

Bonjour ! Alors, je suis Rodrigue Bikangi, je suis biologiste diplômé d'un master de biologie cellulaire et physiologie option biologie moléculaire.

Je suis en poste au centre de recherche médicale de Lambaréné au Gabon où j'y vis et où j'ai la responsabilité de superviseur du laboratoire d'immunologie et de biologie moléculaire.

Alors, je vais ici essayer de vous partager un peu mon expérience sur la pandémie du SARS-CoV-2 dans mon domaine particulier qui était celui normalement du diagnostic des infections, mais aussi de la recherche en fait des variants dans le cas de la circulation des souches mutantes du SARS-CoV-2.

Alors, je vais vous présenter premièrement d'abord le plateau technique, ensuite je vais vous énoncer quelques limites que nous avons rencontrées ici, comment est-ce que nous avons fait pour analyser le peu de séquences que nous produisons, et sur quelles plateformes on a pu partager évidemment cette séquence et l'expérience que je garde d'aider pendant cette période de pandémie.

Donc, le CERMEL a utilisé de manière systématique et cela continue aujourd'hui les plateformes de biologie moléculaire.

Donc, nous avons établi notre méthodologie de séquençage sur la RT-PCR.

Donc, cela a commencé très tôt en mars 2020 avec l'entrée du premier patient, c'est-à-dire de la première suspicion d'infection SARS-CoV-2.

Tout a été mis en place, pour mettre en place des protocoles, une méthodologie qui nous permettait de diagnostiquer les populations qui pouvaient être suspectes d'infection au SARS-CoV-2.

À la suite ce cela, nous avons utilisé progressivement également du Gene-Xpert parce que nous avons un laboratoire de tuberculose qui utilise généralement du Gene-Xpert dans le cas des infections à tuberculose, que ce soit les tuberculoses multi résistantes ou autres types de tuberculose.

Et donc, c'était une méthode alternative que nous avons utilisée.

Ensuite aussi, nous avons acquis des TDR, Test de Diagnostic Rapide.

Il y en avait un certain nombre qui avaient aussi été donné par l'autorité sanitaire du pays et nous avons aussi utilisé ces TDR.

Ces TDR ont été utilisés le plus souvent pour les cas d'alerte, pour les cas d'urgence.

Et à la suite aussi, nous avons essayé d'utiliser des tests salivaires.

Notamment avec un kit et une machine qui nous avait été offerts par une compagnie dont je vais taire le nom, mais qui voulait nous accompagner dans le cadre des moyens pouvant être mis en place pour le diagnostic du SARS-Cov-2.

Alors, ça c'est pour tout ce qui est du diagnostic lui-même.

Bon maintenant, pour ce qui est du séquençage, nous avons utilisé en mars 2021 parce que nous avons commencé la veille génomique ici au Gabon en 2021 à partir de janvier, mais en mars 2021 nous avons essayé de produire nos premières séquences.

Et là ça été fait sur la base du Sanger Sequencing, notamment donc du séquençage ciblé des régions mutantes en fait du SARS-CoV-2.

À la suite, nous avons doucement migré vers la plateforme Oxford Nanopore pour pouvoir faire du génome entier.

Donc, nous avons utilisé le MinION pour faire cela.

Il faut rappeler que nous avons ici au CERMEL trois type de séquenceur, nous avons le 3500 Analyser, nous avons également l'Illumina MiniSeq, mais nous avons également le MinION.

Le problème avec l'Illumina MiniSeq, c'est que nous avons de gros problèmes techniques avec et donc il ne pouvait pas être utilisé jusqu'aujourd'hui.

Il n'est pas utilisé pour ces raisons.

Donc, nous utilisons systématiquement pour le séquençage des variants SARS-CoV, pour leurs recherches, nous utilisons le 3500 Analyser donc le séquenceur ciblée type Sanger et le MinION qui nous permet de faire le "whole genome".

Donc, voici ici un peu présenté aussi bien sur le plan du diagnostic, mais aussi sur le plan du séquençage les plateformes que nous avons utilisées et les tests que nous avons pu mettre en place.

Concernant les limites, il y en avait plusieurs La première limite a été humaine, c'est-à-dire qu'il n'y avait pas assez de personnels qualifiés pour pouvoir mettre en œuvre et mettre en place ces différentes procédures.

Il faut se dire aussi que la psychose créée autour de la transmission par la létalité, mais par le fond toutes retransmissions également du virus, faisaient craindre aux techniciens et aussi à certains ingénieurs de recherche de pouvoir se mettre dans des conditions pour réaliser les tests PCR.

Donc au début, nous n'étions que trois au niveau du centre à pouvoir réaliser ces tests.

Et au fur et à mesure, nous avons formé nos collègues, nous avons formé d'autres collègues pour essayer de renforcer l'équipe du diagnostic parce que, au fur et à mesure que la pandémie s'étalait, le nombre d'infections aussi augmentait et la population infectée grandissait.

Donc, ce n'était pas supportable seulement pour trois personnes.

Donc, on est passé d'une équipe de trois personnes à cinq personnes, de cinq à huit personnes et de huit à 12 personnes.

Donc, c'était une très grande équipe autour desquelles il y avait des tâches et des activités qui étaient définies.

Mais, au début, ça a été réellement une très grande difficulté.

L'autre difficulté était la difficulté d'approvisionnement en intrants, notamment en consommables.

Parce que nous pouvions faire des commandes, parce que les commandes malheureusement se font en Europe, nous pouvions faire des commandes, mais ces commandes pour arriver prenaient beaucoup trop de temps.

Donc, on pouvait commander en janvier ou au début de la pandémie, nous avons commandé en avril, pour des commandes qui sont arrivées par exemple en octobre.

Donc, cette difficulté-là nous a mis en fait dans des conditions où on était obligé de nous adapter aux réactifs et aux consommables qu'utilisaient d'autres laboratoires mais qui n'avaient pas systématiquement les mêmes équipements que nous.

Et derrière il faut regarder les différentes amorces par exemple qui matchent avec quel type de sonde, parce que les fluorochromes ne sont pas forcément les mêmes et donc il fallait réfléchir, il fallait s'adapter, il fallait se mettre dans le contexte et essayer d'organiser le travail en remodifiant notre manière de travailler, mais également en s'adaptant aux kits qui venaient d'arriver.

Donc, là a été aussi une très, très, très forte limite parce que les frontières étaient fermées.

Donc, quand les frontières sont fermées, le fret n'était pas celui qu'on connaît et qui était régulier.

Et donc, nous connaissons de réels problèmes vis-à-vis de l'approvisionnement en intrants et en consommables.

Je l'ai déjà dit également plus haut, mais là, c'est dans le cadre du séquençage, nous avons eu cette difficulté à débiter le séquençage parce que notre machine pour le "whole genome" était, n'était pas disponible.

Donc, l'Illumina MiniSeq que nous avons ici avait un problème et nous n'avons pas pu commencer très tôt la recherche des variants SARS-CoV.

Donc, quand cela est compris, il faut comprendre que nous avons fait de notre mieux et nous sommes quand même allés de l'avant et nous avons commencé comme je l'ai déjà dit plus haut le séquençage des formes mutantes du SARS-CoV-2 entre mars et avril et nous avons poursuivi toute l'année 2021 pour avoir certaines séquences.

Et donc, comment il fallait interpréter ces séquences ?

Une fois que les séquences avaient été produites, ces séquences étaient récupérées.

Une fois récupérées, pour ce qui était du séquençage ciblé, ces séquences étaient nettoyées.

Et nous utilisons deux types de logiciels, BioEdit et Chromas, qui sont des logiciels gratuits et que l'on peut retrouver facilement sur internet.

Ce sont ces logiciels qui nous ont permis de prendre les différentes séquences, de les aligner.

Et les aligner avec comme référence la séquence souche de Wuhan.

Et donc il fallait pour nous, puisque la séquence souche de Wuhan était connue, de regarder les mutations sur cette séquence, sur la séquence, la protéine Spike de nos séquences produites pour voir si en fait il y avait des différences avec la séquence de Wuhan.

Et donc, nous avons en fait un fichier, un fichier qui déterminait à quel niveau, à quel type de régions il y avait des mutations, par exemple la L452 ou la E484, ou encore autres, elles sont situées sur la protéine spike et nous il nous suffisait simplement de faire les alignements à base de la séquence d'origine.

Une fois que l'on faisait ces alignements, on pouvait voir sur les séquences produites, lesquelles étaient assimilables à la séquence d'origine lesquelles pouvaient au niveau des cibles de mutations connues qui présentaient effectivement cette substitution, ou bien de cette substitution de protéine.

Et donc, à base de cela, nous pouvions maintenant simplement conclure à une mutation en regardant deux régions comme il avait été recommandé, où se situait en réalité la mutation.

Et c'est ainsi que nous avons pu préalablement détecter le variant alpha et ensuite le variant kappa.

Nous avons continué avec le variant delta mais cela devenait de plus en plus difficile parce que effectivement les mutations devenaient de plus en plus fortes, mais aussi de plus en plus grandes sur toute la région de la protéine spike.

Et à la suite donc, heureusement nous avons également la technologie Oxford Nanopore avec le MinION.

Donc, nous avons utilisé le MinION pour le séquençage du whole genome.

Et là, c'était beaucoup plus facile parce que il y a des scripts, tout est fait, de sorte que lorsque la séquence est simplement produite, elle nous ressort directement la mutation ou le variant qu'il y a sur la séquence produite.

Et si nous avons effectivement aussi des problèmes, il suffisait d'aller sur NextClade

et d'insérer une autre séquence.

Ça pouvait nous sortir le linéage de la séquence et à quel mutant cette séquence pouvait appartenir.

Donc, de manière globale, c'est comme cela en fait que nous avons travaillé pour analyser nos différentes séquences.

Il faut dire que l'on n'a pas une très, très forte expérience et une très forte formation dans l'analyse des séquences et dans les analyses mutationnelles.

Nous y travaillons et on espère évidemment qu'on va y arriver.

Mais c'est comme cela un peu de manière très simple que nous avons pu détecter, interpréter et analyser les séquences que nous avons pu produire à partir non seulement du Sanger Sequencing, mais également du whole genome via le MinION.

Alors une fois ces séquences produites, il y avait des consignes claires de l'autorité sanitaire il fallait partager systématiquement ces séquences et donc, nous avons utilisé la plateforme GISAID pour lesquels les identifiants avaient été créés.

Et donc, vous pouvez trouver aujourd'hui les séquences qui ont été produites aussi bien au CERMEL, mais aussi dans d'autres centres du Gabon sur la recherche des variants SARS-CoV les séquences d'Alpha, les séquences de Kappa et même les séquences Delta et Omicron, elles sont disponibles, elles sont chargées sur la plateforme de GISAID.

Et donc, c'était une obligation dans le cadre de la mise en place du protocole de veille génomique au niveau du Gabon.

Alors, qu'est-ce que je retiens et qu'est-ce que je peux partager en termes d'expérience et avec les autres laboratoires ou encore avec d'autres chercheurs ou personnes qui voudraient se lancer ou qui sont dans la même activité, c'est que nous devons travailler effectivement à régulièrement investir dans la formation des hommes, dans le transfert des technologies, et le renforcement des capacités.

Parce que nous avons été un peu surpris en Afrique parce que beaucoup de pays font de la recherche, mais très peu possèdent des équipements qui peuvent arriver à donner une réponse claire lorsque nous sommes dans ce genre de cas.

Ces événements-là peuvent encore arriver et peut-être que ça viendra encore.

Donc, je pense qu'aujourd'hui, ce serait d'œuvrer surtout dans le sens des collaborations interinstitutionnelles, peut-être inter-états ou sous régionales, de renforcer nos capacités locales aussi et d'apporter un peu plus dans le domaine de la biologie moléculaire, mais aussi de la biologie.

Donc, voici un peu ce que je peux partager comme expérience.

Il faut dire que ça n'a pas été forcément facile.

On a beaucoup travaillé, mais on y arrive un peu.

Donc, voici ce que je pouvais un peu partager avec vous.

Merci encore.