

UNIVERSITÉ DES SCIENCES, DES TECHNIQUES  
ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO



Faculté de Pharmacie

ANNEE : 2017-2018

Thèse N°.....

## **Surveillance des émergences virales au Mali : étude pilote chez les enfants de 1 à 14 ans à Bamako.**

Thèse présentée et soutenue publiquement le .../... 2018

Par Mr Pierre Amaga Kodio

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

### **Jury :**

Président: Pr Daouda K. MINTA

Membres: Dr Ibréhima GUINDO

Dr Abdallah TRAORE

Co-directeur de thèse : Dr Abdoul Karim SANGARE

Directeur de thèse : Pr Ag. Bourèma KOURIBA

**Liste des membres de l'administration et du corps  
enseignant de la faculté de pharmacie  
année universitaire 2017-2018**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN : M. Boubacar TRAORE**, Professeur

**VICE-DOYEN : M. Ababacar MAIGA**, Professeur

**SECRÉTAIRE PRINCIPAL : M. Seydou COULIBALY**, Administrateur Civil

**AGENT COMPTABLE : M. Famalé DIONSAN**, Contrôleur des Finances

**LES PROFESSEURS HONORAIRES**

M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Mahamadou	CISSE	Biologie
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
M. Boulkassoum	HAÏDARA	Législation
M. Moussa	HARAMA	Chimie Organique (décédé)
M. Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
M. Alou A.	KEÏTA	Galénique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Bréhima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
M. Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

**DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES  
PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

M. Mounirou	BABY	Hématologie
M. Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
M. Alassane	DICKO	Santé Publique
M. Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie

M. Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

### **1. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

M. Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Généraliste
M. Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
M. Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie, Chef de DER
M. Ousmane	TOURE	Santé Publique/ Santé environnement

### **2. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE**

M. Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
M. Charles	ARAMA	Immunologie
M. Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
M. Seydina A. S.	DIAKITE	Immunologie
M. Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
Mme Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
M. Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbiologie
M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie clinique
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie clinique
M. Yaya	GOITA	Biochimie clinique
M. Ibrahima	GUINDO	Bactériologie Virologie
Mme Aminatou	KONE	Biologie moléculaire
M. Birama Apho	LY	Santé publique
M. Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
M. Kassoum	KAYENTAO	Santé Publique/ Biostatistiques
M. Issaka	SAGARA	Santé Publique/ Biostatistiques
M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie

Mme Fanta	SANGHO	Santé publique
M. Mahamadou S.	SISSOKO	Santé Publique/ Biostatistiques

### **3. ASSISTANTS/ATTACHES DE RECHERCHE**

M Issa	DIARRA	Immunologie
M. Mamadou Lamine	Diarra	Botanique-Biologie végétale
Mme Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
Mme Fatou	DIAWARA	Épidémiologie
Mme Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
M. Oumar	GUINDO	Épidémiologie
M. Falaye	KEÏTA	Santé Public/Santé Environnement
Mme N'Deye Lallah Nina	KOÏTE	Nutrition
M. Yacouba	MAÏGA	Biostatistique
M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
M. Oumar	SANGHO	Épidémiologie
M. Djakaridia	TRAORE	Hématologie

## **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

### **1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
M. Saïbou	MAÏGA	Législation
Mme Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

### **2. MAITRES DE CONFÉRENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

Néant

### **3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE**

M. Loséni	BENGALY	Pharmacie hospitalière
M. Moussa	SANOGO	Gestion
M. Yaya	COULIBALY	Législation
Mme Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie
M. Issa	COULIBALY	Gestion

M. Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
M. Souleymane	DAMA	Sciences Pharmaceutiques
M. Hama Boubacar	MAÏGA	Galénique
M. Moussa	SANOGO	Gestion

#### **4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE**

M. Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
M. Antoine	DARA	Sciences Pharmaceutiques
M. Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
M. Adama	DENOU	Pharmacognosie
M. Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
M. Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
Mme Assitan	KALOGA	Législation
M. Ahmed	MAÏGA	Législation
Mme Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique
M. Aboubacar	SANGHO	Législation
M. Bourama	TRAORE	Législation
M. Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
M. Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
Mme Aminata Tieba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
M. Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

### **DER : SCIENCES DU MÉDICAMENT**

#### **1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

M. Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie Chimique
M. Benoit Yaranga	COUMARE	Chimie Analytique
M. Ababacar Ibrahim	MAÏGA	Toxicologie

#### **2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

M Sékou	BAH	Pharmacologie, Chef de DER
---------	-----	----------------------------

#### **3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE**

M. Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
M. Mody	CISSE	Pharmacie Chimique

M. Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie
M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie
<b>4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE</b>		
M. Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
Mme Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
M. Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
Mme Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
M. Abdourahamane	DIARA	Toxicologie Bromatologie
M. Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
M. Madani	MARIKO	Chimie Analytique
M. Mohamed El béchir	NACO	Chimie Analytique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
M. Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

#### **DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

##### **PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

M. Cheick F.	TRAORE	Biologie/Entomologie
M. Mouctar	DIALLO	Biologie Chef de DER
M. Mahamadou	TRAORE	Génétique

##### **1. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

M. Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée
------------	---------	------------------

##### **2. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE**

M. Abdoulaye	KANTE	Anatomie
M. Boureïma	Kelly	Physiologie Médicale

##### **3. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE**

M. Seydou Simba	DIAKITE	Chimie Organique
M. Modibo	DIALLO	Génétique
M. Moussa	KONE	Chimie Organique

M. Massiriba	KONE	Biologie Entomologie
--------------	------	----------------------

**CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

M. Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
M. Babou	BA	Anatomie
M. Adourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
M. Souleymane	COULIBALY	Psychologie de la Santé
M. Bouba	DIARRA	Bactériologie
M. Modibo	DIARRA	Nutrition
M. Moussa I.	DIARRA	Biophysique
M. Babacar	DIOP	Chimie
M. Atimé	DIMDE	Bromatologie
M. Yaya	KANE	Galénique
M. Boubacar	KANTE	Galénique
M. Aboubakary	MAIGA	Chimie Organique
M. Almoustapha I	MAIGA	Virologie
M. Massambou	SACKO	SCMP/SIM
M. Modibo	SANGARE	Anglais
M. Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
Mme Fatoumata	SOKONA	Hygiène du Milieu
M. Fana	TANGARA	Maths
M. Abdel Kader	TRAORE	Sémiologie/Pathologies Médicales
M. Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

## DEDICACES ET REMERCIEMENTS

### DEDICACES

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut  
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour,  
Le respect, la reconnaissance...  
Aussi, c'est tout simplement que  
Je dédie ce travail...

#### **A mon cher Père, MOISE KODIO**

Cher papa, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que nous avons toujours eu pour vous. Vous êtes un père, un guide, un Conseiller, un confident pour vos enfants et vos proches.  
Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour notre éducation et notre bien-être. Vous avez toujours voulu nous voir réussir dans tout ce que nous entreprenons, le respect de l'autre, l'honnêteté, l'amour du travail bien fait. Vous nous avez appris à aimer le travail. Je voudrais vous exprimer toute ma profonde gratitude. Ce travail est le vôtre. Puisse le Seigneur vous protéger, vous bénir et vous donner longue vie auprès de nous.

#### **A ma chère Mère AMINATA KODIO**

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi.

Mère douce, exemplaire, généreuse, attentionnée, affable, honorable, aimable et bonne conseillère, tu représentes pour nous le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de nous encourager et de prier pour nous. Tes prières et tes bénédictions nous ont été d'un grand secours pour mener à bien nos études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Merci d'avoir été toujours une source de persévérance et d'amour pour nous.

Ce travail est le fruit de ta patience et de tes multiples encouragements. Que Dieu te garde encore longtemps auprès de nous et qu'il te donne la santé nécessaire pour savourer les fruits de tes sacrifices.

#### **A mes frères et sœurs : Hawa Kodio, Gabrielle Kodio, Elisabeth G Kodio, Yagonogo Kodio.**

Pour l'affection qui nous lie, pour l'intérêt que vous portez à ma vie, pour vos soutiens, vos compréhensions et vos encouragements. Que ce travail soit le témoin de la reconnaissance infinie. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et que je sois toujours le frère dont vous serez fier.

J'espère que vous trouverez dans ce mémoire le témoignage de mes sentiments les plus sincères et les plus affectueux. Que Dieu vous protège et consolide les liens sacrés qui nous unissent. Je vous adore....



## **A la mémoire de mes grands parents**

Qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

### **REMERCIEMENTS**

Mes grands remerciements vont d'abord à Dieu, le Tout Puissant, le Miséricordieux, qui m'a donné la force d'achever ce travail de thèse en bonne santé et qui m'a aidé à dépasser toutes les difficultés rencontrées.

Ce travail de thèse a été le labeur de plusieurs mois et n'aurait jamais été mené à terme sans le soutien d'un grand nombre de personnes que je tiens vivement et très sincèrement à remercier.

Mes remerciements vont à l'envers de tous ceux et celles qui ont contribué à l'élaboration de ce document et plus particulièrement mes chefs Dr Lassana G Timbiné, Dr Bréhima TRAORE, Dr Abdoul K SANGARE, Dr Maoulouda CHABANE, Mr Judicaël OUEDRAOGO, Mr Abdoulaye TOURE et Mr Issa SOUMARE. Leur disponibilité et leur aide précieuses ont été d'une très grande importance dans le présent document.

A tout le personnel du Centre D'infectiologie Charles Mérieux.

Je remercie également tous ceux qui m'ont encouragé et ont cru en moi durant toutes ces années depuis le début jusqu'à aujourd'hui notamment mes frères, cousins et cousines et mon ami, camarade et frère Mohamed Guindo votre soutien et vos conseils ne m'ont jamais fait défaut... Soyez tous assurés de ma profonde reconnaissance et de mon entière disponibilité.

A tous mes Professeurs de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bamako  
Il vous revient le mérite de nous avoir prodigué un enseignement profitable et une formation complète.

Veillez accepter mes remerciements les plus sincères.

Au personnel du service de pédiatrie du CHU Gabriel Toure et CHU Hôpital du Mali.

### **1.1 A MES ADORABLES COUSINS ET COUSINES**

Je vous dédie cette thèse tout en vous souhaitant une longue vie pleine de réussite de santé et de bonheur...

**A MES AMIS ET COLLEGUES** : Souleymane Konaré, Sidiki Kamissoko, Bekaye Diarra, Aly A Ba, Modibo Traoré, Bourèma Diabaté, Boubacar Traoré, Seydou Coulibaly, Moriba Samaké, à mon compagnon et frère Mohamed Guindo

En souvenir des moments merveilleux que nous avons passés et aux liens solides qui nous unissent. Un grand merci pour votre soutien, vos encouragements, votre aide.

J'ai trouvé en vous le refuge de mes chagrins et mes secrets.

Avec toute mon affection et estime, je vous souhaite beaucoup de réussite et de bonheur, autant dans votre vie professionnelle que privée. Je prie Dieu pour que notre amitié et fraternité soient éternelles...

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail. A tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur.

✓ **A notre Maître et Président du jury**

**Professeur Daouda Kassoum MINTA**

- Professeur Titulaire de Maladies Infectieuses et Tropicales ;
- Directeur du centre d'excellence de Prise en charge VIH adulte du Mali ;
- Chercheur au DEAP/MRTC/FMOS-Mali ;
- Vice-président de la Société Africaine de Pathologies Infectieuses ;
- Président du comité scientifique VIH du Mali ;
- Président de la Société Malienne de Contrôle de Résistances aux Antimicrobiens (SONARAM).

**Cher Maître,**

Nous sommes très honorés que vous ayez accepté de présider notre jury de thèse. Votre disponibilité, votre rigueur scientifique, votre esprit d'ouverture et votre amour pour le travail bien fait nous ont particulièrement impressionnés. Nous gardons de vous l'image d'un enseignant rigoureux et soucieux de transmettre ses connaissances à la jeune génération. Soyez rassurés que nous serons fidèles à vos enseignements et sommes très fiers d'être comptés parmi vos élèves. En espérant que par ce travail nous avons comblé vos attentes, veuillez recevoir cher maître, l'expression de notre profonde gratitude.

**A notre Maître et Juge**

**Docteur Ibréhima GUINDO**

- Maître-Assistant de Bactériologie-Virologie
- Chef du Service de Bactériologie-Virologie à l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP).

**Cher Maître,**

Nous sommes très honorés que vous ayez accepté de juger ce travail malgré vos multiples occupations. Vous nous avez reçus avec une grande disponibilité et nous avons été marqués par votre esprit scientifique et critique. Trouvez ici l'expression de notre profonde admiration et nos remerciements les plus sincères.

✓ **A notre Maître et Juge**

**Docteur Abdallah TRAORE**

- Docteur en microbiologie ;
- Maître de Recherche de microbiologie
- Directeur Adjoint du Laboratoire Central Vétérinaire (LCV) ;
- Responsable du laboratoire de virologie.

**Cher Maître,**

Nous vous remercions infiniment d'avoir accepté de juger ce travail malgré vos multiples occupations. Merci pour vos corrections et suggestions très utiles qui ont permis d'améliorer notre travail. Nous avons eu la chance de découvrir le Laboratoire Central Vétérinaire grâce à notre contact avec vous et nous vous remercions de l'opportunité que vous nous avez offerte. Merci également pour la documentation sur le règlement sanitaire international. Tout cela montre à suffisance votre volonté de transmettre vos connaissances aux jeunes. Nous vous serons reconnaissant et prions DIEU qu'il vous accorde longue vie.

✓ **A notre Maître et Co-directeur**

**Docteur Abdoul Karim SANGARE**

- Docteur en Microbiologie
- Chef de l'unité des Pathogènes Emergents et Re-émergents du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) - Mali,
- Chercheur au Malaria Research and Training Center (MRTC).

**Cher Maître,**

Nous vous remercions de nous avoir suivis et encadrés au cours de ce travail. Vous nous avez grandement apporté tant sur le plan scientifique qu'humain. Vous nous avez soutenus et encouragés et nous vous serons toujours reconnaissant. Nous avons apprécié votre rigueur scientifique, votre ténacité et votre amour pour un travail bien fait.

Recevez ici cher maître nos sincères remerciements et notre profonde gratitude.

✓ **A notre Maître et Directeur de thèse**

**Professeur Bouréma KOURIBA**

- Maître de Conférences Agrégé d'Immunologie
- Chef du Département des Sciences Biologiques et Médicales de la FAPH
- Directeur Scientifique du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux de Bamako
- Chef de l'Unité d'Immunologie Cellulaire et moléculaire du MRTC/DEAP
- Président de la Société Malienne d'Immunologie.

**Cher Maître,**

Nous sommes très honorés que vous nous ayez confié ce travail. Vos qualités humaines et intellectuelles, votre compétence, votre grande simplicité et votre rigueur nous ont profondément marqués. Nous avons bénéficié de vos enseignement tant à la faculté qu'au cours de ce travail et nous retenons votre engagement pour une formation de qualité de la jeunesse. Nous espérons toujours bénéficier de votre attention et vous prions d'excuser nos fautes et imperfections.

Recevez toute notre gratitude.

## **LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS**

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARN** : Acide Ribonucléique

**AS** : Aide-soignant

**AVE** : Elution Buffer (tampon d'élution)

**AVL** : Viral Lysis Buffer and carrier RNA

**AW1** : Wash Buffer (1) (tampon de lavage 1)

**AW2** : Wash Buffer (2) (tampon de lavage 2)

**CCHF** : Crimée Congo Hemorrhagic Fever

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CICM** : Centre d'Infectiologie Charles Mérieux

**CVD** : Centre de Développement des Vaccins

**CY5** : Marqueur Fluorescent de la famille des Cyanines

**DHF** : Dengue Hemorrhagic Fever

**EDTA** : Ethylène Diamine Tétra Acétique

**ELISA** : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

**Et OH** : Ethanol

**FAM** : 5-carboxyfluorescein

**FHCC** : Fièvre Hémorragique Crimée Congo

**FHE** : Fièvre Hémorragique Ebola

**HRP2** : Protéine Riche en Histidine 2

**IgG** : Immunoglobuline G

**IgM** : Immunoglobuline M

**IFN** : Immunofluorescence Indirecte

**Kb** : Kilo Base

**LRM** : Laboratoire Rodolphe Mérieux



**ml** : millilitre

**MSHP** : Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique

**NFS** : Numération Formule Sanguine

**OMS** : Organisation Mondial de la Santé

**PED** : Pathogènes Emergents Dangereux

***P. falciparum*** : *Plasmodium falciparum*

***P. vivax*** : *Plasmodium vivax*

***P. ovale*** : *Plasmodium ovale*

***P. malariae*** : *Plasmodium malariae*

**pLDH** : lactinodeshydrogenase

**PSM** : Poste de Sécurité Microbiologique

**QPCR** : Quantitative Polymérase Chain Reaction en temps réel

**RVFV** : Rift Valley Fever Virus

**SGA** : Streptocoque de Groupe A

**Taq** : Taq polymérase

**TDR** : Test de Diagnostic Rapide

**TET** : Tétrachlorofluorescéine

**TSS** : Technicien supérieur de Santé

**µl**:microlit

# Table des matières

1	INTRODUCTION.....	21
2	OBJECTIFS .....	23
2.1	Objectif général .....	23
2.2	Objectifs spécifiques .....	23
3	GENERALITES .....	24
3.1	Définitions de l'émergence et de la réémergence.....	24
3.2	Maladie à Virus Ebola.....	24
3.2.1	Epidémiologie .....	24
3.2.2	Agent pathogène.....	25
3.2.3	Symptomatologie.....	25
3.2.4	Diagnostic biologique.....	26
3.2.5	Traitement .....	26
3.3	Fièvre de la vallée du Rift .....	27
3.3.1	Epidémiologie .....	27
3.3.2	Agent pathogène.....	28
3.3.3	Symptomatologie.....	28
3.3.4	Diagnostic biologique.....	29
3.3.5	Traitement .....	30
3.4	Dengue .....	30
3.4.1	Epidémiologie .....	30
3.4.2	Agent pathogène.....	31
3.4.3	Symptomatologie.....	31
3.4.4	Diagnostic biologique.....	32
3.4.5	Traitement .....	33
3.5	Fièvre Hémorragique Crimée Congo .....	33
3.5.1	Epidémiologie .....	33
3.5.2	Agent pathogène.....	33
3.5.3	Symptomatologie.....	34
3.5.4	Diagnostic biologique.....	34
3.5.5	Traitement .....	35

4	MATERIELS ET METHODES .....	38
4.1	Lieu d'étude.....	38
4.1.1	CHU Gabriel Touré.....	38
4.1.2	CHU Hôpital du Mali .....	39
4.1.3	Centre d'Infectiologie Charles Mérieux .....	39
4.2	Type et période d'étude.....	40
4.3	Population d'étude.....	40
4.3.1	Critères d'inclusion .....	41
4.3.2	Critères de non inclusion .....	41
4.3.3	Echantillonnage et Calcul de la taille de l'échantillon .....	41
4.4	Méthodes d'études.....	43
4.4.1	Recrutement des volontaires de l'étude.....	43
4.4.2	Tests de diagnostic et prélèvements effectués au sein des 2 structures hospitalières (HGT, HDM).....	44
4.4.3	Techniques biologiques utilisées pour le traitement des échantillons au laboratoire CICM	46
4.5	Saisie et analyse des données .....	57
4.6	Considérations éthiques.....	57
5	RESULTATS .....	60
5.1	Sociodémographiques. ....	60
5.2	Résultats biologiques.....	63
5.3	Températures moyennes chez les patients détectés positifs aux virus .....	66
5.4	Mesure du paramètre hématologique = taux d'hémoglobine .....	67
6	DISCUSSION .....	70
7	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS .....	75
7.1	Conclusion.....	75
7.2	Recommandations .....	75
8	RESUME.....	77
9	REFERENCES .....	81
10	ANNEXES .....	85

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I : SYNTHÈSE SUR LES SIMILITUDES ET LES DIFFÉRENCES ENTRE CES MALADIES ÉMERGENTES.....	36
Tableau II : Calcul de la taille de l'échantillon en fonction des niveaux de confiance. ....	42
Tableau III: Valeurs seuils des taux d'hémoglobine chez les enfants selon l'OMS. ....	47
Tableau IV : Composition du mélange réactionnel en fonction du pathogène recherché.....	51
Tableau V : Programmes du ThermoCycleur en fonction du pathogène recherché. ....	54
Tableau VI: Répartition des enfants de l'étude par classe d'âge à l'HGT et à l'HDM. ....	60
Tableau VII : Répartition des enfants de l'étude selon le sexe à l'HGT et à l'HDM. ....	61
Tableau VIII : Répartition des enfants de l'étude selon le statut vaccinal (rougeole et fièvre jaune) à l'HGT et à l'HDM. ....	62
Tableau IX : Fréquence de pathogènes émergents détectés par RT-PCR chez les enfants fébriles à l'HGT et à l'HDM.....	63
Tableau X: Répartition des enfants de l'étude en fonction de l'intensité de la fièvre à l'HGT et à l'HDM.....	64
Tableau XI : Répartition des pathogènes recherchés en fonction des tranches d'âge. ....	65
Tableau XII : Températures moyennes chez les enfants infectés par le virus dengue par celui de Crimée Congo.....	66
Tableau XIII : Comparaison des taux d'hémoglobine par tranches d'âge et par hôpital chez les enfants inclus dans l'étude.....	67
Tableau XIV: Comparaison de la moyenne des taux d'hémoglobine selon le sexe. ....	68
Tableau XV: Fréquence de l'anémie chez les enfants de l'étude dans les 2 structures de santé.....	68
Tableau XVI : Taux d'hémoglobine chez les enfants porteurs du virus de la Dengue ou de la fièvre Hémorragique Crimée Congo.....	69

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Boîte à gant pour inactivation des échantillons.....	49
Figure 2 : Dispositif complet utilisé pour l'amplification de ARN/ADN : ThermoCycleur = SmartCycler® (Stratagème) ; Ordinateur portable ; mini centrifugeuse pour tube PCR ; portoir de tube PCR. ....	55
Figure 3 : Schéma de l'étude.....	59

## 2 INTRODUCTION

Les maladies virales émergentes et réémergences constituent un problème majeur de santé publique dans le monde (1). Ces dernières années, les fièvres hémorragiques virales (VHF) sont apparues parmi les maladies les plus connues du grand public. Ce sont des zoonoses émergentes ou ré-émergentes, potentiellement fatales, caractérisées chez l'homme par un syndrome fébrile douloureux évoluant dans une proportion vers un syndrome hémorragique plus ou moins sévère. Elles sont causées par plusieurs familles de virus à ARN enveloppés : filovirus (fièvre hémorragique Ebola et Marburg), arénavirus (fièvre de Lassa), bunyavirus (fièvre de la vallée du Rift, fièvre hémorragique de Crimée-Congo et hantavirus) et Flavivirus (dengue, fièvre jaune), et probablement un rhabdovirus découvert non encore isolé (2,3). L'émergence de ces nouvelles maladies tient essentiellement aux modifications de l'environnement, imposées par l'homme, et aux changements dans son mode de vie et son comportement. Seules, l'augmentation de la performance de la surveillance épidémiologique au niveau mondial, l'amélioration des systèmes de santé publique, l'éducation et la recherche de nouveaux anti-infectieux et de nouveaux vaccins nous permettront de lutter efficacement contre la menace sans cesse renouvelée des maladies infectieuses.

Ainsi, certains virus ont traversé les barrières d'espèce et ont provoqué des épidémies souvent meurtrières dans les populations humaines. C'est le cas de la maladie à virus EBOLA qui a récemment fait plus de 11.000 morts en Guinée, Sierra Leone et Libéria. Cette maladie a d'ailleurs traversé les frontières et a atteint des pays voisins de Guinée comme le Mali et le Sénégal puis des pays très éloignés comme les USA, et l'Espagne(4,5).

Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV, famille des Bunyaviridae, genre Nairovirus) est à l'origine de la fièvre hémorragique. Le CCHFV est endémique dans de nombreuses régions du monde, notamment en Eurasie, en Amérique centrale et dans

certaines régions d'Europe et d'Afrique. Jusqu'à présent, les cas signalés d'infection par le virus CCHFV en Afrique de l'Ouest étaient limités au Sénégal(6) et à la Mauritanie (7), tandis que le Mali n'était pas considéré comme une région endémique du CCHFV. Néanmoins, des études récentes ont confirmé l'abondance du vecteur de la tique CCHFV (*Hyalomma* spp.) Au Sud Mali. En outre, ces études ont démontré que les tiques du Mali collectées chez les bovins hébergent le CCHFV (8). Cependant, à ce jour, aucun cas humain n'a été décrit dans le centre du Mali.

Ces menaces ont poussé le gouvernement du Mali à travers le Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique a organisé une surveillance de ces pathologies émergentes et réémergences. C'est dans ce contexte que le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) a initié une étude des causes de fièvre d'origine non connue chez les enfants dans 2 hôpitaux.

Partant de cette expérience le CICM a été sollicité par le Ministère de la Santé et de l'Hygiène Publique (MSHP) pour effectuer le diagnostic de la fièvre de la vallée du rift et de la dengue dans le cadre de la surveillance épidémiologique. Cependant, le but de notre travail était d'une part d'évaluer la fréquence des fièvres chez les enfants venus en consultation à l'hôpital Gabriel Touré (HGT) et l'hôpital du Mali (HDM) et d'autre part de diagnostiquer ces causes de fièvres dans le cadre d'une investigation épidémiologique dans différentes localités du Mali.

### **3 OBJECTIFS**

#### **3.1 Objectif général**

Contribuer au renforcement du système national de surveillance épidémiologique des infections virales émergentes et réémergences au Mali.

#### **3.2 Objectifs spécifiques**

- 1) Identifier les virus responsables de fièvres hémorragiques : Ebola, Dengue, fièvre de la vallée de Rift, fièvre Crimée Congo par la méthode moléculaire chez les enfants venus en consultation pour fièvre dans les hôpitaux Gabriel Touré et du Mali.
- 2) Déterminer les modifications hématologiques chez les enfants fébriles venus en consultation à l'HGT et HDM.
- 3) Participer à la surveillance épidémiologique de : la dengue, la fièvre à virus Ebola, la fièvre de la vallée de Rift, et la fièvre Crimée Congo au Mali.

## **4 GENERALITES**

### **4.1 Définitions de l'émergence et de la réémergence**

De l'étude de quelques définitions existantes, on peut proposer qu'une maladie émergente est une maladie dont l'incidence réelle augmente de manière significative dans une population donnée, d'une région donnée et durant une période donnée, par rapport à la situation épidémiologique habituelle de cette maladie (9). Cette définition s'applique aussi bien aux maladies de l'Homme qu'à celles des animaux ou des végétaux. Même si les maladies émergentes sont principalement de nature infectieuse, il peut s'agir aussi d'autres types de maladies, toxiques, métaboliques ou autres. A partir de cette définition, il est possible d'en déduire une proposition de maladie ré-émergente qui est une « maladie qui a déjà été émergente et qui le redevient »(9).

Les fièvres hémorragiques virales étudiées dans ce travail : Ebola, Dengue, CCHFV, RVFR

### **4.2 Maladie à Virus Ebola**

#### **4.2.1 Epidémiologie**

La maladie à virus Ebola (MVE) est une maladie dévastatrice et hautement infectieuse avec un taux de mortalité élevé. Elle est endémique dans des régions de l'Afrique centrale et de l'Ouest (10) . Les premiers cas de MVE ont été découverts en 1976 simultanément au cours d'épidémies dans 2 pays voisins : au Soudan (actuel Sud Soudan) et au Zaïre (Actuel République Démocratique du Congo)(11,12) .

L'épidémie de l'Afrique de l'Ouest 2014-2015 a coûté la vie à plus de 11000 personnes et a infecté plus de 27000 dans sept pays (13). Celle-ci a prouvé que ces épidémies régionales pourraient devenir une menace potentielle pour la santé publique mondiale, car elle est devenue la source des évènements de transmission ultérieures en Espagne et aux Etats Unis.



Avant cette épidémie, la MVE avait infecté moins de 2500 personnes dans environ 30 foyers depuis sa découverte en 1976 (13). Les épidémies de la fièvre hémorragique Ebola en Afrique subsaharienne sont associées à des taux de létalité allant jusqu'à 90% (14).

#### **4.2.2 Agent pathogène**

Le virus Ebola appartient au genre Ebolavirus qui avec le genre Marburgvirus forme la famille des *Filoviridae* de l'ordre des Mononegavirales. C'est un virus à ARN, enveloppé avec un génome d'environ 19kb. Ebola virus est composé de 5 espèces : Ebola virus du Soudan, Ebola virus de la forêt de TAI, Bundibugyo Ebola virus et Reston Ebola virus, Zaïre Ebola virus (15). Les particules de ces virus ont un aspect filamenteux caractéristique qui donne à la famille de virus son nom. Le virus à l'origine de la flambée 2014-2016 en Afrique de l'Ouest appartient à l'espèce Zaïre.(16)

Le génome du virus se compose de sept gènes qui codent pour la nucléoprotéine, la glycoprotéine, la protéine 24 (VP) de virion, le VP30, le VP35, le VP40 et la Polymérase ARN ARN-dépendante (15).

#### **4.2.3 Symptomatologie**

Les symptômes précoces de l'EVD incluent une forte fièvre, un malaise, de l'asthénie et des douleurs corporelles. La fièvre persiste et de J3 au J5 puis commencent les symptômes gastro-intestinaux généralement avec des douleurs épigastriques, des nausées, maux de tête des vomissements et de la diarrhée. A la longue le malade présentera des douleurs thoraciques, abdominales, des arthralgies, myalgies, le hoquet et de l'injection conjonctivale (yeux rouges). Les symptômes neurologiques fréquemment observés incluent le délire à la fois hypo actif et hyperactif , manifesté par la confusion, le ralentissement de la cognition et l'agitation et moins fréquemment les convulsions (17). Les pertes de fluides profondes du tractus gastro-

intestinal entraînent une diminution, des volumes, des anomalies métaboliques, le choc et l'insuffisance organique. Une hémorragie persistante survient rarement (18).

#### **4.2.4 Diagnostic biologique**

L'ARN viral d'Ebola peut être détecté dans des échantillons biologiques par une réaction en chaîne en polymérase à transcription inverse en temps réel (RT-PCR).

Si le virus est détecté par un test de diagnostic d'antigènes spécifique ou par détection d'anticorps IgM dirigés contre Ebola, la RT-PCR doit être utilisée pour la confirmation. Etant donné que la sensibilité des tests moléculaires dépend des charges virales d'Ebola, les spécimens recueillis dans les 3 jours suivants l'apparition des symptômes peuvent être faussement négatifs en raison de la virémie indétectable au début du cours clinique. Dans ces circonstances, un autre échantillon de sang pour le test RT-PCR devrait être recueilli 3 jours après l'apparition des symptômes. Les tests de diagnostic rapides ont été testés sur le terrain mais ils manquent de sensibilité, nécessitent une chaîne de froid et restent en cours d'évaluation dans des essais cliniques (19). En contexte épidémique, le diagnostic biologique des maladies infectieuses doit être simple, fiable et rapide. La PCR en temps réel peut aujourd'hui être considérée comme une nouvelle méthode de diagnostic rapide.

Quelle que soit la qualité de ces tests, ils ne peuvent se substituer ni à l'examen clinique, ni aux méthodes de diagnostic conventionnelles, celles-ci restant indispensables pour isoler l'agent pathogène en cause.(20)

#### **4.2.5 Traitement**

À l'heure actuelle, ni un vaccin ni un traitement antiviral efficace n'est disponible pour l'homme.

Favipiravir était le médicament testé dans l'étude clinique JIKI en Guinée mais les résultats de cette étude n'a permis aucune conclusion statistiquement significative sur l'efficacité du médicament (21).

La combinaison d'anticorps monoclonaux avec l'IFN-alpha vectorisé par un adénovirus a récemment prolongé la fenêtre de traitement à 3 jours après exposition lorsque la virémie précoce et les symptômes étaient déjà détectables. Malgré le succès majeur jusqu'à présent, la fenêtre thérapeutique pour traiter Ebola est encore étroite en soulignant la nécessité d'élaborer des stratégies pour la prise en charge clinique de l'FHE symptomatique au-delà de la thérapie de soutien.

Néanmoins, toute une gamme de traitements potentiels, y compris des produits sanguins, des thérapies immunitaires et des traitements médicamenteux sont en cours d'évaluation. Un vaccin expérimental anti-Ebola s'est avéré très protecteur dans le cadre d'un essai majeur en Guinée (22).

### **4.3 Fièvre de la vallée du Rift**

#### **4.3.1 Epidémiologie**

Le virus de la fièvre de la vallée de Rift (RVFV) a causé plusieurs épidémies surtout en Afrique et la péninsule arabe constituant une menace importante pour la santé humaine et animale. Elle fut identifiée pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1930 au Kenya. C'est en Egypte que la 1<sup>ère</sup> et la plus importante épidémie de la RVFV s'est produite en 1977 / 78 avec une multitude d'humains infecté et d'énormes pertes économiques dans les bétails (23).

Une série d'endémies à grande échelle de RVFV dans toute la gamme endémique, y compris l'Afrique de l'Est 1997-1998, 2006-2007, le Soudan (2007), Mauritanie (2000,2012), et l'Arabie Saoudite et au Yémen (2000) a gravement affecté la santé et l'économie de dizaine de millier d'humains et des centaines de millier de bétails (24,25)

C'était la première fois que la maladie était observée en dehors du continent africain, suscitant des inquiétudes quant à sa propagation possible vers d'autres régions de l'Asie et de l'Europe.

#### **4.3.2 Agent pathogène**

Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) appartient au genre des *Phlebovirus*, qui sont des virus regroupés en raison de la ressemblance entre leurs vecteurs (des moustiques) avec le phlébotome (petit diptère piqueur). Le RVFV constitue, avec quatre autres sérogroupes (virus Bunya, Hanta, Nairo et Toscana), la famille des Bunyaviridae, ainsi nommée en raison d'un virus découvert à Bunyamwera, en Ouganda. Les particules virales enveloppées ont une forme sphérique d'un diamètre de 90 à 100 nm. Le génome viral est constitué de trois segments d'ARN (L : large ; M : medium ; S : Small). Les segments L et M sont de polarité négative, alors que l'on a constaté que le segment S avait une stratégie de codage ambisens (en partie positive et en partie négative). Le segment L code pour l'ARN-polymérase ARN-dépendante et le segment M pour les deux glycoprotéines G1 et G2 ainsi que pour une protéine non structurale (NSM). Le segment S code pour la nucléoprotéine (N) et pour une protéine non structurale (NSS).(26)

#### **4.3.3 Symptomatologie**

L'infection humaine par RVFV est généralement asymptomatique, et la majorité des personnes atteintes de symptômes cliniques présente une maladie fébrile courte et aucune séquelle à long terme. Dans certains cas chez l'homme, il y a la fièvre avec des maux de tête jusqu'à 10 jours suivit de 2 semaines de faiblesse avant rétablissement. Cependant une petite minorité développe une maladie grave de la RVFV présentant des symptômes précoces d'hépatite aigüe associée à une insuffisance rénale et des complications hémorragiques (27).

Les manifestations hémorragiques peuvent inclure une éruption cutanée, des ecchymoses sur les membres et les paupières, des saignements de gencives et des muqueuses gastro-intestinales une pression artérielle basse, une hématomérose, un méléna et une hépatomégalie.

Si le patient survit à l'hépatite, les manifestations neurologiques peuvent inclure une perte de vision et de signes d'encéphalites. Le risque de mortalité augmente pour les patients atteints de jaunisse, d'encéphalite ou de maladie hémorragique avec un taux de mortalité de 1 à 3% pouvant atteindre 50% chez les patients présentant des complications hémorragiques.

Des séquelles à long terme sont observées chez un petit nombre de patients ou les troubles neurologiques résultant d'une encéphalite peuvent conduire à une cécité, une hémiparésie, une quadraparésie une incontinence, des hallucinations, un syndrome incarné ou coma (27). La plupart des cas chez l'homme restent relativement bénins mais une petite proportion de patients développent une pathologie beaucoup plus grave prenant en général la forme d'un ou de plusieurs des trois syndromes suivants : forme oculaire (0,5 à 2% des patients), méningo-encéphalite (moins de 1%) ou fièvre hémorragique (moins de 1%) (25).

#### **4.3.4 Diagnostic biologique**

Le virus peut être détecté dans le sang pendant la phase précoce de la maladie ou dans les tissus après le décès, et ce par isolement viral en culture cellulaire, par le recours à la méthode ELISA de détection d'antigènes, et par l'utilisation de techniques moléculaires PCR.

Le dépistage d'anticorps par dosage immunoenzymatique (ELISA) peut être utilisé pour confirmer la double présence d'anticorps IgM apparaissant comme une réaction passagère et précoce, et d'anticorps IgG, les quels demeureront présents pendant plusieurs années. La présence d'anticorps IgM et IgG est spécifique au virus de la fièvre de la vallée de Rift.

### **4.3.5 Traitement**

Il n'existe ni vaccin ni de médicament agissant spécifiquement contre cette maladie. Cependant l'efficacité de la Ribavirine fut démontré en cas de prise en charge à temps. Dans les cas plus graves, l'approche thérapeutique la plus fréquente consiste à dispenser un traitement global de soutien. Néanmoins, un vaccin inactivé à usage humain et à titre expérimentale a été mis au point en 2017 (25).

## **4.4 Dengue**

### **4.4.1 Epidémiologie**

La dengue est une maladie émergente dans les régions tropicales et subtropicales, transmis à l'homme par l'intermédiaire de moustiques vecteur du genre *Aedes* : *Aedes aegypti* le plus souvent mais également *Aedes albopictus* (moustique-tigre) et *Aedes polynesiensis*. Le vecteur principal *Aedes aegypti* développe son habitat en Asie, en Afrique, en Amérique centrale, en Amérique du sud et dans les pacifiques. Bien que la plupart des infections de la dengue entraîne une maladie fébrile auto limitée, la dengue est un problème de santé publique par ce que la DHF peut être fatale (28)

Les infections virales de la dengue sont l'une des maladies importantes causées par les moustiques dans le monde. Actuellement la dengue est endémique dans 112 pays dans le monde et on estime que, près de 100 millions de cas de dengue et un demi-million de cas de dengue hémorragique (DHF) se produisent dans le monde entier (29).

L'OMS estime que 3,9 milliards d'individus vivant dans 128 pays sont « exposés » au virus de la dengue aujourd'hui. En 1998 elle fut l'une des plus importantes maladies infectieuses tropicales après le paludisme, avec environs 100 millions de cas de dengue, 500000 cas de (DHF) et 25000 décès par an. Le nombre de cas dans le monde a été multiplié par 30 ces cinquante dernières années, 90% des sujets de (DHF) sont des enfants de moins de 15 ans.

Les raisons de cette résurgence et de l'émergence de cette maladie dans ces années sont complexes et pas entièrement comprises, mais les changements démographiques, sociétaux et de l'infrastructure de la santé publique au cours des 30 dernières années ont grandement contribué.(30)

#### **4.4.2 Agent pathogène**

La dengue est une maladie arbovirale transmise aux humains par les piqures de moustique Aedes femelles infectées, le virus appartient à la famille des flaviviridae et au genre Flavivirus(31). Il existe quatre serotypes différents du virus de la dengue appelés DENV 1, DENV2, DENV3 DENV 4 et une infection par chacune des serotypes entraîne une immunité permanente à ce serotype spécifique.(32)

Le virion de la dengue se compose d'un génome d'ARN monocaténaire entouré d'une nucléocapside icosaédrique ou isométrique d'environ 30nm de diamètre couverte par une enveloppe lipidique. Le virion complet mesure environ 50nm de diamètre et le génome viral a une longueur de 11kb.(29)

Comme les autres virus à ARN, le génome du virus de la dengue est en constante variation à cause de l'ARN polymérase qui n'a pas de mécanisme de vérification des erreurs lors de la réplication de l'ARN. Les nombreuses variations génétiques sont aussi causées par la réplication rapide du virus et la grande quantité de virus retrouvée dans le monde (33).

#### **4.4.3 Symptomatologie**

L'infection par le virus de la dengue peut entraîner de graves symptômes semblables à ceux de la grippe. La dengue est le plus souvent bénigne, la plupart des cas sont asymptomatiques. Par contre, chez les personnes symptomatiques, les premiers signes apparaissent habituellement de 3 à 7 jours marqués par : fièvre, maux de tête, douleurs oculaires, musculaires et articulaires, éruption cutanée. Dans certains cas, la maladie peut évoluer en

dengue sévère ou en dengue avec syndrome de choc : contusions et saignements légers (nez ou gencives) ; vomissements persistants ; douleurs abdominales ; dyspnée. La plupart des personnes infectées par le virus de la dengue se rétablissent, mais environ 2,5 % des personnes qui développent la dengue sévère ou la dengue avec syndrome de choc en meurent.(34)

#### **4.4.4 Diagnostic biologique**

Les techniques de diagnostic biologique incluent les tests d'inhibition de l'hémagglutination, le test enzymatique (ELISA), le test de fixation du complément et les tests de neutralisation.

Les tests de IgM et de IgG de la dengue ont une sensibilité de (83,9-98,4%).

Les anticorps IgG de la dengue apparaissent dans le sérum à J5 de l'infection et deviennent détectables de 30 à 60 jours après le début de la maladie. Les tests ELISA conventionnels ou de capture ont été utilisés pour identifier différents serotypes du virus de la dengue.

La RT-PCR est un outil de diagnostic précoce avec une sensibilité et une spécificité élevées avant même l'apparition d'anticorps spécifiques de la dengue. La RT-PCR est plus sensible par rapport à l'isolement du virus et identifie également le sérotype circulant, il évite également les interférences liées à la réactivité croisée des serotypes de la dengue avec d'autres Flavivirus.(29)

Un autre test plus récent recherche la protéine virale NS1, qui apparaît aux jours 1 à 3 de la maladie. Cet examen montre que la maladie est aiguë et active chez le patient. Le test possède une sensibilité d'environ 70% comparé à la PCR. Cette méthode est indiquée pour obtenir un diagnostic précoce de la maladie (32).



#### **4.4.5 Traitement**

Il n'existe actuellement aucun vaccin ou traitement antiviral spécifique pour faire face à une menace croissante de la dengue. Seule une détection rapide et une gestion clinique appropriée peuvent réduire la mortalité due à la dengue sévère (35).

### **4.5 Fièvre Hémorragique Crimée Congo**

#### **4.5.1 Epidémiologie**

La fièvre hémorragique de Crimée Congo (CCHF) est la plus importante maladie virale transmise par les tiques chez les humains, provoquant des cas sporadiques ou des épidémies de maladie grave dans une vaste région de l'Ouest de la Chine au Moyen Orient et du Sud-Est de l'Europe et dans la majeure partie de l'Afrique (36).

En Afrique il a été détecté pour la première fois en RDC et depuis lors CCHF a été découvert dans un certain nombre de pays en Afrique dont la Mauritanie et ses pays voisins (Mali) (37).

CCHF peut causer une fièvre hémorragique sévère chez les humains avec des taux de létalité pouvant aller jusqu'à 80%.

#### **4.5.2 Agent pathogène**

L'agent causal, le virus (CCHF) est un arbovirus appartenant au genre *Nairovirus*, famille *Bunyaviridae*. Le virus de la FHCC se transmet à l'être humain soit par les piqûres de tiques du genre *Hyalomma* spp, soit par contact avec du sang ou des tissus d'animaux infectés.

Le génome viral englobe 3 segments, petit (S), moyen (M) et grand (L) dont chacun contient un seul cadre de lecture ouvert flanqué par des régions non codantes, codante pour la nucléocapside, le précurseur de la glycoprotéine de la membrane et l'ARN polymérase RNA dépendante respectivement. Cinq protéines connues ( domaine de type Mucin, GP38, Gn, Nsm et Gc) sont générés à partir du précurseur de glycoprotéine (38).

### **4.5.3 Symptomatologie**

CCHF se caractérise par l'apparition abrupte de la fièvre, des maux de tête, de fatigue et de myalgie ainsi que par des symptômes gastro-intestinaux tels que les nausées, vomissements, et diarrhée. Les cas graves présentent des manifestations hémorragiques allant de pétéchies, épistaxis ecchymose et hémorragie de gingivale à des hémorragies sévères provenant de divers systèmes. Les sujets les plus gravement atteints peuvent développer une insuffisance hépatique, rénale et pulmonaire à partir du cinquième jour de maladie (39). Le taux de mortalité est de 30%. Les animaux domestiques et sauvages présentent une virémie courte (2 à 15 jours) sans développer la maladie clinique.

### **4.5.4 Diagnostic biologique**

Les techniques utilisées en routine sont l'immunofluorescence indirecte (IFI) et l'Elisa. En IFI, les anticorps IgM ou IgG ne sont pas détectables avant le troisième jour de la maladie. Aux J4 et J5, ils sont détectés chez 10 % des patients ; puis chez 65 % à J6, 83 % à J7, 94 % à J8, pour être retrouvés chez tous les patients à partir de J9. En Elisa, la détection est légèrement plus précoce qu'en IFI puisque les IgM et les IgG sont détectables dès le troisième jour de la maladie (39).

Le diagnostic moléculaire se fait par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) : la RT-PCR peut être nichée ou simple. Cette dernière présente l'avantage d'être plus rapide et de diminuer le risque de contamination, tout en offrant une sensibilité comparable à celle de la PCR nichée.(40)

Chez les patients décédés, il est rare de mettre en évidence la présence d'anticorps. C'est l'isolement viral ou la RT-PCR qui permettent le plus souvent le diagnostic.

#### **4.5.5 Traitement**

Chez l'homme, la prise en charge du CCHF repose principalement sur le traitement symptomatique (39).

On considère que l'administration de ribavirine ou de plasma en phase de convalescence avec un titre élevé d'anticorps neutralisants est un traitement utile.

Il n'a pas de vaccin efficace prouvé contre de maladie. Récemment, des études ont porté sur d'éventuels vaccins à ADN. L'innocuité et l'efficacité de ces vaccins chez l'homme n'ont toutefois pas été démontrées. (39)

1 **Tableau I : SYNTHÈSE SUR LES SIMILITUDES ET LES DIFFÉRENCES ENTRE CES MALADIES ÉMERGENTES**

<b>Virus</b>	<b>Agent pathogène</b>	<b>Mode de transmission</b>	<b>Symptômes</b>	<b>Mortalité</b>	<b>Traitement</b>
<b>Ebola</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Virus à ARN,</li> <li>- Genre Ebolavirus,</li> <li>- Famille des Filoviridae,</li> <li>- Ordre des Mononegavirales.</li> </ul>	<p>Contact avec les liquides biologiques d'une personne infectée (sang, selles, vomis, salives, spermes ....).</p> <p>Par contact avec les animaux infectés morts ou vivants.</p>	<p>Fièvre, fatigue, douleurs musculaires, céphalées et maux de gorge, diarrhées sanglantes, éruptions cutanées, insuffisance rénale et hépatique. Hémorragies internes et externes surviennent suivies du décès.</p>	<p>Les taux de létalité peuvent aller à 90%.</p>	<p>Pas de traitement disponible, pris en charge symptomatique.</p>
<b>RVFV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Virus à ARN,</li> <li>- Genre Phlebovirus,</li> <li>- Famille des Bunyaviridae.</li> </ul>	<p>Contact direct ou indirect avec le sang ou organes d'animaux contaminés.</p>	<p>Généralement asymptomatique : fièvre de courte durée sans séquelles. Souvent graves avec symptômes d'hépatite aigue, saignement des gencives et des muqueuses gastro-intestinales, insuffisance rénale, complications hémorragiques. Perte de vision, encéphalite.....</p>	<p>Le taux de mortalité est de 1 à 3% pouvant atteindre 50% chez les patients présentant des complications hémorragiques.</p>	<p>Pas vaccin ni médicament disponible. Traitement global de soutien.</p>

<b>DENGUE</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Virus à ARN,</li> <li>- Genre Flavivirus,</li> <li>- Famille des Flaviviridae.</li> </ul>	Transmis à l'homme par l'intermédiaire de moustiques de moustiques vecteurs du genre Aedes.	<p>La plupart des cas sont asymptomatiques, dans certains cas la maladie peut évoluer en dengue sévère ou en dengue avec syndrome de choc et en meurent souvent.</p> <p>fièvre, maux de tête, vomissements, douleurs abdominales, dyspnées, contusions avec saignement du nez et gencives....</p>	Environ 2,5% des personnes qui développent la dengue sévère ou avec syndrome de choc en meurent.	Pas de vaccin ni traitement antiviral spécifique, prise en charge uniquement symptomatique.
<b>CCHFV</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Virus à ARN</li> <li>- Genre Nairovirus,</li> <li>- Famille des Bunyaviridae.</li> </ul>	Transmission à l'homme à partir des tiques, et animaux d'élevage. Transmission interhumaine possible suite de contact direct avec du sang, des sécrétions biologiques des sujets infectés.	Apparition brusque de fièvre, maux de tête, fatigue et myalgies, nausées vomissements et diarrhées. Manifestations hémorragiques, épistaxis, ecchymose et saignement des gencives, souvent insuffisance hépatique, rénale et pulmonaire.	Le taux de mortalité est de 30% environ.	Pris en charge symptomatique chez l'homme, pas de vaccin efficace contre la maladie.

## **5 MATERIELS ET METHODES**

### **5.1 Lieu d'étude**

Ce travail a été effectué dans les CHU Gabriel Touré, Hôpital du Mali, et au CICM

#### **5.1.1 CHU Gabriel Touré**

C'est un centre Hospitalier Universitaire situé dans la commune 3 en plein cœur de la ville de Bamako. Il est organisé en 7 départements regroupant au total 26 services médicotechniques. Notre étude a eu lieu dans le département de pédiatrie qui est situé dans un bâtiment à 2 niveaux composé de salles de consultations externes et de suivi ; d'une salle de consultation d'urgence ; du service des hospitalisations avec les unités suivantes d'urgences (36 lits), de néonatalogie (84 lits) et de pédiatrie générale (72 lits) dont l'oncologie pédiatrique.

Le centre d'excellence pédiatrique, la nutrition, la drépanocytose et la neuro-pédiatrie sont entre autre les spécialités de ce service équipé aussi de salles pour des projets du Centre de Développement des Vaccins (CVD). Le service s'est donné comme mission les consultations ordinaires et spécialisées, le suivi des enfants hospitalisés et la formation/recherche. En 2016, le personnel était composé de : 1 Professeur, 1 Professeur agrégé, 1 Médecin chef, 15 Pédiatres, 2 animatrices, 5 assistants médicaux, 14 techniciens supérieurs de santé, 28 techniciens de santé, 1 TSS, 5 AS, 18 infirmiers contractuels de garde, 5 manœuvres et 2 secrétaires.

Durant l'année 2016, un total de 30180 enfants ont été reçus pour une consultation et 4658 enfants ont été hospitalisés.

### **5.1.2 CHU Hôpital du Mali**

L'Hôpital du Mali situé dans le quartier de Missabougou en commune VI du district de Bamako, est une structure née du fruit de la coopération Sino-Malienne. Il a été inauguré en 2010 et comporte actuellement les services suivants : médecine et spécialités médicales, chirurgie et spécialités chirurgicales, urgences et réanimation, imagerie médicale, laboratoires de diagnostic médical, radiothérapie et pharmacie hospitalière. Il a une capacité de 132 lits. Au total 60327 patients ont été consultés dans cet hôpital dont 4698 ont été hospitalisés en 2015. Notre étude s'est déroulée dans le service de pédiatrie composé d'unités et de sous unités suivantes :

- L'unité d'hospitalisation comprenant les sous-unités de néonatalogie, de pédiatrie générale et des urgences pédiatriques.
- L'unité de consultation externe comprenant 3 salles.

Le service a une capacité de 37 lits. Le personnel est composé de neuf (9) agents maliens (quatre pédiatres, un technicien supérieur, trois (3) infirmiers, un aide-soignant) et deux (2) chinois (pédiatre et une infirmière).

En 2015 au total 13841 enfants ont été reçus en consultation externe dont 1367 ont été hospitalisés (Rapport annuel 2015 du comité d'administration de l'hôpital du Mali).

### **5.1.3 Centre d'Infectiologie Charles Mérieux**

Ce centre a servi de lieu de collecte et d'analyses biologiques des échantillons de cette étude.

Il est situé dans le quartier de l'ex- base aérienne de Bamako, rue du Docteur Charles Mérieux. Il a été créé grâce au partenariat entre le Gouvernement de la République du Mali et la Fondation Mérieux.

Il a été inauguré en janvier 2005 et depuis, ses activités sont en cours jusqu'à nos jours. Il est organisé en une administration générale, un centre de formation et un laboratoire d'analyses médicales dénommé Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM). Ses activités portent sur le

diagnostic biologique, la formation et la recherche en infectiologie. Les activités de diagnostic biologiques sont les examens biochimiques, hématologiques, immunologiques, parasitomycologiques, bactériologiques et virologiques.

Le personnel est composé de 29 agents, répartis entre les services techniques du LRM (17 agents) et les fonctions de support administratif, financier et logistique (12 agents).

Le laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) se compose de laboratoire 1 et 2 au sein desquels les activités de recherche et de diagnostic sont effectuées. Le Laboratoire 1 est équipé pour réaliser des examens d'hématologie, de biochimie et d'immunologie et le Laboratoire 2 est organisé pour la microbiologie (bactériologie, virologie et parasitologie-mycologie).

Les examens moléculaires se déroulent dans 3 pièces séparées : une salle d'extraction, une salle de préparation de « Mix » et une salle d'amplification. En outre, il existe 3 salles de prélèvements et une salle des réfrigérateurs.

En plus, le CICM dispose également d'un laboratoire fixe de sécurité microbiologique de niveau 3 (P3) pour le diagnostic des tuberculoses multi-résistantes et d'un laboratoire mobile pour le diagnostic de certains pathogènes émergents potentiellement dangereux. Le laboratoire effectue également des analyses spécialisées en partenariat avec le laboratoire BIOMNIS de Lyon, France.

## **5.2 Type et période d'étude**

Il s'agissait d'une étude prospective transversale qui s'est déroulée sur un an de mars 2016 à février 2017.

## **5.3 Population d'étude**

Elle était composée d'enfants de 0 à 14 ans se présentant dans les CHU Gabriel Touré et du Mali en consultation.



### **5.3.1 Critères d'inclusion**

Etaient inclus dans cette étude, les enfants venus sur l'un des 2 sites de l'étude et remplissant les critères suivants :

- Etre venu en consultation pédiatrique
- Avoir donné le consentement écrit d'un parent ou tuteur ;
- Avoir donné l'assentiment pour un enfant âgé de 12 ans-14ans ;
- Avoir une température rectale ou tympanique mesurée à l'hôpital  $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$

### **5.3.2 Critères de non inclusion**

- N'avoir pas obtenu le consentement du parent ou tuteur
- N'avoir pas obtenu l'assentiment pour un enfant âgé de 12 à 14 ans
- Avoir des symptômes évidents d'une maladie infectieuse ou non infectieuse incluant mais non restreintes à celles ci-dessous :
  - a. Avoir une fièvre palustre ;
  - b. Avoir une infection de la peau et des muqueuses incluant la cellulite et un abcès local ;
  - c. Avoir une sinusite, ou une otite moyenne ;
  - d. Avoir un cancer ou une maladie auto-immune ;
  - e. Avoir une immunodéficience, comme le SIDA ;
  - f. Avoir une pharyngite streptococcique A ;
  - g. Etre incapable de compléter l'étude ;
  - h. Etre âgé d'au moins 3 mois et au plus 14 ans.

### **5.3.3 Echantillonnage et Calcul de la taille de l'échantillon**

Tous les patients qui répondaient aux critères d'inclusion de l'étude étaient invités à participer à cette étude. Le nombre attendu de cas ne pouvant pas être estimé avec précision en raison de la variabilité de la transmission de la maladie, le manque de données actualisées et les

contraintes de laboratoires nous avons estimé sur la base des registres des hôpitaux, pouvoir inclure environ 1000 patients (500 par site) sur 12 mois. Le but principal de cette étude est de décrire la fréquence de divers agents pathogènes de la fièvre et de ne pas comparer les populations. Cependant les comparaisons statistiques seront effectuées lors de l'analyse des facteurs de risques pour les étiologies spécifiques. Le tableau I ci-dessous montre la taille de l'échantillon nécessaire pour l'analyse des facteurs de risques.

**Tableau II : Calcul de la taille de l'échantillon en fonction des niveaux de confiance.**

Taille Population ( <i>N</i> ):.....	7.830.000
Fréquence estimée des évènements dans la population ( <i>p</i> ):	Inconnue
Limite de confiance ( <i>d</i> ):.....	5%
Effet de grappe ( <i>DEFF</i> ):.....	1
<b>Taille (<i>n</i>) pour différents niveaux de confiance</b>	
<b>Niveaux de Confiance (%)</b>	<b>Taille</b>
80%	165
90%	271
97%	471
<b>99%</b>	<b>664</b>
99.9%	1083
99.99%	1514
Taille de l'échantillon $n = (DEFF * Np(1-p)) / ((d^2 / Z^2_{1-\alpha/2} * (N-1) + p*(1-p))$	

Le calcul de la taille de l'échantillon a été réalisé en utilisant l'OPEN EPI (41). Les calculs sont basés sur une population estimée à 7.830.000 de l'âge de 0-14 ans au Mali et un niveau de confiance de 99%. Les estimations de niveau de la prévalence de la maladie chez les exposés et les non- exposés et la prévalence de l'exposition sont fondées sur les résultats d'une surveillance AFI en Egypte pour la Brucellose qui utilise une méthodologie similaire à celle décrite dans notre étude (42). Comme la prévalence réelle est inconnue pour ces paramètres, le scénario qui présentait le plus de cas a été utilisé pour le calcul. Pour prendre en compte les perdus de vues et les cas de données non exploitables la taille de l'échantillon a été fixée à 1000 (500 par site d'étude).

## **5.4 Méthodes d'études**

### **5.4.1 Recrutement des volontaires de l'étude**

Les enfants malades qui étaient amenés en consultation à l'hôpital par leur parent étaient sélectionnés pour un enrôlement dans l'étude. Au moins 2 médecins et 2 infirmières sur chaque site d'études étaient formés pour identifier les patients qui répondent aux critères d'inclusion. Les parents ou tuteurs d'enfants éligibles étaient informés et invités à participer volontairement à l'étude. Le consentement ou l'assentiment écrit (voir annexe 1a et 1b) était expliqué au parent ou au tuteur de l'enfant, dans sa langue et une copie de la fiche d'information du volontaire (voir annexe 2) lui était remise. Si le parent ou tuteur acceptait l'enrôlement de son enfant, il signait la fiche de consentement et l'enfant était ainsi inclus dans l'étude.

#### **5.4.1.1 Définition de cas**

Tout enfant âgé de 3 mois à 14 ans ayant une fièvre  $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$  n'ayant pas de paludisme, ni d'infection urinaire, ni d'angine infectieuse.

#### **5.4.1.2 Prélèvements biologiques chez les volontaires**

Pour tout enfant inclus dans l'étude les prélèvements suivants étaient systématiquement effectués : écouvillonnage de la gorge, ponction veineuse et prélèvement d'urine.

#### **5.4.2 Tests de diagnostic et prélèvements effectués au sein des 2 structures hospitalières (HGT, HDM)**

##### **5.4.2.1 Test d'urine à la bandelette à dix paramètres**

C'est un test commercial Combur 9 Test (Roche, Diagnostics GmbH, Allemagne) utilisé pour détecter dans l'urine certaines substances spécifiques des troubles du métabolisme et de la fonction hépatique, urinaire et rénale. Il s'agit : des leucocytes, des nitrites, du pH, des protéines, du glucose, des corps cétoniques, de l'urobilinogène, de la bilirubine, du sang (Technique du test voir annexe 3).

##### **5.4.2.2 Test rapide de streptocoque beta hémolytique du groupe A**

C'est aussi un test commercial MoLab® StrepA (moLab, GmbH, Allemagne) qui a été utilisé dans cette étude. L'angine bactérienne à Streptocoque A représente 25 à 40% des angines chez les enfants et seulement 10 à 25% chez les adultes. Les enfants de moins de 3 ans développent rarement une angine bactérienne. Elle se manifeste par une douleur des amygdales de la gorge profonde accompagnée d'une fièvre (38-39°C). Le principe du TDR est la mise en évidence des antigènes de la paroi spécifique de ce streptocoque éventuellement présent dans le prélèvement par les anticorps anti-SGA (apportés par le test). Si le Streptocoque de groupe A (SGA) est présent dans les sécrétions prélevées, ses antigènes réagiront avec les anticorps du test et la réaction sera visible (Technique du test voir annexe 4).

#### **5.4.2.3 Test de diagnostic rapide du paludisme**

Les deux (2) structures hospitalières (HGT et HDM) ont utilisé le même test commercial CareStart™ (Access Bio, USA) afin d'écarter les cas de paludisme. C'est un test rapide et qualitatif pour le dépistage de protéine riche en histidine 2 (HRP2) du *P. falciparum* et de Lactinodeshydrogenase (pLDH) (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*) dans le sang. Le test contient une bandelette de membrane enduite de deux anticorps monoclonaux sur deux lignes différentes de la bandelette-test. Un anticorps monoclonal (ligne test 2) est spécifique à la lactinodeshydrogenase (pLDH) des espèces de Plasmodium (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*) et l'autre ligne (ligne de test 1) contient un anticorps monoclonal spécifique à la protéine riche en histidine 2 (HRP2) du *P. falciparum*. Le tampon conjugué comprend des anticorps liés à des particules d'or, qui sont spécifiques au pLDH pan et au HRP2 du *P. falciparum* (Technique du test voir annexe 5).

#### **5.4.2.4 Prélèvements pour hémoculture et PCR**

Trois (3) ml de sang veineux étaient prélevés dans le flacon d'hémoculture et au minimum 1,5 ml de sang dans le tube contenant l'anticoagulant (tube EDTA) étaient acheminés au laboratoire CICM.

#### **5.4.2.5 Transport des échantillons au laboratoire CICM**

Les échantillons ont été transportés dans les triples emballages (Biological Substance, Category B UN3373). Les tubes primaires étiquetés étaient mis dans des flacons rigides avec fermeture à vis. Cet ensemble était ensuite introduit dans un box fermé hermétiquement. Les échantillons étaient ensuite acheminés au laboratoire dans un délai de 6 heures maximum.

#### **5.4.2.6 Réception des échantillons au laboratoire CICM**

Les échantillons étaient traités le plus rapidement possible comme suite :

- Enregistrement des échantillons dans le logiciel de gestion de laboratoire SYSLAM (Codatec Informatique)
- Etiquetages des fiches et des flacons
- Remplissage d'une fiche de laboratoire pour chaque échantillon
- Enregistrement des échantillons dans le registre des échantillons
- Réalisation de l'hémogramme
- Insertion des flacons d'hémoculture dans le BacT/ALERT 3D.

Après l'hémogramme, les tubes EDTA étaient centrifugés et le plasma reparti en aliquot de 200µl chacun. Un aliquot de chaque échantillon était utilisé pour l'extraction des acides nucléiques (ADN et ARN). Le reste était conservé à -80° comme backup.

### **5.4.3 Techniques biologiques utilisées pour le traitement des échantillons au laboratoire CICM**

#### **5.4.3.1 Hémogramme**

L'hémogramme est un examen biologique qui apporte des informations sur les cellules du sang contribuant au maintien de l'intégrité de l'organisme : oxygénation des tissus, défense de l'organisme contre les agents pathogènes, prévention du risque hémorragique. Il constitue l'expression du résultat de :

- La numération des éléments cellulaires du sang circulant (hématie, leucocyte, et plaquette) accompagnée des paramètres permettant de caractériser la population érythrocytaire (constante érythrocytaire).
- La formule leucocytaire : détermination de la proportion des différents types de leucocyte (polynucléaire neutrophile, éosinophile, basophile, lymphocyte, monocyte) et la détection d'autres cellules éventuellement (anormalement rencontré dans le sang).

Cet examen est réalisé sur du sang veineux prélevé sur anticoagulant sec (EDTA). Lors du prélèvement, le tube doit être agité pour éviter la formation de micro caillots. La

numération formule sanguine (NFS) est maintenant automatisée de façons suffisamment fiable. Cependant ces appareils ne détectent pas les cellules dont la présence dans le sang est anormale (cellules maligne par exemple), en conséquence en cas d'anomalie quantitative ou qualitative détectées par l'automate, une étude morphologique du frottis de sang est indispensable. Elle est réalisée par étalement d'une goutte de sang sur une lame de verre et coloration au MGG. L'analyse microscopique permet au biologiste :

- Etudier la morphologie des globules rouges, des leucocytes et des plaquettes ;
- Etablir une formule leucocytaire avec détection d'éventuelles cellules anormales non identifiées par l'automate (blaste, myélemie, cellules lymphomateuses) ;
- Apprécier la présence d'éventuels agrégats plaquettaires permettant de détecter une fausse thrombopénie.

Les indications de la numération formule sanguine sont très nombreuses. Parmi elles on note un syndrome infectieux inexplicé, persistant, récidivant ou grave.

Le syndrome infectieux regroupe la fièvre, les signes cardiaques, respiratoires, digestifs, neuropsychique, cutanéomuqueux , adénopathie cervicale, axillaire, inguinale (43).

Les anomalies de la NFS pouvant faire suspecter une infection bactérienne sont (44) :

- Polynucléose : augmentation des globules blancs polynucléaires
- neutropénie : diminution du taux de granulocyte neutrophiles dans le sang
- lymphopénie : diminution du taux de lymphocyte dans le sang.

**Tableau III:** Valeurs seuils des taux d'hémoglobine chez les enfants selon l'OMS.

TRANCHE D'AGE	HEMOGLOBINE (g/l)	
	Pas d'anémie	Anémie
Enfants de 6 à 59 mois	110	100-109
Enfants de 5 à 11 ans	115	110-114
Enfants de 12 à 14 ans	120	114-119

#### **5.4.3.2 Hémoculture**

Une hémoculture est un examen sanguin essentiel en infectiologie. Elle consiste en un prélèvement de sang veineux, qui est ensuite mis en culture afin d'y rechercher des microorganismes (lors d'une septicémie) et permet également de réaliser un antibiogramme (étude de la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques) sur les germes retrouvés. Elle permet de confirmer le diagnostic clinique d'un état infectieux en isolant et en identifiant la bactérie responsable. Cependant, elle a deux intérêts : un intérêt de diagnostic et un intérêt thérapeutique.

#### **5.4.3.3 Diagnostic moléculaire des pathogènes**

Les échantillons d'origine humaine étaient constitués de plasma de préférence

##### **5.4.3.3.1 Etapes pré-analytiques**

- **Inactivation des prélèvements**

Cette inactivation était effectuée pour les échantillons à forte suspicion de fièvre hémorragique. Les échantillons de sang étaient reçus et immédiatement placés dans une boîte à gant (Figure 1).

- Disposer le tube Eppendorff de 1,5ml contenant 560ml d'AVL + 5,6ml de ARN carrier dilué.
- Ajouter délicatement 50 µl de sang prélevé au tube contenant le mélange AVL+ ARN Carrier dilué.
- Mélanger au vortex et centrifuger 30s avec la micro-centrifugeuse placée dans la boîte à gant.
- Laisser incuber pendant 10mn à la température de la boîte à gants.
- Ajouter 560ml d'éthanol.



- L'inactivation est ainsi terminée et le tube peut être sorti de la boîte à gant en prenant toutes les mesures de sécurité selon la procédure.



**Figure 1** : Boîte à gant pour inactivation des échantillons.

#### **5.4.3.3.2 Etapes analytiques**

##### **a. Extraction des acides nucléiques avec le Kit QIAGEN QIAmp Viral RNA**

Elle avait lieu sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) type I.

Préparation préalable des réactifs :

- *Le mélange "RNA carrier" + Tampon AVE :*

310  $\mu$ l de tampon AVE étaient ajoutés au tube contenant 310  $\mu$ g du carrier ARN lyophilisé pour obtenir une solution de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Le « ARN carrier » complètement dissout était partagé en aliquot et conservé à -20°C.

- *Le mélange "RNA carrier" + Tampon AVE+ Tampon AVL :*

5,6 $\mu$ l du "RNA carrier" dilué étaient mélangés à 560  $\mu$ l de tampon AVL. Pour un plus grand nombre d'échantillons, les volumes étaient calculés ainsi qui suit :

$$N \quad x \quad 0,22 \quad \text{ml} \quad = \quad Y \quad \text{ml}$$

$$Y \quad \text{ml} \quad x \quad 28 \quad \mu\text{l} \quad / \quad \text{ml} \quad = \quad Z \quad \mu\text{l}$$

N= nombre d'échantillons à traiter simultanément

Y = volume calculé du tampon AVL

Z = volume de "RNA carrier" +Tampon AVE à ajouter au tampon AVL

Le mélange était homogénéisé doucement en inversant le tube 10 fois pour éviter le moussage.

○ *Les tampons AW1 et AW2 :*

Les flacons de ces 2 tampons sont reconstitués en ajoutant 130 ml d'éthanol pour obtenir 228 ml du tampon AW1 et 160 ml d'éthanol pour obtenir 226 ml du tampon AW2.

• Pour les échantillons qui ont été inactivés dans la boîte à gant, le contenu du tube Eppendorff est totalement extrait. Pour les échantillons de plasma non inactivés, la procédure est la suivante :

- A 140  $\mu\text{l}$  d'échantillon de plasma prélevés dans un micro tube de 1,5ml sont ajoutés 560  $\mu\text{l}$  de carrier ARN+AVE+AVL. Le mélange est agité au vortex pendant 15 secondes et incubé à température ambiante pendant 10 mn.
- Après une brève centrifugation, 560  $\mu\text{l}$  d'éthanol pur (96-100%) sont ajoutés au mélange et le tube est centrifugé.
- A partir des tubes d'échantillon de sang inactivé ou de plasma non inactivé, 630  $\mu\text{l}$  du mélange sont délicatement déposés dans une colonne.
- Après centrifugation de la colonne à 8000 rpm pendant 1 mn la partie contenant le filtrat est jetée dans la poubelle et la colonne est placée à nouveau sur un tube de 1,5ml.
- Le reste du mélange est déposé dans la colonne et centrifugé à 8000rpm pendant 1 mn et la partie contenant le filtrat est encore jeté à la poubelle.

- La colonne est déposée sur un autre tube vide et 500 µl de tampon AW1 sont délicatement ajoutés.
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 mn. La partie contenant le filtrat est jetée dans la poubelle.
- La colonne est placée dans un tube de 1,5ml et 500 µl de tampon AW2 est déposé délicatement dans la colonne.
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 3 min et jeter la partie contenant toujours le filtrat.
- La colonne est ensuite reprise sur un tube de 1,5ml et centrifugée à vide à 14000rpm pendant 1min.
- La colonne est disposée sur un tube Eppendorff de 1,5ml puis ouverte délicatement pour déposer sur la membrane 40 µl de tampon AVE et laisser incuber, le bouchon fermé, pendant 1 min à température ambiante.
- Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 min. Cette étape est répétée une deuxième fois.
- Jeter la colonne à la poubelle et garder le tube contenant le filtrat d'acides nucléiques qui doit être conservé à 2-8°C si l'amplification doit suivre immédiatement ou à -80 °C pour un stockage à long terme.

#### **b. Préparation du mélange réactionnel (Master mix)**

Cette procédure était réalisée dans une salle exempte d'ADN/ARN le mélange réactionnel était préparé dans un micro tube de 1.5ml selon le nombre d'échantillon à tester. La composition du mélange réactionnel et du programme PCR (tableau II et III) sont variables selon le virus à détecter.

**Tableau IV** : Composition du mélange réactionnel en fonction du pathogène recherché

<b>Virus</b>	<b>Réactifs</b>	<b>Quantité pour une réaction (µl)</b>
Dengue/Zika	2x Reaction mix	12 ,5

	SuperScript®III RT/ Platinum®TaqMix	0,40
	Zika Forw 3b (10µM) Primer sens	0,75
	Zika Rev 3(10µM) Primer anti sens	0,75
	Zika Plex p3 (10µM) sonde	0,75
	DEN13 forw (10µM) Primer sens	1
	DEN2f 177(10µM) Primer sens	1
	DEN24rev (10µM) Primer anti sens	1
	PanDen p1 LNA (10µM) sonde	0,75
	Eau sans RNase	1,10
	Volume total du master mix (µl)	20
	Volume de l'échantillon (µl)	5
	Volume final de la réaction (µl)	25
Ebola	Master Mix A	5
	Master Mix B	15
	Contrôle interne	1
	Volume du master mix (µl)	20
	Volume de l'échantillon (µl)	10
	Volume total de la réaction (µl)	30
Rift Vallée	2X réaction Mix	12,5
	RFV_2912_F Amorces sens	1
	RFV_2981_R Amorces reverse	1
	RFV_2950_P Sonde	0,75
	MgSO4	0,40
	Eau_PCR	3,35

	SuperScriptIII RT/Taq	1
	Volume Master Mix ( $\mu$ l)	20
	Template ( $\mu$ l)	5
	Volume final réaction ( $\mu$ l)	25
Crimée-	2x Réaction Mix	10
Congo	Mix "amorces_sondes_eau "	6,5
	Transcriptase reverse iScript	0,5
	Volume Mix ( $\mu$ l)	17
	Volume échantillon ( $\mu$ l)	3
	Volume final de la réaction ( $\mu$ l)	20

**Tableau V** : Programmes du TherrmoCycleur en fonction du pathogène recherché.

Virus	Dengue/Zika			Ebola			Rift Vallée			Crimée-Congo		
Réaction PCR	T°C	Durée	Nbre cycle	T°C	Durée	Nbre cycle	T°C	Durée	Nbre cycle	T°C	Durée	Nbre cycle
<b>Reverse transcriptase</b>	50°	30mn	1	55°	20mn	1	50°	25mn	1	50°	10mn	1
<b>Activation du Taq</b>	95°	5mn	1	95°	10mn	1	94°	2mn	1	95°	3mn	1
<b>Amplification</b>	95°	30s	50	95°	15s	45	94°	15s	50	95°	15s	40
	59°	45s		58°	45s		55°	30s		59°	30s	
	68°	45s		72°	15s		68°	30s				

### c. Technique d'amplification à l'aide de l'automate SmartCycler®

Le SmartCycler®-Cepheid (Figure 2) est un système automatisé pour technique PCR en temps réel, avec des tubes réactionnels en plastique. La commande se fait par logiciel depuis un ordinateur portable branché au dispositif, et le déroulement de la PCR (courbes de fluorescence) peut être suivi directement depuis cet ordinateur. En quelques étapes, l'analyse proprement dite, est réalisée sur ordinateur et offre la possibilité d'imprimer les résultats en générant un rapport d'essai complet avec tous les paramètres appliqués.

Description (données techniques et utilisation) de l'automate d'amplification (voir annexe 6).



**Figure 2 :** Dispositif complet utilisé pour l'amplification de ARN/ADN : Thermocycleur = SmartCycler® (Stratagème) ; Ordinateur portable ; mini centrifugeuse pour tube PCR ; portoir de tube PCR.

#### - Technique de la PCR (Polymerase Chain Reaction)

##### **Définition**

En 1983, Kary Mullis met au point la technique d'amplification de l'ADN : la PCR (Polymérase Chain Réaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne). C'est une réaction enzymatique qui permet de sélectionner puis d'amplifier en une très grande quantité un

fragment d'ADN particulier, présent en très faible quantité au départ, parmi des millions d'autres fragments. Aujourd'hui c'est une technique incontournable et couramment utilisée en routine dans les laboratoires.

### **Principe**

La PCR est une suite de cycles, qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température. De plus, chacun de ces paliers est caractérisé par une réaction chimique distincte. En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles.

#### **- Réaction PCR**

En effet, la réaction de PCR se déroule dans un thermocycleur. Cependant, l'appareil est programmé pour effectuer les différents cycles de la PCR. Ainsi, chaque cycle est composé d'une succession de paliers de température prédéterminée, et d'une durée bien définie. Ces deux paramètres, température et temps, dépendent de la taille de la séquence à amplifier de la taille et de la composition en désoxyribonucléotides des amorces. Chaque cycle est donc constitué de trois périodes différentes : dénaturation, hybridation, et élongation.

##### **a. La dénaturation :**

A cette période, la température dans le tube est réglée à 95°C. A cette température, l'ADN se dénature et perd sa structure caractéristique en double hélice, car les liaisons hydrogène reliant les bases de chaque brin d'ADN sont instables à cette température. Ainsi, l'ADN double-brin (2 brins) est dénaturé en ADN simple brin (1 brin).

##### **b. L'hybridation :**

A cette phase, la température chute de 95°C pour atteindre la température dite d'hybridation. Cette dernière est généralement comprise entre 50°C et 60°C et est fonction de la composition en désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et Dctp) des amorces. Les amorces



reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène. On dit que les amorces s'hybrident au brin d'ADN.

c. L'élongation :

A cette période, la température est réglée à 72°C, température idéale pour l'activité de la Taq polymérase. C'est une enzyme très spéciale, puisqu'elle est dite thermorésistante. En effet, sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des températures allant jusqu'à 100°C.

Cette étape permet à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. Au

cycle suivant, les nouveaux fragments synthétisés servent à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux fragments d'ADN.

En théorie, à la fin de chaque cycle la quantité d'ADN cible est doublée. Cela pourrait se reproduire 30 fois (en fonction du protocole de PCR) comme vous pouvez le voir sur la figure 4 dans l'annexe 6.

## **5.5 Saisie et analyse des données**

Les données ont été saisies sur Epi Info version 7 et les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS version 16.0.

## **5.6 Considérations éthiques**

Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako. La participation à l'étude était volontaire. Les parents d'enfants ont signé un consentement écrit avant leur inclusion dans l'étude et en plus les grands enfants de 12 à 14 ans ont donné leur assentiment écrit. L'étude s'est déroulée en respectant les règles d'éthique liées à la recherche clinique sur les sujets humains en vigueur au Mali, ainsi que les règles

internationales. La collecte des échantillons biologiques, leur manipulation et leur traitement ont été faits selon les normes de sécurité biologique. La gestion et l'élimination des déchets biologiques se sont effectuées en accord avec les procédures de traitements des résidus biologiques et matières infectieuses du Mali. Les noms et prénoms des participants n'ont pas été utilisés. Seulement les numéros d'identification des patients ont été utilisés pour identifier les prélèvements. Les résultats des prélèvements positifs ont systématiquement été communiqués aux cliniciens afin de permettre une prise en charge correcte et rapide des pathologies.

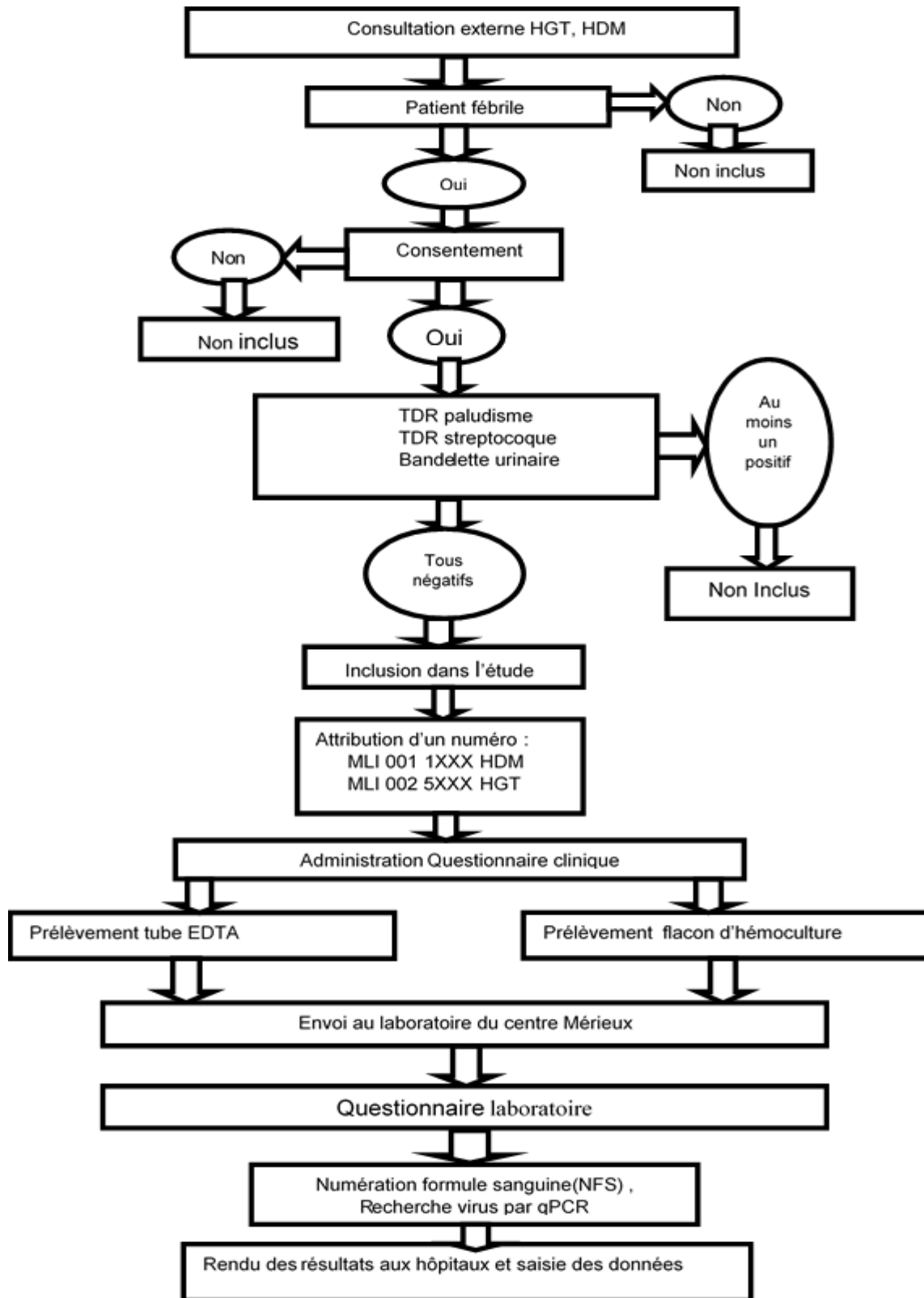


Figure 3 : Schéma de l'étude

## 6 RESULTATS

### 6.1 Sociodémographiques.

**Tableau VI:** Répartition des enfants de l'étude par classe d'âge à l'HGT et à l'HDM.

Classes d'âge		HDM	HGT	Total
<b>]0-1an]</b>	N	49	54	103
	%	47,6	52,4	100
<b>]1-3ans]</b>	N	66	113	179
	%	36,9	63,1	100
<b>]3-5ans]</b>	N	32	42	74
	%	43,2	56,8	100
<b>]5-10ans]</b>	N	29	50	79
	%	36,7	63,3	100
<b>]10-14ans]</b>	N	10	12	22
	%	45,5	54,5	100
<b>Total</b>	N	186	271	457
	%	40,7	59,3	100

$$\chi^2 = 4,029 \text{ ddl}=4 \text{ p}=0,4$$

Aussi bien à l'hôpital du Mali qu'à l'hôpital Gabriel Touré, les enfants de 1-3 ans étaient les plus représentés alors que ceux âgés de 10-14 ans étaient les moins représentés. Il n'y avait

pas de différence statistiquement significative entre les deux hôpitaux quant à la distribution des enfants selon les classes d'âges ( $p=0,4$ ).

**Tableau VII** : Répartition des enfants de l'étude selon le sexe à l'HGT et à l'HDM.

<b>Sexe</b>		<b>HDM</b>	<b>HGT</b>	<b>Total</b>
<b>Féminin</b>	N	117	156	273
	%	62,9	57,6	59,7
<b>Masculin</b>	N	69	115	184
	%	37,1	42,4	40,3
<b>Total</b>	N	186	271	457
	%	100	100	100

---


$$\chi^2 = 1,307 \text{ ddl}=1 \text{ } p=0,2$$

Les filles étaient plus représentées que les garçons dans les deux hôpitaux. Cependant, il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les deux structures quant à la distribution des enfants selon le sexe ( $p= 0,2$ ).

**Tableau VIII** : Répartition des enfants de l'étude selon le statut vaccinal (rougeole et fièvre jaune) à l'HGT et à l'HDM.

Hôpitaux	Statut vaccinal			
	Rougeole*		Fièvre jaune**	
	Oui	Non	Oui	Non
<b>Hôpital du Mali</b>	144 (74,4%)	42	147 (79,0%)	39
<b>Hôpital Gabriel Touré</b>	227 (83,8%)	44	228 (84,1%)	43
<b>Total</b>	371	86	375	82

$$\chi^2 = 2,9 \text{ ddl}=1 \text{ p}=0,8$$

A l'hôpital du Mali et à l'hôpital Gabriel Touré, la plupart des enfants de l'étude étaient vaccinés contre la rougeole : soit 74,4% et 83,8% respectivement. En plus, 79,0%) et 84,1% étaient vaccinés contre la fièvre jaune à l'hôpital du Mali et Gabriel Touré respectivement.

## 6.2 Résultats biologiques

**Tableau IX** : Fréquence de pathogènes émergents détectés par RT-PCR chez les enfants fébriles à l'HGT et à l'HDM

Hôpitaux	VIRUS				Total
	<i>Denv/Zikv</i>	<i>CCHFV</i>	<i>RVFV</i>	<i>EBOLA</i>	
CHU du Mali	1 (0,53%)	0	0	0	186
CHU Gabriel Touré	0	2 (0,73%)	0	0	271
<b>Total</b>	1 (0,21%)	2 (0,36%)	0	0	457

Au total, nous avons détecté trois virus parmi les enfants dans l'étude dont un cas de dengue à l'hôpital du Mali (soit 0,53%) et deux cas de fièvre hémorragique de Crimée Congo (soit 0,73%) à l'hôpital Gabriel Touré.

**Tableau X:** Répartition des enfants de l'étude en fonction de l'intensité de la fièvre à l'HGT et à l'HDM.

<i>Hôpitaux</i>		<i>Température (°C)</i>		<i>Total</i>
		<i>]38-40]</i>	<i>]40-42]</i>	
<i>Hôpital du Mali</i>	N	170	16	186
	%	91,4	8,6	100,0
<i>Hôpital Gabriel Toure</i>	N	258	13	271
	%	95,2	4,8	100,0
<i>Total</i>	N	428	29	457
	%	93,7	6,3	100,0

La majorité des enfants de l'étude avait une température comprise entre 38°C et 40°C soit 93,7% des cas. Les enfants ayant une température de 41 °C à 42°C étaient faiblement représentés soit 6,3% des cas.



**Tableau XI** : Répartition des pathogènes recherchés en fonction des tranches d'âge.

<i>Classes d'âge</i>	<i>Dengue</i>	<i>CCHF</i>	<i>Ebola</i>	<i>FVR</i>	<i>Effectif</i>
<i>]0-1an]</i>	0	0	0	0	103
<i>]1-3ans]</i>	1	2	0	0	179
<i>]3-5ans]</i>	0	0	0	0	74
<i>]5-10ans]</i>	0	0	0	0	79
<i>]10-14ans]</i>	0	0	0	0	22
<i>Total</i>	1	2	0	0	457

Les deux types de virus ont été détectés chez les enfants ayant l'âge compris entre 1 à 3ans.

### 6.3 Températures moyennes chez les patients détectés positifs aux virus

**Tableau XII :** Températures moyennes chez les enfants infectés par le virus dengue par celui de Crimée Congo

		Température Moyenne	Nbre de positifs
<b>Virus</b>	<i>DENV/ZIKV</i>	38,5°C	1
	<i>CCHFV</i>	39,1°C	2

Les enfants chez qui ont été détectés les virus de la dengue et de la fièvre hémorragique de Crimée Congo avaient respectivement des températures de 38,5° et 39,1 °C.

#### 6.4 Mesure du paramètre hématologique = taux d'hémoglobine

**Tableau XIII** : Comparaison des taux d'hémoglobine par tranches d'âge et par hôpital chez les enfants inclus dans l'étude.

Classe d'âge	Moyenne du taux d'hémoglobine (g/dl)				Total	
	HDM		HGT		Moyenne	Effectif
	Moyenne	Effectif	Moyenne	Effectif		
<b>]0-1an]</b>	9,55	49	10,09	54	9,83	103
<b>]1-3ans]</b>	9,79	66	10,05	113	9,95	179
<b>]3-5ans]</b>	9,78	32	10,15	42	9,99	74
<b>]5-10ans]</b>	9,44	29	10,43	50	10,07	79
<b>]10-14ans]</b>	10,35	10	9,94	12	10,13	22
<b>Total</b>	9,7	186	10,14	271	9,96	457

Le taux d'hémoglobine moyen était légèrement plus élevé chez les enfants de l'Hôpital Gabriel Touré que chez ceux de l'hôpital du Mali. Ces taux d'hémoglobine étaient relativement faibles dans les 2 structures soit 9,7g/dl à HDM et 10,1g/dl à HGT. Cependant, la différence n'est pas significative. *Anova = 0,25 ; p = 0,9*.

**Tableau XIV:** Comparaison de la moyenne des taux d'hémoglobine selon le sexe.

Sexe	Moyenne des taux d'hémoglobines (g/dl)
	Moyenne (Effectif)
Masculin	9,98 (273)
Féminin	9,93 (184)
Total	9,96 (457)

Le taux d'hémoglobine moyen chez les garçons de l'étude était comparable à celui des filles dans les deux hôpitaux. En effet il n'y avait pas de différence statistiquement significative.

Anova = 6,54 ;  $p=0,1$ .

**Tableau XV:** Fréquence de l'anémie chez les enfants de l'étude dans les 2 structures de santé.

		Hôpitaux		Total
		HDM	HGT	
		Anémie	Oui	138 (41,9%)
	Non	48 (37,5%)	80 (62,5%)	128 (100%)
	Total	186 (40,7%)	271 (59,3%)	457 (100%)

La majorité des enfants de l'étude présentait une anémie quel qu'en soit leur provenance, soit 58,1% d'enfants anémiés à l'hôpital Gabriel Touré et 41,9% à l'hôpital du Mali.

**Tableau XVI** : Taux d'hémoglobine chez les enfants porteurs du virus de la Dengue ou de la fièvre Hémorragique Crimée Congo.

<b>Virus</b>	<b>Taux d'hémoglobine (g/dl)</b>
<b>DENV</b>	10,2
<b>Cas 1 de CCHFV</b>	9,31
<b>Cas 2 de CCHFV</b>	11,10

Parmi les trois enfants chez qui les virus ont été détectés, seul le patient (cas 2 de CCHFV) ne présentait pas d'anémie (soit 11,1g/dl) par contre les deux autres (cas DENV et le cas 1 de CCHFV) avaient un taux d'hémoglobine en dessous de la normale (soit 10,2g/dl et 9,3g/dl) avec une anémie normocytaire.

## 7 DISCUSSION

Le Mali est parmi les pays confrontés à de nombreux problèmes de santé liés à la pauvreté, la malnutrition et le manque d'hygiène et d'assainissement. Malgré les récentes améliorations, ses indicateurs de santé et de développement sont parmi les plus bas au monde. Dans ce travail, nous avons voulu développer des capacités de diagnostic moléculaire des infections virales émergentes au CICM en appui au Ministère de la santé du Mali pour ainsi contribuer à la surveillance des maladies ré-émergentes. Pour atteindre cet objectif, nous avons adopté comme méthodologie de conduire une étude prospective dans les services de pédiatrie de l'hôpital Gabriel Touré et de l'hôpital du Mali. Le choix de ces deux services se justifie par le fait que ce sont les deux références à Bamako qui reçoivent pratiquement la majorité des enfants malades. Avant le démarrage de l'étude, il a été réalisé au CICM un atelier de formation organisé par les investigateurs maliens du CICM et les allemands dans le but de former le staff technique des hôpitaux pour le bon déroulement des activités de recherche. Cependant, les résultats présentés dans cette thèse sont préliminaires car la taille d'échantillon prévu (500 enfants par hôpital) n'est pas atteinte. Par ailleurs le mode recrutement des enfants n'a pas permis d'inclure tous les enfants fébriles arrivés après les heures de travail quotidien (8h-16h). Ce qui indique que l'échantillon ici présenté n'est pas représentatif de l'ensemble des syndromes fébriles vus dans ces services pendant une année.

Il y a eu plus de difficultés à recruter les enfants à l'hôpital du Mali qu'à l'HGT ce qui justifie que le nombre d'enfants inclus à l'hôpital du Mali soit inférieur à celui de HGT.

Au total, nous avons analysé 457 prélèvements ; parmi lesquels 3 échantillons étaient positifs (0,65%). Les enfants de 1-3 ans étaient les plus représentés alors que ceux âgés de 10-14 ans étaient les moins représentés. Dans une étude effectuée au Maroc dans la province Kénitra au

Nord-ouest du pays, sur 306 enfants, l'âge moyen était de 13 ans avec respectivement 30 % d'enfants âgés de 12 ans, 48,5 % âgés de 13 ans et un peu moins de 20 % dépassant 14 ans. Cependant, l'âge maximal était de 16 ans (45). Par ailleurs, l'âge ne semble pas être un facteur de risque important au cours de notre étude car la différence entre les prévalences de l'anémie selon les classes d'âge des enfants n'étaient pas statistiquement significatives :  $p=0,9$ . Ainsi, la majorité des enfants de l'étude présentait une anémie quel qu'en soit leur provenance : 58,1% d'enfants anémiés à l'hôpital Gabriel Touré et 41,9% à l'hôpital du Mali, soit une prévalence globale de 71,99% (329/457) pour les deux structures confondues. Dans l'étude d'Aboussaleh et collègues, la prévalence de l'anémie dans la population d'âge scolaire et particulièrement pendant la préadolescence était de 31,68% (45). Comparativement à notre étude, cette différence dans la prévalence de l'anémie pourrait s'expliquer au niveau de la limite d'âge supérieure à 14 ans à Kenitra.

Certaines études ont montré que les *flavivirus*, *bunyavirus* et *togavirus* contribuent à la maladie humaine au Mali (46). Cependant, la maladie à virus Ebola (MVE) est endémique dans les régions d'Afrique centrale et de l'Ouest, où l'infrastructure de laboratoire est limitée. La récente épidémie de MVE en 2014 en Afrique de l'Ouest a été sans précédent en termes de nombre de cas et de décès, et a prouvé que de telles épidémies régionales pouvaient devenir une menace potentielle pour la santé publique mondiale. Des flambées initiales se sont produites en Guinée à la fin de 2013 et se sont rapidement étendues à un total de 28 610 cas confirmés et à 11 308 décès signalés. Les flambées sans précédent en Guinée, au Libéria, en Sierra Leone et les événements de transmission subséquents au Mali, au Nigéria, au Sénégal, en Espagne et aux États-Unis, représentent une préoccupation mondiale (10). L'épidémie de 2014 a appelé à des mesures alternatives pour pallier le manque d'infrastructures sanitaires avec inactivation de l'échantillon dans des enceintes de confinement biologique de classe III,

des « boîtes à gants » ou dans des laboratoires chauds isolés (47). Cependant, dans notre étude, nous n'avons trouvé aucun cas positif d'EBOV. par contre une étude menée par le laboratoire SEREFO au Mali en mars 2016, a démontré que sur 103 échantillons testés dont 88 cas suspects, 10 étaient positifs à l'EBOV (48). Tout ceci démontre l'importance de notre étude afin de nous outiller de moyens techniques pour une meilleure surveillance de ces émergences.

Quant à la dengue, on estime à 100 millions le nombre de cas chaque année et à plusieurs centaines de milliers de cas de dengue hémorragique, selon l'activité épidémique. Cependant, la dengue hémorragique est l'une des principales causes d'hospitalisation et de décès chez les enfants dans de nombreux pays d'Asie du Sud-Est.(30). Ainsi, notre étude révèle un seul cas de dengue soit 0,21% (1/457) sur l'ensemble des échantillons testés. Cependant, nous n'avons pas pu effectuer le sérotypage de la souche faute de moyen technique. Par ailleurs, une étude prospective réalisée dans 2 hôpitaux en Thaïlande démontre que les patients avec infection DEN-2 sont susceptibles de faire une maladie plus grave que ceux infectés avec les autres serotypes de dengue (DEN-1,3 ou 4) (29). Dans une épidémie descriptive de la dengue dans la commune de Sadiola district sanitaire de KAYES, sur 109 cas notifié, 6 cas fut confirmé positifs à la dengue soit 3,71%(6/109) (49).

Au Burkina Faso en 2016 une étude de prévalence de la dengue faite par Zékiba Tarnagda, et al., révèle 54,28% (19/35) de dengue sur 35 échantillons de sérum testés (50). Comparativement à notre étude, ces prévalences sont plus élevées et pourraient se justifier à travers la période de collecte des échantillons et le type de population. Ainsi, l'étude de Sadiola s'est déroulée en période d'épidémie. Dans notre étude les enfants de 0 à 14ans étaient uniquement concernés tandis que l'étude faite à Sadiola (Mali) et au Burkina Faso s'est effectuée dans une population mixte de tout âge et genre confondus.



La fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF) est la seconde arbovirose la plus répandue, après la dengue, puisqu'elle a été décrite en Afrique, en Asie, en Europe et au Moyen-Orient (36). Le virus responsable est un agent de niveau 4, ce qui le rend susceptible d'être utilisé dans l'arsenal bioterroriste. Que ce soit à l'issue d'une contamination naturelle ou bioterroriste, le virus de la CCHF est susceptible d'occasionner des épidémies de grande ampleur, dans une grande partie du monde; à ce titre, il mérite d'être mieux connu (39). Cependant, elle a fait l'objet d'une attention médicale moderne en 1944-1945, quand environ 200 militaires soviétiques ont été infectés alors qu'ils aidaient des paysans dans la Crimée dévastée par la guerre (RSS d'Ukraine). En plus, des épidémies subséquentes ont eu lieu à Astrakhan (1953-1968) et à Rostov Oblasts (1963-1971) en URSS et en Bulgarie (1953-1973); ainsi que de nombreuses petites épidémies dans le sud de l'URSS et au Pakistan en 1976 (51).

Dans notre étude, nous avons retrouvé deux cas humains de CCHFV soit 0,43% (2/457). Cependant, au Mali une étude faite par Maïga, et al. sur la séro-surveillance du CCHFV chez les bovins trouve 66% de positifs sur 1 074 échantillons de sérum testés par le test immunoenzymatique (52). Par ailleurs, les taux régionaux de séroprévalence au Mali variaient de 15% à 95% (52). A travers ces données, nous pouvons dire que le CCHFV circule dans les régions du Mali, et cela nécessite la mise en place d'une surveillance accrue dans nos différentes régions.

Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (RVFV) a provoqué plusieurs flambées sur l'ensemble du continent africain et dans la péninsule arabique, ce qui représente une menace importante pour la santé humaine et animale. En Egypte, la première et la plus importante épidémie de fièvre de la vallée du Rift s'est produite en 1977/78 infectant des milliers d'êtres humains et d'énormes pertes économiques en bétail (23). Aucun cas de fièvre de la vallée de Rift chez l'homme n'a été détecté dans notre étude, cela peut s'expliquer par le fait que la

plupart des cas chez l'homme restent relativement bénins et seule une petite proportion de patients développent une pathologie beaucoup plus grave prenant en général la forme d'un ou de plusieurs des trois syndromes suivants : forme oculaire (0,5 à 2% des patients), méningo-encéphalite (moins de 1%) ou fièvre hémorragique (moins de 1%) (23). Par contre, au Niger dans leur bulletin d'information, sur la flambée épidémiologique du 2 août au 22 septembre 2016, 64 cas humains, dont 23 mortels, ont été notifiés dans le district sanitaire de Tchintabaraden, dans la région de Tahoua, principalement peuplée d'éleveurs nomades. Cependant, la plupart des sujets touchés étaient des hommes (62,5 %) exerçant la profession d'agriculteur ou d'éleveur. Le 16 septembre 2016, six (6) des 13 échantillons humains provenant du Niger et examinés à l'Institut Pasteur de Dakar ont donné un résultat positif pour la fièvre de la vallée du Rift. Par ailleurs, 3 des 6 échantillons animaux examinés ont aussi donné un résultat positif (53). Du 16 septembre 2012 au 13 novembre 2012, 36 cas de FVR dont 18 mortels, ont été notifiés dans 6 régions de la Mauritanie. Dans ce contexte, le Ministère de la santé Mauritanien a déclaré une flambée de FVR le 4 octobre 2012. Face à ce fléau, le Mali devra mettre en place une surveillance renforcée au niveau de ses frontières afin de prévenir la propagation de ces émergences virales sur son territoire. Ailleurs, En Afrique du Sud, de février à juillet 2010, le Gouvernement a signalé 237 cas confirmés de FVR chez l'homme, dont 26 décès, dans 9 provinces. De 2006/07 des épidémies de fièvre de la vallée de Rift ont surgi au Kenya et en Somalie. La fièvre de la Vallée du Rift (FVR) étant une zoonose virale touchant principalement les animaux et les éleveurs, nos résultats pourraient se justifier à travers notre population cible composée uniquement d'enfants qui sont rarement en contact avec les bétails. Cependant, il serait intéressant d'étendre cette étude à la population générale humaine mais aussi animale (bétails) afin d'estimer des prévalences spécifiques de cette maladie émergente transfrontalière.

## **8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

### **8.1 Conclusion**

Cette étude a permis de détecter les virus de la Dengue et de la Fièvre Hémorragique de Crimée Congo chez les enfants fébriles de 0 à 14ans à Bamako. Ces virus étaient souvent associés à des modifications hématologiques chez ces enfants. Elle a également permis de développer les capacités de diagnostic moléculaire d'un certain nombre de pathologies émergentes et ré-émergentes notamment la dengue au CICM et de renforcer le système national de surveillance épidémiologique des émergences au Mali.

### **8.2 Recommandations**

#### **Aux autorités**

- Renforcer le système National de surveillance des pathologies émergentes et re-émergentes au Mali
- Intégrer la recherche des pathogènes émergents dans la stratégie de prise en charge des fièvres dans les services de pédiatrie au Mali
- Encourager les études épidémiologiques nationales sur les émergences et réémergences au Mali.
- Mettre en place une structure adéquate pour la prise en charge des infections virales émergentes et re-émergentes au Mali.

#### **• A la population**

- Eviter la promiscuité des animaux et des hommes en éloignant les parcs à bétails des habitations.
- Promouvoir des actions locales d'assainissement contre les gîtes larvaires ;
- Dormir sous moustiquaires.

#### **• Aux personnels de santé et chercheurs**

- Respecter les règles de biosécurité et de biosûreté dans leurs pratiques quotidiennes car ils peuvent être confrontés à des cas de pathogènes émergents et ré-émergents. Adresser tous prélèvements suspects aux laboratoires de référence des pathogènes émergents ;
- Améliorer leur pratique de prise en charge des syndromes fébriles en intégrant les infections virales émergentes.
- Déclarer rapidement tous cas suspects de FHV à la division épidémiologique.
- Continuer cette étude en l'élargissant au niveau communautaire au Mali pour mieux étayer le problème des FHVs en tenant compte des groupes socioprofessionnels (éleveurs, bouchers, paysans, les professionnels médicaux et vétérinaires).

## **FICHE SIGNALETIQUE**

**Nom :** KODIO

**Prénom :** Pierre Amaga

**Email :** kodiopierre@yahoo.fr

**Contact :** 0022365604944/ 0022374732251

**Titre de la thèse :** Surveillance des émergences virales au Mali : étude pilote chez les enfants de 1 à 14ans à Bamako.

**Nationalité :** Malienne

**Année universitaire :** 2017-2018

**Ville de soutenance :** Bamako /Mali

**Date de soutenance :** vendredi 06 juillet 2018

**Section :** Pharmacie

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la FMOS et PHAP.

## **9 RESUME**

**Introduction & Objectifs** : Les maladies fébriles constituent des motifs majeurs de consultation médicale dans les services de santé et sont aussi les principales causes d'admission et de décès à l'hôpital, spécifiquement chez les enfants de moins de 5 ans en Afrique subsaharienne et aussi dans les pays en voie de développement. Ainsi, le but de notre travail était de renforcer le système de surveillance des fièvres hémorragiques virales émergentes ou ré émergentes chez les enfants fébriles vus en consultation à l'HGT et à l'HDM au Mali.

**Matériels et Méthode** : Nous avons effectué une étude transversale qui s'est déroulée durant 12 mois (mars 2016 à février 2017). Un total de 457 enfants fébriles de 0 à 14 ans ont été inclus. Les échantillons étaient inactivés dans une boîte à gant, et l'extraction des acides nucléiques a été réalisée avec le Kit QIAGEN QIAmp Viral RNA. La technique de la PCR en temps réel utilisant l'automate SmartCycler®-Cepheid fut utilisée pour la détection des pathogènes viraux : CCHFV, RVFV, EBOV, et DENV.

**Résultats** : La RT-PCR nous a permis de détecter 3 cas d'infection virales émergentes et ré-émergentes (soit 0,65% (3/457)) dont 2/271 cas de CCHF au service pédiatrique de l'HGT et 1/186 cas de DENV à l'HDM chez les patients dont l'âge était compris entre 1 et 3ans. Les recherches du virus Ebola et du RVFV n'ont pas permis de les mettre en évidence chez les enfants. La majorité des patients de l'étude présentait une anémie, soit 58,1% et 41,9% respectivement à l'HGT et l'HDM. Parmi les trois patients infectés par les virus émergents et re-émergents, seul un patient porteur de CCHFV ne présentait pas d'anémie (soit 11,1g/dl) par contre les deux autres (cas DENV et le cas 1 de CCHFV) avaient un taux d'hémoglobine en dessous de la normale (soit 10,2g/dl et 9,3g/dl) avec une anémie normocytaire.

**Conclusion** : Cette étude a montré que des pathogènes émergents et ré-émergents circule dans la population malienne surtout chez des enfants à Bamako. Elle a permis au CICM de renforcer le système national de surveillance épidémiologique des émergences au Mali.

**Mots clés** : Emergences, Enfants, Mali, Réémergences, Surveillance, Virus hémorragiques.

## **ABSTRACT**

**Introduction and Objectives :** Febrile disease are major reasons for medical consultation in health services and are also the main causes of admission and death in the hospital, specifically for children under 5 years of age in Africa and also in developing countries. Thus, the aim of our work was to strengthen the surveillance system for emerging or re-emerging viral haemorrhagic fevers in febrile children seen in consultation at L'HGT and HDM in Mali.

**Materials and Method :** We conducted a cross-sectional study that took place for 12 months (March 2016 to February 2017). A total of 457 febrile children aged 0 to 14 years were included. The samples were inactivated in a glove box, and nucleic acid extraction was performed with the QIAGEN QIAmp Viral RNA Kit. The real-time PCR technique using the SmartCycler®-Cepheid plc was used for the detection of viral pathogens : CCHFV, RVFV, EBOV, and DENV.

**Results :** RT-PCR allowed us to detect 3 cases of emerging and re-emerging viral infection 0.65% (3/457) of which 2/271 cases of CCSO to the pediatric service of HGT and 1/186 cases of DENV to HDM in patients aged between 1 and 3ans. The research of the Ebola virus and the RVFV did not highlight them in children. The majority of patients in the study had anemia, or 58.1% and 41.9%, respectively, of HGT and HDM. Among the three patients infected with emerging and re-emerging viruses, only one patient with CCHFV did not have anemia (11, 1g/dl) against the other two (DENV cases and Case 1 of CCHFV) had a hemoglobin level below normal (10, 2g/dl and 9, 3g/dl) with normocytic anemia.

**Conclusion :** This study showed that emerging and re-emerging pathogens circulated in the Malian population especially in children in Bamako.

**Key words** : Emergence, Children, Mali, Reemergence, Surveillance, Hemorrhagic

Virus.



## 10 REFERENCES

1. Paules CI, Fauci AS. Yellow Fever — Once Again on the Radar Screen in the Americas. *N Engl J Med*, 2017 ;376(15) :1397-9.
2. Grard G, Fair JN, Lee D, Slikas E, Steffen I, Muyembe J-J, et al. A novel rhabdovirus associated with acute hemorrhagic fever in central Africa. *PLoS Pathog*, 2012 ;8(9) : e1002924.
3. Zapata JC, Cox D, Salvato MS. The role of platelets in the pathogenesis of viral hemorrhagic fevers. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014 ;8(6) : e2858.
4. Onyeonoro UU, Ekpemiro UC, Abali C, Nwokeukwu HI. Ebola epidemic--the Nigerian experience. *Pan Afr Med J*, 2015 ; 22 Suppl 1 :17.
5. Abdoulaye B, Moussa S, Daye K, Boubakar BS, Cor SS, Idrissa T, et al. Experience on the management of the first imported Ebola virus disease case in Senegal. *Pan Afr Med J*, 2015 ;22 Suppl 1 : 6.
6. Tall A, Sall AA, Faye O, Diatta B, Sylla R, Faye J, et al. [Two cases of Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) in two tourists in Senegal,2004]. *Bull Soc Pathol Exot* 1990, 2009 ;102(3):159-61.
7. Nabeth P, Cheikh DO, Lo B, Faye O, Vall IOM, Niang M, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever, Mauritania. *Emerg Infect Dis*, 2004 ; 10(12) :2143-9.
8. Zivcec M, Maïga O, Kelly A, Feldmann F, Sogoba N, Schwan TG, et al. Unique Strain of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus, Mali. *Emerg Infect Dis* 2011, 4 ; 20(5) :911-3.
9. Toma, B, Thiry E. Qu'est-ce qu'une maladie émergente ? *Epidémiologie et Santé Animale*, 2003; 44(1):11.
10. Coarsey CT, Esiobu N, Narayanan R, Pavlovic M, Shafiee H, Asghar W. Strategies in Ebola virus disease (EVD) diagnostics at the point of care. *Crit Rev Microbiol*, 25 avr 2017 ;0(0):1-20.
11. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team. *Bull World Health Organ*. 1978 ;56(2) :247-70.
12. Ebola haemorrhagic fever in Zaïre, 1976. *Bull World Health Organ*. 1978 ;56(2):271-93.
13. Johnson O, Youkee D, Brown CS, Lado M, Wurie A, Bash-Taqi D, et al. Ebola Holding Units at government hospitals in Sierra Leone : evidence for a flexible and effective model for safe isolation, early treatment initiation, hospital safety and health system functioning. *BMJ Glob Health*,2016 ;1(1) : e000030.
14. Feldmann H, Geisbert TW. Ebola haemorrhagic fever. *The Lancet*, 2011 ;377(9768) :849-62.
15. Says MS. Quel est Ebola ? [Internet]. *News-Medical.net*. 2009 [cité 17 mai 2017]. Disponible sur : [http://www.news-medical.net/health/What-is-Ebola-\(French\).aspx](http://www.news-medical.net/health/What-is-Ebola-(French).aspx)
16. WHO\_EVD\_HIS\_EMP\_14.1\_eng.pdf [Internet]. [Cité 15 mai 2017]. Disponible sur : [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137590/1/WHO\\_EVD\\_HIS\\_EMP\\_14.1\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137590/1/WHO_EVD_HIS_EMP_14.1_eng.pdf?ua=1)

17. Chertow DS, Kleine C, Edwards JK, Scaini R, Giuliani R, Sprecher A. Ebola Virus Disease in West Africa — Clinical Manifestations and Management. *N Engl J Med*, 2014;371(22):2054-7.
18. West TE, von Saint André-von Arnim A. Clinical presentation and management of severe Ebola virus disease. *Ann Am Thorac Soc*, 2014 ;11(9) : 1341-50.
19. Leligdowicz A, Fischer WA, Uyeki TM, Fletcher TE, Adhikari NKJ, Portella G, et al. Ebola virus disease and critical illness. *Crit Car*, 2016 [cité 5 mars 2018] ; 20(1). Disponible sur : <http://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-016-1325-2>
20. Chakour M, Koeck JL, Maslin J, Nicand E, Chadli M, Nizou JY, et al. Diagnostic biologique rapide en contexte épidémique : état des lieux, perspectives. *Médecine Mal Infect*, 2003 ;33(8) :396-412.
21. Maehira Y, Kurosaki Y, Saito T, Yasuda J, Tarui M, Malvy DJM, et al. Responding to ever-changing epidemiological dynamics of Ebola virus disease. *BMJ Glob Health*,2016 ;1(3) : e000180.
22. OMS | Maladie à virus Ebola [Internet]. WHO. [Cité 17 mai 2017]. Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/fr/>
23. Mroz C, Gwida M, El-Ashker M, El-Diasty M, El-Beskawy M, Ziegler U, et al. Seroprevalence of Rift Valley fever virus in livestock during inter-epidemic period in Egypt, 2014/15. *BMC Vet Res*, 2017 ; 13(1):87.
24. Linthicum KJ, Britch SC, Anyamba A. Rift Valley Fever : An Emerging Mosquito-Borne Disease. *Annu Rev Entomol*. 11 mars 2016 ; 61(1) :395-415.
25. OMS | Fièvre de la vallée du Rift [Internet]. WHO. [Cité 19 mai 2017]. Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/fr/>
26. Fact Sheet : Rift-Valley-Fieber - Rift-Valley\_Fieber\_f.pdf [Internet]. [Cité 31 mai 2017]. Disponible sur: [https://www.labor-spiez.ch/pdf/fr/doc/fas/Rift-Valley\\_Fieber\\_f.pdf](https://www.labor-spiez.ch/pdf/fr/doc/fas/Rift-Valley_Fieber_f.pdf)
27. Mansfield KL, Banyard AC, McElhinney L, Johnson N, Horton DL, Hernández-Triana LM, et al. Rift Valley fever virus : A review of diagnosis and vaccination, and implications for emergence in Europe. *Vaccine*, 2015 ;33(42) :5520-31.
28. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue Viremia Titer, Antibody Response Pattern, and Virus Serotype Correlate with Disease Severity. *J Infect Dis*, 2000 ;181(1) : 2-9.
29. Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A, Seneviratne SL. DENGUE VIRAL INFECTIONS. *Indian J Dermatol*, 2010 ;55(1) : 68-78.
30. Gubler DJ. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev*, 1998 ; 11(3) : 480-96.
31. Dengue : Le virus est en pleine expansion dans le monde [Internet]. [Cité 20 mai 2017]. Disponible sur : <http://www.20minutes.fr/sante/1755671-20151223-dengue-virus-pleine-expansion-monde>
32. Almeida RR de, Paim B, Oliveira SA de, Souza AS, Gomes ACP, Escuissato DL, et al. Dengue Hemorrhagic Fever : A State-of-the-Art Review Focused in Pulmonary Involvement. *Lung*, 2017 ;1-7.

33. Virus de la dengue. In : Wikipédia [Internet]. 2016 [cité 8 juin 2017]. Disponible sur : [https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Virus\\_de\\_la\\_dengue&oldid=132479177](https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Virus_de_la_dengue&oldid=132479177)
34. Gouvernement du Canada A de la santé publique du C. Dengue - Symptômes [Internet]. 2014 [cité 23 mai 2017]. Disponible sur : <http://www.phac-aspc.gc.ca/id-mi/vhf-fvh/dengue/symptoms-symptomes-fra.php>
35. Murray NEA, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue : past, present and future prospects. *Clin Epidemiol*, 2013 ; 5 :299-309.
36. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever : History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res*,2013 ;100(1) :159-89.
37. Sas MA, Mertens M, Isselmou E, Reimer N, El Mamy BO, Doumbia B, et al. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Specific Antibody Detection in Cattle in Mauritania. *Vector-Borne Zoonotic Dis*, 2017 ; 17(8) : 582-7.
38. OMS | Fièvre hémorragique de Crimée-Congo [Internet]. WHO. [Cité 6 juin 2017]. Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs208/fr/>
39. Nabeth P, Sall AA, Faye O, Simon F. Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo, un agent venu de l'Est. *Virologie*. 1 sept 2004 ;8(5) : 377-85.
40. Drosten C, Götting S, Schilling S, Asper M, Panning M, Schmitz H, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol*, 2002 ; 40(7) : 2323-30.
41. Enk MJ, Oliveira e Silva G, Rodrigues NB. Diagnostic Accuracy and Applicability of a PCR System for the Detection of *Schistosoma mansoni* DNA in Human Urine Samples from an Endemic Area. Diemert DJ, éditeur. *PLoS ONE*, 2012 ; 7(6) : e38947.
42. Afifi S, Earhart K, Azab MA, Youssef FG, El Sakka H, Wasfy M, et al. Hospital-based surveillance for acute febrile illness in Egypt : a focus on community-acquired bloodstream infections. *Am J Trop Med Hyg*, 2005 ;73(2) :392-9.
43. *Le\_Syndrome\_Infectieux.pdf* [Internet]. [Cité 16 mars 2017]. Disponible sur : [http://ifsi53000.free.fr/Module\\_maladies\\_infectieuses/Documents\\_pdf/Le\\_Syndrome\\_Infectieux.pdf](http://ifsi53000.free.fr/Module_maladies_infectieuses/Documents_pdf/Le_Syndrome_Infectieux.pdf)
44. *untitled - leconimprim.pdf* [Internet]. [Cité 20 mars 2017]. Disponible sur : <http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/corpus/disciplines/pedia/cancred/297d/leconimprim.pdf>
45. Aboussaleh Y, Ahami AOT, Alaoui L, Delisle H. Prévalence de l'anémie chez les préadolescents scolaires dans la province de Kénitra au Maroc. *Cah Détudes Rech Francoph Santé*, 2004 ;14(1) :37-42.
46. Safronetz D, Sacko M, Sogoba N, Rosenke K, Martellaro C, Traoré S, et al. Vectorborne Infections, Mali. *Emerg Infect Dis*, 2016 ;22(2) :340-2.

47. Flint M, Goodman CH, Bearden S, Blau DM, Amman BR, Basile AJ, et al. Ebola Virus Diagnostics : The US Centers for Disease Control and Prevention Laboratory in Sierra Leone, 2014 to March 2015. *J Infect Dis*, 2015 ;212(suppl 2) : S350-8.
48. Diarra B, Safronetz D, Sarro Y dit S, Kone A, Sanogo M, Tounkara S, et al. Laboratory Response to 2014 Ebola Virus Outbreak in Mali. *J Infect Dis*, 2016 ;214(suppl\_3) : S164-8.
49. Mariko Y. Etude Descriptive de l'Epidémie de la Dengue dans la commune de Sadiola, District Sanitaire de Kayes. [Mali] : Université de Bamako Faculté de Medecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie,2009.
50. Tarnagda Z, Cissé A, Bicaba BW, Diagbouga S, Sagna T, Ilboudo AK, et al. Dengue Fever in Burkina Faso, 2016. *Emerg Infect Dis*, 2018 ;24(1) :170-2.
51. Hoogstraal H. Review Article 1 : The Epidemiology of Tick-Borne Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Asia, Europe, and Africa<sup>23</sup>. *J Med Entomol*, 1979 ;15(4) :307-417.
52. Maiga O, Sas MA, Rosenke K, Kamissoko B, Mertens M, Sogoba N, et al. Serosurvey of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Cattle, Mali, West Africa. - PubMed - NCBI [Internet]. [Cité 5 janv 2018]. Disponible sur : [http://login.research4life.org/tacsgr1www\\_ncbi\\_nlm\\_nih\\_gov/pubmed/28719259](http://login.research4life.org/tacsgr1www_ncbi_nlm_nih_gov/pubmed/28719259)
53. OMS. Bulletin d'information sur les flambées epidemiques : Fievre de la Vallée de Rift. OMS. 09 2016 ;
54. Analyse d'urine l'ABC du praticien - analyse-durine\_labc-du-praticien.pdf [Internet]. [Cité 6 mars 2017]. Disponible sur : [https://vincentbourquin.files.wordpress.com/2010/01/analyse-durine\\_labc-du-praticien.pdf](https://vincentbourquin.files.wordpress.com/2010/01/analyse-durine_labc-du-praticien.pdf)
55. Interprétation d'une bandelette urinaire - Le livre de sémiologie médicale [Internet]. [Cité 6 mars 2017]. Disponible sur : [http://www.e-semio.org/spip.php?page=tableautype4&id\\_rubrique=2771](http://www.e-semio.org/spip.php?page=tableautype4&id_rubrique=2771)

## 11 ANNEXES

### Annexe 1A : FORMULAIRE DE CONSENTEMENT ECLAIRE

1. Nous souhaitons que votre enfant \_\_\_\_\_ soit volontaire dans une étude de recherche clinique intitulée "Surveillance des étiologies des Fièvres au Mali". Le but de cette étude est de trouver ce dont souffre votre enfant malade. La participation de votre enfant ne vous prendra pas plus de 40mn à 1heure. Si vous êtes d'accord nous vous demanderons de répondre à des questions portant sur les conditions et circonstances d'apparition de la maladie. Un peu de sang (à peu près 2 à 6 ml c'est à dire d'1 à 2 cuillérées à café) seront prélevés avant le traitement. En plus nous demanderons ses urines et effectuerons un prélèvement de gorge. Les échantillons collectés serviront au diagnostic de la maladie dont souffre votre enfant. Aussi nous souhaiterons revoir votre enfant 2-4 semaines après son hospitalisation et effectuer les mêmes prélèvements afin de savoir vérifier les paramètres qui ont changé et de confirmer le diagnostic. Au cours de cette visite de contrôle, nous examinerons votre enfant afin de recueillir des informations sur les symptômes, les signes et le traitement de la maladie de votre enfant ainsi que le diagnostic final et les résultats d'autres tests de laboratoire réalisés le médecin.
2. Les risques et inconforts auxquels votre enfant sera exposé sont la douleur mineure, une ecchymose ou une infection bénigne sur le site de prélèvement. Pour minimiser ces risques, seules les personnes formées vont faire le prélèvement dans les conditions stériles selon les règles de bonnes pratiques de laboratoire. Tous les tests de laboratoire, qui sont en relation directe avec cette étude seront gratuits pour votre enfant. L'avantage que vous pouvez attendre de la participation de votre enfant dans cette étude est de savoir potentiellement ce qui provoque la fièvre (bactérie ou un virus), et le sang de votre enfant sera testé pour déterminer les causes de la fièvre avec des procédures de laboratoire que votre enfant pourrait ne pas recevoir autrement. Il est important de vous signaler que les tests de laboratoire ne déterminent pas toujours ce qui est faux, et dans de rares cas, ils peuvent donner un résultat erroné.
3. Les résultats de laboratoire et les renseignements recueillis sur votre enfant seront strictement confidentiels en tout temps; y compris après la fin de l'étude. Pour protéger la confidentialité votre enfant et sa vie privée, nous allons remplacer son nom avec un code d'étude. Ce code sera utilisé durant toute la durée de l'étude et apparaîtra sur tous les échantillons de votre enfant. En outre, si certains tests sont positifs, les investigateurs sont tenus de signaler le cas de votre enfant aux autorités locales compétentes de santé publique, qui peuvent demander des investigations approfondies du dossier de votre enfant. Un échantillon de sang de l'enfant sera stocké pour une future analyse de laboratoire. Tout identifiant personnel sur les échantillons biologiques sera retiré des tubes. Les spécimens seront archivés uniquement avec le numéro de l'étude.
4. Cette étude est un effort conjoint du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux de Bamako, la Fondation Mérieux internationale de Lyon, en France, la coopération allemande "Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit" (GIZ), l'Institut de microbiologie de la Bundeswehr de Munich, Allemagne et les hôpitaux Gabriel Touré et du Mali. Seuls les investigateurs du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux, de l'Institut international de la Bundeswehr de Microbiologie et des hôpitaux Gabriel Touré et du Mali peuvent examiner les dossiers de recherche dans le cadre de leur responsabilité de protéger les êtres humains impliqués dans la recherche.

5. Si vous avez des questions au sujet de cette étude, vous pouvez contacter les personnes suivantes:

Pour des aspects ou des blessures liées aux questions des sujets de recherche **contactez le Prof. Kouriba, du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux de Bamako. Téléphone + (223) 20225154.** Pour des questions sur les aspects éthiques de cette étude ou les droits de votre enfant en tant que volontaire, ou de tout problème lié à la protection du volontaire de la recherche, contactez le **Pr. Marouf Kéita, Président du Comité d'éthique de la FMOS BP 1805, Tél: (223) 222 52 77, Cellulaire : 76 46 86 28 Bamako – Mali** ou **Pr Mahamadou Diakité, Secrétaire permanent du Comité du Comité d'éthique de la FMOS BP 1805, Tél: (223) 222 52 77, Cellulaire : 76 23 11 91 / 66 23 11 91.**

6. La participation de votre enfant dans cette étude est entièrement volontaire. Vous pouvez refuser sa participation à cette étude ou décider de retirer votre enfant au cours de la sélection en toute liberté et à tout moment sans que cela vous cause la moindre pénalité ou perte de soins médicaux.

7. Vous comprenez que les formulaires de consentement et les dossiers de recherche sont stockés pour des temps indéfinis dans un endroit sécurisé au Centre d'Infectiologie Charles Mérieux à Bamako, au Mali et pourraient être partagés avec une tierce partie. Les personnes impliquées dans la conduite de cette étude, les moniteurs chargés de contrôler la qualité de l'étude, peuvent examiner ces dossiers.

8. Toutes les réponses fournies par l'investigateur sont compréhensibles pour moi et sont satisfaisantes. Je comprends ce qui a été expliqué dans ce formulaire de consentement au sujet de la participation de mon enfant dans cette étude. J'ai eu assez de temps pour examiner la décision d'avoir mon enfant participé à cette étude. Je ne veux pas plus d'informations pour prendre ma décision ou non de participer ou de laisser mon enfant participer à l'étude. Avec ma signature ou mon empreinte digitale ci-dessous, je donne mon consentement éclairé et volontaire à la participation de mon enfant à cette étude.

---

**Signature/Empreinte digitale du parent / tuteur  
de l'enfant volontaire**

---

**Date (JJ/MM/AA)**

---

**Prénom et Nom du volontaire**

---

**Prénom et Nom parent / tuteur**

**Je certifie que cette forme a été expliquée à la personne ci-dessus et que toutes les questions au sujet de cette étude ont été répondues.**

**Prénom et Nom de l'investigateur    Signature de l'investigateur    Date (JJ/MM/AA)**

*A compléter si le participant est illettré :*

Témoignage de l'interview du consentement :

*Je soussigné, témoin du consentement ci-dessus pour la participation à l'étude, atteste, qu'à la date indiquée à côté de ma signature, le contenu du formulaire de consentement, a été clairement expliqué au parent/tuteur du participant et que le parent/tuteur du participant a indiqué que ses questions ont été répondues de façon appropriée.*

\_\_\_\_\_

**Prénom et Nom du témoin    Signature du témoin    Date (JJ/MM/AA)**

Numéro du Patient				
<i>SSIN</i>	-	<i>000</i>	-	<i>XY*</i>

## Annexe 1B : FORMULAIRE D'ASSENTIMENT

1. Nous souhaitons que vous \_\_\_\_\_ soyez volontaire dans une étude de recherche clinique intitulée "Surveillance des étiologies des Fièvres au Mali". Le but de cette étude est de trouver ce dont souffre votre enfant malade. Votre participation ne vous prendra pas plus de 40mn à 1heure. Si vous êtes d'accord nous vous demanderons de répondre à des questions portant sur les conditions et circonstances d'apparition de la maladie. Un peu de votre sang (à peu près 2 à 6 ml c'est à dire d'1 à 2 cuillerées à café) seront prélevés avant le traitement. En plus nous vous demanderons des urines et effectuerons un prélèvement de gorge. Les échantillons collectés serviront au diagnostic de la maladie dont vous souffrez. Aussi nous souhaiterons vous revoir 2-4 semaines après votre hospitalisation et effectuer les mêmes prélèvements afin de vérifier les paramètres qui ont changé et de confirmer le diagnostic. Au cours de cette visite de contrôle, nous vous examinerons afin de recueillir des informations sur les symptômes, les signes et le traitement de votre maladie ainsi que le diagnostic final et les résultats d'autres tests de laboratoire réalisés le médecin.

2. Les risques et inconforts auxquels vous sera exposé sont la douleur mineure, une ecchymose ou une infection bénigne sur le site de prélèvement. Pour minimiser ces risques, seules les personnes formées vont faire le prélèvement dans les conditions stériles selon les règles de bonnes pratiques de laboratoire. Tous les tests de laboratoire, qui sont en relation directe avec cette étude seront gratuits pour vous. L'avantage que vous pouvez attendre de votre participation dans cette étude est de savoir potentiellement ce qui provoque la fièvre (bactérie ou un virus), et votre sang sera testé pour déterminer les causes de la fièvre avec des procédures de laboratoire que vous pourriez ne pas recevoir autrement. Il est important de vous signaler que les tests de laboratoire ne déterminent pas toujours ce qui est faux, et dans de rares cas, ils peuvent donner un résultat erroné.

3. Les résultats de laboratoire et les renseignements recueillis seront strictement confidentiels en tout temps; y compris après la fin de l'étude. Pour protéger votre confidentialité et votre vie privée, nous allons remplacer votre nom avec un code d'étude. Un échantillon de sang sera stocké pour une future analyse de laboratoire. Tout identifiant personnel sur les échantillons biologiques sera retiré des tubes. Les spécimens seront archivés uniquement avec le numéro de l'étude.

4. Si vous avez des questions au sujet de cette étude, vous pouvez contacter les personnes suivantes:

Pour des aspects liés aux questions des sujets de recherche **contactez le Prof. Kouriba, du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux de Bamako. Téléphone + (223) 20225154.** Pour des questions sur les aspects éthiques de cette étude ou les droits de votre enfant en tant que volontaire, ou de tout problème lié à la protection du volontaire de la recherche, contactez le **Pr. Marouf Kéita, Président du Comité d'éthique de la FMOS BP 1805, Tél: (223) 222 52 77, Cellulaire : 76 46 86 28 Bamako – Mali ou Pr Mahamadou Diakit, Secrétaire permanent du Comité du Comité d'éthique de la FMOS BP 1805, Tél: (223) 222 52 77, Cellulaire : 76 23 11 91 / 66 23 11 91**

5. Votre participation à cette étude est entièrement volontaire. Vous pouvez refuser de participer à cette étude ou décider de vous retirer à tout moment et en toute liberté sans que cela vous cause la moindre pénalité ou perte de soins médicaux.





## **Annexe 2 : LETTRE D'INFORMATION AU PARTICIPANT A L'ETUDE**

**CHERCHEUR PRINCIPAL** : Pr Bourèma KOURIBA

Madame, Monsieur,

Vous êtes invité(e) à faire participer votre enfant à une étude de recherche scientifique sur « **la Surveillance des Etiologies des Fièvres au Mali** ».

Avant de décider de participer à cette étude, il est important d'en comprendre l'objectif ainsi que ses implications. Prenez le temps de lire consciencieusement les informations suivantes et d'en discuter avec vos proches. Si toutefois certains points manquent de clarté ou si vous avez besoin d'informations complémentaires, n'hésitez pas à en parler avec le chercheur principal ou un membre de l'équipe. Vous pouvez prendre tout le temps nécessaire pour décider si vous souhaitez participer ou non à l'étude.

Vous trouverez ci-après des informations sur cette étude, sur votre rôle dans cette étude, sur les risques, les contraintes et les bénéfices liés à votre éventuelle participation à cette étude ainsi que sur la procédure de consentement.

Si vous décidez de participer à cette recherche, il vous sera demandé de signer un formulaire de consentement. Cette signature confirmera que vous êtes d'accord pour que votre enfant participe à cette étude.

### **Quel est l'objectif de l'étude ?**

Le but de cette étude est d'évaluer l'ampleur et l'importance des pathogènes émergents et dangereux (PED) dans les étiologies des maladies fébriles.

### **Comment se déroulera l'étude ? Quel sera votre rôle ?**

L'étude porte sur 2000 enfants âgés de 0 à 14 ans souffrant d'une maladie qui donne la fièvre. Nous préleverons 2 à 5ml de sang, 5 à 10ml d'urine selon l'âge de l'enfant et un prélèvement de gorge afin que l'on puisse déterminer s'il souffre d'une infection quelconque.

### **Quels sont les contraintes et les risques liés à l'étude ?**

La principale contrainte de l'étude est d'accepter un prélèvement de sang, de 2 à 5 ml, conservé, puis utilisé à des fins de recherche. Toutes les investigations qui seront réalisées dans les laboratoires seront à la charge des investigateurs et cela ne vous coûtera rien.

### **Combien de temps durent l'interview?**

En fonction de votre rapidité à répondre aux questions il faut compter environ 30mn à 1heure. Ce temps dépendra de vous et nous pouvons moduler ce temps en fonction de votre disponibilité. Ce temps n'aura aucun impact sur la prise en charge de votre enfant.

### Quels sont les bénéfices attendus ?

Cette étude présente un bénéfice direct pour les participants s’y prêtant. Car la présence d’infection dans leur organisme sera précisée par les tests ce qui permettra une meilleure prise en charge par un médecin.

### Droit de refuser ou de se retirer de l’étude

Votre participation à cette étude est totalement volontaire et vous êtes libre de refuser de participer à l’étude ou de l’interrompre à tout moment sans avoir à vous justifier et sans aucun préjudice.

Si vous acceptez de participer à l’étude, il vous sera demandé de signer un consentement de participation de votre enfant avant toute intervention dans le cadre de l’étude. Si votre enfant a entre 12 et 14 ans nous lui demanderons en plus son assentiment. La signature du formulaire de consentement ou d’assentiment n’affecte aucunement vos droits légaux.

L’investigateur peut interrompre à tout moment la participation de votre enfant à l’étude s’il estime que les procédures de l’étude ne sont pas respectées, ou pour des raisons administratives ou autres.

La participation de votre enfant à cette étude et les données recueillies le concernant resteront strictement confidentielles. Ses données seront utilisées pour cette étude et les publications qui en découleront, seront sous une forme anonyme et codée. Son identité ne sera jamais révélée.

Pour toute question relative à cette étude, vous pouvez contacter :

Le chercheur principal **Professeur Bourema KOURIBA** tél : 66.75.37.28 ou 20.22.51.54 ou le **Professeur Marouf Kéita**, Président du Comité d’éthique de la FMOS Tél: (223) 222 52 77, Cellulaire : 76 46 86 28 Bamako – Mali ou le **Pr Mahamadou Diakit**, Secrétaire permanent du Comité du Comité d’éthique de la FMOS BP 1805, Tél: (223) 222 52 77, Cellulaire : 76 23 11 91 / 66 23 11 91.

#### **L’investigateur :**

#### **Le Participant :**

Nom : .....

Nom : .....

Prénom.....

Prénom :.....

Date:.....

Date :.....

#### **Signature :**

#### **Signature :**

Si vous acceptez de participer à cette étude, merci de compléter et de signer le formulaire de recueil de consentement. Vous conserverez cette note d’information que vous pouvez communiquer à qui de droit
--

Fait en 2 exemplaires originaux, datés et signés.

- Un exemplaire conservé par la personne donnant son consentement
- Un exemplaire conservé par le responsable du programme

### **Annexe 3 : Test d'urine à la bandelette à dix paramètres**

Le test commercial Combur<sup>9</sup> Test (Roche, Diagnostics GmbH, Allemagne) a été utilisé.

#### **Principe :**

Les bandelettes permettent de détecter dans l'urine certaines substances spécifiques des troubles du métabolisme et de la fonction hépatique, urinaire et rénale. Ce sont : les leucocytes, les nitrites, le pH, les protéines, le glucose, les corps cétoniques, l'urobilinogène, la bilirubine, le sang.

#### **Réalisation du test :**

Pour obtenir les performances analytiques optimales, suivre attentivement les instructions données dans le présent document.

1. Utiliser de l'urine fraîchement émise, non centrifugée. Bien mélanger l'échantillon d'urine. Pour l'analyse, l'échantillon doit être à température ambiante et ne doit pas avoir été recueilli depuis plus de 2 heures.
2. Sortir une bandelette du tube. Refermer le tube immédiatement à l'aide du bouchon d'origine contenant un desséchant. Ceci est important pour éviter que les conditions environnementales telles que l'humidité ou les nitrites n'altèrent la couleur des zones réactives. Ceci peut conduire à de résultats erronés
3. Immerger brièvement (environ 1 seconde) la bandelette dans l'urine en veillant à ce que toutes les zones réactives soient recouvertes
4. Egoutter la bandelette en passant la tranche de celle-ci contre le bord du récipient de manière à éliminer l'excès d'urine
5. Après 60 secondes (60 à 120 secondes pour les zones réactives des leucocytes) comparer la couleur des zones réactives avec la gamme de couleurs figurant sur l'étiquette. Toujours choisir les valeurs du bloc de couleurs se rapprochant le plus de la couleur de la zone réactive.

- En ce qui concerne la 9<sup>ème</sup> zone réactive (sang), la couleur obtenue doit être comparé avec 2 gammes colorimétriques distinctes pour les érythrocytes et l'hémoglobine.

Toute coloration n'apparaissant qu'à la périphérie des zones réactives ou survenant qu'après plus de 2 minutes n'a aucune signification diagnostique.

Les leucocytes, Les nitrites, et le sang dans les urines constituent les marqueurs d'une infection urinaire. Leur mise en évidence reflète donc une multiplication bactérienne au niveau de l'appareil urogénital.

### **Leucocyturie :**

Le test met en évidence l'activité des estérases granulocytaires présente dans les leucocytes intacts ou lysés. Un test positif pour les leucocytes se manifeste par l'apparition d'une coloration violète, violet-claire ou blanc-sale selon que le test soit fortement, moyennement ou faiblement positif sur la zone réactive du paramètre concerné après 60 à 120 secondes. Une coloration jaune claire signifie l'absence de leucocyte. Une leucocyturie peut signaler une inflammation et n'est pas spécifique pour une infection bactérienne donnée. En effet, on retrouvera des globules blancs dans l'urine lors d'une infection urinaire ou une pyélonéphrite, mais également lorsque le patient présente une leucocyturie stérile dans un contexte de tuberculose, ou d'antibiothérapie. La leucocyturie est sensible à 62-82% et spécifique à 82-90% pour une infection urinaire. L'absence de leucocyte sur la bandelette a une valeur prédictive négative de 97-99%(54).

Les valeurs normales de la leucocyturie est de zéro et une valeur supérieure à  $10/\text{mm}^3$  constitue sa limite de détection(55)

### **Nitrites dans les urines**

Il n'y a pas de nitrites dans les urines, sauf quand les bactéries qui possèdent une nitrate réductase (par exemple *E. coli*) transforment les nitrates alimentaires en nitrites. Le test est positif pour les nitrites si une coloration rose claire se manifeste sur la zone réactive du dit paramètre et négatif si la zone reste inchangée. Ce test a une spécificité de 96,5-97,5% pour une bactériémie alors que sa sensibilité reste mauvaise (48%). En cas de leucocyte et de nitrites positifs, la spécificité du test s'élève à 98-99,5% (54).

Une valeur de nitrite supérieure à 0,5mg/l (1mmol/l) constitue sa valeur limite détectable(55).

### **Hématurie**

L'hémoglobine et la myoglobine catalyse l'oxydation de l'indicateur par l'hydro peroxyde organique contenu dans la zone réactive pour donner une coloration bleu-vert.

## Annexe 4 : Test rapide de streptocoque beta hémolytique du groupe A

### Principe

Le principe du TDR est la mise en évidence des antigènes de la paroi spécifique de ce streptocoque éventuellement présent dans le prélèvement par les anticorps anti-SGA (apportés par le test). Si le SGA est présent dans les sécrétions prélevées, ses antigènes réagiront avec les anticorps du test et la réaction sera visible.

### Matériels et réactifs

- Tube à essai
- Flacon de réactif A (nitrate de sodium)
- Flacon de réactif B (acide acétique)
- Ecouillons
- Bandelettes réactives
- Contrôle positif (Strep A)
- Contrôle négatif (Srep A)

### Réalisation du test

- Déposer 3 gouttes du réactif A dans le tube à essai puis 3 gouttes du réactif B.
- Frotter l'amygdale avec l'écouvillon (sans toucher les lèvres, les dents ou la langue) et le déposer dans le tube
- Après 1 minute retirer l'écouvillon du tube
- Y plonger la bandelette réactive, attendre 5 minutes (jusqu'à apparition d'un trait rouge).

Les contrôles positif et négatif permettent de s'assurer de la validité du test.

### Interprétation

Le test est positif quand un trait bleu apparaît ; négatif quand le trait rouge reste seul ; invalide s'il n'y a pas de trait rouge.

**NB :** les relatifs A et B sont des solutions d'extraction de l'antigène du streptocoque A

## Annexe 5 : Test de diagnostic rapide du paludisme

### Principe

Un test rapide et qualitatif pour le dépistage de protéine riche en histidine 2 (HRP2) du *P.falciparum* et de Lactinodeshydrogenase (pLDH) (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*) dans le sang.

Le test contient une bandelette de membrane enduite de deux anticorps monoclonaux sur deux lignes différentes de la bandelette-test. Un anticorps monoclonal (ligne test 2) est spécifique à la lactinodeshydrogenase (pLDH) des espèces de Plasmodium (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*) et l'autre ligne (ligne de test 1) contient un anticorps monoclonal spécifique à la protéine riche en histidine 2 (HRP2) du *P. falciparum*. Le tampon conjugué comprend des anticorps liés à des particules d'or, qui sont spécifiques au pLDH pan et au HRP2 du *P. falciparum*.

### Matériels et réactifs

- Plaque de test (scellées dans des enveloppes individuelles d'aluminium avec un déshydratant)
- Tampon de test conjugué (comportant des anticorps liés à des particules d'or, qui sont spécifiques au pLDH Pan et spécifique au HRP2 du *P. falciparum*)
- Pipettes pour échantillon
- Lancettes
- Tampon d'alcool

### Réalisation du test

- Nettoyer la surface à tester avec un tampon d'alcool (bout des doigts en général)
- Presser doucement et percer à l'aide de la lancette fournie
- Essuyer la première goutte de sang avec coton stérile. (non fournis)
- Prélever un échantillon de sang (5 µl) à l'aide de la micropipette fournie
- Verser tout le sang (5µl) dans le puits de prélèvement
- Ajouter 2 gouttes (60µl) du tampon dans le puits du tampon
- Lire le résultat 20 minutes après.

### Interprétation

Dans la fenêtre des résultats on distingue 3 ligne : une première ligne C (contrôle) qui indique la validité du test ; une seconde ligne 2 sur la quelle une bande signifie un résultat positif au

*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* ; et une dernière ligne 1 sur la quelle une bande signifie un résultat positif au *P.falciparum* seul.

## **Annexe 6 : Description (données techniques et utilisation) de l'automate d'amplification**

### **Description de l'appareil**

Le SmartCycler de Cepheid est un système automatisé pour technique PCR en temps réel, avec tubes réactionnels en plastique. La commande se fait par logiciel depuis un ordinateur branché. Le déroulement de la PCR (courbes de fluorescence) peut être suivi directement depuis l'ordinateur branché. Les premières données qualitatives et semi-quantitatives sont déjà disponibles pendant l'exécution du passage. En quelques étapes, l'analyse à proprement parler, est réalisée sur ordinateur et offre la possibilité d'imprimer les résultats en générant un rapport d'essai complet avec tous les paramètres appliqués.

### **Données techniques**

Dimensions : Longueur : 30 cm Largeur : 25 cm Hauteur : 30 cm

Poids : 10 kg

Capacité d'échantillons : 16 cavités

Tubes réactionnels : tubes capillaires en plastique de 25 µl

Volume réactionnel : 20 à 30 µl

Canaux de détection : FAM/Cy3/TET/Texas Red/Cy5

Vitesse de chauffage : 10 °C/sec de 50 °C à 95 °C

Vitesse de refroidissement : 2.5 °C/sec de 95 °C à 50 °C

Précision de la température : +/- 0,5° C entre 60 °C et 95 °C

Alimentation électrique : 100 - 240 V ; 350 W ; 50-60 Hz

Température de fonctionnement : 15 °C à 35 °C

Humidité relative : 10 % à 80 %

Température de stockage : -20 °C à +60 °C

### **Les différents canaux et fluorochromes :**

- FCTC25 (FAM, Cy3, Texas Red, Cy5)
- FTTC25 (FAM, TET, Texas Red, Cy5)
- FATA25 (FAM, Alexa Fluor 532, Texas Red, Alexa Fluor 647)
- fluorochrome pour le contrôle interne.



## Utilisation de l'appareil

### Connexion de l'appareil

Mettre en marche l'ordinateur, ouvrir une session sous «TE050» .

Mettre le SmartCycler sous tension en appuyant sur l'interrupteur d'alimentation ; l'appareil affiche «0» et «1».

Placer le pointeur de la souris sur l'icône SmartCycler et faire un double clic pour lancer le logiciel SmartCycler.

L'écran d'accueil SmartCycler est activé et sont affichés deux «A» au lieu de «0» et «1».

Ouvrir une session sous «TE050» et entrer le mot de passe «Poly-Titration».

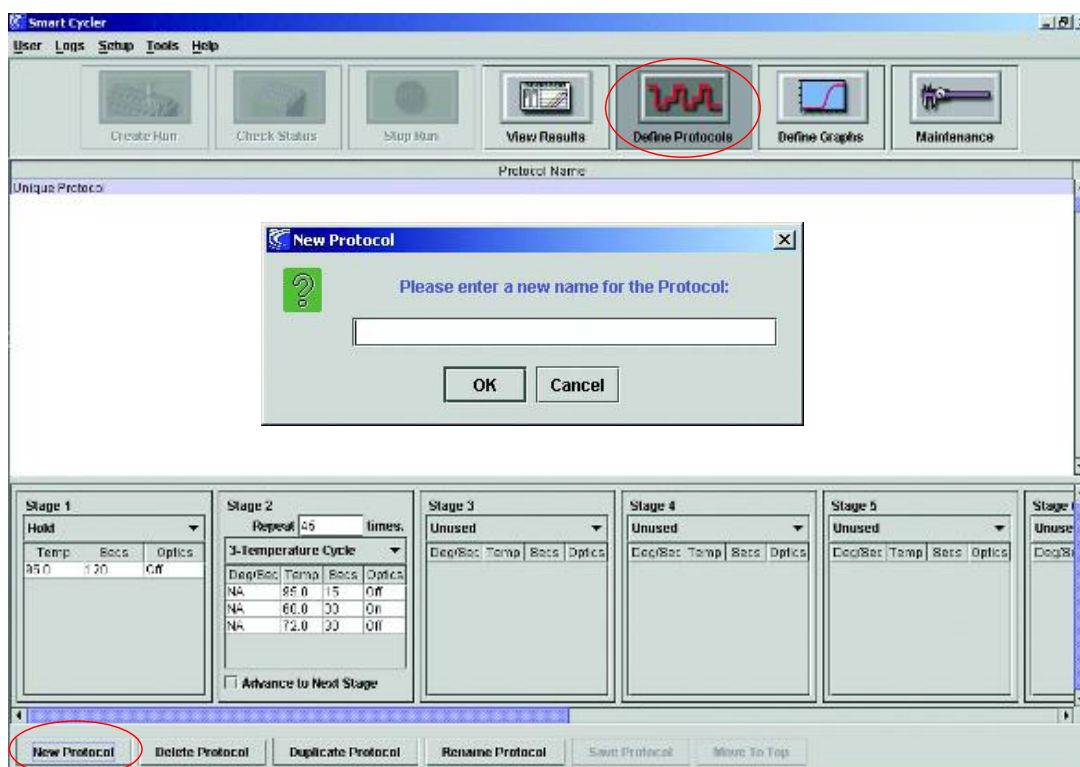
Le logiciel est ouvert et l'écran *Viewresults* s'affiche.

### Création d'un nouveau protocole de PCR

Cliquer sur l'icône *DefineProtocols*

Cliquer sur le bouton *New Protocol*

Saisir le nom du protocole



**Figure 1: Etapes de détermination d'un nouveau programme de PCR (nombre de cycles, température, temps).**

Afin d'insérer une étape à température stable choisir *Hold* dans le menu déroulant et saisir une température (allant de 40 à 98 °C) ainsi que la durée en secondes (entre 3 et 3200 sec)

Pour saisir un cycle, choisir la *Température Cycle* souhaité dans le menu déroulant et saisir température, durée et nombre de cycles correspondants.

Pour mesurer le signal de fluorescence après l'étape d'hybridation mettre *Optics* sur « On »

**Remarque :** La mesure optique se fait simultanément pour tous les 4 canaux.

Il est possible d'effectuer une seule mesure optique par étape qui doit durer au moins 6 secondes.

Enregistrer le profil thermique par le bouton *Save Protocol*

## Exécution d'un protocole de PCR et saisi d'identifiants des échantillons

Cliquer sur l'icône *CreateRun*

Dénomination du passage sous *Run Name*

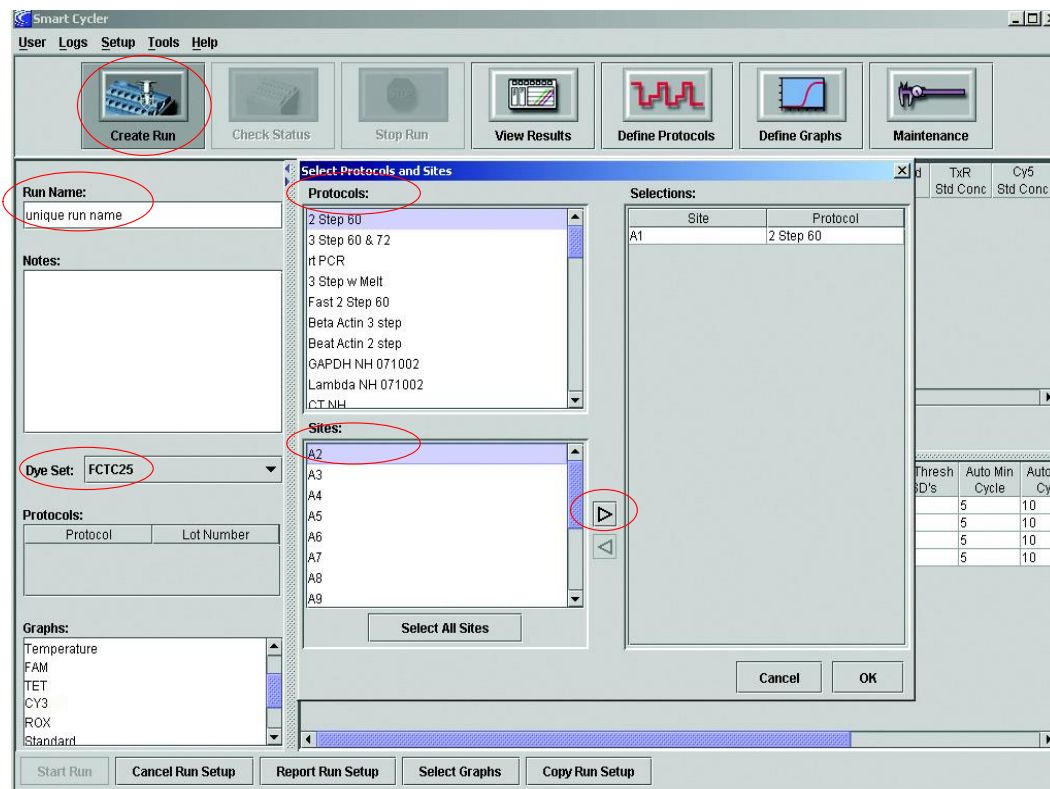
Sélection des canaux de fluorescence sous *Dye Set* (descriptif voir point 4.4 Données techniques)

Cliquer sur le bouton *Add/Remove Sites*

Sélectionner un protocole enregistré et les blocs à occuper.

Cliquer sur la flèche directionnelle droite, répétez les étapes si vous désirez occuper des blocs supplémentaires par d'autres profils thermiques. Cette opération peut également se faire si un autre passage est déjà en cours.

Appuyer sur *OK*



**Figure 2 :** Etapes de lancement d'une PCR.

La désignation de l'échantillon peut maintenant être saisie.

Site ID	Protocol	Sample ID	Sample Type	Notes	FAM Std Conc	Cy3 Std Conc	TxR Std Conc	Cy5 Std Conc
A2	2 Step 60		UNKN					
A3	2 Step 60		UNKN					
A4	2 Step 60		UNKN					
A5	2 Step 60		UNKN					
A6	2 Step 60		UNKN					

**Figure 3 :** Fenêtre pour la vérification du nombre d'échantillon par rapport au site ID.

Cliquer sur le bouton *Start Run*

**Remarque :** après avoir démarré le passage le logiciel passe automatiquement à l'écran *ViewResults*. Les passages antérieurs peuvent être regardés pendant que d'autres sont en cours.

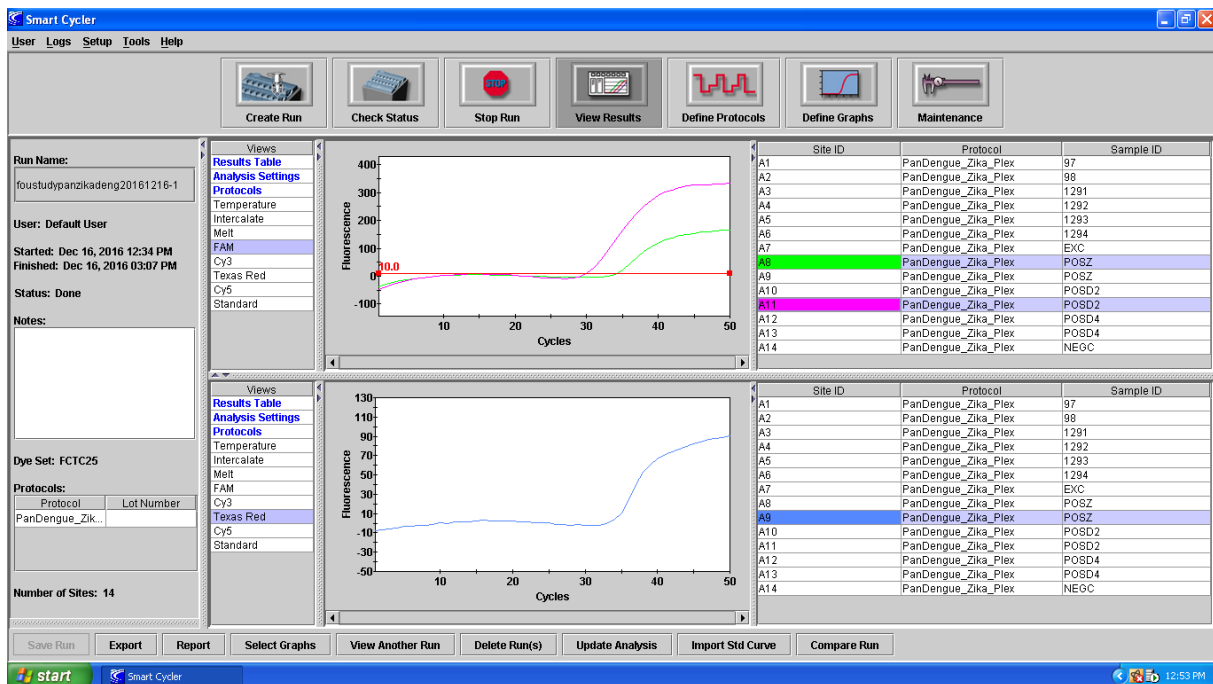
**Validation du test :**

Vérifier d'abord que le control positif est positif et que le contrôle négatif est négatif.

Cliquer sur *ViewResults* et ensuite sur le test à analyser.

Cliquer sur le Channel FAM dans le cadran supérieur et sur le Channel Texas Red dans le cadran inférieur.

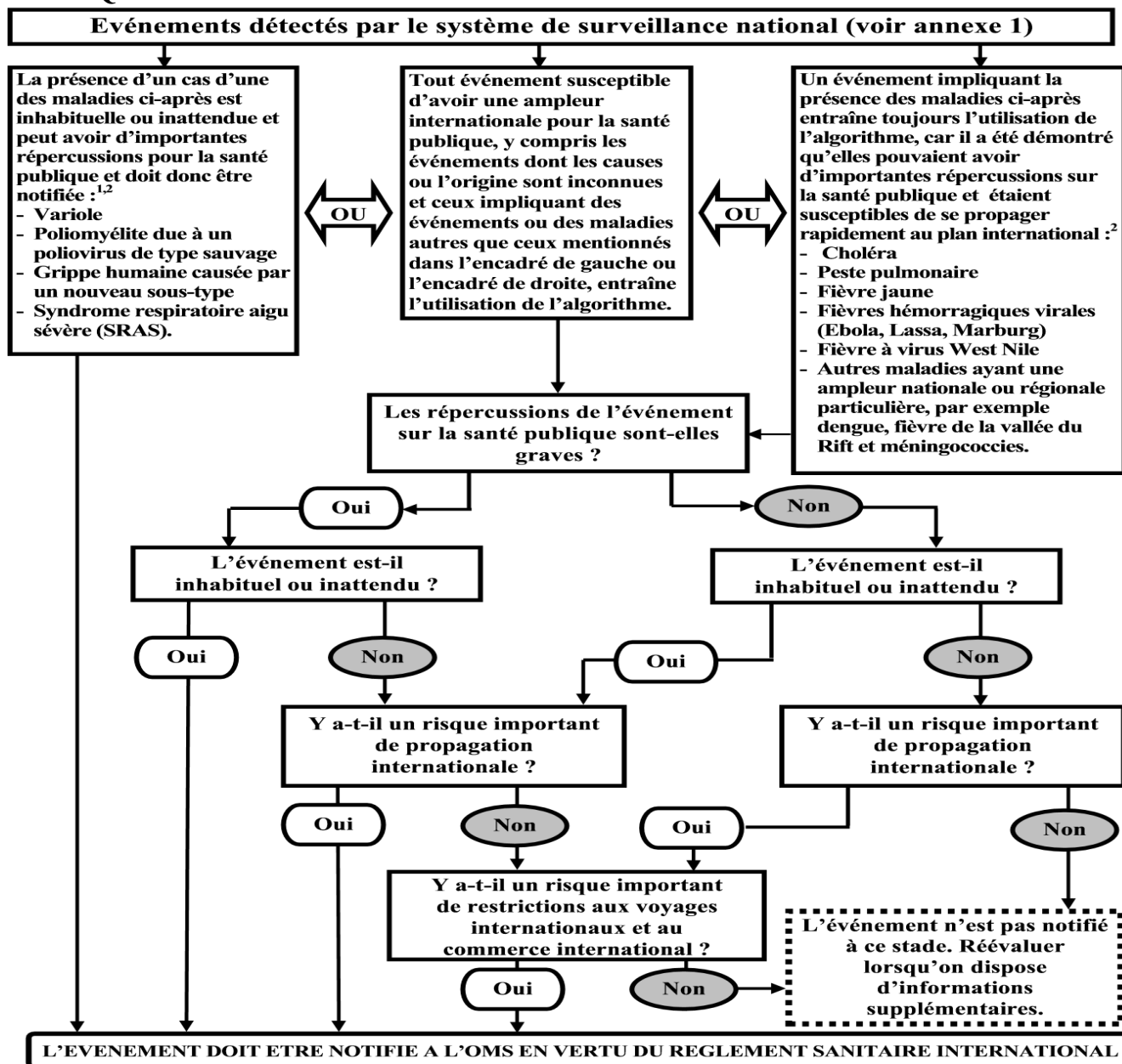
Cliquer à droite sur les contrôles et vérifier l'aspect des courbes. Les courbes doivent avoir les trois phases (initiale, exponentielle et plateau). Vérifier l'aspect sigmoïdale de la courbe.



**Figure 4 :** Courbes d'amplification des matériels génétiques éventuellement présents dans les échantillons.

## ANNEXE 7

### INSTRUMENT DE DECISION PERMETTANT D'ÉVALUER ET DE NOTIFIER LES ÉVÉNEMENTS QUI PEUVENT CONSTITUER UNE URGENCE DE SANTÉ PUBLIQUE DE PORTEE INTERNATIONALE



1 Selon les définitions de cas de l'OMS.

2 Cette liste de maladies est à utiliser uniquement aux fins du présent Règlement.

**EXEMPLES POUR L'APPLICATION DE L'INSTRUMENT DE DECISION  
A L'EVALUATION ET LA NOTIFICATION D'EVENEMENTS QUI PEUVENT  
CONSTITUER UNE URGENCE DE SANTE PUBLIQUE DE PORTEE  
INTERNATIONALE**

**L'EVENEMENT REPOND-IL A DEUX AU MOINS DES CRITERES SUIVANTS ?**

	<b>I. Les répercussions de l'événement sur la santé publique sont-elles graves ?</b>
<p>Le s ré pe rc us sio ns de l'é vé ne m en t su r la sa nté pu bli qu e so nt - ell es gr av es ?</p>	<p>1. <i>Le nombre de cas et/ou le nombre de décès pour ce type d'événement est-il élevé pour le lieu, la période ou la population considérés ?</i></p> <p>2. <i>L'événement risque-t-il d'avoir d'importantes répercussions sur la santé publique ?</i></p> <p><b>EXEMPLES DE CIRCONSTANCES POUVANT AVOIR D'IMPORTANTES RÉPERCUSSIONS SUR SANTÉ PUBLIQUE :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ Événement causé par un agent pathogène ayant un fort potentiel épidémique (infectiosité de l'agent, taux de létalité élevé, voies de transmission multiples ou porteur sain).</li> <li>☞ Indication de l'échec du traitement (résistance nouvelle ou émergente aux antibiotiques, échec du vaccin, résistance aux antidotes ou échec des antidotes).</li> <li>☞ L'événement constitue un risque important pour la santé publique, même si le nombre de cas recensés chez l'être humain est nul ou très faible.</li> <li>☞ Cas signalés parmi le personnel de santé.</li> <li>☞ Les populations à risque sont particulièrement vulnérables (réfugiés, couverture vaccinale insuffisante, enfants, personnes âgées, immunodéprimés, dénutris, etc.).</li> <li>☞ Facteurs concomitants susceptibles d'entraver ou de retarder l'action de santé publique (catastrophes naturelles, conflits armés, conditions météorologiques défavorables, foyers multiples dans l'Etat Partie).</li> <li>☞ L'événement survient dans une zone à forte densité de population.</li> <li>☞ Propagation de matériel toxique ou infectieux ou de matériel dangereux pour d'autres raisons, d'origine naturelle ou autre, qui a contaminé ou risque de contaminer une population et/ou une vaste zone géographique.</li> </ul> <p>3. <i>Une aide extérieure est-elle nécessaire pour détecter, étudier, endiguer et maîtriser l'événement en cours, ou pour éviter de nouveaux cas ?</i></p> <p><b>EXEMPLES DE CIRCONSTANCES DANS LESQUELLES UNE AIDE PEUT ÊTRE NÉCESSAIRE :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ Ressources humaines, financières, matérielles ou techniques insuffisantes, en particulier : <ul style="list-style-type: none"> <li>– moyens de laboratoire ou épidémiologiques insuffisants pour étudier l'événement (matériel, personnel, ressources financières) ;</li> <li>– manque d'antidotes, de médicaments et/ou de vaccins et/ou de matériel de protection, de décontamination ou de soutien pour satisfaire les besoins estimés ;</li> <li>– incapacité du système de surveillance existant à détecter de nouveaux cas en temps utile.</li> </ul> </li> </ul>

**LES RÉPERCUSSIONS DE L'ÉVÉNEMENT SUR LA SANTÉ PUBLIQUE SONT-ELLES GRAVES ?**

Répondre « oui » si l'on a répondu « oui » aux questions 1, 2 ou 3 ci-dessus.

<b>II. L'événement est-il inhabituel ou inattendu ?</b>	
L' év én e m en t est -il in ha bit ue l ou in att en du ?	<p>4. <i>L'événement est-il inhabituel ?</i></p> <p>EXEMPLES D'ÉVÉNEMENTS INHABITUELS :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ L'événement est causé par un agent inconnu, ou bien la source, le vecteur, la voie de transmission sont inhabituels ou inconnus.</li> <li>☞ L'évolution des cas est plus grave que prévu (notamment le taux de morbidité ou de létalité) ou s'accompagne de symptômes inhabituels.</li> <li>☞ La survenue de l'événement est inhabituelle pour la zone, la saison ou la population.</li> </ul>
	<p>5. <i>L'événement est-il inattendu dans une perspective de santé publique ?</i></p> <p>EXEMPLES D'ÉVÉNEMENTS INATTENDUS :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ L'événement est causé par une maladie/un agent qui a déjà été éliminé(e) ou éradiqué(e) dans l'Etat Partie ou qui n'a pas été signalé(e) précédemment.</li> </ul>
	<p><b>L'ÉVÉNEMENT EST-IL INHABITUEL OU INATTENDU ?</b></p> <p>Répondre « oui » si l'on a répondu « oui » aux questions 4 ou 5 ci-dessus.</p>

	<b>III. Y a-t-il un risque important de propagation internationale ?</b>
Y a-t-il un risque important de propagation internationale ?	6. <i>Y a-t-il des signes de lien épidémiologique avec des événements semblables dans d'autres Etats ?</i>
	<p>7. <i>Y a-t-il un facteur quelconque qui fasse craindre la possibilité d'un mouvement transfrontières de l'agent, du vecteur ou de l'hôte ?</i></p> <p><b>EX</b></p> <p>⌚</p> <p><b>EMPLES DE CIRCONSTANCES FAVORABLES À UNE PROPAGATION INTERNATIONALE :</b></p> <p>Quand il y a des signes de propagation locale, un cas indicateur (ou d'autres cas qui lui sont associés) observé[s] le mois précédent :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– sujet ayant effectué un voyage international au cours de cette période (ou pendant une durée équivalant à la période d'incubation si l'agent pathogène est connu) ; ou</li> <li>⌚ – sujet ayant participé à un rassemblement international (pèlerinage, manifestation sportive, conférence, etc.) ; ou</li> <li>⌚ – sujet ayant eu un contact rapproché avec un voyageur international ou une population très mobile.</li> </ul> <p>Événement causé par une contamination de l'environnement qui risque de se propager au-delà des frontières internationales.</p> <p>Événement survenant dans une zone de trafic international intense ayant une capacité limitée de contrôle sanitaire, de détection dans l'environnement ou de décontamination.</p>
<p><b>Y A-T-IL UN RISQUE IMPORTANT DE PROPAGATION INTERNATIONALE ?</b></p> <p><b>Répondre « oui » si l'on a répondu « oui » aux questions 6 ou 7 ci-dessus.</b></p>	

	<b>IV. Y a-t-il un risque important de restrictions aux voyages ou aux échanges internationaux ?</b>
restric- Y a-t-il un risque important de restrictions aux voyages ou aux échanges internationaux ?	8. <i>Des événements semblables survenus dans le passé ont-ils entraîné l'imposition de restrictions aux échanges et/ou aux voyages internationaux ?</i>
	9. <i>Soupçonne-t-on ou sait-on que la source est un produit alimentaire, de l'eau ou toute autre marchandise susceptibles d'être contaminés, qui ont été exportés vers d'autres Etats ou importés d'autres Etats ?</i>
	10. <i>L'événement s'est-il produit dans le cadre d'un rassemblement international ou dans une zone de tourisme international intense ?</i>
	11. <i>L'événement a-t-il suscité des demandes d'informations supplémentaires de la part de responsables étrangers ou de médias internationaux ?</i>

**Y A-T-IL UN RISQUE IMPORTANT DE RESTRICTIONS AUX ÉCHANGES OU AUX VOYAGES INTERNATIONAUX ?**

**Répondre « oui » si l'on a répondu « oui » aux questions 8, 9, 10 ou 11 ci-dessus.**

**Les Etats Parties ayant répondu « oui » à la question de savoir si l'événement satisfait à deux des quatre critères (I-IV) énoncés ci-dessus doivent adresser une notification à l'OMS, en vertu de l'article 6 du Règlement sanitaire international.**



## **LE SERMENT DE GALIEN**

Je jure, en présence des Maitres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- D'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !