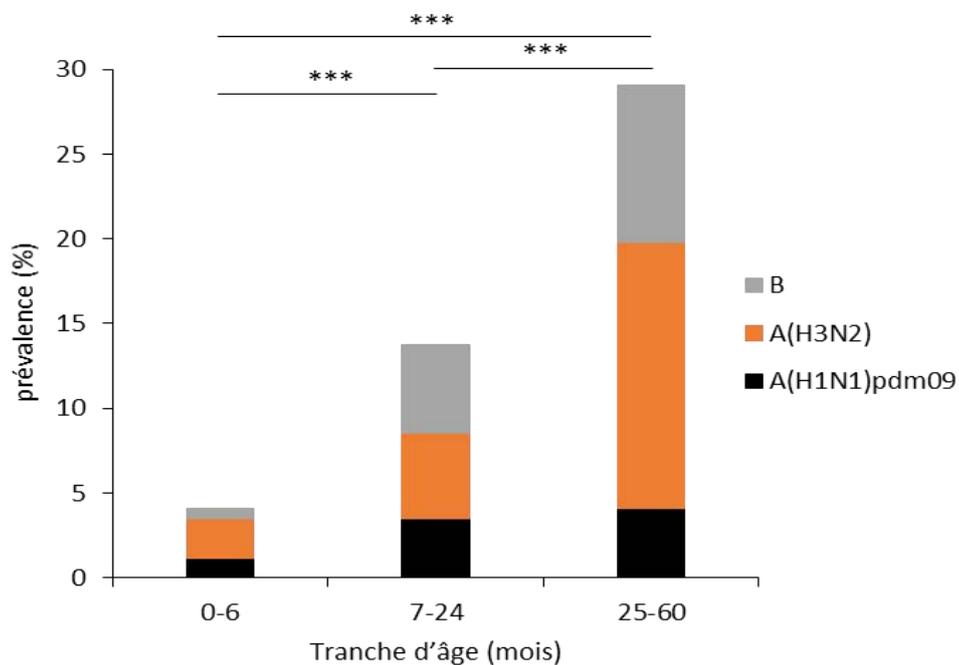


Figure 15: Prévalence des types et sous-types des virus influenza par tranche d'âge chez les enfants atteints de SG.

Caractéristiques génétiques

L'étude des caractéristiques génétiques des virus influenza a porté sur les sous-types du virus influenza A : A/H3N2, A/H1N1 pdm09. L'analyse phylogénique a concerné 14 séquences de A/H1N1 pdm09 et 29 séquences de A/H3N2. Les séquences obtenues ont été alignées et comparées avec les séquences de référence définies par le WHO Collaborative Center for Reference on Influenza de Londres ainsi que les séquences des souches vaccinales.

Les sous-types détectés chez les patients atteints d'IRAS correspondaient à ceux trouvés chez les patients atteints de SG pendant la même période.

A/H1N1 pdm09 : L'analyse des séquences du gène HA (1701 bp) du virus A/H1N1 pdm09 a montré que les souches du Burkina Faso sont classées en deux clades : clade 6B et clade 6C. (**Figure 20**). Les virus influenza A/H1N1 pdm09 qui ont circulé en 2014 au Burkina Faso, appartenaient majoritairement au clade 6C (A/Burkina-Faso/CL35/2014, A/Burkina-Faso/CMADO20/2014, A/Burkina Faso/DO1431/2014, A/Burkina Faso/CL17/2014, A/Burkina Faso/CL50/2014). Un appartenait au clade 6B (A/Burkina Faso/DO1464/2014). En 2015, tous les virus A/H1N1 pdm09 identifiés étaient classés parmi le clade 6B (A/Burkina Faso/CMA3003/2015, A/Burkina Faso/CHU55/2015, A/Burkina Faso/AV189/2015, A/Burkina Faso/CHU60/2015, A/Burkina Faso/DO1581/2015, A/Burkina Faso/CMA3010/2015, A/Burkina Faso/AV185/2015, A/Burkina Faso/AV181/2015). Aucun des virus identifiés durant ces deux années de surveillance n'appartenait aux sous-clades 6B.1 et 6B.2. De plus, toutes les souches du virus A/H1N1 pdm09 identifiées étaient similaires à la souche vaccinale A/California/07/2009 incluse dans la composition du vaccin antigrippal.

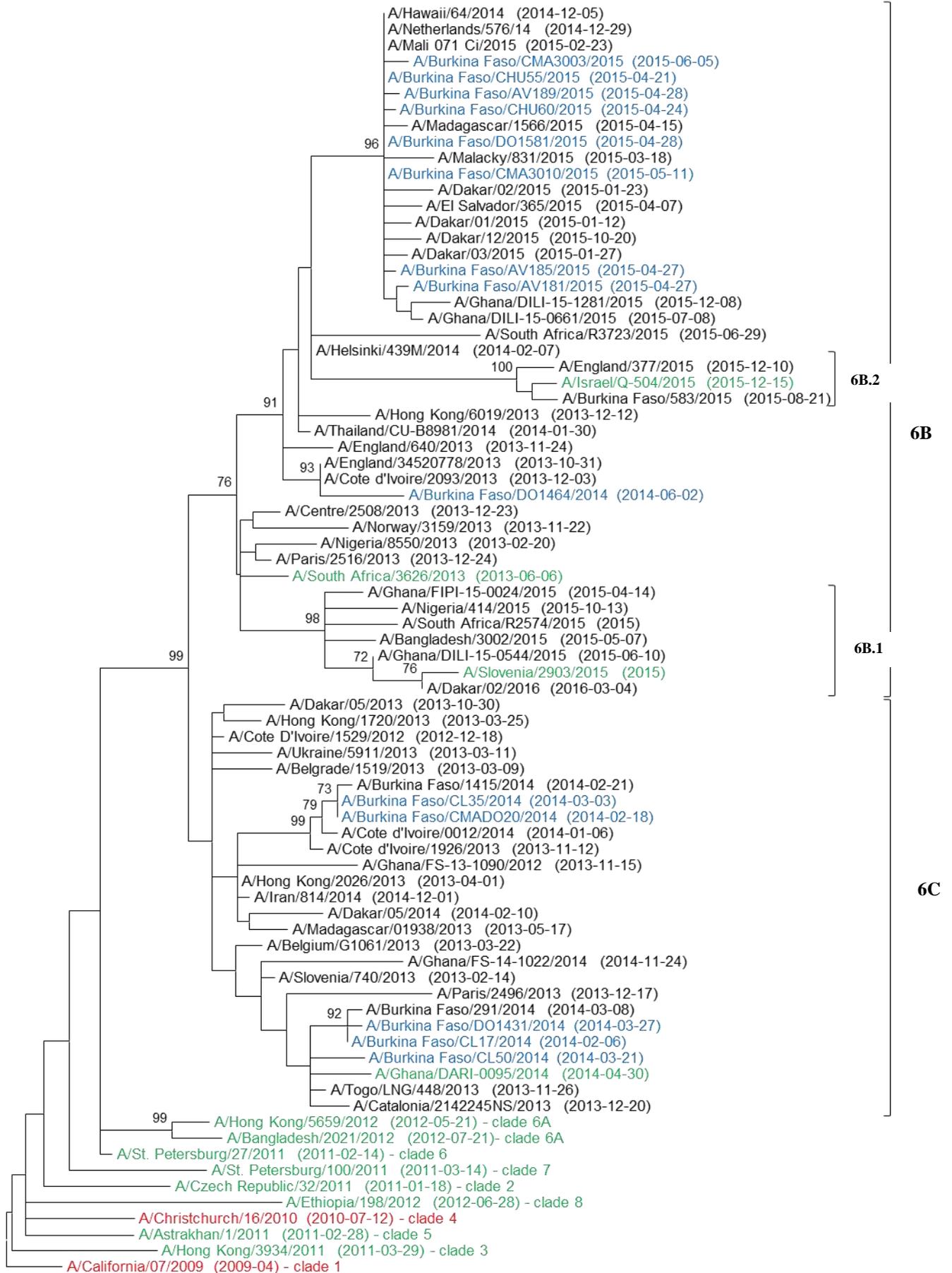


Figure 16: Analyses phylogénétiques des séquences du gène HA des souches A /H1N1 pdm09 (1701 pb) de 2014-2015 du Burkina Faso avec la méthode du maximum de vraisemblance et le modèle de substitution des nucléotides HKY + G.

A/H3N2 : L'analyse phylogénétique des séquences du gène HA (1674 pb) du virus A/H3N2 a montré que les souches ayant circulé au Burkina Faso en 2014 et 2015 appartenaient à deux clades : 3C.2 et 3C.3 (**Figure 21**). Sur les 24 souches virales appartenant au clade 3C.3, 13 souches étaient classées parmi le sous-clade 3C.3a. Les 5 autres souches appartenaient au clade 3C.2 et au sous-clade 3C.2a (**Figure 21**). Les souches virales A/H3N2 étaient similaires aux souches vaccinales incluses dans la composition du vaccin antigrippal.

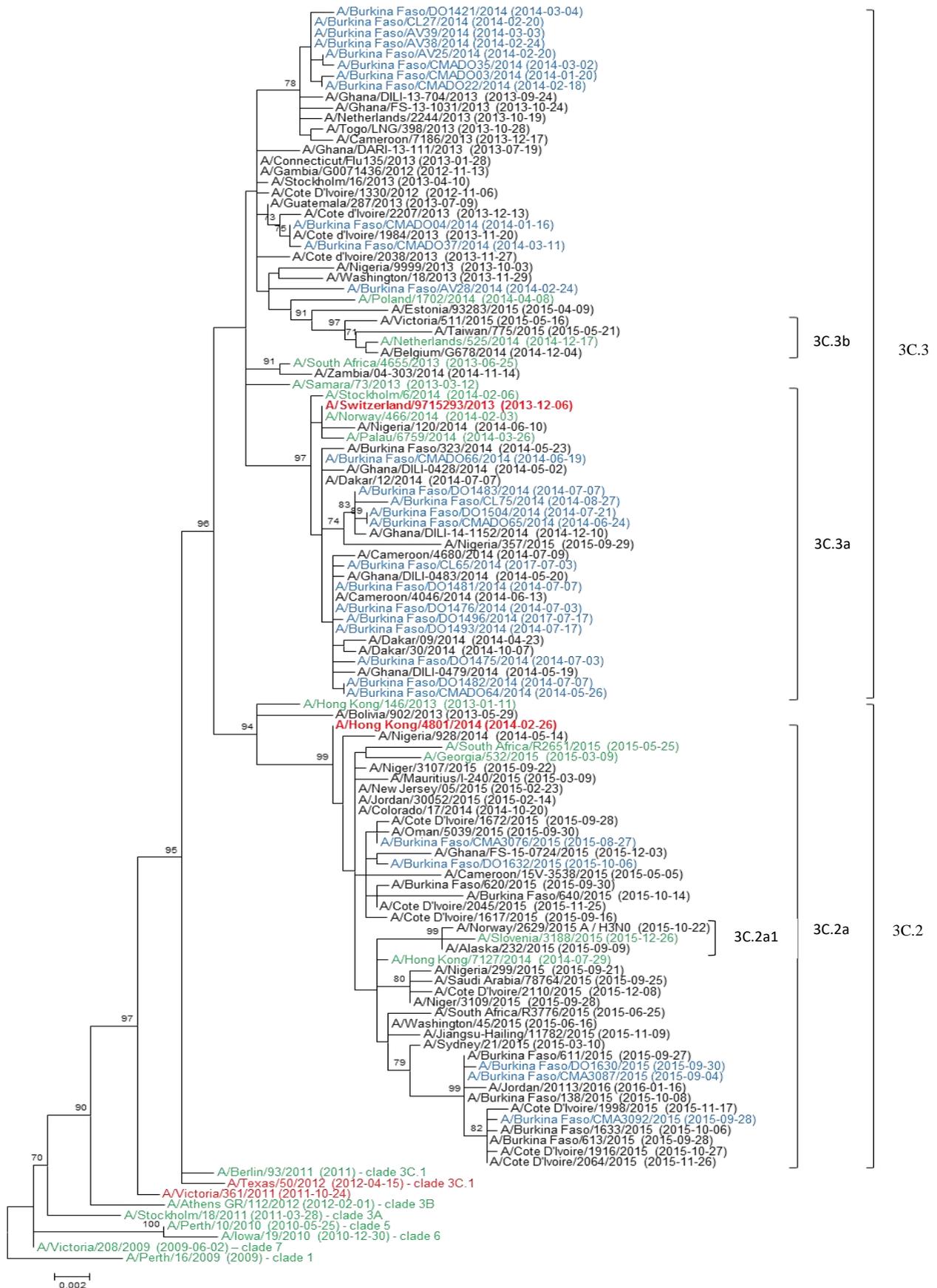


Figure 17: Analyses phylogénétiques des séquences du gène de l'hémagglutinine des souches A/H3N2 (1674 pb) de 2014-2015 du Burkina Faso avec la méthode du maximum de vraisemblance et le modèle de substitution des nucléotides HKY + G.

Circulation des virus influenza entre Janvier 2014 et Décembre 2015

Le nombre d'échantillons collectés par semaine variait tout au long de la période d'étude. Malgré cela, quelques périodes de circulation des virus influenza ont été observées (**Figure 22**). La première période de transmission a été observée entre la fin de janvier et le début d'avril 2014 (S3 à S15, pic en S8) avec une co-circulation de A/H1N1 pdm09 clade 6C, de A/H3N2 clade 3C.3 et du virus B. Une deuxième période de transmission presque exclusivement due au A/H3N2 clade 3C.3a s'est produite entre la fin du mois de mai et la mi-septembre 2014 (S22 à S36, pic S27). Une souche pdm09 A/H1N1 de clade 6B a été détectée en juin.

En 2015, la première période de transmission a été observée entre la mi-avril et la mi-juin (S16 à S23, pic à la S18) et était due au clade 6B de A/H1N1 pdm09. Les types de clades 3C.2a de A/H3N2 et influenza B ont co-circulé entre août et mi-octobre (S31 à S43, pic S41). Une seule souche A/H1N1 pdm09 de clade 6B a été signalée en août.

Les souches influenza B/Victoria (n = 15) ont été détectées exclusivement dans la première période de 2014 avec 2 souches B/Yamagata. En 2015, les souches B/Yamagata (n = 12) ont été détectées sporadiquement tout au long de l'année (**Tableau VI**). Aucune différence temporelle entre Bobo-Dioulasso et Ouagadougou n'a été observée en 2015.

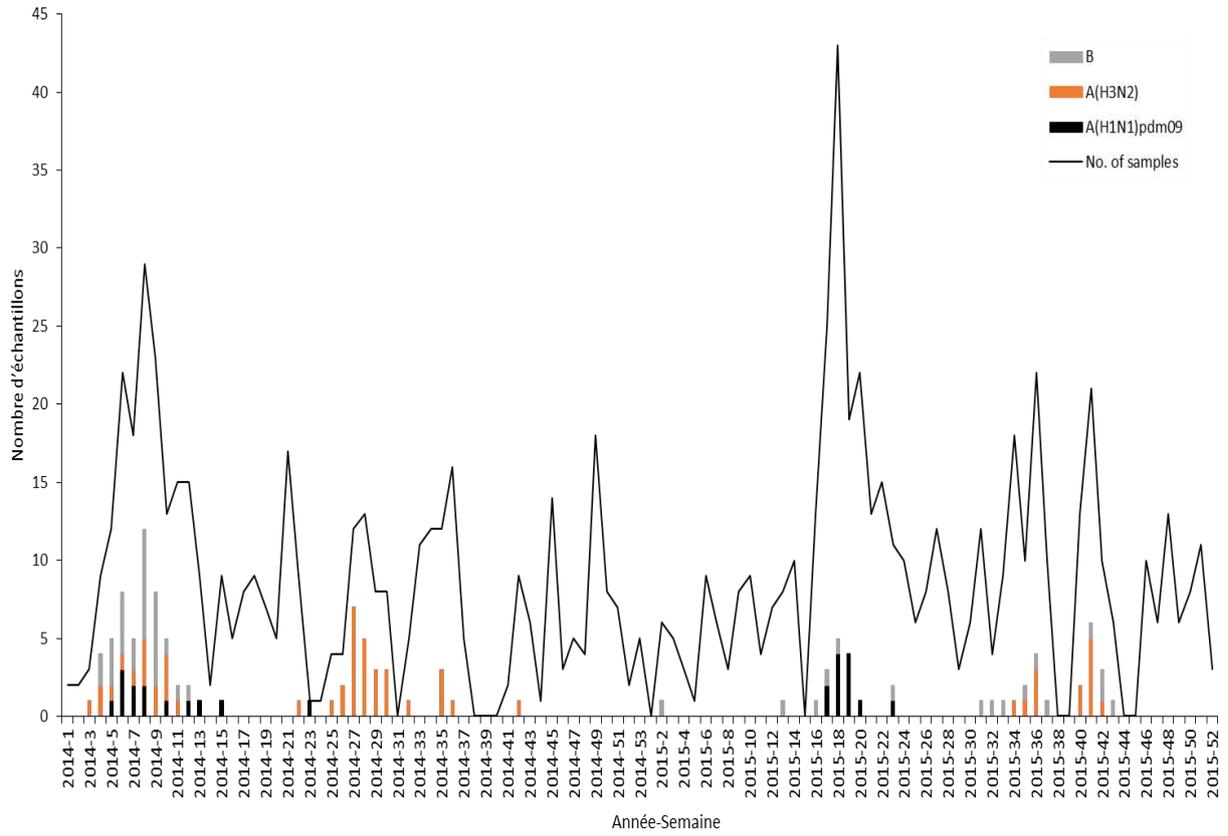


Figure 18: Distribution mensuelle des virus influenza A et B en 2014 et 2015.

Période de transmission accrue des virus influenza entre 2011 et 2016

Afin de déterminer, les périodes de transmission accrues des virus influenza entre 2011 et 2016, les données de surveillance de la grippe du Burkina Faso ont été extraites de la base de données FluNet pour les années 2011-2013 et 2016 (**Tableau VII**). Une période était considérée comme période de transmission accrue lorsque la proportion de cas positifs était supérieure à la médiane annuelle pendant au moins deux mois consécutifs. Ainsi, la période de transmission accrue des virus influenza a été identifiée entre septembre-octobre 2011, février-mars 2012, septembre 2012-mars 2013, octobre 2013-mars 2014, juin-août 2014, avril-juin 2015, août-octobre 2015 et juin-octobre 2016. Sur une échelle de semaines, deux pics clairs peuvent être identifiés pour deux des trois saisons prolongées (> 3 mois) avec différents virus dominants : novembre 2012 avec les virus A /H3N2 et influenza B, et février 2013 avec A/H1N1 pdm09 novembre 2013 avec A /H3N2 et février 2014 avec les trois sous-types de grippe). En considérant la période de surveillance de manière agrégée (2011-2016), la transmission des virus influenza a été la plus élevée entre janvier-mars et septembre-octobre (**Tableau VII**).

En conclusion, avec une prévalence de 13,1%, les virus influenza constituent l'un des principaux agents causals des IRA infantiles au Burkina Faso. Les infections aux virus influenza sont marquées par un caractère saisonnier sous forme épidémique durant les périodes de janvier-mars et septembre-octobre. De plus, les souches virales identifiées sont en adéquation avec la composition vaccinale pour l'hémisphère sud.

Tableau IVI: Périodes de transmissions accrues des virus influenza au Burkina Faso, 2011-2016.

Mois	Nbre de cas positif/Nbre d'échantillon collecté par mois (proportion de cas positif par mois *100)						
	2011 ^a	2012 ^a	2013 ^a	2014	2015	2016 ^a	2011-2016
Jan	-	1/69 (1.4)	14/46 (30.4)	10/28 (35.7)	1/20 (5.0)	0/27 (0.0)	26/190 (13.7)
Feb	-	2/43 (4.7)	31/57 (54.4)	33/92 (35.9)	0/26 (0.0)	0/58 (0.0)	66/276 (23.9)
Mar	-	2/31 (6.5)	9/40 (22.5)	10/52 (19.2)	1/28 (3.6)	1/37 (2.7)	23/188 (12.2)
Apr	-	2/47 (4.3)	0/29 (0.0)	1/24 (4.2)	9/91 (9.9)	1/44 (2.3)	13/235 (5.5)
May	-	0/29 (0.0)	3/61 (4.9)	1/47 (2.1)	5/69 (7.2)	0/77 (0.0)	9/283 (3.2)
Jun	-	1/32 (3.1)	0/53 (0.0)	4/10 (40.0)	2/35 (5.7)	3/55 (5.5)	10/185 (5.4)
Jul	0/31 (0.0)	0/37 (0.0)	3/51 (5.9)	18/41 (43.9)	1/41 (2.4)	6/31 (19.4)	28/232 (12.1)
Aug	4/49 (8.2)	1/44 (2.3)	3/77 (3.9)	4/40 (10.0)	5/41 (12.2)	10/48 (20.8)	27/299 (9.0)
Sep	11/75 (14.7) ^b	3/24 (12.5)	3/55 (5.5)	1/21 (4.8)	5/32 (15.6)	16/66 (24.2)	39/273 (14.3)
Oct	14/72 (19.4)	11/24 (45.8)	13/65 (20.0)	1/18 (5.6)	12/50 (24.0)	15/55 (27.3)	66/284 (23.2)
Nov	1/46 (2.2)	13/29 (44.8)	12/59 (20.3)	0/26 (0.0)	0/29 (0.0)	0/31 (0.0)	26/220 (11.8)
Dec	-	8/29 (27.6)	12/56 (21.4)	0/35 (0.0)	0/28 (0.0)	0/46 (0.0)	20/194 (10.3)
Total	30/273 (11.0)	44/438 (10.0)	103/649 (15.9)	83/434 (19.1)	41/490 (8.4)	52/575 (9.0)	353/2859 (12.3)
Proportion de la médiane annuelle	8.2	4.5	12.9	7.8	5.4	2.5	11.9

^a Données de FluNet

^b Périodes de transmission accrue des virus influenza (activité > proportion de la médiane annuelle for ≥ 2 mois) indiquées en gras.

Chapitre 3: Autres virus respiratoires : Epidémiologie et caractérisation moléculaire

Ces résultats ont fait l'objet d'un article, Article 3 «**Epidemiology and genetic diversity of respiratory viruses in children with Acute Respiratory Infections in Burkina Faso**» à soumettre pour publication.

Afin de déterminer le fardeau des virus respiratoires dans la survenue des IRA au Burkina Faso, nous avons analysé des prélèvements respiratoires obtenus chez des enfants de moins de cinq ans atteints de SG ou d'IRAS avec des PCR multiplex. Les résultats obtenus sont décrits ci-dessous.

Caractéristiques sociodémographiques et cliniques des patients

Au total, 584 enfants avec un diagnostic clinique de SG (n = 402 ; 68,8%) et d'IRAS (n = 182 ; 31,2%) ont été inclus dans cette étude. Parmi eux, 333 (57,0%) étaient de sexe masculin avec un sexe ratio de 1,3. L'âge moyen des patients était de 16,9 mois (1 – 60 mois). La majorité des enfants (424/584 ; 72,6%) avaient un âge < à 2 ans. La toux (539/584 ; 92,4%), la difficulté respiratoire (236/584 ; 40,5%) et l'écoulement nasal (155/584 ; 26,5%) étaient les principaux symptômes respiratoires retrouvés chez les enfants. Un traitement antibiotique a été administré chez 532 enfants (91,1%) et 24 (39,3%) des patients atteints d'IRAS ont reçu de l'oxygénothérapie. Les caractéristiques sociodémographiques et cliniques des patients de l'étude sont résumées dans le **Tableau VIII**.

Tableau VI: Caractéristiques sociodémographiques et cliniques de la population d'étude

Caractéristiques	SG		IRAS		Total	
	Nombre de patients n = 402 (%)	Nombre de patients positifs* n' = 233 (%)	Nombre de patients n = 182 (%)	Nombre de patients positifs* n' = 140 (%)	Nombre de patients N = 584 (%)	Nombre de patients positifs* N' = 373
Sexe						
Masculin	218 (54,2)	127 (54,5)	115 (63,2)	88 (62,8)	333 (57,0)	215 (57,6)
Féminin	184 (45,8)	106 (45,5)	67 (36,8)	52 (37,2)	251 (43,0)	158 (42,4)
Tranche d'âge (mois)						
< 6	70 (17,4)	44 (62,9)	64 (35,2)	50 (83,3)	134 (22,9)	94 (70,1)
6 - 11	108 (26,9)	78 (72,2)	30 (16,5)	22 (73,3)	138 (23,6)	100 (72,5)
12 -23	99 (24,6)	58 (58,6)	53 (29,1)	42 (79,3)	152 (26,0)	100 (65,8)
24 - 60	125 (31,1)	53 (42,4)	35 (19,2)	26 (74,3)	160 (27,4)	79 (49,4)
Signes cliniques						
Fièvre (T°>38°C)	340 (84,6)	192 (82,4)	118 (64,8)	99 (70,7)	458 (78,4)	291 (78,0)
Toux	382 (95,3)	223 (95,7)	157 (86,3)	121(86,4)	539 (92,4)	344 (92,2)
Mal de gorge	15 (3,7)	9 (3,9)	2 (1,1)	2 (1,4)	17 (2,9)	11 (2,9)
Écoulement nasal	107 (26,6)	68 (29,2)	48 (26,4)	41 (29,3)	155 (26,5)	109 (29,2)
Difficulté respiratoire	82 (20,5)	56 (24,0)	154 (84,6)	119 (85,0)	236 (40,5)	175 (46,9)
Tirage intercostal	5 (1,3)	3 (1,3)	52 (28,6)	40 (28,6)	57 (9,8)	43 (11,5)
Diarrhée	33 (8,2)	20 (8,6)	28 (15,4)	20 (14,3)	61 (10,5)	40 (10,7)
Vomissement	35 (8,7)	20 (8,6)	54 (2,7)	39 (27,9)	89 (15,2)	59 (15,8)
Antibiothérapie	375 (93,3)	217 (93,1)	157 (86,3)	118(84,3)	532 (91,1)	335 (89,8)
Oxygénothérapie	0 (0,00)	0 (00,0)	24 (39,3)	16 (11,4)	24 (4,1)	16 (4,3)

* Nombre de patients pour lequel au moins un virus a été détecté

Prévalence virale

Tous les spécimens ont été analysés pour la détection de 14 virus respiratoires. Un total de 373 (373/584 ; 76,2%) spécimens étaient positifs pour un virus au moins. Le HRV (174/584 ; 29,8%), le VRS (76/584 ; 13,0%), l'AdV (57/584 ; 9,8%) et le BoV (48/584 ; 8,2%) étaient les virus fréquemment détectés (**Figure 23**). Les PIV1-4 ont été détectés dans 46 (46/584 ; 7,8%) échantillons, le HMPV dans 36 (36/584 ; 6,2%), les HCoV dans 18 (18/584 ; 3,1%) et le virus influenza C dans 17 (17/584 ; 2,9%). Sur les 46 échantillons testés positifs aux PIV, 16 (16/46 ; 34,8%) étaient le PIV1, 1 (1/46 ; 2,2%) le PIV2, 27 (27/46 ; 58,7%) le PIV3 et 2 (2/46 ; 4,3%) le PIV4. Parmi les 18 échantillons positifs aux HCoV, NL63 a été trouvé dans 8 (8/18 ; 44,4%) échantillons, E229 dans 5 (5/18 ; 27,7%), OC43 dans 4 (4/18 ; 22,2%) et HKU1 dans 1 (1/18 ; 5,5%). Sur les 584 échantillons inclus dans cette analyse, 72 (72/584 ; 12,3%) étaient positifs aux virus influenza A et B (**Figure 23**).

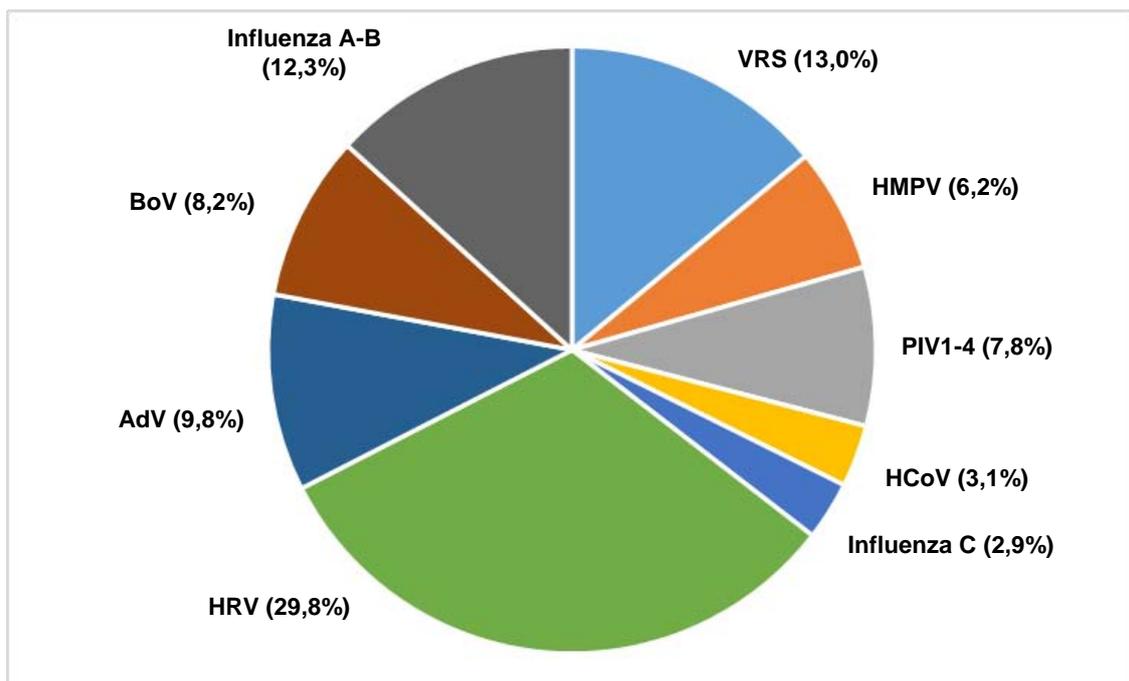


Figure 19: Prévalence des virus respiratoires détectés

L'analyse des données a révélé que les virus étaient plus détectés chez les enfants atteints d'IRAS (OR = 2,4, $p < 0,001$) comparé à ceux atteints de SG. Le VRS (OR = 6,7, $p < 0,001$), l'AdV (OR = 5,8, $p < 0,001$) et le BoV (OR = 4,2, $p < 0,001$) étaient les virus fréquemment détectés chez les enfants souffrant d'IRAS. Le VRS était également significativement plus fréquemment détecté chez les enfants de moins de 6 mois ($p < 0,001$). Par contre, le HMPV (OR = 0,2, $p = 0,012$) était plus associé aux cas de SG. L'analyse des données a également montré que les cas de coïnfection étaient plus détectées chez les enfants atteints d'IRAS. La distribution des virus respiratoires en fonction de l'âge et du cas clinique est décrite dans le **Tableau IX**.

L'infection par le HRV a été négativement associée à la fièvre (OR = 0,5, $p < 0,001$). Le VRS (OR = 3,8, $p < 0,001$), l'AdV (OR = 2,2, $p = 0,006$) et le BoV (OR = 2,7, $p = 0,002$) étaient positivement associés à la difficulté à respiratoire. Quant au virus influenza C il était positivement associé à l'écoulement nasal (OR = 2,7, $p = 0,044$). La distribution des virus respiratoires en fonction des caractéristiques cliniques est décrite dans le **Tableau X**.

Tableau IX: Distribution des virus détectés en fonction de l'âge et du cas clinique

Virus	Cas clinique (%)		p value	Tranche d'âge (%)				p value
	SG n = 402 (%)	IRAS n = 182 (%)		< 6 n = 134 (%)	6 – 11 n = 138 (%)	12 – 23 n = 152 (%)	24 – 60 n = 160 (%)	
VRS	23 (5,7)	53 (29,1)	0,001	34 (25,4)	17 (12,4)	18 (11,8)	7 (4,4)	0,001
HMPV	32 (8,0)	4 (2,2)	0,012	10 (7,5)	11 (8,0)	8 (5,3)	7 (4,4)	0,519
PIV	34 (8,5)	12 (6,6)	0,439	5 (3,7)	17 (12,3)	12 (7,9)	12 (7,5)	0,073
HCoV	15 (3,7)	3 (1,6)	0,177	0 (0,0)	7 (5,1)	6 (3,9)	5 (3,1)	0,091
Influenza C	11 (2,7)	6 (3,3)	0,709	1 (0,7)	3 (2,2)	7 (4,6)	6 (3,8)	0,219
HRV	117 (29,1)	57 (31,3)	0,588	48 (35,8)	38 (27,5)	45 (29,6)	43 (26,9)	0,345
AdV	18 (4,5)	39 (21,4)	0,001	14 (10,4)	13 (9,4)	20 (13,2)	10 (6,3)	0,229
BoV	18 (4,5)	30 (16,5)	0,001	11 (8,2)	9 (6,5)	16 (10,5)	12 (7,5)	0,635
Virus (+)	233 (58,0)	140 (76,9)	0,001	94 (70,1)	100 (72,5)	100 (65,8)	79 (49,4)	0,001
Coïnfection	34 (8,5)	49 (26,9)	0,001	24 (17,9)	13 (9,4)	27 (17,8)	19 (11,9)	0,094

Tableau VI: Distribution des virus détectés en fonction des caractéristiques cliniques

	Toux			Ecoulement nasal			Difficulté respiratoire		
	n = 344 (%)	OR (95% CI)	p value	n = 109 (%)	OR (95% CI)	p value	n = 175 (%)	OR (95% CI)	p value
VRS	72 (20.9)	1.54 (0.53 – 4.43)	0.422	23 (21.1)	1.23 (0.72-2.10)	0.431	52 (29.7)	3.80 (2.26-6.37)	0.001
HMPV	35 (10.2)	2.98 (0.39- 22.33)	0.287	11 (10.1)	1.32 (0.63-2.75)	0.458	17 (9.7)	1.34 (0.68-2.63)	0.396
PIV	43 (12.5)	1.02 (0.23 – 4.46)	0.978	13 (11.9)	1.25 (0.53-2.92)	0.783	18 (10.3)	1.01 (0.46-2.21)	0.977
HCoV	17 (4.9)	0.56 (0.06 – 4.70)	0.598	4 (3.7)	0.98 (0.10-9.51)	0.673	4 (2.3)	0.48 (0.09-2.42)	0.379
Influenza C	17 (4.9)	1	0.232	8 (7.3)	2.71 (1.02-7.16)	0.044	7 (4.0)	1.03 (0.38-2.74)	0.953
HRV	162 (47.1)	1.14 (0.57 – 2.28)	0.698	46 (42.2)	1.08 (0.72-1.62)	0.692	74 (42.3)	1.12 (0.78-1.61)	0.511
AdV	48 (14.0)	0.38 (0.17 – 0.83)	0.016	16 (14.7)	1.16 (0.63-2.15)	0.618	33 (18.9)	2.18 (1.25-3.80)	0.006
BoV	37 (10.8)	0.22 (0.10 – 0.47)	0.001	12 (11.0)	0.98 (0.49-1.94)	0.955	30 (17.1)	2.66 (1.44-4.89)	0.002

Coïnfection

Des cas de coïnfection avec deux virus ou plus ont été détectés dans 106 (106/445 ; 23,8%) échantillons de patients affectés par une infection virale. Parmi eux, une coïnfection avec 2 virus a été observée dans 89 (89/106 ; 84,0%) cas, une coïnfection avec 3 virus dans 16 (16/106 ; 15,1%) cas et une coïnfection avec 4 virus dans 1 (1/106 ; 0,9%) cas (**Tableau XI**). Les virus fréquemment impliqués dans les cas de coïnfection étaient le HRV (49/106 ; 46,2%), le BoV (38/106 ; 35,8%), l'AdV (34/106 ; 32,1%), et le VRS (24/106 ; 22,6%). Les coïnfections les plus répandues étaient de type: HRV-AdV (10/106 ; 9,4%), HRV-BoV (9/106 ; 8,5%), HRV-VRS (8/106 ; 7,5%) et BoV-VRS (8/106 ; 7,5%). La prévalence des coïnfections était plus élevée chez les enfants atteints d'IRAS ($p < 0,001$).

Tableau VIII: Coïnfection virale chez les patients atteints de SG ou d'IRAS

Multiple infections	Nombre
	N = 106
	(%)
Double infection	89 (84.0%)
HRV + AdV	10
HRV + BoV	9
RSV + BoV	8
RSV + hRV	8
RSV + AdV	4
HRV + ICV	4
Influenza A + HRV	4
AdV + BoV	3
HRV + PIV3	3
HMPV + BoV	3
HMPV + hRV	2
ICV + BoV	2
AdV + PIV3	2
Influenza A + BoV	2
Influenza + AdV	2
Influenza B + BoV	2
HMPV + AdV	1
RSV + PIV1	1
PIV1 + hMPV	1
PIV1 + E229	1
PIV1 + hRV	1
PIV1 + ICV	1
PIV2 + BoV	1
PIV3 + OC43	1
PIV3 + NL63	1
PIV3 + ICV	1
PIV3 + BoV	1

OC43 + BoV	1
Influenza B + AdV	1
Influenza B + PIV3	1
Influenza B + Influenza C	1
Influenza A + Influenza C	1
Influenza A + HMPV	1
Influenza A + PIV3	1
Influenza A + PIV1	1
Influenza B + HMPV	1
Influenza B + E229	1
Triple infection	16 (15,1%)
RSV +AdV + BoV	1
HMPV + AdV + BoV	1
HMPV + HRV + AdV	1
PIV3 + ICV + HRV	1
PIV1 + HRV + BoV	1
NL63 + HRV + AdV	1
PIV3 + HRV + AdV	1
PIV1 + AdV + BoV	1
NL63 + ICV + HRV	1
RSV + hRV + BoV	1
PIV1 + ICV + AdV	1
HMPV + PIV1 + AdV	1
Influenza A + ICV + BoV	1
Influenza A + PIV1 + Influenza C	1
Influenza B + HMPV + BoV	1
Influenza A + HMPV + BoV	1
Quadruple infection	1 (0,9%)
RSV + NL63 + AdV + BoV	1

Distribution saisonnière

Le HRV était le seul virus détecté chaque mois durant la période d'étude (**Figure 24**). Le VRS a été principalement détecté en 2015 avec un pic en saison de pluie (juin à septembre) (OR = 2,24 ; p = 0,01). Le HMPV a été détecté principalement en 2014 avec un pic en saison de pluie (juillet – septembre) également. Les PIV ont été détectés principalement pendant la saison sèche (mars – mai) (OR = 5,22, p = 0,001). Le virus influenza C (OR = 4,05 ; p = 0,035), et l'AdV (OR = 2,34 ; p = 0,001) ont montré une prévalence plus élevée pendant la saison sèche et chaude (mars-mai). L'incidence de HBoV était plus élevée pendant la saison sèche et chaude (OR = 2,67, p = 0,023) et la saison pluvieuse (OR = 3,54, p = 0,003) (**Figure 25**).

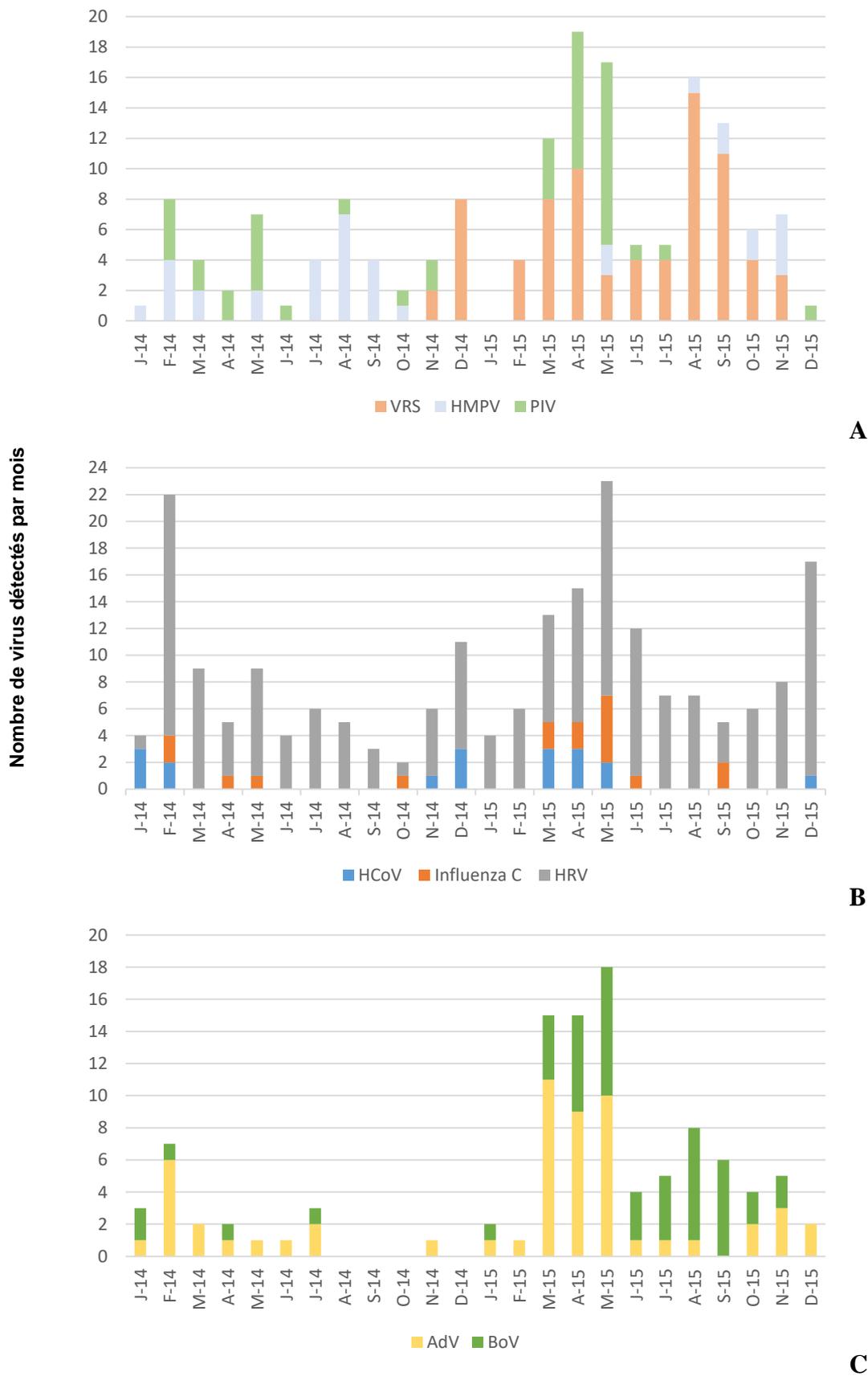


Figure 20 : Distribution mensuelle des virus respiratoires détectés au cours de la période d'étude

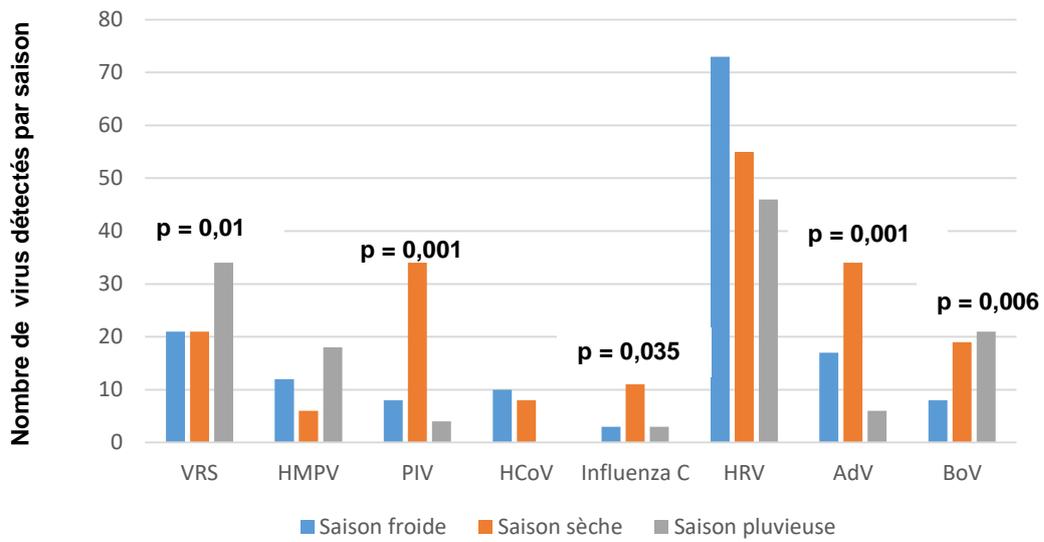


Figure 21: Détection des virus respiratoires en fonction des saisons

Caractéristiques génétiques du VRS

La caractérisation moléculaire du VRS a consisté en l'amplification et au séquençage du gène G. L'analyse phylogénique a concerné 47 séquences partielles de VRS-A et 02 séquences de VRS-B. La majorité des souches du VRS-A (44/47 ; 93,6%) ayant circulé au Burkina Faso durant la période d'étude appartenaient au génotype ON1. Quant aux autres souches restantes (3/47 ; 6,4%), elles appartenaient au génotype NA1 (**Figure 26**). Les deux souches du VRS-B appartenaient aux génotypes BA9 et SAB4 comme le montre l'arbre phylogénétique (**Figure 27**).

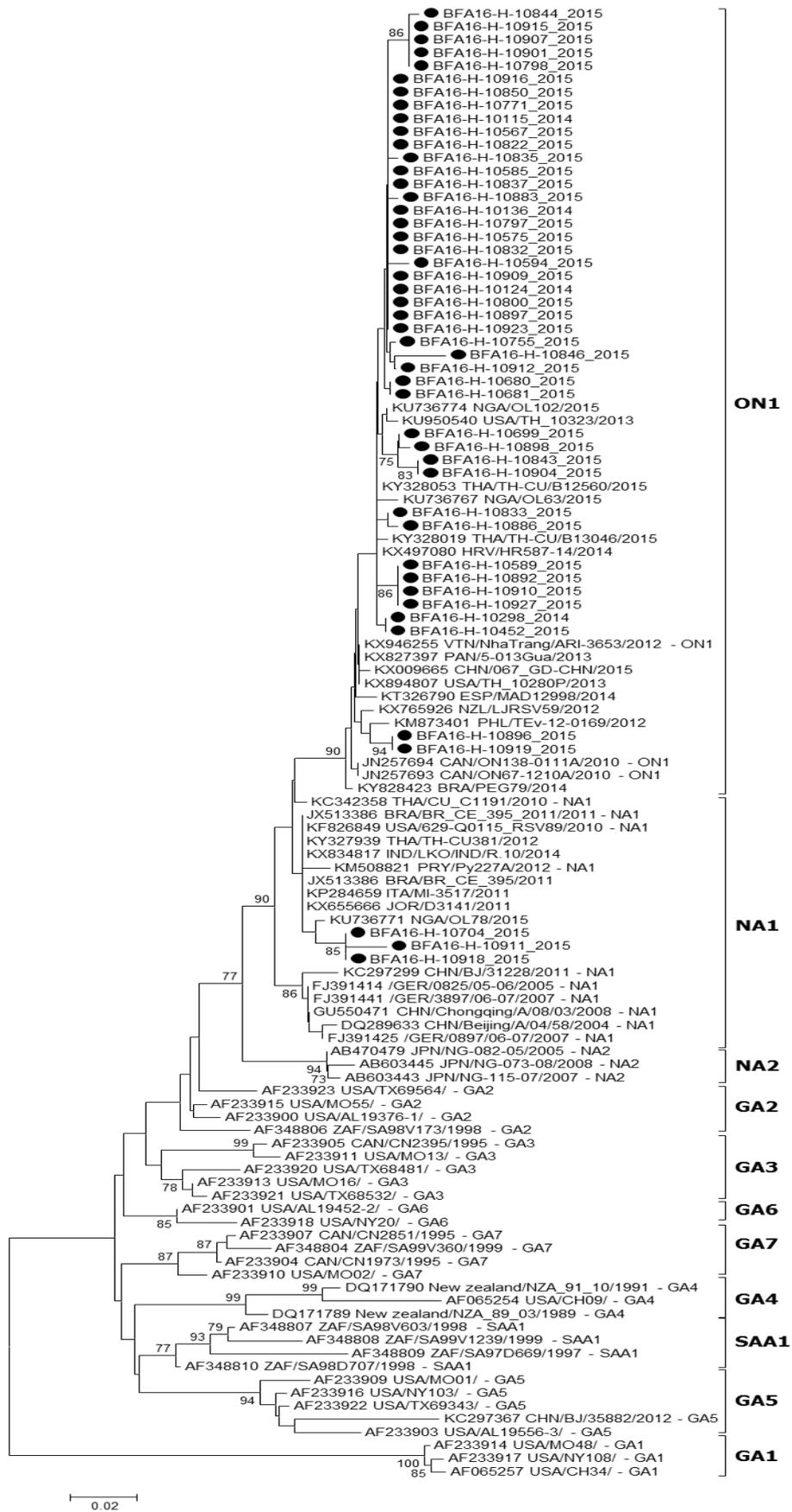


Figure 22: Analyse phylogénétique des séquences partielles du gène G du RSV-A. Les souches séquencées dans cette étude sont montrées avec un cercle complet.

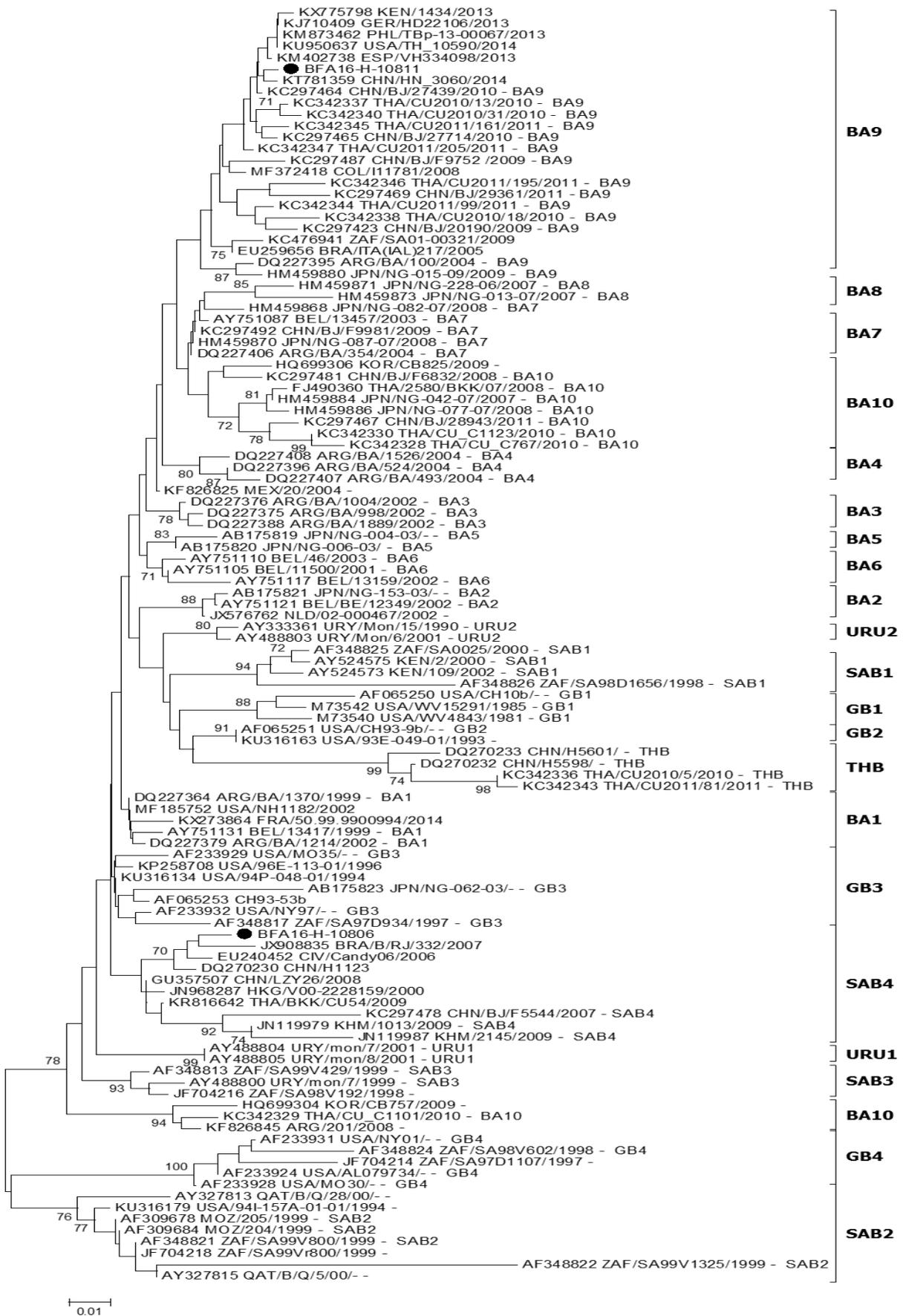


Figure 23: Analyse phylogénétique des séquences partielles du gène G du RSV-B. Les souches séquencées dans cette étude sont montrées avec un cercle complet.

Caractérisation moléculaire du HRV

La caractérisation moléculaire du HRV a consisté en l'amplification et au séquençage du gène VP4/VP2/5'NC suivi de l'analyse phylogénétique de 207 pb de la région VP4. Sur les 95 séquences qui ont été incluses dans l'analyse phylogénétique, 55 (55/95 ; 57,9%) appartenaient au HRV-A (**Figure 28**), 11 (11/95 ; 11,6%) au HRV-B et 29 (29/95 ; 30,5%) au HRV-C (**Figure 29**). L'analyse phylogénétique par groupe a relevé une grande diversité des souches de HRV ayant circulé au Burkina Faso entre 2014 et 2015. Ainsi, les 55 souches du groupe A (HRV-A) appartenaient aux sérotypes suivants : A49, A2, A56, A81, A22, A43, A10, A59, A41, A39, A24, A21, A9, A25, A44, A3, A1, A89 et A66 (**Figure 28**). Pour les souches HRV-B, les sérotypes B93, B06, B79, B04 et B26 étaient ceux ayant circulé au Burkina Faso pendant la période de l'étude (**Figure 29**). Quant aux HVR-C, ils appartenaient aux sérotypes C1, C26, C12, C42, C43, C46, C2, et C49 (**Figure 29**).

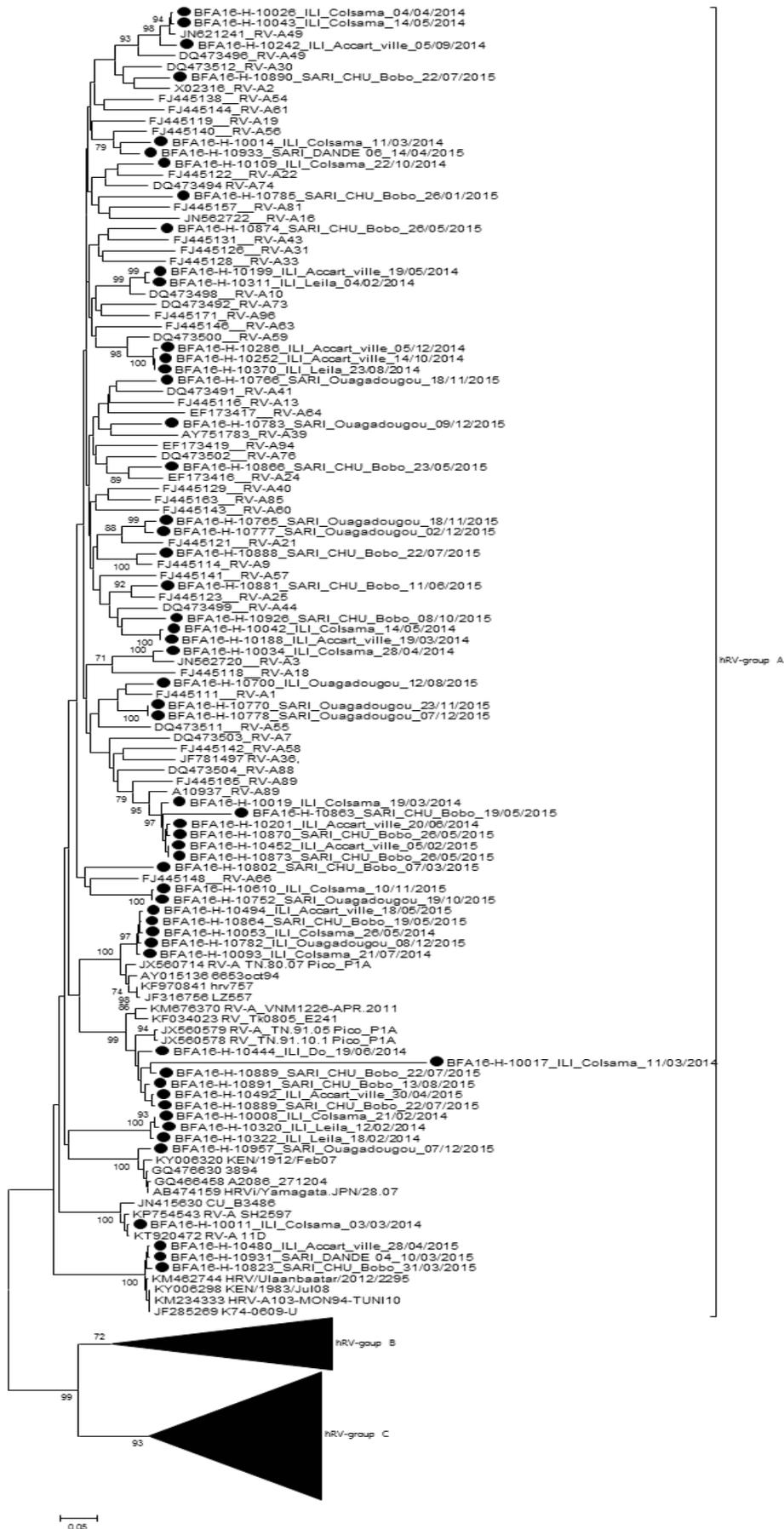


Figure 24: Analyse phylogénétique de 207 pb de VP4 du groupe A de rhinovirus humains circulant au Burkina Faso en 2014 et 2015.



Figure 25: Analyse phylogénétique de 207 pb de VP4 des groupes B et C de rhinovirus humains circulant au Burkina Faso en 2014 et 2015.

Chapitre 4 : Epidémiologie des bactéries atypiques impliquées dans les infections respiratoires aiguës

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un article, Article 4 «**Low prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children hospitalized for Acute Respiratory Infection in Burkina Faso**» à soumettre pour publication.

Au Burkina Faso, bien que les IRA constituent un problème de santé publique il n'existe pratiquement pas d'informations sur l'épidémiologie de ces bactéries atypiques chez les enfants. Afin de combler ce manque de données, *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* ont été recherchées par la PCR en temps réel dans les prélèvements respiratoires des enfants atteints de SG ou d'IRAS au Burkina Faso.

Caractéristiques de la population d'étude

Les caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude sont celles décrites dans le chapitre 2 des « Autres virus respiratoires ». Sur les 584 échantillons analysés, *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* ont été détectées chacune chez 3 patients (3/584 ; 0,5%) atteints d'IRAS et hospitalisés au CHUSS de Bobo-Dioulasso. Quatre (04) des six (06) patients chez qui une de ces bactéries atypiques a été détectée, avaient moins de 2 ans (4/6 ; 66,7%). Tous les patients atteints ont reçu une antibiothérapie à base de β -lactamines et d'aminosides. Les caractéristiques des patients infectés par *M. pneumoniae* ou *C. pneumoniae* sont décrites dans le tableau ci-dessous (**Tableau XII**).

Tableau VIII: Caractéristiques des enfants infectés par *M. pneumoniae* ou *C. pneumoniae*

Numéro d'échantillon	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>			<i>Chlamydia pneumoniae</i>		
	BFA16-H-10809	BFA16-H-10812	BFA16-H-10819	BFA16-H-10855	BFA16-H-10917	BFA16-H-10918
Sexe	F	M	F	F	M	F
Age (mois)	41	18	9	48	12	14
Cas clinique	IRAS	IRAS	IRAS	IRAS	IRAS	IRAS
Antibiothérapie	Genta.+ Ceftri.	Ceftri.	Ceftri.	Genta.+ Ceftri.	Ampi.	Genta.+ Ceftri.
Symptômes	Toux, Ecoulement nasal	Toux, Difficulté respiratoire, Léthargie	Toux	Toux	Toux, Difficulté respiratoire	Toux
Oxygénothérapie	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Coïnfection	Non	NL63- AdV-HRV	Influenza B	IVC-AdV	BoV	VRS

Genta. : Gentamycine; Ampi. : Ampicilline; Ceftri.: Ceftriaxone

Les résultats de cette étude montrent pour la première fois la circulation de *M. pneumoniae* et de *C. pneumoniae* chez les enfants atteints d'IRA au Burkina Faso. Malgré leur faible prévalence, nos résultats soulignent la nécessité de la prise en compte de ces pathogènes dans la recherche étiologique des IRA. En outre, d'autres investigations à grande échelle sont nécessaires pour déterminer l'épidémiologie de ces bactéries atypiques dans la survenue des IRA au Burkina Faso.

**QUATRIEME PARTIE :
DISCUSSION GENERALE**

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE

1. Revue systématique de la littérature sur les étiologies des IRA chez les enfants de moins de cinq ans en Afrique Sub-Saharienne

La première partie de nos travaux a consisté à faire un état des lieux sur les étiologies des IRA chez les enfants de moins de cinq ans en Afrique sub-saharienne à travers une revue systématique de la littérature portant sur des données publiées ou non entre 2000 et 2015. Cette étude, première du genre en Afrique Sub-Saharienne, a démontré que le VRS, les HPIV, les virus influenza A et B, l'AdV, le HRV, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* et *H. influenza* et *Candida spp* étaient les pathogènes respiratoires fréquemment détectés. Elle a également mis en exergue le manque de données dans plusieurs pays d'Afrique Sub-Saharienne. En effet, sur les 43 pays que compte l'Afrique Sub-Saharienne, seulement 13 pays ont abrité les 29 études incluses dans cette revue et environ la moitié de ces études a été réalisée dans seulement 2 pays : 8 en Afrique du Sud et 5 au Kenya. En outre, notre revue de littérature n'a identifié qu'une seule étude au Nigéria et aucune en République Démocratique du Congo (RDC), sachant que ces deux pays font partie des 5 pays qui enregistrent le plus fort taux de mortalité infantile due à la pneumonie dans le monde (Naïr et al. 2013).

Pendant cette dernière décennie, plusieurs pays africains ont introduit les vaccins contre *H. influenzae b* et *S. pneumoniae* dans leur programme national de vaccination (Zar et al. 2013 ; Zar et al. 2015). La majorité des études incluses dans cette revue ont été réalisées avant 2010 suggérant ainsi la mise en œuvre de nouvelles études afin de déterminer l'évolution épidémiologique des pathogènes respiratoires.

Malgré les résultats intéressants rapportés dans cette étude, quelques limites ont été constatées. Tout d'abord, seuls les articles publiés en anglais et en français ont été inclus dans cette revue excluant ainsi ceux publiés en portugais et en espagnol. Soulignons que le portugais est la langue officielle de cinq pays d'Afrique Sub-Saharienne (Angola, Cap-Vert, Guinée-Bissau, Mozambique et Sao Tomé et Principe) et que l'espagnol est la langue officielle de la Guinée équatoriale. Deuxièmement, à part la littérature grise du Burkina Faso, celle des autres pays n'a pas été incluse dans la revue. Enfin, la qualité des études incluses dans la revue n'a pas été estimée.

Néanmoins, ces résultats ont démontré le manque de données dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne témoignant de la nécessité de mettre en œuvre des études de qualité afin de déterminer le rôle des virus et bactéries dans les IRA chez l'enfant et aussi de définir l'évolution

de l'épidémiologie des pathogènes respiratoires après l'introduction de deux vaccins conjugués que sont le vaccin contre *H. influenza b* et le vaccin contre le pneumocoque.

2. Virus influenza chez les enfants de moins de cinq (05) ans au Burkina Faso

La deuxième partie de nos travaux de recherche a porté sur l'épidémiologie et les caractéristiques génétiques des virus influenza chez les enfants ≤ 5 ans atteints de SG et d'IRAS au Burkina Faso. Les enfants entre 5 et 14 ans constituent généralement le groupe le plus largement affecté pour les épidémies annuelles de grippe. En moyenne, un enfant sur cinq souffre d'une grippe chaque année. De plus, les jeunes enfants ont un plus grand risque de développer des complications lors d'une infection par un virus influenza A ou B (WHO, 2012 ; Chaves et al. 2014). Les résultats obtenus montrent que les virus influenza A et B ont été détectés dans 15,1% des cas de SG et 6,6% de cas d'IRAS soulignant ainsi l'importance de ces virus dans les infections respiratoires chez les enfants au Burkina Faso. Des résultats similaires ont été rapportés dans des études conduites en Afrique chez des enfants appartenant à la même tranche d'âge. Ainsi, la prévalence des virus influenza A et B chez les enfants atteints de SG se situait entre 8% et 20% (Bonney et al. 2012 ; Lekana-Douki et al. 2014 ; Maman et al. 2014 ; Mainassara et al. 2015 ; Wabwire-Mangen et al. 2016) et était d'environ 7% chez ceux atteints d'IRAS (McMorrow et al. 2015). Les analyses statistiques ont révélé une augmentation de la prévalence des virus influenza avec l'âge. Cette situation, rapportée dans d'autres études (Maman et al. 2014 ; Mainassara et al. 2015 ; Wabwire-Mangen et al. 2016) pourrait s'expliquer par plusieurs raisons. D'abord, la faible prévalence des virus influenza chez les enfants de moins de 6 mois suggèrerait une protection par les anticorps maternels. Les femmes enceintes constituent un groupe cible pour la vaccination antigrippale, cela afin d'éviter les complications au cours de la grossesse et aussi d'assurer la protection des nourrissons (Chaves et al. 2014) qui sont inéligibles pour la vaccination antigrippale (Katz et al. 2012 ; WHO, 2012). Ensuite, la socialisation croissante des enfants avec l'âge augmenterait le risque de contact avec les virus influenza. Enfin, principalement chez les jeunes enfants, la définition de cas de SG n'est pas précise et inclut les enfants atteints d'infections respiratoires causées par d'autres virus tels le VRS et le HRV (Razanajatovo et al. 2011 ; Lim et al. 2016).

L'étude des caractéristiques génétiques des virus influenza est primordiale pour la détection de souches émergentes et aussi pour la production de vaccin (Broberg et al. 2016). Dans notre étude, nous avons analysé les séquences du gène HA des virus A/H1N1 pdm09 et A/H3N2 en les comparant aux séquences de référence ainsi qu'aux souches vaccinales définies par l'OMS. Les résultats ont montré que les virus A/H1N1 pdm09 ayant circulé entre janvier 2014 et

décembre 2015 appartiennent aux clades 6B et 6C. Ces clades étaient antigéniquement similaires à la souche virale incluse dans le vaccin trivalent (A/California/7/2009 (H1N1) pdm09-like virus) recommandée pour l'hémisphère sud pour les années 2014 et 2015. Pour ce qui est des virus A/H3N2, les souches ayant été détectées durant la surveillance appartenaient aux clades 3C.2 et 3C.3 et aux sous-clades 3C.3a et 3C.2a. Les souches virales A/H3N2 étaient antigéniquement similaires à A/Switzerland/9715293/2013 qui est la souche sélectionnée pour le vaccin 2015 dans l'hémisphère Sud. Aussi, l'analyse phylogénétique des virus A/H3N2 a montré que les souches de 2014-2015 étaient génétiquement divergents de la souche vaccinale A/Texas/50/2012.

Au Burkina Faso comme dans d'autres régions tropicales, la saisonnalité des virus influenza A et B n'est pas très bien définie (Tarnagda *et al.* 2014 ; Ouédraogo *et al.* 2014 ; Hirve *et al.* 2016). La détermination de la saisonnalité de ces virus est d'autant plus importante qu'elle permettrait d'identifier la période propice à l'administration du vaccin antigrippal. Les résultats des deux années de surveillance ont montré une variation de la circulation des virus influenza d'une année à l'autre, janvier-avril et mai-septembre en 2014, avril-juin et août-octobre en 2015. Ces périodes de circulation des virus influenza en 2014-2015 étaient dues à des sous-types et clades des virus différents, comme révélé par les analyses phylogénétiques des souches A/H1N1 pdm09 et A/H3N2, suggérant la survenue de nouveaux événements au moins deux fois par an et parfois dans des intervalles de temps très courts. Aussi, malgré la non-homogénéité des prélèvements au cours de cette surveillance, nous pouvons dire que les virus influenza ne semblent pas circuler toute l'année au Burkina Faso. Cette situation est similaire à celle du Niger (Données FluNet, Mainassara *et al.* 2015) mais différente de celle de la Côte d'Ivoire, du Ghana et du Togo où une circulation des virus influenza a été observée toute l'année (Bonney *et al.* 2012 ; Kadjo *et al.* 2013 ; Maman *et al.* 2014, Hirve *et al.* 2016). Cette différence pourrait être due entre autre à la différence de climat entre le Burkina Faso et ces pays. A l'avenir, un effort dans l'échantillonnage et la caractérisation moléculaire des souches au niveau individuel aideront à une meilleure compréhension de la circulation spatiotemporelle des virus influenza, de la propagation des virus entre les pays et la persistance de l'infection en Afrique de l'Ouest (Nelson *et al.* 2014).

En combinant les données du FluNet de 2011-2013, 2016 avec celles de nos deux années de surveillance (2014-2015), les périodes de transmission accrue des virus influenza (épidémies de grippe) semblent se produire principalement entre septembre et octobre (période correspondant à la fin de la saison des pluies et le début de l'harmattan) et de janvier à mars

(période correspondant à la fin de l'harmattan). L'harmattan correspond à la saison sèche et froide avec un vent sec et chaud le jour et plus froid la nuit. Par conséquent, la période propice à l'administration du vaccin serait comme pour l'hémisphère Nord le plus tôt possible en septembre-octobre, et couvrirait la longue période de transmission (septembre à mars) comme cela a déjà été suggéré par Hirve S et *al.* 2016. La vaccination en avril aurait peu d'avantages en raison de la faible transmission des virus influenza entre avril et juin et aussi à cause de la protection décroissante au cours du temps (Belongia et *al.* 2015). Par contre, jusqu'à ce que les variations annuelles de la circulation des virus influenza soient mieux comprises, la vaccination des femmes enceintes devrait être recommandée à n'importe quel moment de l'année avec la formulation de vaccin la plus récente (Richard et *al.* 2010). Il est à noter que le vaccin contre la grippe n'est pas inclus dans le programme élargi de vaccination (PEV) au Burkina Faso. Ces résultats seront utiles à la mise en place de stratégie vaccinale au Burkina. Aussi, l'OMS recommande de plus en plus une vaccination annuelle des groupes à risque que sont les jeunes enfants, les femmes enceintes, les personnes âgées, etc.

La majorité des patients atteints de SG ont été traités avec des antibiotiques, bien que les virus soient généralement la principale cause des SG (Razanajatovo et *al.* 2011). Cette situation qui ne concernerait pas uniquement les pays à ressources limitées (Low, 2008) souligne la nécessité de réviser les pratiques cliniques afin d'identifier les cas de coïnfection bactérienne (Elfving et *al.* 2016 ; Prasso et *al.* 2017). L'éducation et la sensibilisation du personnel de santé ainsi que les parents des patients aux risques liés à la résistance aux antibiotiques seront également nécessaires pour contrôler efficacement une utilisation abusive (Tillekeratne et *al.* 2015 ; McDonagh et *al.* 2016).

3. Autres virus respiratoires : épidémiologie et diversité génétique

La troisième partie de nos travaux a porté sur l'épidémiologie des virus respiratoires autres que les virus influenza impliqués dans les SG et les IRAS chez les enfants ≤ 5 ans au Burkina Faso. Aussi, il a été question de déterminer les caractéristiques génétiques du VRS et du HRV.

Au total, 14 virus ont été recherchés par la PCR multiplex. Cette technique qui permet la détection simultanée de plusieurs pathogènes est considérée comme étant une méthode sensible et spécifique pour le diagnostic biologique des infections respiratoires (Deng et *al.* 2013). A notre connaissance, cette étude rapportant des données sur l'étiologie virale des SG et des IRAS chez les enfants ≤ 5 ans ainsi que leurs caractéristiques génétiques est la première du genre au

Burkina Faso. Sur les 584 échantillons testés, au moins un virus a été détecté dans 373 (63,9%) spécimens. Ce taux était de 58,0% chez les enfants atteints de SG et de 76,9% chez ceux atteints d'IRAS. Ces résultats sont similaires à ceux de plusieurs études qui ont rapporté des taux de détection virale allant de 35,3% à 69,2% parmi les cas de SG (Njouom et al. 2012 ; Pretorius et al. 2016 ; Lim et al. 2016 ; Wang et al. 2016) et de 70,0% à 93% parmi les cas d'IRAS (Suryadevara et al. 2011 ; Ouédraogo et al. 2014 ; Lagaré et al. 2015 ; Pretorius et al. 2016). Des taux de détection virale plus faibles ont été rapportés par Kwofie et al. 2012 au Ghana (25,7%) et Khor et al. 2012 en Malaisie (26,4%) chez des patients atteints d'IRAS. La population d'étude, les méthodes diagnostiques, le climat, la période/saison et la durée de l'étude, sont autant de facteurs pouvant expliquer cette différence de taux de détection virale.

Le HRV (29,8%) et le VRS (13,1%) étaient les virus fréquemment détectés au cours de notre étude. Ces résultats corroborent ceux de plusieurs autres études conduites en Afrique et ailleurs qui identifiaient également ces virus comme étant les principaux agents étiologiques des SG et des IRAS chez les enfants. Ainsi, les résultats rapportés dans ces études se présentaient comme suit : Ouédraogo et al. 2014 au Burkina Faso [HRV (59,1%), VRS (16,1%)], Njouom et al. 2012 au Cameroun [HRV (64,6%), VRS (83,9%)]; Richter et al. 2016 en Chypre [HRV (27,4%), VRS (30,4%)] ; Bhuyan et al. 2017 à Dhaka, Bangladesh [HRV (31,5%), VRS (31,0%)] et Janahi et al. 2017 au Qatar [HRV (25,5%), VRS (51,2%)]. L'AdV (9,8%), le BoV (8,2%), les PIV (7,8%) , le HMPV (6,2%), les HCoV (3,1%) et le virus influenza C (2,9%) étaient les autres virus détectés, soulignant ainsi le rôle important qu'ils jouent dans la survenue des IRA chez les enfants au Burkina Faso. Ces résultats sont en accord avec plusieurs autres qui ont rapporté des prévalences similaires (Uršič et al. 2012 ; Ritcher et al. 2016 ; Wang et al. 2016 ; Wansaula et al. 2016).

Dans notre étude, le VRS tout comme l'AdV et le BoV étaient plus détectés chez les enfants atteints d'IRAS. De plus la prévalence du VRS (25,4%) était plus élevée chez les enfants < 6 mois. Le même constat a été fait dans plusieurs études s'intéressant au fardeau du VRS dans l'hospitalisation des enfants atteints d'IRAS (Weber et al. 2002 ; Homaira et al. 2012 ; Homaira et al. 2016). Ces résultats soulignent la nécessité et l'urgence du développement d'un vaccin contre le VRS. A ce jour, il n'existe aucun antiviral et aucun vaccin. Seul le Palivizumab qui a une efficacité prouvée sur la réduction du taux d'hospitalisation est recommandé chez les enfants à haut risque dans les pays développés (Wang et al. 2008). Cependant, à notre connaissance, cette molécule n'est pas disponible au Burkina Faso. Même disponible, son coût élevé le rendrait inaccessible à la majorité de la population (660 000 FCFA le flacon de 100

mg). Il serait alors judicieux de continuer à investiguer la saisonnalité du VRS au Burkina à travers une surveillance sentinelle pour pouvoir donner des phases d'alerte aux hopitaux et aux cliniciens.

La coïnfection avec deux ou plusieurs virus a été détectée dans 22,2% des cas. Des proportions semblables ont été rapportées dans d'autres études (Jennings *et al.* 2004 ; Khor *et al.* 2012 ; Uršič *et al.* 2012 ; Kenmoe *et al.* 2016). Le BoV, l'AdV, le PIV, le VIC et le VRS étaient les virus fréquemment détectés en coïnfection dans cette étude. Pareils résultats ont également été retrouvés par d'autres études (Paranhos-Baccala *et al.* 2008 ; Stefanska *et al.* 2012 ; Ljubin-Sternak *et al.* 2016). Tout comme les résultats des études de Wolf *et al.* 2006 et Frobert *et al.* 2011, la coïnfection était fréquemment détectée chez les patients atteints d'IRAS dans notre étude. Cependant, les coïnfections virales ne semblent pas influencer la sévérité de l'infection (Aberle *et al.* 2005 ; Njouom *et al.* 2008 ; Huguenin *et al.* 2012). En effet, dans notre étude, les virus étaient fréquemment détectés chez les enfants atteints d'IRAS. Il est donc normal à notre avis que des cas de coïnfections soient plus détectés chez ces patients. De plus, il est possible que la coïnfection soit liée à la persistance virale dans les muqueuses des voies respiratoires. Par exemple, l'ADN du BoV peut être détecté dans les voies respiratoires jusqu'à une année après l'infection primaire (Martin *et al.* 2015).

L'information sur la saisonnalité des pathogènes respiratoires est très importante pour la mise en place de mesures préventives, ainsi que pour un meilleur management clinique des patients. Dans notre étude, malgré le manque d'uniformité dans l'inclusion des patients au cours des deux années de surveillance, une saisonnalité a pu être établie pour certains virus. L'AdV, les PIV, le virus influenza C ont montré des prévalences plus élevées pendant la saison sèche et chaude (mars – mai). Quant au HRV, il a circulé tout au long de l'année sans une saisonnalité distincte. Cette similarité a également été rapportée par Ouédraogo *et al.* 2014 dans une étude conduite à Ouagadougou au Burkina Faso et aussi par Bhuyan *et al.* 2017 à Dakha, Bengladesh. Aussi, similairement aux données rapportées par Ouédraogo *et al.* 2014 au Burkina Faso, Kenmoe *et al.* 2016 au Cameroun et Calvo *et al.* 2010 en Espagne, nos résultats ont montré que le VRS était détecté principalement pendant la saison pluvieuse. Ce résultat est d'autant plus important car elle permettra de déterminer la période propice à l'administration d'un futur vaccin contre le VRS.

Dans cette étude, nous avons décrit pour la première fois la diversité génétique des deux pathogènes fréquemment détectés chez les enfants atteints d'IRA, le VRS et le HRV. Les génotypes ON1 et NA1 ont été identifiés pour le VRS/A et les génotypes BA9 et SAB4 pour le

VRS/B. Quant aux HRV, l'analyse phylogénétique a mis en exergue la co-circulation des trois groupes : HRV-A, HRV-B, HRV-C. En effet, la caractérisation moléculaire de ces pathogènes est essentielle pour la détection de l'émergence d'une nouvelle souche virale, pour la sélection des souches à prendre en compte dans le développement d'un vaccin et aussi pour la mise en place de stratégies d'intervention en santé publique (Esposito et al. 2015).

4. Aspects épidémiologiques des bactéries atypiques

La quatrième étape de notre travail a consisté à examiner l'épidémiologie des bactéries atypiques que sont *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* chez les enfants ≤ 5 ans au Burkina Faso. En effet, très peu de données existent sur le rôle joué par ces bactéries dans la survenue des infections respiratoires, en particulier dans les pays à ressources limitées. Cette situation pourrait s'expliquer par l'inaccessibilité de ces pays aux outils de la biologie moléculaire qui constituent la technique de référence pour la détection de *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* (Beersma et al. 2005). Les résultats obtenus dans notre étude, première du genre au Burkina Faso, ont montré une prévalence de 0,5% (3/584) pour chacune de ces bactéries. Malgré cette faible prévalence, ces résultats révèlent la nécessité de prendre en compte *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* dans l'étiologie des IRA. Cela est d'autant plus important dans un contexte où l'administration d'un antibiotique est systématique dans le management clinique des patients atteints d'IRA. En effet, ces bactéries atypiques, à cause du manque de la paroi bactérienne sont naturellement résistantes aux β -lactamines (Marchello et al. 2016). Dans notre étude, tous les patients infectés par l'une de ces bactéries atypiques ont reçu une antibiothérapie à base de β -lactamines (Ampicilline, Ceftriaxone) ou d'aminosides (Gentamycine). D'autrepart, l'implication de ces bactéries dans la pathogénèse et l'exacerbation de l'asthme chez les enfants et les adultes (Atkinson, 2013 ; Marchello et al. 2016) rend également important leur recherche chez les patients atteints d'IRA.

Nos données corroborent avec celles de certaines études conduites en Afrique et en Thaïlande qui ont rapporté des prévalences allant de 1,5% à 3,0% pour *M. pneumoniae* et de 0,0% à 3,0% pour *C. pneumoniae* (Lassmann et al. 2008 ; Feikin et al. 2013 ; Wertheim et al. 2015). Ces études ont été menées parmi les enfants de moins de 5 ans atteints de SG et d'IRAS. Par contre, des prévalences plus élevées (*M. pneumoniae* : 7,1% à 25,2% ; *C. pneumoniae* : 10,5% à 31,4%) ont également été reportées par plusieurs autres études (Grassi et al. 2014 ; Ravelomanana et al. 2017 ; del Valle-Mendoza et al. 2017). La différence de population d'étude pourrait être l'une des raisons expliquant ces différences de prévalences. En effet, les études

ayant reporté des prévalences plus élevées ont été conduites chez les enfants âgés de 2 à 18 ans. Selon les données de la littérature, *M. pneumoniae* est le plus souvent détecté chez les enfants d'âge scolaire (5 – 15 ans) atteints de pneumonie (Sauteur et al. 2016). Quant à *C. pneumoniae*, elle est plus fréquente chez les adultes (Marchello et al. 2016).

Dans notre étude, une coinfection avec des virus a été détectée dans 83,3% (5/6) des cas. Cette coinfection bactérienne ou virale est d'autant plus importante qu'elle contribuerait à accroître la sévérité de l'infection (Qing et al. 2015).

Tous les cas d'infection à *M. pneumoniae* ont été détectés en mars 2015 et ceux de *C. pneumoniae* entre juin et septembre 2015. Eu égard au faible nombre de cas positifs, aucune saisonnalité n'a pu être déterminée dans notre étude pour ces deux bactéries.

Le faible nombre de cas positif a été une limite dans la détermination de la tranche d'âge la plus touchée, la saisonnalité de ces bactéries ainsi que l'établissement de lien causalité entre la sévérité de l'infection et la coinfection. Du reste, ces résultats nous confirment pour la première fois, la circulation de ces bactéries atypiques au Burkina Faso parmi les enfants atteints d'infections respiratoires, dégageant également la nécessité de la mise en place d'un système national de surveillance des bactéries atypiques au Burkina Faso afin de déterminer une épidémiologie claire.

Conclusion Générale

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La présente étude a fourni des données importantes sur les étiologies des infections respiratoires aiguës chez les enfants au Burkina Faso, sur la saisonnalité et ainsi que sur les caractéristiques génétiques des pathogènes respiratoires. Les résultats ont montré que les virus influenza A et B, le HRV et le VRS constituaient les principaux agents étiologiques viraux des IRA infantiles au Burkina Faso. Cette information devrait être prise en compte par les cliniciens lors du traitement des enfants atteints d'IRA. Aussi, cette information est très utile pour les autorités sanitaires pour la conception des protocoles de prise charge. Par ailleurs, les investigations moléculaires ont montré que les souches du virus influenza A ayant circulé au Burkina au cours de la période d'étude sont en adéquation avec la composition vaccinale antigrippale pour les années 2014-2015. Celles des souches du VRS ont permis d'identifier pour la première fois au Burkina les génotypes ON1, NA1, BA9 et SAB4. Ces résultats préliminaires soulignent l'importance de la mise en place d'une surveillance sentinelle afin de suivre l'évolution des génotypes du VRS. Les informations alors générées seront très utiles pour la composition du futur vaccin. Les résultats de cette étude ont également permis de mettre en exergue le caractère saisonnier de certains pathogènes. Ainsi, les infections aux virus influenza étaient marquées par un caractère saisonnier sous forme épidémique durant les périodes de janvier-mars et septembre-octobre suggérant ainsi que début septembre serait la période propice à l'administration du vaccin. L'infection par le VRS était plus corrélée avec la saison de pluie (juin à septembre) suggérant aussi que le mois de mai serait la période idéale à l'administration du futur vaccin. Cependant d'autres études sur de longues durées sont nécessaires pour confirmer ces saisonnalités. Bien que faiblement détectés (0,5%) chez les enfants atteints de SG et d'IRAS, les résultats de cette étude nous confirment pour la première fois, la circulation de *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* au Burkina Faso. Ils soulignent également la nécessité de la prise en compte de ces bactéries dans la recherche étiologique des IRA, et la mise en place d'un système national de surveillance des bactéries atypiques afin de déterminer une épidémiologie claire. Cette étude rapporte une antibiothérapie chez environ 95,1% des patients de l'étude bien que les virus soient généralement la principale cause des IRA. Cette situation révèle la nécessité de réviser les pratiques cliniques pour une meilleure prise en charge des patients. L'éducation et la sensibilisation du personnel de santé ainsi que les parents des patients aux risques liés à la résistance aux antibiotiques seront également nécessaires pour contrôler efficacement une utilisation abusive. Elle souligne également l'urgence de la vulgarisation des outils diagnostics pour une utilisation rationnelle des

antibiotiques. Par exemple, une utilisation des tests de diagnostic rapides du VRS et des virus influenza A et B dans les CSPS permettrait d'identifier les cas d'IRA virales ou bactériennes, donc à une diminution d'utilisation des antibiotiques.

La présente étude a fourni pour la première fois au Burkina Faso, des données scientifiques pour une meilleure connaissance de l'étiologie des IRA chez les enfants au Burkina Faso. Cependant, elle révèle la nécessité d'orienter les futures études sur la recherche des voies et moyens pour une réduction de l'usage des antibiotiques dans la prise en charge des cas d'IRA. De plus, la place et le rôle des pathogènes respiratoires non inclus dans cette étude devraient être déterminés à travers de futures études. Enfin, la recherche sur les bactéries impliquées dans les IRA ainsi que leur sensibilité aux antibiotiques devront être menées afin de permettre une meilleure prise en charge des patients.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aberle JH, Aberle SW, Pracher E, Hutter HP, Kundi M, Popow-Kraupp T. (2005) Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: impact on clinical course of disease and interferon-gamma response. *Pediatr Infect Dis J*, **24**:605–10.

Agoti CN, Mwihuri AG, Sande CJ, Onyango CO, Medley GF, Cane PA, et al. (2012) Genetic relatedness of infecting and reinfecting respiratory syncytial virus strains identified in a birth cohort from rural Kenya. *The Journal of Infectious Diseases*, **206**(10):1532-41.

Allander T, Jartti T, Gupta S, Niesters HGM, Lehtinen P, Osterback T, et al. (2007) Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis*, **44**:904–10.

Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. (2005) Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci*, **102**:12891– 12896.

Alonso W, Laranjeira B, Pereira S, Florencio C, Moreno E, Miller M, et al. (2012) Comparative Dynamics, Morbidity and Mortality Burden of Pediatric Viral Respiratory Infections in an Equatorial City. *Pediatr Infect Dis J*, **31**(1):e9-14. doi: 10.1097/INF.0b013e31823883be

Amer HM, Alshaman MS, Farrag MA, Hamad ME, Alsaadi MM, Almajhdi FN. (2015) Epidemiology of 11 Respiratory RNA Viruses in a Cohort of Hospitalized Children in Riyadh, Saudi Arabia. *J Med Virol*, **88**(6):1086-91. doi: 10.1002/jmv.24435.

Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, et al. (1985) Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis*, **151**:626–633. <https://doi.org/10.1093/infdis/151.4.626>.

Ansari SA, Springthorpe VS, Sattar SA, Rivard S, Rahman M. (1991) Potential role of hands in the spread of respiratory viral infections: studies with human parainfluenza virus 3 and rhinovirus 14. *J Clin Microbiol*, **29**(10):2115–2119.

Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. (2006) Human bocavirus: prevalence and clinical spectrum at a children’s hospital. *Clin Infect Dis*, **43**:283–8.

Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. (2008) Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of Mycoplasma pneumoniae infections. *FEMS Microbiol Rev*, **32**:956–973.

Atkinson TP. (2013) Is asthma an infectious disease? New evidence. *Curr Allergy Asthma Rep*, **13**(6):702-9. doi: 10.1007/s11882-013-0390-8.

Aubry P, Gaüzère B-1 (2016). Les infections respiratoires aiguës. Diplôme de Médecine Tropicale des pays de l'Océan Indien. <http://medecinetroicale.free.fr/cours/infrespi.pdf> Consulté le 03/11/2017

Bakeera-Kitaka S, Musoke P, Downing R, Tumwine JK. (2004) Pneumocystis carinii in children with severe pneumonia at Mulago Hospital, Uganda. *Annals of Tropical Paediatrics*, **24**(3):227-35.

Barbeyrac B, Obeniche F, Ratsima E, Labrousche S, Moraté C, Renaudin H et al. (2006) Limites et perspectives du diagnostic sérologique à l'ère de l'amplification génique in vitro: infections génitales à Chlamydia trachomatis et infections respiratoires à Chlamydia pneumoniae et Mycoplasma pneumoniae. *Ann Biol Clin*, **64** (5) : 409-19

Bébéar CM, de Barbeyrac B, Pereyre S, Bébéar C. (2007) Mycoplasmes et chlamydiae : sensibilité et résistance aux antibiotiques. *Rev Franc Lab*, **392**:77–85.

Bébéar CM. (2008) Physiopathologie et diagnostic des infections à Mycoplasma pneumoniae. *Archives de pédiatrie*, **15**: 1253–1256.

Beersma M, Dirven K, van Dam A, Templeton KE, Claas EC, Goossens H. (2005) Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for *Mycoplasma pneumoniae*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the "gold standard". *J Clin Microbiol*, **43**(5):2277±85 doi: 10.1128/JCM.43.5.2277-2285.2005

Belongia EA, Sundaram ME, McClure DL, Meece JK, Ferdinands J, VanWormer JJ. (2015) Waning vaccine protection against influenza A (H3N2) illness in children and older adults during a single season. *Vaccine*; **33**(1):246-51. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.06.052.

Bénet T, Sylla M, Messaoudi M, Sánchez Picot V, Telles J-N, Diakite A-A, et al. (2015) Etiology and Factors Associated with Pneumonia in Children under 5 Years of Age in Mali: A Prospective Case- Control Study. *PLoS One*, **10**(12): e0145447. doi:10.1371/journal.pone.0145447

Bezerra PG, Britto MC, Correia JB, Duarte MdoC, Fonceca AM, Rose K, et al. (2011) Viral and bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. *PLoS One*, **6**(4):e18928. doi: 10.1371/journal.pone.0018928.

Bhuyan GS, Hossain MA, Sarker SK, Rahat A, Islam MT, Haque TN, et al. (2017) Bacterial and viral pathogen spectra of acute respiratory infections in under-5 children in hospital settings in Dhaka city. *PLoS One*, **12**(3): e0174488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174488>

Bii CC, Kose J, Taguchi H, Amukoye E, Ouko TT, Muita LC, Mugasia O, Wamae N, Kamiya S. (2006) *Pneumocystis jirovecii* and microbiological findings in children with severe pneumonia in Nairobi, Kenya. *International Journal of tuberculosis and Lung Diseases*, **10**(11):1286-91.

Bii CC, Yamaguchi H, Kai M, Nagai K, Sugiura Y, Taguchi H, Chakaya JM, et al. (2002) *Mycoplasma pneumoniae* in children with pneumonia at Mbagathi District Hospital, Nairobi. *East Afr Med J*, **79**(6):317-22.

Bil-Lula I, Ussowicz M, Rybka B, Wendycz-Domalewska D, Ryczan R, Gorczyńska E, et al. (2010) Hematuria due to adenoviral infection in bone marrow transplant recipients. *Transplant Proc*, **42**(9):3729–3734.

Bohmwald K, Espinoza JA, Rey-Jurado E, Gómez RS, González PA, Bueno SM, et al. (2016) Human Respiratory Syncytial Virus: Infection and Pathology. *Semin Respir Crit Care Med*, **37**:522–537.

Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Côté S, et al. (2002) Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis*, **186**(9):1330–1333.

Boivin G, De Serres G, Côté S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, et al. (2003) Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis*, **9**:634–40.

Bonney JH, Kronmann KC, Lindan CP, Asante IA, Parbie P, Aboagye J, et al. (2012) Virological surveillance of influenza-like illness among children in Ghana, 2008-2010. *J Infect Dis*, **206 Suppl 1**:S108-13. doi: 10.1093/infdis/jis577.

Branche AR, Falsey AR. (2016) Parainfluenza Virus Infection. *Semin Respir Crit Care Med*, **37**:538–554.

Brierley I, Bourns ME, Binns MM, Bilimoria B, Blok VC, Brown TD, et al. (1987) An efficient ribosomal frame-shifting signal in the polymerase encoding region of the coronavirus IBV. *EMBO J*, **6**:3779–85.

Broberg E, Melidou A, Prosenc K, Bragstad K, Hungnes O, et al. (2016) Predominance of influenza A(H1N1)pdm09 virus genetic subclade 6B.1 and influenza B/Victoria lineage viruses at the start of the 2015/16 influenza season in Europe. *Euro Surveill*, **21**(13). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.13.30184.

Buecher C, Mardy S, Wang W, Duong V, Vong S, Naughtin M, et al. (2010) Use of a multiplex PCR/RT-PCR approach to assess the viral causes of influenza-like illnesses in Cambodia during three consecutive dry seasons. *J Med Virol*, **82**(10):1762-72. doi: 10.1002/jmv.21891.

Cabeça TK, Granato C, Bellei N. (2013) Epidemiological and clinical features of human coronavirus infections among different subsets of patients. *Influenza Other Respir Viruses*, **7**:1040–7. doi:10.1111/irv.12101.

Catalano-Pons C, Vallet C, Lebon P, Gendrel D. (2009) Infections à Bocavirus humain. *Médecine et maladies infectieuses*, **39**: 353–355.

Centers for Disease Control and Prevention. Influenza (flu). 2016. <https://www.cdc.gov/flu/index.htm> (Consulté le 29/12/2017)

Chan, AB and Fox JD. (1999) NASBA and other transcription-based amplification methods for research and diagnostic microbiology. *Reviews Med. Microbiol*, **10**:185–196.

Chang SY, Lee CN, Lin PH, Huang HH, Chang LY, Ko W, et al. (2008) A community-derived outbreak of adenovirus type 3 in children in Taiwan between 2004 and 2005. *J Med Virol*, **80**(1):102–112.

Chanock RM, Roizman B, Myers R. (1957) Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). Isolation properties and characterization. *Am J Hyg*, **66**: 281–290.

Chanock RM. (1956) Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup. *J Exp Med*, **104**(4):555–576.

Chen WJ, Arnold JC, Fairchok MP, Danaher PJ, McDonough EA, Blair PJ, et al. (2015) Epidemiologic, clinical, and virologic characteristics of human rhinovirus infection among otherwise healthy children and adults: rhinovirus among adults and children. *J Clin Virol*, **64**:74e82.

Cheuk DK, Tang IW, Chan KH, Woo PC, Peiris MJ, Chiu SS. (2007) Rhinovirus infection in hospitalized children in Hong Kong: a prospective study. *Pediatr Infect Dis J*, **26**(11): 995e1000.

Chew FT, Doraisingham S, Ling AE, Kumarasinghe G, Lee BW. (1998) Seasonal trends of viral respiratory tract infections in the tropics. *Epidemiol Infect*, **121**(1):121–128.

Cho GS, Moon BJ, Lee BJ, Gong CH, Kim NH, Kim YS, et al. (2013) High rates of detection of respiratory viruses in the nasal washes and mucosae of patients with chronic rhinosinusitis. *J Clin Microbiol*, **51**(3):979e84.

Collins PL, Graham BS. (2008) Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol*, **82**(5):2040–2055.

Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, Mukha DV, Pintel DJ, Qiu J, et al. (2014) The family Parvoviridae. *Arch Virol*, **159**:1239–47. doi: 10.1007/s00705-013-1914-1 PMID: 24212889.

Counihan ME, Shay DK, Holman RC, Lowther SA, Anderson LJ. Human parainfluenza virus-associated hospitalizations among children less than five years of age in the United States. *Pediatr Infect Dis J*, **20**(7):646–653.

Calvo C, Pozo F, García-García ML, Sanchez M, Lopez-Valero M, Pérez-Breña P, et al. (2010) Detection of new respiratory viruses in hospitalized infants with bronchiolitis: a three-year prospective study. *Acta Paediatr*, **99**(6):883-7. doi: 10.1111/j.1651-2227.2010.01714.x.

Chaves SS, Perez A, Farley MM, Miller L, Schaffner W, Lindegren ML, et al. (2014) The burden of influenza hospitalizations in infants from 2003 to 2012, United States. *Pediatr Infect Dis J*, **33**(9):912-9. doi: 10.1097/INF.0000000000000321.

Chen ZR, Ji W, Wang YQ, Yan YD, Shao XJ, Zhang XL et al. (2014) Etiology of acute bronchiolitis and the relationship with meteorological conditions in hospitalized infants in China. *J Formos Med Assoc*, **113**(7):463-9. doi: 10.1016/j.jfma.2012.12.013.

Cohen C, Walaza S, Moyes J, Groome M, Tempia S, Pretorius M, et al. (2015) Epidemiology of viral-associated acute lower respiratory tract infection among children <5 years of age in a high HIV prevalence setting, South Africa, 2009-2012. *The Pediatric infectious disease journal*, **34**(1):66-72.

Deiman B, van Aarle P, Sillekens P (2002) Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Mol Biotechnol* **20** (2):163-79.

del Valle-Mendoza J, Orellana-Peralta F, Marcelo-Rodríguez A, Verne E, Esquivel-Vizcarra M, Silva-Caso W, et al. (2017) High Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in Children with Acute Respiratory Infections from Lima, Peru. *PLoS One*, **12**(1): e0170787. doi:10.1371/journal.pone.0170787

Delport SD, Brisley T. (2002) Aetiology and outcome of severe community-acquired pneumonia in children admitted to a paediatric intensive care unit. *S Afr Med J*, **92**(11):907-11.

Deng J, Ma Z, Huang W, Li C, Wang H, Zheng Y, et al. (2013) Respiratory virus multiplex RT-PCR assay sensitivities and influence factors in hospitalized children with lower respiratory tract infections. *Virol Sin*, **28**: 97–102. doi: 10.1007/s12250-013-3312-y.

Denny FW, Murphy TF, Clyde WA Jr, Collier AM, Henderson FW. (1983) Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics*, **71**(6):871–876.

de-Paris F, Beck C, Machado AB, Paiva RM, da Silva Menezes D, de Souza Nunes L, et al. (2012) Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods*, **186**: 189–192. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.07.008>.

Dumke R, Schnee C, Pletz MW, Rupp J, Jacobs E, Sachse K, et al. (2015) *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia spp.* infection in community-acquired pneumonia, Germany, 2011-2012. *Emerg Infect Dis*, **21**(3):426-34. doi: 10.3201/eid2103.140927.

Eaton MD, Meikejohn G, Van Herick W. (1944) Studies on the etiology of primary atypical pneumonia: a filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chick embryos. *J Exp Med*, **79**: 649–667.

Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG, et al. (2013) New Vaccine Surveillance Network. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *N Engl J Med*, **368**(7):633–643.

Elfving K, Shakely D, Andersson M, Baltzell K, Ali AS, Bachelard M, et al. (2016) Acute Uncomplicated Febrile Illness in Children Aged 2-59 months in Zanzibar - Aetiologies, Antibiotic Treatment and Outcome. *PLoS One*, **11**(1):e0146054.

Endo R, Ishiguro N, Kikuta H, Teramoto S, Shirkoohi R, Ma X, et al. (2007) Seroepidemiology of human bocavirus in Hokkaido prefecture, Japan. *J Clin Microbiol*, **45**:3218–23.

Esposito S, Mastrolia MV. (2016) Metapneumovirus Infections and Respiratory Complications. *Semin Respir Crit Care Med*, **37**:512–521. doi: 10.1055/s-0036-1584800.

Esposito S, Piralla A, Zampiero A, Bianchini S, Di Pietro G, Scala A, et al. (2015) Characteristics and Their Clinical Relevance of Respiratory Syncytial Virus Types and Genotypes Circulating in Northern Italy in Five Consecutive Winter Seasons. *PLoS One*, **10**(6): e0129369. doi:10.1371/journal.pone.0129369

Feikin DR, Njenga MK, Bigogo G, Aura B, Aol G, Audi A, et al. (2013) Viral and Bacterial Causes of Severe Acute Respiratory Illness Among Children Aged Less Than 5 Years in a High Malaria Prevalence Area of Western Kenya, 2007–2010. *Pediatr Infect Dis J*, **32**(1):e14-9. doi: 10.1097/INF.0b013e31826fd39b.

Feng L, Li Z, Zhao S, Nair H, Lai S, Xu W, et al. (2014) Viral Etiologies of Hospitalized Acute Lower Respiratory Infection Patients in China, 2009-2013. *PLoS One*, **9**(6): e99419. doi:10.1371/journal.pone.0099419

Feuillet F, Rosa-Calatrava M, Boivin G. (2011) Le métapneumovirus humain, le point dix années après sa découverte. Caractéristiques génomiques, virologiques et avancées thérapeutiques. *Virologie*, **15**(4) : 235-50. doi:10.1684/vir.2011.0411

Filho EP, da Costa Faria NR, Fialho AM, de Assis RS, Almeida MM, Rocha M, et al. (2007) Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *J Med Microbiol*, **56**(Pt 3):313–319.

Foulongne V, Segondy M. (2009) Le bocavirus humain (HBoV). *Pathologie Biologie*, **57**:197–202.

Freytmuth F, Vabret A, Legrand L, Lebon P, Bach N, Brouard J, Guillois B. (2004) Le métapneumovirus humain. *Virologie*, **8**(6) : 413-23.

Freytmuth F. (2004) Virus syncytial respiratoire et virus parainfluenza humains : épidémiologie. *EMC-Pédiatrie*, **1**: 2–11.

Frobert E, Escuret V, Javouhey E, Casalegno JS, Bouscambert-Duchamp M, Moulinier C, et al. (2011) Respiratory viruses in children admitted to hospital intensive care units: evaluating the CLART(R) Pneumovir DNA array. *J Med Virol*, **83**: 150–155. doi: 10.1002/jmv.21932

Fry AM, Curns AT, Harbour K, Hutwagner L, Holman RC, Anderson LJ. (2006) Seasonal trends of human parainfluenza viral infections: United States, 1990-2004. *Clin Infect Dis*, **43**(8):1016–1022.

Gaunt ER, Hardie A, Claas ECJ, Simmonds P, Templeton KE. (2010) Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method. *J Clin Microbiol*, **48**:2940–7. doi:10.1128/JCM.00636-10.

Gendrel D, Guedj R, Pons-Catalano C, Emerian A, Raymond J, Rozenberg F, et al. (2007) Human bocavirus in children with asthma. *Clin Infect Dis*, **45**:404.

George SN, Garcha DS, Mackay AJ, Patel AR, Singh R, Sapsford RJ, et al. (2014) Human rhinovirus infection during naturally occurring COPD exacerbations. *Eur Respir J*, **44**(1):87e96.

Gerna G, Percivalle E, Sarasini A, Campanini G, Piralla A, Rovida F, et al. (2007) Human respiratory coronavirus HKU1 versus other coronavirus infections in Italian hospitalised patients. *J Clin Virol*, **38**:244–50. doi:10.1016/j.jcv.2006.12.008.

Gilbert BE, Knight V. (1986) Biochemistry and clinical applications of ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother*, **30**(2):201–205.

Glanville N, McLean GR, Guy B, Lecouturier V, Berry C, Girerd Y, et al. (2013) Cross-serotype immunity induced by immunization with a conserved rhinovirus capsid protein. *PLoS Pathog*, **9**(9):e1003669.

Grassi T, Mancini F, Ciervo A, Vescio MF, Ghazal A, Ashour H, et al. (2014) *Chlamydomydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and influenza in children with respiratory infections in Alexandria, Egypt. *J Infect Dev Ctries*, **8**(3):379-83. doi: 10.3855/jidc.4458.

Grayston JT, Kuo CC, Wang SP, Altman T. (1986) A new Chlamydia psittaci strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections. *N Engl J Med* **315**:161-168.

Greenberg SB. (2011) Update on rhinovirus and coronavirus infections. *Semin Respir Crit Care Med*, **32**(4):433–446.

Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. (2017) Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin Microbiol Rev*, **30**(1):277-319.

Hacking D, Hull J. (2002) Respiratory syncytial virus—viral biology and the host response. *J Infect*, **45**(1):18–24.

Hamada N, Gotoh K, Hara K, Iwahashi J, Imamura Y, Nakamura S, et al. (2008) Nosocomial outbreak of epidemic keratoconjunctivitis accompanying environmental contamination with adenoviruses. *J Hosp Infect*, **68**(3): 262–268.

Hammitt LL, Kazungu S, Morpeth SC, Gibson DG, Mvera B, Brent AJ, et al. (2012) A preliminary study of pneumonia etiology among hospitalized children in Kenya. *Clinical infectious diseases*, **54 Suppl 2**:S190-9.

Hamre D, Kindig DA, Mann J. (1967) Growth and Intracellular Development of a New Respiratory Virus. *J Virol*, **1**:810–6.

Heikkinen T, Salmi AA, Ruuskanen O. (2001) Comparative study of nasopharyngeal aspirate and nasal swab specimens for detection of influenza. *BMJ* **322**:138.

Hirsch HH, Martino R, Ward KN, Boeckh M, Einsele H, Ljungman P. (2013) Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus. *Clin Infect Dis*, **56**(2):258–266.

Hirve S, Newman LP, Paget J, Azziz-Baumgartner E, Fitzner J, Bhat N et al. (2016) Influenza Seasonality in the Tropics and Subtropics - When to Vaccinate? *PLoS One*, **11**(4):e0153003. doi: 10.1371/journal.pone.0153003.

Hiscox JA, Wurm T, Wilson L, Britton P, Cavanagh D, Brooks G. (2001) The Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Nucleoprotein Localizes to the Nucleolus. *J Virol*, **75**:506–12. doi:10.1128/JVI.75.1.506-512.2001.

Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. (2001) Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol*, **146**(12):2275-89.

Homaira N, Luby SP, Hossain K, Islam K, Ahmed M, Rahman M, et al. (2016) Respiratory Viruses Associated Hospitalization among Children Aged < 5 Years in Bangladesh: 2010-2014. *PLoS One*, **11**(2): e0147982. doi:10.1371/journal.pone.0147982

Homaira N, Luby SP, Petri WA, Vainionpaa R, Rahman M, Hossain K, et al. (2012) Incidence of respiratory virus-associated pneumonia in urban poor young children of Dhaka, Bangladesh, 2009–2011. *PLoS One*, **7**(2):e32056. doi: 10.1371/journal.pone.0032056

Houser K, Subbarao K. (2015) Influenza vaccines: challenges and solutions. *Cell Host Microbe*, **17**: 295–300.

Howie SRC, Morris GAJ, Tokarz R, Ebruke BE, Machuka EM, Ideh RC, et al. (2014) Etiology of Severe Childhood Pneumonia in The Gambia, West Africa, Determined by Conventional and Molecular Microbiological Analyses of Lung and Pleural Aspirate Samples. *Clinical Infectious Diseases*, **59**(5):682-5.

Huguenin A, Moutte L, Renois E, Leveque N, Talmud D, Abely M, et al. (2012) Broad respiratory virus detection in infants hospitalized for bronchiolitis by use of a multiplex RT-PCR DNA microarray system. *J Med Virol*, **84**(6):979-85. doi: 10.1002/jmv.23272.

Huong Ple T, Hien PT, Lan NT, Binh TQ, Tuan DM, Anh DD. (2014) First report on prevalence and risk factors of severe atypical pneumonia in Vietnamese children aged 1–15 years. *BMC Public Health*, **14**:1304. doi: 10.1186/1471-2458-14-1304.

Hussey GD, Apolles P, Arendse Z, Yeates J, Robertson A, Swingler G, et al. (2000) Respiratory syncytial virus infection in children hospitalised with acute lower respiratory tract infection. *S Afr Med J*, **90**(5):509-12.

Institut National de la Statistique et de la Démographie (INSD) 2010. Enquête Démographique et de Santé et à Indicateurs Multiples (EDS). Accessible: <http://www.dhsprogram.com/pubs/pdf/FR256/FR256.pdf> Consulté le 19/09/2017

Ishiko H, Aoki K. (2009) Spread of epidemic keratoconjunctivitis due to a novel serotype of human adenovirus in Japan. *J Clin Microbiol*, **47**(8):2678–2679.

Ison MG. (2006) Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis*, **43**(3):331–339.

Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. (2015) Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. *N Engl J Med*, **373**(5):415e27.

Janahi I, Abdulkayoum A, Almshwesh F, Alkuwari M, Al Hammadi A, Alameri M. (2017) Viral aetiology of bronchiolitis in hospitalised children in Qatar. *BMC Infectious Diseases*, **17**:139. doi: 10.1186/s12879-017-2225-z.

Jartti T, Hedman K, Jartti L, Ruuskanen O, Allander T, Söderlund-Venermo M. (2012) Human bocavirus—the first 5 years. *Rev Med Virol*, **22**: 46–64. doi: 10.1002/rmv

Jean A, Quach C, Yung A, Semret M. (2013) Severity and Outcome Associated With Human Coronavirus OC43 Infections Among Children. *Pediatr Infect Dis J*, **32**:325–9. doi:10.1097/INF.0b013e3182812787.

Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. (2004) Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. *Pediatr Infect Dis J*, **23**:1003–1007.

Johnson AW, Osinusi K, Aderele WI, Gbadero DA, Olaleye OD, Adeyemi-Doro FA. (2008) Etiologic agents and outcome determinants of community-acquired pneumonia in urban children: a hospital-based study. *J Natl Med Assoc*, **100**(4):370-85.

Kadjo HA, Ekaza E, Coulibaly D, Kouassi DP, Nzussouo NT, Kouakou B, et al. (2013) Sentinel surveillance for influenza and other respiratory viruses in Cote d'Ivoire, 2003-2010. *Influenza Other Respir Viruses*, **7**(3):296-303. doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.00389.x.

Katz MA, Schoub BD, Heraud JM, Breiman RF, Njenga MK, Widdowson MA. (2012) Influenza in Africa: uncovering the epidemiology of a long-overlooked disease. *J Infect Dis*, **206 Suppl 1**:S1-4. doi: 10.1093/infdis/jis548.

Kelly MS, Smieja M, Luinstra K, Wirth KE, Goldfarb DM, Steenhoff AP, et al. (2015) Association of Respiratory Viruses with Outcomes of Severe Childhood Pneumonia in Botswana. *Plos One*, **10**(5):e0126593.

Kenmoe S, Tchendjou P, Vernet MA, Moyo-Tetang S, Mossus T, Njankouo-Ripa M, et al. (2016) Viral etiology of Severe Acute Respiratory Infections in hospitalized children in Cameroon, 2011-2013. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, **10**(5), 386–393. doi: 10.1111/irv.12391.

Khor C, Sam I, Hooi P, Quek K, Chan Y. (2012) Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. *BMC Pediatr*, **12**:1–9. doi: 10.1186/1471-2431-12-32.

Kim C, Nyoka R, Ahmed JA, Winchell JM, Mitchell SL, Kariuki Njenga M, et al. (2012) Epidemiology of respiratory infections caused by atypical bacteria in two Kenyan refugee camps. *J Immigr Minor Health*, **14**(1):140-5. doi: 10.1007/s10903-011-9494-1.

Kim SM, Kim YI, Pascua PN, Choi YK. (2016) Avian Influenza A Viruses: Evolution and Zoonotic Infection. *Semin Respir Crit Care Med*, **37**:501–511.

Kim Y-J, Boeckh M, Englund JA. (2007) Community respiratory virus infections in immunocompromised patients: hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients, and individuals with human immunodeficiency virus infection. *Semin Respir Crit Care Med*, **28**(2):222–242.

Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS. (2003) The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol*, **13**(3):155–171.

Korsun N, Angelova S, Tzotcheva I, Georgieva I, Lazova S, Parina S et al. (2017) Prevalence and genetic characterisation of respiratory syncytial viruses circulating in Bulgaria during the 2014/15 and 2015/16 winter seasons. *Pathogens and Global Health*, **111**(7):351-361. doi: 10.1080/20477724.2017.1375708

Krause JC, Panning M, Hengel H, Henneke P. (2014) The role of multiplex PCR in respiratory tract infections in children. *Dtsch Arztebl Int*, **111**(38):639-45. doi: 10.3238/arztebl.2014.0639.

Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Ukae S, Mori T, Hotsubo T. (2004) Comparison of an immunochromatography test with multiplex reverse transcription-PCR for rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections. *J Clin Microbiol* **42**:4812–4.

Kwofie TB, Anane YA, Nkrumah B, Annan A, Nguah SB, Owusu M. (2012) Respiratory viruses in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection in Ghana. *Virol J*, **9**:78. doi: 10.1186/1743-422X-9-78.

Lachiewicz AM, Cianciolo R, Miller MB, Derebail VK. (2014) Adenovirus causing fever, upper respiratory infection, and allograft nephritis complicated by persistent asymptomatic viremia. *Transpl Infect Dis*, **16**(4):648–652.

Lagare A, Mainassara HB, Issaka B, Sidiki A, Tempia S. (2015) Viral and bacterial etiology of severe acute respiratory illness among children < 5 years of age without influenza in Niger. *BMC Infect Dis*, **15**:515. doi: 10.1186/s12879-015-1251-y.

Lanari M, Vandini S, Faldella G. (2014) Human Respiratory Syncytial Virus Infections. In: Sunit K. Singh. Human Respiratory Viral Infection. *CRC Press*, p. 662.

Lanaspa M, O'Callaghan-Gordo C, Machevo S, Madrid L, Nhampossa T, Acácio S, et al. (2015). High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among Mozambican children <5 years of age admitted to hospital with clinical severe pneumonia. *Clinical Microbiology and Infection*, **21**(11): e9-e15.

Lassmann B, Poetschke M, Ninteretse B, Issifou S, Winkler S, Kremsner PG, et al. (2008) Community-acquired Pneumonia in Children in Lambarene, Gabon. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, **79**(1):109–114.

Lau SK, Yip CC, Lin AW, Lee RA, So LY, Lau YL, et al. (2009) Clinical and molecular epidemiology of human rhinovirus C in children and adults in Hong Kong reveals a possible distinct human rhinovirus C subgroup. *J Infect Dis*, **200**(7): 1096e103.

Lau SKP, Yip CCY, Que T, Lee RA, Au-Yeung RKH, Zhou B, et al. (2007) Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. *J Infect Dis*, **196**: 986–93.

Lee J, Choi EH, Lee HJ. (2010) Comprehensive serotyping and epidemiology of human adenovirus isolated from the respiratory tract of Korean children over 17 consecutive years (1991-2007). *J Med Virol*, **82**(4):624–631.

Lee JI, Chung J, Han TH, Song M, Hwang E. (2007) Detection of human bocavirus in children hospitalized because of gastroenteritis. *J Infect Dis*, **196**:994–7.

Lekana-Douki SE, Nkoghe D, Drosten C, Ngougou EB, Drexler JF, Leroy EM. (2014) Viral etiology and seasonality of influenza-like illness in Gabon, March 2010 to June 2011. *BMC Infect Dis*, **14**:373. doi: 10.1186/1471-2334-14-373.

Leland DS, Ginocchio CC. (2007) Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev*, **20**(1):49–78.

Leruez-Ville M. (2007) Diagnostic virologique des infections respiratoires. *Archives de pédiatrie*, **14**: 404–409.

Lim FJ, Wake ZV, Levy A, Tempone S, Moore HC, Richmond PC, et al. (2016) Viral Etiology and the Impact of Codetection in Young Children Presenting With Influenza-Like Illness. *J Pediatric Infect Dis Soc*, **6**(3):260-266. doi: 10.1093/jpids/piw042.

Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, et al. (2012) Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *The Lancet*, 379(9832): p. 2151-2161. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60560-1

Ljubin-Sternak S, Marijan T, Ivković-Jureković I, Čepin-Bogović J, Gagro A, Vraneš J. (2016) Etiology and Clinical Characteristics of Single and Multiple Respiratory Virus Infections Diagnosed in Croatian Children in Two Respiratory Seasons. *Journal of Pathogens*, **21**:687-80. doi: 10.1155/2016/2168780.

Low D. (2008) Reducing antibiotic use in influenza: challenges and rewards. *Clin Microbiol Infect*, **14**(4): 298-306.

Lu X, Erdman DD. (2006) Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Arch Virol*, **151**(8):1587–1602.

Luksić I, Kearns PK, Scott F, Rudan I, Campbell H, Nair H. (2013) Viral etiology of hospitalized acute lower respiratory infections in children under 5 years of age – a systematic review and meta-analysis. *Croat Med J*, **54**:122–134.

Lynch JP III, Fishbein M, Echavarria M. (2011) Adenovirus. *Semin Respir Crit Care Med*, **32**(4):494–511.

Lynch JP III, Kajon AE. (2016) Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin Respir Crit Care Med*, **37**:586–602.

Madhi SA, Kuwanda L, Cutland C, Klugman KP. (2005) The Impact of a 9-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine on the Public Health Burden of Pneumonia in HIV-Infected and -Uninfected Children. *Clinical infectious diseases*, **40** (2005): 1511-1518.

Madhi SA, Ramasamy N, Petersen K, Madhi A, Klugman KP. (2002) Severe lower respiratory tract infections associated with human parainfluenza viruses 1-3 in children infected and noninfected with HIV type 1. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, **21**(7):499-505.

Madisch I, Wölfel R, Harste G, Pommer H, Heim A. (2006) Molecular identification of adenovirus sequences: a rapid scheme for early typing of human adenoviruses in diagnostic samples of immunocompetent and immunodeficient patients. *J Med Virol*, **78**(9):1210–1217.

Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, de Graaf M, et al. (2004) Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol*, **42**(3):981–986.

Mainassara HB, Lagare A, Tempia S, Sidiki A, Issaka B, Abdou Sidikou B, et al. (2015) Influenza Sentinel Surveillance among Patients with Influenza-Like-Illness and Severe Acute Respiratory Illness within the Framework of the National Reference Laboratory, Niger, 2009-2013. *PLoS One*, **10**(7):e0133178. doi: 10.1371/journal.pone.0133178.

Mäkelä MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, et al (1998). Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol*, **36**(2):539–542.

Maman I, Badziclou K, Landoh ED, Halatoko AW, Nzussouo TN, Defang GN, et al. (2014) Implementation of influenza-like illness sentinel surveillance in Togo. *BMC Public Health*, **14**:981. doi: 10.1186/1471-2458-14-981.

Marchello C, Dale AP, Thai TN, Han DS, Ebell MH. (2016) Prevalence of Atypical Pathogens in Patients With Cough and Community-Acquired Pneumonia: A Meta-Analysis. *Ann Fam Med*, **14**(6):552-566. doi: 10.1370/afm.1993.

Martin ET, Kuypers J, McRoberts JP, Englund JA, Zerr DM. (2015) Human bocavirus 1 primary infection and shedding in infants. *J Infect Dis*, **212**(4):516-24. doi: 10.1093/infdis/jiv044

McDonagh M, Peterson K, Winthrop K, Cantor A, Holzhammer B, Buckley DI. (2016) Improving Antibiotic Prescribing for Uncomplicated Acute Respiratory Tract Infections. *Rockville* (MD).

McIntosh K, Dees JH, Becker WB, Kapikian AZ, Chanock RM. (1967) Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc Natl Acad Sci*, **57**:933–40.

McMorrow ML, Wemakoy EO, Tshilobo JK, Emukule GO, Mott JA, Njuguna H, et al. (2015) Severe Acute Respiratory Illness Deaths in Sub-Saharan Africa and the Role of Influenza: A Case Series From 8 Countries. *J Infect Dis*, **212**(6):853-60. doi: 10.1093/infdis/jiv100.

Michelow IC, Olsen K, Lozano J, Rollins NK, Duffy LB, Ziegler T, et al. (2004) Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics*, **113**(4):701-7.

Ministère de l'Economie et du Développement. Recensement général de la population et de l'habitat (RGPH) 2006 du Burkina Faso. Accessible http://www.insd.bf/documents/publications/insd/publications/resultats_enquetes/autres_enq/Resultats_definitifs_RGPH_2006.pdf Consulté le 19/09/2017

Ministère de la santé Burkina Faso. Annuaire statistique de santé 2015 Burkina Faso. 2017. Available from: http://cns.bf/IMG/pdf/annuaire_ms_2015_signe.pdf

Ministère de la Santé. (2016) Tableau de Bord 2016 des indicateurs de santé. Accessible <http://www.sante.gov.bf/index.php> Consulté le 3/11/2017

Moscona A. (2005) Entry of parainfluenza virus into cells as a target for interrupting childhood respiratory disease. *J Clin Invest*, **115**(7):1688–1698.

Mubareka S, Louie L, Wong H, Granados A, Chong S, Luinstra K, et al. (2013) Co-circulation of multiple genotypes of human rhinovirus during a large outbreak of respiratory illness in a veterans' long-term care home. *J Clin Virol*, **58**(2):455e60.

Naesens L, Lenaerts L, Andrei G, Snoeck R, Van Beers D, Holy A, et al. (2005) Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**(3):1010–1016.

Nair H, Brooks WA, Katz M, Roca A, Berkley JA, Madhi SA, et al. (2011) Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, **378**(9807):1917-30. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61051-9.

Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, **375**(9725):1545–1555.

Nair H, Simões EA, Rudan I, Gessner BD, Azziz-Baumgartner E, Zhang JS et al. (2013) Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *The Lancet*, **381**(9875): 1380–1390. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61901-1

Nantanda R, Hildenwall H, Peterson S, Kaddu-Mulindwa D, Kalyesubula I, Tumwine JK. (2008) Bacterial aetiology and outcome in children with severe pneumonia in Uganda. *Ann Trop Paediatr*, **28**(4):253-60.

Nelson MI, Njouom R, Viboud C, Niang MN, Kadjo H, Ampofo W, et al. (2014) Multiyear persistence of 2 pandemic A/H1N1 influenza virus lineages in West Africa. *J Infect Dis*, **210**(1):121-5.

Ng DL, Hosani FA, Keating MK, Gerber SI, Jones TL, Metcalfe MG, et al. (2016) Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Findings of a Fatal Case of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in the United Arab Emirates, April 2014. *Am J Pathol*, **186**:652–8. doi:10.1016/j.ajpath.2015.10.024.

Niang MN, Diop OM, Sarr FD, Goudiaby D, Malou-Sompy H, Ndiaye K, et al. (2010) Viral etiology of respiratory infections in children under 5 years old living in tropical rural areas of Senegal: The EVIRA project. *J Med Virol*, **82**(5):866-72.

Njouom R, Yekwa EL, Cappy P, Vabret A, Boisier P, Rousset D. (2012) Viral Etiology of Influenza-Like Illnesses in Cameroon, January–December 2009. *J Infect Dis*, **206 Suppl 1**:S29-35. doi: 10.1093/infdis/jis573.

Njouom R, Komurian-Pradel F, Javouhey E, Perret M, Rajoharison A, Bagnaud A, et al. (2008) The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*, **27**(3):213-7. doi: 10.1097/INF.0b013e31815b4935.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* **28**(12):E63.

Nunes MC, Kuschner Z, Rabede Z, Madimabe R, Van Niekerk N, et al. (2014) Clinical Epidemiology of Bocavirus, Rhinovirus, Two Polyomaviruses and Four Coronaviruses in HIV-Infected and HIV-Uninfected South African Children. *Plos One*, **9**(2):e86448.

O'Callaghan-Gordo C*, Diez-Padriza N, Abacassamo F, Perez-Brena P, Casas I, Alonso PL, et al. (2011) Viral acute respiratory infections among infants visited in a rural hospital of southern Mozambique. *Tropical medicine & international health*, **16**(9):1054-60.

O'Callaghan-Gordo C, Bassat Q, Morais L, Diez-Padrisa N, Machevo S, Nhampossa T, et al. (2011) Etiology and epidemiology of viral pneumonia among hospitalized children in rural Mozambique: a malaria endemic area with high prevalence of human immunodeficiency virus. *The Pediatric infectious disease journal*, **30**(1):39-44.

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). (2016) Grippe saisonnière, Aide-mémoire n°211. Novembre 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/fr/> Consulté le 03/11/2017

Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Les 10 principales causes de mortalité dans le monde. Janvier 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/fr/> Consulté le 03/11/2017

Ouédraogo S, Traoré B, Nene Bi ZA, Yonli FT, Kima D, Bonané P, et al. (2014) Viral etiology of respiratory tract infections in children at the pediatric hospital in Ouagadougou (Burkina Faso). *PLoS One*, **9**(10):e110435.

Palese P, Shaw ML. (2007) Orthomyxoviridae: the virus and their replication. **In:** Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia, PA: LippincottWilliams &Wilkins; p.1647–1690.

Panda S, Mohakud NK, Pena L, Kumar S. (2014) Human metapneumovirus: review of an important respiratory pathogen. *Int J Infect Dis*, **25**:45–52.

Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, Richard N, Vernet G, Lina B, Floret D. (2008) Mixed respiratory virus infections. *J Clin Virol*, **43**(4):407-10. doi: 10.1016/j.jcv.2008.08.010.

Paules C, Subbarao K. (2017) Influenza. *The Lancet*; **390**(10095):697-708. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30129-0.

Peiris JSM, Guan Y, Yuen KY. (2004) Severe acute respiratory syndrome. *Nat Med*, **10**:S88–97. doi:10.1038/nm1143.

Peteranderl C, Herold S, Schmoltdt C. (2016) Human Influenza Virus Infections. *Semin Respir Crit Care Med*, **37**:487–500.

Piralla A, Rovida F, Campanini G, Rognoni V, Marchi A, Locatelli F, et al. (2009) Clinical severity and molecular typing of human rhinovirus C strains during a fall outbreak affecting hospitalized patients. *J Clin Virol*, **45**(4):311e7.

Prasso JE, Deng JC. (2017) Postviral Complications: Bacterial Pneumonia. *Clin Chest Med*, **38**(1):127-138.

Pretorius MA, Tempia S, Walaza S, Cohen AL, Moyes J, Variava E. (2016) The role of influenza, RSV and other common respiratory viruses in severe acute respiratory infections and

influenza-like illness in a population with a high HIV sero-prevalence, South Africa 2012–2015. *J Clin Virol*, **75**:21–6. doi: 10.1016/j.jcv.2015.12.004.

Qing S, Bao-Ping X, Shen K. (2015) Effects of bacterial and viral co-infections of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children: analysis report from Beijing Children's Hospital between 2010 and 2014. *Int J Clin Exp*, **8**(9):15666±15674.

Rabon-Stith KM, McGuiness CB, Saunders B, Edelman L, Kumar VR, Boron ML. (2013) Laboratory testing trends for respiratory syncytial virus, 2007–2011. *J Clin Virol*, **58**:575–578. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.09.012>.

Raulston JE. (1995) Chlamydial envelope components and pathogen host cell interactions: a micro review. *Mol Microbiol*, **15** (suppl 4): 607–16.

Ravelomanana L, Bouazza N, Rakotomahefa M, Andrianirina AZ, Robinson AL, Raobidjaona H, et al. (2017) Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* Infection in Malagasy Children. *Pediatr Infect Dis J*, **36**(5):467–471. doi: 10.1097/INF.0000000000001471.

Razanajatovo NH1, Richard V, Hoffmann J, Reynes JM, Razafitrimo GM, Randremanana RV, et al. (2011) Viral etiology of influenza-like illnesses in Antananarivo, Madagascar, July 2008 to June 2009. *PLoS One*, **6**(3):e17579. doi: 10.1371/journal.pone.0017579.

Reese SM, Thompson M, Price CS, Young HL. (2016) Evidence of nosocomial transmission of human rhinovirus in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control*, **44**(3): 355e7.

Ren L, Xiang Z, Guo L, Wang J. (2012) Viral infections of the lower respiratory tract. *Curr Infect Dis Rep*, **14**:284–291.

Rhedin S, Lindstrand A, Rotzén-Östlund M, Tolfvenstam T, Ohrmalm L, Rinder MR et al. (2014) Clinical Utility of PCR for Common Viruses in Acute Respiratory Illness. *Pediatrics*. **133**(3):e538–45. doi: 10.1542/peds.2013-3042.

Richard SA, Viboud C, Miller MA. (2010) Evaluation of Southern Hemisphere influenza vaccine recommendations. *Vaccine*, **28**(15):2693–9. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.01.053.

Richter J, Panayiotou C, Tryfonos C, Koptides D, Koliou M, Kalogirou N, et al. (2016) Aetiology of Acute Respiratory Tract Infections in Hospitalised Children in Cyprus. *PLoS One*, **11**(1): e0147041. doi:10.1371/journal.pone.0147041

Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB. (2008) Complications of viral influenza. *Am J Med*, **121**: 258–64.

Russell KL, Hawksworth AW, Ryan MA, Strickler J, Irvine M, Hansen CJ, et al. (2006) Vaccine-preventable adenoviral respiratory illness in US military recruits, 1999-2004. *Vaccine*, **24**(15):2835–2842.

Rux JJ, Burnett RM. (2004) Adenovirus Structure. *Human Gene Therapy*, **15**:1167–1176.

Salmi A, Ziola B, Hovi T, Reunanen M. (1982) Antibodies to coronaviruses OC43 and 229E in multiple sclerosis patients. *Neurology*, **32**:292–5.

Sanchez JL, Binn LN, Innis BL, Reynolds RD, Lee T, Mitchell-Raymundo F, et al. (2001) Epidemic of adenovirus induced respiratory illness among US military recruits: epidemiologic and immunologic risk factors in healthy, young adults. *J Med Virol*, **65**(4):710–718.

Sanchez MP, Erdman DD, Torok TJ, Freeman CJ, Matyas BT. (1997) Outbreak of adenovirus 35 pneumonia among adult residents and staff of a chronic care psychiatric facility. *J Infect Dis*, **176**(3):760–763.

Sarantis H, Johnson G, Brown M, Petric M, Tellier R. (2004) Comprehensive detection and serotyping of human adenoviruses by PCR and sequencing. *J Clin Microbiol*, **42**(9):3963–3969.

Schwarz NG, Sarpong N, Hunger F, Marks F, Acquah SE, Agyekum A, et al. (2010) Systemic bacteraemia in children presenting with clinical pneumonia and the impact of non-typhoid salmonella (NTS). *BMC Infect Dis*, **10**:319.

Shabir AM, Keith PK (2006). Acute respiratory infections, **In**: Disease and Mortality in Sub-Saharan Africa, Chapter 11. World Bank, 2nd edition, Washington.

Siddell S, Wege H, ter Meulen V. (1982) The structure and replication of coronaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, **99**:131–63.

Simoes AF, Cherian T, Chow J, Shahid-Salles SA, Laxminarayan R, John TJ. (2006). Acute respiratory infections in children, **In**: Diseases Control Priorities in developing countries, Chapter 25. Oxford University Press, New York: 1400p.

Slinger R, Milk R, Gaboury I, Diaz-Mitoma F. (2004) Evaluation of the QuickLab RSV test, a new rapid lateral-flow immunoassay for detection of respiratory syncytial virus antigen. *J Clin Microbiol* **42**:3731–3.

Sloots TP, Whiley DM, Lambert SB, Nissen MD. (2008) Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases? *J Clin Virol*, **42**(3):233-43. doi: 10.1016/j.jcv.2008.03.002.

Smith DW, Frankel LR, Mathers LH, Tang AT, Ariagno RL, Prober CG. (1991) A controlled trial of aerosolized ribavirin in infants receiving mechanical ventilation for severe respiratory syncytial virus infection. *N Engl J Med*, **325**:24–29. <https://doi.org/10.1056/NEJM199107043250105>.

Smuts H. (2008) Human coronavirus NL63 infections in infants hospitalised with acute respiratory tract infections in South Africa. *Influenza and Other Respiratory viruses*, **2**:135-8.

Stefanska I, Romanowska M, Donevski S, Gawryluk D, Brydak LB. (2013) Co-infections with influenza and other respiratory viruses. *Adv Exp Med Biol*, **756**:291–301. doi: 10.1007/978-94-007-4549-0_36

Sung CC1, Chi H, Chiu NC, Huang DT, Weng LC, Wang NY, et al. (2011) Viral etiology of acute lower respiratory tract infections in hospitalized young children in Northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*, **44**(3):184-90. doi: 10.1016/j.jmii.2011.01.025.

Suryadevara M, Cummings E, Bonville CA, Bartholoma N, Riddell S, Kiska D. (2011) Viral Etiology of Acute Febrile Respiratory Illnesses in Hospitalized Children Younger Than 24 Months. *Clin Pediatr*, **50**(6):513-7. doi: 10.1177/0009922810394834.

Tabbara KF, Omar N, Hammouda E, Akanuma M, Ohguchi T, Ariga T, et al. (2010) Molecular epidemiology of adenoviral keratoconjunctivitis in Saudi Arabia. *Mol Vis*, **16**:2132–2136.

Tanaka R, Iwasaki Y, Koprowski H. (1976) Intracisternal virus-like particles in brain of multiple sclerosis patient. *J Neurol Sci*, **28**:121–6.

Tarnagda Z, Yougbaré I, Ilboudo AK, Kagoné T, Sanou AM, Cissé A, et al. (2014) Sentinel surveillance of influenza in Burkina Faso: identification of circulating strains during 2010-2012. *Influenza Other Respir Viruses*, **8**(5):524-9. doi: 10.1111/irv.12259.

Tillekeratne LG, Bodinayake CK, Nagahawatte A, Vidanagama D, Devasiri V, Arachchi WK, et al. (2015) Use of Rapid Influenza Testing to Reduce Antibiotic Prescriptions Among Outpatients with Influenza-Like Illness in Southern Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg*, **93**(5):1031-7. doi: 10.4269/ajtmh.15-0269.

To KK, Lau SK, Chan KH, Mok KY, Luk HK, Yip CC, et al. (2016) Pulmonary and extrapulmonary complications of human rhinovirus infection in critically ill patients. *J Clin Virol*, **77**:85e91.

To KKW, Yip CCY, Yuen KY. (2017) Rhinovirus - From bench to bedside. *Journal of the Formosan Medical Association*, **116**(7):496-504. doi: 10.1016/j.jfma.2017.04.009.

Tondella ML, Talkington DF, Holloway BP, Dowell SF, Cowley K, Soriano-Gabarro M, et al. (2002) Development and evaluation of real-time PCR-based fluorescence assays for detection of *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, **40**(2):575-83.

Touati A, Pereyre S, Bouziri A, Achour W, Khaldi A, Ben Jaballah N, et al. (2010) Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae*-associated respiratory tract infections in hospitalized children: results of a

4-year prospective study in Tunis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **68**(2):103-9. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.05.010.

Triana-Baltzer GB, Sanders RL, Hedlund M, Jensen KA, Aschenbrenner LM, Larson JL, et al. (2011) Phenotypic and genotypic characterization of influenza virus mutants selected with the sialidase fusion protein DAS181. *J Antimicrob Chemother*, **66**(1):15–28.

Uriyo J, Gosling RD, Maddox V, Sam NE, Schimana W, Gillespie SH et al. (2006) Prevalences of *Pneumocystis jiroveci*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Streptococcus pneumoniae* infection in children with severe pneumonia, in a tertiary referral hospital in northern Tanzania. *Annals of tropical medicine and parasitology*, **100**(5-6):415-31.

Uršič T, Jevšnik M, Zigon N, Krivec U, Beden AB, Praprotnik M, et al. (2012) Human bocavirus and other respiratory viral infections in a 2-year cohort of hospitalized children. *J Med Virol*, **84**(1):99-108. doi: 10.1002/jmv.22217.

Uyeki TM. (2017) Influenza. *Ann Intern Med*; 167(5):ITC33-ITC48. doi: 10.7326/AITC201709050.

Vabret A, Mouthon F, Mourez T, Gouarin S, Petitjean J, Freymuth F. (2001) Direct diagnosis of human respiratory coronaviruses 229E and OC43 by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*, **97**:59–66. doi:10.1016/S0166-0934(01)00343-3.

van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. (2001) A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*, **7**(6):719–724.

van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, de Swart RL, et al. (2004) Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis*, **10**(4):658–666.

van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, et al. (2004) Identification of a new human coronavirus. *Nat Med*, **10**:368–73. doi:10.1038/nm1024.

Van Vlierbergh H, Delanghe JR, De Vos M, Leroux-Roel G, Committee BS. (2001) Factors influencing ribavirin-induced hemolysis. *J Hepatol*, **34**:911–916. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(01\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00029-0).

Venter M, Lassauniere R, Kresfelder TL, Westerberg Y, Visser A. (2011) Contribution of common and recently described respiratory viruses to annual hospitalizations in children in South Africa. *J Med Virol*, **83**(8):1458-68.

Viegas M, Barrero PR, Maffey AF, Mistchenko AS. (2004) Respiratory viruses seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina: a five-year analysis. *J Infect*, **49**(3):222–8.

Vijgen L, Keyaerts E, Moës E, Maes P, Duson G, Ranst MV. (2005) Development of One-Step, Real-Time, Quantitative Reverse Transcriptase PCR Assays for Absolute Quantitation of Human Coronaviruses OC43 and 229E. *J Clin Microbiol*, **43**:5452–6. doi:10.1128/JCM.43.11.5452-5456.2005.

Wabwire-Mangen F, Mimbe DE, Erima B, Mworozi EA, Millard M, Kibuuka H, et al. (2016) Epidemiology and Surveillance of Influenza Viruses in Uganda between 2008 and 2014. *PLoS One*, **11**(10):e0164861. doi: 10.1371/journal.pone.0164861.

Waites KB, Talkington D. (2004) *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev*, **17**:697–728.

Walsh EE, Shin JH, Falsey AR. (2013) Clinical Impact of Human Coronaviruses 229E and OC43 Infection in Diverse Adult Populations. *J Infect Dis*, **208**:1634–42. doi:10.1093/infdis/jit393.

Wang D, Chen L, Ding Y, Zhang J, Hua J, Geng Q, et al. (2016) Viral etiology of medically attended influenza-like illnesses in children less than five years old in Suzhou, China, 2011 to 2014. *J Med Virol*, **88**(8):1334-40. doi: 10.1002/jmv.24480.

Wang D, Cummins C, Bayliss S, Sandercock J, Burls A. (2008) Immunoprophylaxis against respiratory syncytial virus (RSV) with palivizumab in children: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*, **12**(36):iii, ix–x, 1–86.

Wansaula Z, Olsen SJ, Casal MG, Golenko C, Erhart LM, Kammerer P. (2016) Surveillance for severe acute respiratory infections in Southern Arizona, 2010–2014. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, **10**(3), 161–169. doi: 10.1111/irv.12360.

Weber WM, Gopalakrishna G, Awomoyi A, Cunningham A, Adegbola RA, Falade AG, et al. (2006) The role of *Chlamydia pneumoniae* in acute respiratory tract infections in young children in The Gambia, West Africa. *Annals of Tropical Paediatrics*, **26**:87-94.

Weber WM, Mulholland EK, Greenwood BM. (2002) Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Tropical Medicine and International Health*, **3**(4):268–80.

Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR. (2004) Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. *J Infect Dis* **189**:706–10.

Were FN, Govedi AF, Revathi G, Wambani JS. (2002) *Chlamydia* as a cause of late neonatal pneumonia at Kenyatta National Hospital, Nairobi. *East Afr Med J*, **79**(9):476-9.

Wertheim HF, Nadjm B, Thomas S, Agustiniingsih A, Malik S, Diep NN, et al. (2015) Viral and atypical bacterial aetiologies of infection in hospitalised patients admitted with clinical suspicion of

influenza in Thailand, Vietnam and Indonesia. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, **9**(6): p. 315-322. doi: 10.1111/irv.12326.

Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. (2002) Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *The Lancet Infectious Diseases*, **2**(1): 25-32.

Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt-Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. (2004) Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med*, **350**(5): 443–450.

Williams JV, Wang CK, Yang CF, Tollefson SJ, House FS, Heck JM, et al. (2006) The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience. *J Infect Dis.*; **193**(3):387–395.

Winchell JM, Thurman KA, Mitchell SL, Thacker WL, Fields BS. (2008) Evaluation of three real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in an outbreak investigation. *J Clin Microbiol*, **46**(9):3116-8. doi: 10.1128/JCM.00440-08.

Winther B, McCue K, Ashe K, Rubino JR, Hendley JO. (2007) Environmental contamination with rhinovirus and transfer to fingers of healthy individuals by daily life activity. *J Med Virol*, **79**(10):1606e10.

Wolf DG, Greenberg D, Kalkstein D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Saleh N, et al. (2006) Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. *Pediatr Infect Dis J*, **25**: 320–324.

Woo PCY, Lau SKP, Chu C, Chan K, Tsoi H, Huang Y, et al. (2005) Characterization and Complete Genome Sequence of a Novel Coronavirus, Coronavirus HKU1, from Patients with Pneumonia. *J Virol*, **79**:884–95. doi:10.1128/JVI.79.2.884-895.2005.

World Health Organization (WHO). (2011) Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44518/1/9789241548090_eng.pdf (Consulté le 29/12/2017)

World Health Organization (WHO). (2012) Vaccines against influenza: WHO position paper - November 2012. *Weekly epidemiological record*, **47**(87):461-476.

Wurzel DF, Marchant JM, Yerkovich ST, Upham JW, Mackay IM, Masters IB, et al. (2014) Prospective characterization of protracted bacterial bronchitis in children. *Chest*, **145**(6):1271–1278.

Wyde PR, Chetty SN, Jewell AM, Boivin G, Piedra PA. (2003) Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res*, **60**: 51-9.

Xiao Q, Zheng S, Zhou L, Ren L, Xie X, Deng Y, et al. (2015) Impact of human rhinovirus types and viral load on the severity of illness in hospitalized children with lower respiratory tract infections. *Pediatr Infect Dis J*, **34**(11):1187e92.

Yokose N, Hirakawa T, Inokuchi K. (2009) Adenovirus-associated hemorrhagic cystitis in a patient with plasma cell myeloma treated with bortezomib. *Leuk Res*, **33**(8):e106 doi: 10.1016/j.leukres.2009.02.021.

Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. (2012) Isolation of a Novel Coronavirus from a man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med.*; 367:1814–20. doi:10.1056/NEJMoa1211721.

Zar HJ, Hanslo D, Tannenbaum E, Klein M, Argent A, Eley B, et al. (2001) Aetiology and outcome of pneumonia in human immunodeficiency virus-infected children hospitalized in South Africa. *Acta Paediatr*, **90**:119-25.

Zar HJ, Madhi SA, Aston SJ, Gordon SB. (2013) Pneumonia in low and middle income countries: progress and challenges. *Thorax*, **68**(11):1052-6. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-204247.

Zar HJ, Polack FP. (2015) Childhood pneumonia: the role of viruses. *Thorax*, **70**(9):811-2. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-207320.

Annexes

Annexe 1

Fiche de notification des infections respiratoires aiguës sévères (IRAS)

Nom de la structure sanitaire : -----

Données sociodémographiques

Nom et prénom(s) du patient : -----

Numéro d'identification : -----

Age : ----- (ans) (Si < 1 an) : Age en mois : ----- Sexe : M F

Lieu de Résidence : ----- Secteur : ----- N° Tél. : -----

Profession du père ou Tuteur : -----

Profession de la mère ou Tutrice : -----

Données cliniques

Date de début des symptômes : --- --/ --- --/ --- --

Début : Progressif Brutal

Date d'hospitalisation (si hospitalisation il y'a) : --- --/ --- --/ --- --

Date de prélèvements : --- --/ --- --/ --- --

Antécédents médicaux : Faible poids à la naissance Dénutrition Asthme
 Cardiopathie Diabète Mal. Rénale
 Maladie du foie Cancer Drépanocytose
 Autres (préciser) : -----

Signes cliniques : Fièvre (-----°C) Toux Mal de gorge Diarrhée
 Vomissements Dyspnée/Difficultés respiratoires
 Léthargique ou inconscients Convulsion Stridor
 Incapable de boire ou de téter Tirage intercostal
 Saturation en oxygène < 90 % Autres (préciser) : -----

Prise d'antibiotiques avant la consultation : Non Oui (Préciser) : -----

Diagnostic : -----

Traitement administré : -----

Annexe 2

Protocole d'extraction des acides nucléiques à l'aide du kit QIAamp Viral RNA Kit de QIAGEN

Point important

- Toutes les étapes de centrifugation doivent se mener à la température ambiante (15–25°C).

Choses à faire avant de commencer

- Equilibrer les échantillons à la température ambiante (15–25°C) pendant au moins 30 minutes.
- Equilibrer le tampon AVE pour l'élution à la température ambiante pendant au moins 30 minutes.
- Vérifier que les tampons AW1 et AW2 ont été préparés selon les instructions du Kit.
- Add carrier RNA reconstituted in Buffer AVE to Buffer AVL according to instructions.

Procédure

Etape de lyse

1. Transférer 560 µl du tampon AVL- carrier RNA dans un tube eppendorf RNase – DNase free de 1.5 ml ;
 2. Ajouter 140 µl d'échantillon au tampon AVL- carrier RNA dans le tube puis vortexer pendant 15 s.
- R:** Pour s'assurer de la bonne lyse, il est essentiel que l'échantillon et le tampon AVL-carrier RNA soient bien mélangés pour donner une solution homogène.
3. Incuber pendant 10 min à la température ambiante (15–25°C).
 4. Centrifuger brièvement le tube pour enlever les gouttes se trouvant à l'intérieur du capuchon.

Etape de fixation

5. Ajouter 560 µl d'éthanol (96–100%) dans le tube contenant le mélange l'échantillon – tampon AVL-carrier RNA puis vortexer pendant 15 s. Ensuite, centrifuger brièvement le tube pour enlever les gouttes se trouvant à l'intérieur du capuchon.
- R:** Afin d'assurer une meilleure fixation, il est essentiel que l'échantillon soit bien mélangé avec l'éthanol pour donner une solution homogène.
6. Transférer soigneusement 630 µl de la solution (échantillon – tampon AVL-carrier RNA – éthanol) dans une mini colonne QIAamp surmontée sur un tube collecteur de 2 ml sans arroser ou mouiller le bord. Fermer le capuchon et centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 min. Placer la mini colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur de 2 ml puis éliminer le tube contenant le filtrat. Fermer chaque mini colonne afin d'éviter les contaminations croisées au cours de la centrifugation.

R: Si la solution n'est pas complètement passée à travers la membrane, centrifuger de nouveau à une grande vitesse jusqu'à ce que toute la solution passe à travers la membrane.

7. Ouvrir soigneusement la mini colonne QIAamp et répéter l'étape 6.

Etape de lavage

8. Ouvrir soigneusement la mini colonne QIAamp et ajouter 500 µl du tampon AW1. Fermer le capuchon et centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 min. Placer la mini colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur et éliminer le tube contenant le filtrat.

9. Ouvrir soigneusement la mini colonne QIAamp et ajouter 500 µl du tampon AW2. Fermer le capuchon et centrifuger à 20 000 x g (14 000 rpm) pendant 3 min. Placer la mini colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur et éliminer le tube contenant le filtrat.

Note: Les résidus du tampon AW2 dans l'éluat peuvent causer des problèmes au moment de l'analyse.

10. Recommandé: Placer la mini colonne QIAamp dans un nouveau tube collecteur et éliminer l'ancien tube contenant le filtrat. Centrifuger à haute vitesse pendant une minute.

Etape d'éluion

11. Placer la mini colonne QIAamp dans un tube Eppendorf RNAse – DNase free de 1.5 ml. Eliminer l'ancien tube collecteur contenant le filtrat. Ouvrir soigneusement la mini colonne et ajouter 60 µl de tampon AVE équilibré à la température ambiante. Fermer le capuchon et incubé à la température ambiante pendant 1 min. Centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 min.

R: Une seule éluion avec 60 µl de tampon AVE est suffisante pour éluer au moins 90% de l'ARN viral de la mini colonne QIAamp. L'éluion avec un volume inférieur à 30 µl entraînera une réduction de la quantité de l'ARN viral extrait.

L'ARN viral est stable pendant une année si il est conservé à – 20°C ou – 70°C.

Précautions à prendre au cours de la manipulation

En raison de la sensibilité de la technologie d'amplification de l'Acide nucléique, les précautions suivantes sont nécessaires quand on manipule les mini colonnes QIAamp afin d'éviter les contaminations croisées.

- Transférer soigneusement l'échantillon dans la mini colonne sans arroser le bord de la colonne.
- Changer d'embouts entre les différentes étapes. L'utilisation d'embouts filtrés est recommandée.
- Eviter de toucher la membrane de la mini colonne QIAamp avec l'embout de la pipette.
- Après avoir vortexé les échantillons, centrifuger les brièvement afin d'enlever les gouttes de solution se trouvant à l'intérieur du capuchon.

- Porter des gants pendant toute la procédure. En cas de contact entre le gant et l'échantillon, changer immédiatement de gants.
- Bien fermer la mini colonne QIAamp avant de la placer dans la centrifugeuse.

Annexe 3

1) Composition des mélanges réactionnels

Multiplex	Virus	Kit utilisé	H2O	Tampon de l'enzyme	Solution Q	Amorces	dNTP	Rnase out	Mélange d'enzyme	ARN	Final volume
Multiplex 1	RSV	Qiagen One-Step RT-PCR kit	9,14 µl	6 µl	3,6 µl	CaneP1 (10µM): 1,44 µl CaneP2 (10µM): 1,44 µl	1,2 µl	0,3 µl	1 µl	3 µl	30 µl
	HMPV					M1a (10µM): 1,44 µl M2 (10µM): 1,44 µl					
Multiplex 2	PIV1	Qiagen One-Step RT-PCR kit	3,38 µl	6 µl	3,6 µl	PiS1_F (10µM) : 1,44 µl PiS2_R (10µM) : 1,44 µl	1,2 µl	0,3 µl	1 µl	3 µl	30 µl
	PIV2					PiP1_F (10µM): 1,44 µl PiP2_R (10µM): 1,44 µl					
	PIV3					P3-1_F (10µM): 1,44 µl P3-2_R (10µM): 1,44 µl					
	PIV4					Pi4S_F (10µM): 1,44 µl Pi4S_R (10µM): 1,44 µl					
Multiplex 3	HCoV_OC43	Qiagen One-Step RT-PCR kit	3,38 µl	6 µl	3,6 µl	hCoV_OC43_MF1 (10µM): 1,44 µl hCoV_OC43_MF3 (10µM): 1,44 µl	1,2 µl	0,3 µl	1 µl	3 µl	30 µl
	HCoV_E229					hCoV_E229MD1 (10µM): 1,44 µl hCoV_E229_MD3 (10µM): 1,44 µl					
	HCoV_NL63					hCoV_NL63_Sens (10µM) : 1,44 µl hCoV_NL63_antisense (10µM) : 1,44 µl					
	hCoV_HKU1					hCoV_HKU1_Nsens-3 (10µM): 1,44 µl					

						hCoV_HKU1_antisense (10µM): 1,44 µl					
Multiplex 4	HRV	6,26 µl	6 µl	3,6 µl		SRHi1 (10µM) : 1,44 µl SRHi2 (10µM) : 1,44 µl	1,2 µl	0,3 µl	1 µl	3 µl	30 µl
	ICV					CHAA (10µM) : 1,44 µl CHAD (10µM) : 1,44 µl					
	SARS-CoV					Bin/outS (10µM) : 1,44 µl Bin/outS2 (10µM) : 1,44 µl					

	Virus	Kit utilisé	H₂O	Buffer x10	amorces	dNTP	MgCl₂	Taq	ADN	Final volume
Multiplex 5	AdV	Invitrogen	13,75 µl	2,5 µl	ADHEX1F (10µM): 1 µl ADHEX2R (10µM) : 1 µl	0,5 µl	1,25 µl	0,5 µl	2,5 µl	25 µl
	BoV				188F (10µM): 1 µl 542R (10µM): 1 µl					

2) Protocoles d'amplification des 5 PCR-Multiplex

Protocole d'amplification des PCR-Multiplex 1-4

Etape de la réaction	Température	Durée
Transcription reverse	50°C	30 min
Inactivation de la RT/Activation de la Taq	94°C	15 min
PCR amplification (8 cycles)		
Dénaturation	94°C	30 s
Hybridation	58°C	30 s
Elongation	72°C	1 min
PCR amplification (30 cycles)		
Dénaturation	94°C	30 s
Hybridation	50°C	30 s
Elongation	72°C	1 min
Elongation finale		
	72°C	10 min
	4°C	10 min

Protocole d'amplification de la PCR-Multiplex 5

Etape de la réaction	Température	Durée
Activation de la Taq	94°C	5 min
PCR amplification (40 cycles)		
Dénaturation	94°C	30 s
Hybridation	58°C	30 s
Elongation	72°C	1 min
Elongation finale		
	72°C	10 min

3) Liste des amorces utilisées pour la détection des virus respiratoires (Buecher et al.; 2010)

Amorces	Séquence (5' – 3')	Gène cible	Taille d'amplicon
RSV		Nucléocapside	278 bp
Cane P1_F	GGA ACA AGT TGT TGA GGT TTA TGA ATA TGC		
Cane P2_R	CTG CTG TCA AGT CTA GTA CAC TGT AGT		
HMPV		Protéine de la Matrix	537 bp
M1a_F	GGA GTC CTA CCT AGT AGA C		
M2_R	GCA GCT TCA ACA GTA GCT G		
PIV1		HA-NA	317 bp
PiS1_F	CCG GTA ATT TCT CAT ACC TAT G		
PiS2_R	CTT TGG AGC GGA GTT GTT AAG		
PIV2		HA-NA	507 bp
PiP2_F	AAC AAT CTG CTG CAG CAT TT		
PiP2_R	ATG TCA GAC AAT GGG CAA AT		
PIV3		HA-NA	189 bp
P3-1_F	CTC GAG GTT GTC AGG ATA TAG		
P3-2_R	CTT TGG GAG TTG AAC ACA GTT		
PIV4		Phosphoprotéine	451 bp
Pi4S_F	CTG AAC GGT TGC ATT CAG GT		
Pi4S_R	TTG CAT CAA GAA TGA GTC CT		
HRV		VP4/VP2/5'NC	549 bp
SRHi1_F	GCA TCI GGY ARY TTC CAC CAC CAN CC		
SRHi2_R	GGG ACC AAC TAC TTT GGG TGT CCG TGT		
ICV		HA-estérase	485 bp
CHAA_F	ACA CTT CCA ACC CAA TTT GG		
CHAD_R	CCT GAC AGC AAC TCC C TC AT		
HCoV-E229		Gène M	574 bp
MD1_F	TGG CCC CAT TAA AAA TGT GT		

MD3_R	CCT GAA CAC CTG AAG CCA AT		
HCoV-OC43		Gène M	334 bp
MF1_F	GGC TTA TGT GGC CCC TTA CT		
MF3_R	GGC AAA TCT GCC CAA GAA TA		
HCoV-NL63		Nucléocapside	255 bp
NL63 sens_F	GAT AAC CAG TGG AAG TCA CCT AGT TC		
NL63 antisense_R	ATT AGG AAT CAA TTC AGC AAG CTG TG		
HCoV-HKU1		Gène de la Polymérase	443 bp
HKU-N-sens3_F	ATC TGA GCG AAA TTA CCA AAC		
HKU1 antisense_R	CGG AAA CCT AGT AGG GAT AGC TT		
AdV		Gène de la protéine Hexon	270 bp
ADHEX1_F	CAA CAC CTA YGA STA CAT GAA		
ADHEX2_R	ACA TCC TTB CKG AAG TTC CA		
BoV			354 bp
188F	GAS CTC TGT AAG TAC TAT TAC		
542R	CTC TGT GTT GAC TGA ATA CAG		

Annexe 4

1) Composition des mélanges réactionnels des PCRs en temps réel pour *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae*

	Bactérie	Kit utilisé	H ₂ O	Taqman FAST Universal PCR Master Mix	amorces	ADN	Final volume
PCR en temps réel	<i>M. pneumoniae</i>	Applied Biosystem	6,0 µl	12,5 µl	Mp181_F: 0,70 µl Mp181_R: 0,70 µl Mp181_P: 0,70 µl	5 µl	25 µl
	<i>C. pneumoniae</i>		6,9 µl		VD4_F: 0,25 µl VD4_R: 0,25 µl VD4_P: 0,125 µl		

2) Protocole d'amplification de *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae*

Etape de la réaction	Température	Durée
Activation de la Taq	95°C	10 min
PCR amplification (40 cycles)		
Dénaturation	95°C	15 s
Annealing	60°C	1 min
Elongation finale	10°C	10 min

3) Liste des amorces utilisées pour la détection de *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae* (Tondella et al., 2002, Winchell et al., 2008)

Amorces	Séquence (5' – 3')	Gène cible	Taille d'amplicon
<i>M. pneumoniae</i>		Toxine CARDS	73 bp
Mp181_F	TTT-GGT-AGC-TGG-TTA-CGG-GAA-T		
Mp181_R	GGT-CGG-CAC-GAA-TTT-CAT-ATA-AG		
Mp181_P	FAM-TGT-ACC-AGA-GCA-CCC-CAG-AAG-GGC-T		
<i>C. pneumoniae</i>		Gène ompA	125 bp
VD4_F	TCC-GCA-TTG-CTC-AGC-C		
VD4_R	AAA-CAA-TTT-GCA-TGA-AGT-CTG-AGA-A		
VD4_P	FAM-TAA-ACT-TAA-CTG-CAT-GGA-ACC-CTT-CTT-TAC-TAG-G-TAMRA	HA-NA	317 bp

Annexe 5

1) Composition du mélange réactionnel et protocole d'amplification de la RT

			Mélange 1					Mélange 2				
	Virus	Kit utilisé	Uni12 primer (5 μ M)	dNTP (10 mM)	H ₂ O	ARN	Total	5X first-strand buffer	0.1 M DTT	RNase OUT (40 U/ml)	Superscript III (200U)	Final volume
RT	Influenza A	SuperScript III specific Reverse Transcription	0,4 μ l	1 μ l	6,6 μ l	5 μ l	13 μ l	4 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	7 μ l

SuperScript III Influenza specific Reverse Transcription

Protocole Mélange 1

Dénaturation : 72°C pendant 10 min puis rapidement sur la glace

Protocole Mélange 2

Incubation : 55°C pendant 80 min

Inactivation de la réaction : 70°C pendant 15 min

2) Composition du mélange réactionnel des PCR nichées

A/H1N1 pdm09

PCR	Virus : A/H1N1 pdm09	H2O	Buffer 10x	MgCl ₂	Amorces	dNTP	Taq	ADNc	Final volume
1^{ère} étape	H1-1	17,0 µl	2,5 µl	1 µl	pH1N1_HA-27F : 0,5 µl ph1n1-ha-625r : 0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	2,5 µl	25 µl
	H1-2				pH1N1_HA442F: 0,5 µl pH1N1_HA-891R: 0,5 µl				
	H1-3				ph1n1-ha-795f: 0,5 µl pH1N1-HA-1313R: 0,5 µl				
	H1-4				pH1N1-HA-1020F: 0,5 µl pH1N1-ha-1591r: 0,5 µl				
	H1-5				pH1N1-HA1451f: 0,5 µl pH1N1_HA-1735R: 0,5 µl				
2^{ème} étape	H1-1.1	17,0 µl	2,5 µl	1 µl	pH1N1_HA-27F: 0,5 µl pH1N1_HA-618R: 0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	2,5 µl	25 µl
	H1-2.1				pH1N1_HA-544F: 0,5 µl pH1N1_HA-891R: 0,5 µl				
	H1-3.1				ph1n1-ha-817f : 0,5 µl pH1N1_HA-1265R : 0,5 µl				
	H1-4.1				pH1N1-HA-1020F: 0,5 µl pH1N1-HA-1535r: 0,5 µl				
	H1-5.1				pH1N1-HA-1471f: 0,5 µl pH1N1_HA-1735R: 0,5 µl				

A/H3N2

PCR	Virus : A/H3N2 pdm09	H2O	Buffer 10x	MgCl ₂	Amorces	dNTP	Taq	ADNc	Final volume
1^{ère} étape	H3-1	17,0 µl	2,5 µl	1 µl	h3-2f : 0,5 µl h3-660r : 0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	2,5 µl	25 µl
	H3-2				h3-269f: 0,5 µl h3-854r: 0,5 µl				
	H3-3				h3-763f: 0,5 µl h3-1353r: 0,5 µl				
	H3-4				h3-1189f: 0,5 µl h3-1727r: 0,5 µl				
2^{ème} étape	H3-1.1	17,0 µl	2,5 µl	1 µl	h3-2f: 0,5 µl h3-594r: 0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	2,5 µl	25 µl
	H3-2.1				h3-357f: 0,5 µl h3-854r: 0,5 µl				
	H3-3.1				h3-763f: 0,5 µl h3-1322r : 0,5 µl				
	H3-4.1				h3-1248f: 0,5 µl h3-1727r: 0,5 µl				

3) Protocole d'amplification des PCR nichées

Etape de la réaction	Température	Durée
Activation de la Taq	95°C	5 min
PCR amplification (40 cycles)		
Dénaturation	95°C	30 s
Annealing	56°C	30 s
Elongation	72°C	1 min
Elongation finale	10°C	10 min

4) Liste des amorces utilisées pour les PCR nichées

Fragments	Amorces	Séquence (5' – 3')	Taille d'amplicon
H1-1	pH1N1_HA-27F	GCAACAAAAATGAAGGCAAT	598 bp
	ph1n1-ha-625r	GGTCAGCASTAGTAGAYGGAT	
H1-2	pH1N1_HA-442F	TGACTCGAACAAAGGTGTAA	449 bp
	pH1N1_HA-891R	GGGTGTYTGRCAAGTTGTAT	
H1-3	ph1n1-ha-795f	GCAACTGGAAATCTAGTGGTA	518 bp
	pH1N1-HA-1313R	CCAGGAAACCATCATCAA	
H1-4	pH1N1-HA-1020F	GAGGAATGTCCCGTCTATT	571 bp
	pH1N1-ha-1591r	CCTTGTTGATTCCAGCTTT	
H1-5	pH1N1-HA-1451f	GGCTGCTTTGAATTTTACCACAA	284 bp
	pH1N1_HA-1735R	CTCATGCTTYTGAAATCCTAATG	
H1-1.1	pH1N1_HA-27F	GCAACAAAAATGAAGGCAAT	591 bp
	pH1N1_HA-618R	CCCATAGTACGAGGACTT	
H1-2.1	pH1N1_HA-544F	GCTCAGCAAATCCTACATYAAT	347 bp
	pH1N1_HA-891R	GGGTGTYTGRCAAGTTGTAT	
H1-3.1	ph1n1-ha-817f	CGAGATATGCATTTCGCAAT	448 bp
	pH1N1_HA-1265R	CCAGGTGGTTGAACTCTT	
H1-4.1	pH1N1-HA-1020F	GAGGAATGTCCCGTCTATT	515 bp
	pH1N1-HA-1535r		
H1-5.1	pH1N1-HA-1471f	CTCATGCTTYTGAAATCCTAATG	264 bp
	pH1N1_HA-1735R		
H3-1	h3-2f	GCAAAAGCAGGGGATAWTTYTATTAA	658 bp
	h3-660r	GAAGATTTGGTCHTTGTCCGTA	
H3-2	h3-269f	CTGCACRCTRATAGATGCTCTAT	585 bp
	h3-854r	GGGTGCATCTGAYCTCATT	
H3-3	h3-763f	GCAKAATAAGCATCTATTGGACRRT	590 bp
	h3-1353r	GCGTTGTAWGACCAGAGRTCTAT	
H3-4	h3-1189f	CTCAAGCAGCAATCGATCAA	538 bp
	h3-1727r	GCAAATGTTGCAYYTAATGTT	
H3-1.1	h3-2f	GCAAAAGCAGGGGATAWTTYTATTAA	592 bp

	h3-594r	CATTGTTYGGCATAGTYACGTT	
H3-2.1			497 bp
	h3-357f	CCYACAGCAACTGTTACCCTTA	
	h3-854r	GGGTGCATCTGAYCTCATT	
H3-3.1			559 bp
	h3-763f	GCAKAATAAGCATCTATTGGACRRT	
	h3-1322r	CTCAACRTATTTCTCWAGGTCCTGAAT	
H3-4.1			479 bp
	h3-1248f	CTCAGAAGTMGAAGGGAGAA	
	h3-1727r	GCAAATGTTGCAYYTAATGTT	

Annexe 6

Protocole de purification des amplicons à l'aide du Kit JetQuick PCR purification spin (Genomed, Loehne, Germany)

Points importants

Avant de commencer, lors de l'utilisation d'un nouveau kit

- Reconstituer le tampon de liaison M1 avec de l'isopropanol,
- Reconstituer le tampon de lavage M2 avec de l'éthanol absolu (96-100%),

Protocole

1. Placer la colonne de JetQuick Spin dans un tube collecteur de 2 ml,
2. Sur votre plaque PCR, ajouter 80 µl de tampon de fixation M1 à 20 µ d'échantillons d'ADN,
3. Bien mélanger en pipetant ou vortexant la plaque,
4. Transférer soigneusement le volume total (100 µl) sur la colonne,
5. Centrifuger à 12 000 g pendant 1 min,
6. Eliminer le tube collecteur contenant le filtrat et réinsérer la colonne sur un nouveau tube collecteur,
7. Ajouter 500 µl de tampon de lavage M2,
8. Centrifuger à 12 000 g pendant 1 min,
9. Eliminer le tube collecteur contenant le filtrat et réinsérer la colonne sur un nouveau tube collecteur,
10. Centrifuger à 12 000 g pendant 1 min
11. Placer la colonne dans un tube eppendorf marqué de 1,5 ml,
12. Ajouter 30 µl de tampon TE préchauffé à 70°C
13. Centrifuger à 12 000 g pendant 2 min
14. Placer l'éluât à – 20°C en attendant le séquençage.

Annexe 7

1) Composition des mélanges réactionnels de la PCR nichée pour l'amplification du gène

PCR	Virus	Kit utilisé	H ₂ O	Qiagen RT-PCR buffer 5x	MgCl ₂	Amorces	dNTP	RNase OUT	Qiagen 1 step RT-PCR enzyme	ARN	Final volume
1^{ère} étape	RSV : gène G	Qiagen One-Step RT-PCR kit	14,7 µl	5 µl	0,5 µl	hrs_v_ab_1f : 0,6 µl hrs_v_ab_2r : 0,6 µl	0,5 µl	0,1 µl	1 µl	2 µl	25 µl
2^{ème} étape	RSV : gène G		17,0 µl	2,5 µl	1 µl	hrs_v_ab_3f : 0,4 µl hrs_v_ab_4r : 0,4 µl	0,5 µl		0,2 (Taq Platinum)	2,5 µl Echantillon dilué au 5 ^{ème} de la première étape	25 µl

2) Liste des amorces utilisées dans la PCR nichée pour l'amplification du gène G (Agoti et al., 2012)

Amorces	Séquence (5' – 3')	Gène cible	Taille d'amplicon
RSV A/B		Gène G	73 bp
hrsv_ab_1f	GGCAAATGCAAWCATGTCC		
hrsv_ab_2r	GTTATRACACTRGTATACCAACC		
hrsv_ab_3f	GCAATGATAATCTCAACYTC		
hrsv_ab_4r	CAACTCCATKGTTATTTGCC		

Annexe 8

MINISTERE DE LA SANTE

SECRETARIAT GENERAL

Comité D'Ethique



BURKINA FASO

Unité – Progrès – Justice

N/Réf. A17-2013/CE-CM

Bobo-Dioulasso, le 20 juin 2013

Avis d'examen d'un Projet de Recherche

1. Numéro d'enregistrement du projet de recherche :
17-2013/CE-CM

2. Intitulé du Projet de recherche :

« Etiologies des infections respiratoires aiguës (IRA) chez les enfants de moins de cinq ans au Burkina Faso ».

3. Investigateur Principal

Prof. Zékiba TARNAGDA

4. Avis du Comité d'Ethique

Avis favorable du Comité à l'exécution du projet de recherche

5. Durée de validité :

1 an à partir de la date d'approbation

6. Liste des membres présents :

1. *Dr Abdoulaye OUEDRAOGO (Président)*
2. *Dr Germain TRAORE*
3. *Dr Diane VALEA*
4. *Dr Hervé KPODA*
5. *Dr Léa PARE*
6. *Mr Cyprien DABIRE*
7. *Mme Martine SOMDA*
8. *Mme Odile Hato ZAMPA*
9. *Dr Dezemon ZINGUE (Secrétaire)*



Dr. Abdoulaye OUEDRAOGO

