

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DES SCIENCES, DES
TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES
DE BAMAKO



Année universitaire 2023-2024

République du Mali

Un Peuple-Un But-Une Foi

FACULTÉ DE PHARMACIE
(FAPH)



N°..... /2024

TITRE

**CHALLENGE DU DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DES
FLAVIVIRUS : CAS DU VIRUS ZIKA AU MALI**

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le .../ .../ 2024 devant le jury de la
Faculté de Pharmacie

Par **M. BOUBACAR ELMADANE CISSE**

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie **(DIPLÔME D'ETAT)**.

Jury

PRÉSIDENT : Pr Souleymane DIALLO

MEMBRES : Pr Yéya dit Sadio SARRO

Pr Yacouba CISSOKO

Dr Mohamed Ag BARAIKA

DIRECTEUR : Pr Djénéba Koumba DABITAO

LISTE DES MEMBRES DE L'ADMINISTRATION ET DU CORPS ENSEIGNANT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE ANNÉE UNIVERSITAIRE 2023-2024

➤ **ADMINISTRATION**

Doyen : Sékou BAH, Professeur

Vice-doyen : Souleymane DAMA, Maître de conférences

Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

Agent comptable : Ismaël CISSE, Contrôleur des Finances.

➤ **PROFESSEURS HONORAIRES**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
4	Abdoulaye	DABO	Malacologie -Biologie animale
5	Yaya	COULIBALY	Législation
6	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
7	Mouctar	DIALLO	Parasitologie-mycologie
8	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
9	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie humaine
10	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
11	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
12	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
13	Alou A.	KEÏTA	Galénique
14	Ousmane	KOÏTA	Biologie-Moléculaire
15	Mamadou	KONE	Physiologie
16	Bréhima	KOUMARE	Bactériologie
17	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
18	Saïbou	MAÏGA	Législation
19	Mahamadou	TRAORE	Génétique
20	Sékou Fantamadv	TRAORE	Zoologie

➤ **PROFESSFURS DECEDES**

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mahamadou	CISSE	Biologie
2	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
3	Moussa	HARAMA	Chimie analytique
4	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
5	Moussa	SANOGO	Gestion pharmaceutique
6	Elimane	MARIKO	Pharmacologie

➤ **DER: SCIENCES BIOLOGIQUES ET MÉDICALES**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Professeur	Hématologie
2	Mahamadou	DIAKITE	Professeur	Immunologie-Génétique
3	Alassane	DICKO	Professeur	Santé Publique
4	Abdoulaye	DJIMDE	Professeur	Parasitologie-Mycologie
5	Amagana	DOLO	Professeur	Parasitologie-Mycologie
6	Aldjouma	GUINDO	Professeur	Hématologie. Chef de DER
7	Akory Ag	IKNANE	Professeur	Santé Publique/Nutrition
8	Kassoum	KAYENTA O	Directeur de recherche	Santé publ./ Bio-statistique
9	Issaka	SAGARA	Directeur de recherche	Bio-statistique
10	Ousmane	TOURE	Directeur de recherche	Santé publ./ Bio-statistique
11	Boubacar	TRAORE	Professeur	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Bourèma	KOURIBA	Maître de conférences	Immunologie
2	Almoustapha Issiaka	MAÏGA	Maître de recherche	Bactériologie-Virologie
3	Mahamadou S.	SISSOKO	Maître de recherche	Bio-statistique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Maître de conférences	Biochimie clinique
5	Djénéba Koumba	DABITAO	Maître de conférences	Biologie-moléculaire
6	Antoine	DARA	Maître de conférences	Biologie-moléculaire
7	Souleymane	DAMA	Maître de conférences	Parasitologie - Mycologie
8	Laurent	DEMBELE	Maître de conférences	Biotechnologie-Microbienne

9	Seydina A. S.	DIAKITE	Maître de conférences	Immunologie
10	Fatou	DIAWARA	Maître de conférences	Epidémiologie
11	Ibrahima	GUINDO	Maître de conférences	Bactériologie Virologie
12	Amadou Birama	NIANGALY	Maître de conférences	Parasitologie – Mycologie
13	Fanta	SANGHO	Maître de conférences	Santé publ/Santé commun.
14	Yéya dit Sadio	SARRO	Maître de conférences	Epidémiologie

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Maître-Assistant	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Maître-Assistant	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Maître-Assistant	Biologie clinique
4	Seydou Sassou	COULIBALY	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
5	Klétigui Casimir	DEMBELE	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
6	Yaya	GOÏTA	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
7	Aminatou	KONE	Maître-Assistant	Biologie moléculaire
8	Birama Apho	LY	Maître-Assistant	Santé publique
9	Dinkorma	OUOLOGUEM	Maître-Assistant	Biologie Cellulaire

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Cheick Amadou	COULIBALY	Attaché de Recherche	Entomologie/Parasitologie
2	Michel Emmanuel	COULIBALY	Attaché de Recherche	Entomologie/Parasitologie
3	Abdallah Amadou	DIALLO	Attaché de Recherche	Entomologie/Parasitologie
4	Bakary	FOFANA	Attaché de Recherche	Recherche clinique
5	Merepen dit Agnès	GUINDO	Assistant	Immunologie
6	Falaye	KEITA	Attaché de Recherche	Santé Publique/Santé Environn.
7	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Assistant	Nutrition
8	Oumou	NIARE	Attaché de Recherche	Biologie appliquée
9	Lamine	SOUMAORO	Attaché de Recherche	Entomologie/Parasitologie
10	Aliou	TRAORE	Attaché de Recherche	Sciences biologiques appliquées
11	Djakaridia	TRAORE	Assistant	Hématologie

➤ **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Rokia	SANOGO	Professeur	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Maitre de Conférences	Pharmacie hospitalière
2	Mahamane	HADARA	Maitre de Conférences	Pharmacognosie

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Bakary Moussa	CISSE	Maitre-Assistant	Galénique
2	Issa	COULIBALY	Maitre-Assistant	Gestion
3	Balla Fatogoma	COULIBALY	Maitre-Assistant	Pharmacie hospitalière
4	Adama	DENOU	Maitre-Assistant	Pharmacognosie
5	Hamma Boubacar	MAÏGA	Maitre-Assistant	Galénique
6	Adiaratou	TOGOLA	Maitre-Assistant	Pharmacognosie
7	Aminata Tiéba	TRAORE	Maitre-Assistant	Pharmacie hospitalière

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Assistant	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Assistant	Pharmacognosie
3	Sékou	DOUMBIA	Assistant	Pharmacognosie
4	Assitan	KALOGA	Assistant	Législation
5	Ahmed	MAÏGA	Assistant	Législation
6	Aichata Ben Adam	MARIKO	Assistant	Galénique
7	Aboubacar	SANGHO	Assistant	Législation
8	Bourama	TRAORE	Assistant	Législation
9	Sylvestre	TRAORÉ	Assistant	Gestion pharmaceutique
10	Mohamed dit Sarmove	TRAORE	Assistant	Pharmacie hospitalière

➤ **DER : SCIENCES DU MEDICAMENT**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Professeur	Pharmacologie
2	Benoit Yaranga	KOUMARE	Professeur	Chimie Analytique
3	Ababacar I.	MAÏGA	Professeur	Toxicologie

1. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Tidiane	DIALLO	Maitre de Conférences	Toxicologie
2	Hamadoun Abba	TOURE	Maitre de Conférences	Bromatologie Chef de DER

2. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Maitre-Assistant	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Maitre-Assistant	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Maitre-Assistant	Chimie thérapeutique
4	Madani	MARIKO	Maitre-Assistant	Chimie Analytique
5	Karim	TRAORE	Maître-Assistant	Pharmacologie

3. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Assistant	Pharmacologie
2	Dalave Bernadette	COULIBALY	Assistant	Chimie analytique
3	Blaise	DACKOUO	Assistant	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Assistant	Pharmacologie
5	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Assistant	Pharmacologie
6	Mohamed El Béchir	NACO	Assistant	Chimie analytique
7	Mahamadou	TANDIA	Assistant	Chimie Analytique
8	Mohamed	TOURE	Assistant	Pharmacologie

➤ **DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
-	-	-	-	-

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Maitre de Conférences	Chimie appliquée
2	Abdoulaye	KANTE	Maitre de Conférences	Anatomie
3	Boubacar	YALCOUYE	Maitre de Conférences	Chimie organique

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Mamadou Lamine	DIARRA	Maitre-Assistant	Botanique-Biol. Végét Chef de DER
2	Joseph Sékou B.	DEMBELE	Maitre-Assistant	Biologie végétale
3	Boureima	KELLY	Maître-Assistant	Physiologie médicale

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Assistant	Chimie organique
2	Modibo	DIALLO	Assistant	Génétique
3	Moussa	KONE	Assistant	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Assistant	Biologie Entomologie

➤ **CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba M	COULIBALY	Droit commercial
5	Moussa I	DIARRA	Biophysique
6	Mahamadou	KONE	Droit et éthique
7	Modibo	SANGARE	Anglais
8	Satigui	SIDIBÉ	Pharmacie vétérinaire
9	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
10	Fana	TANGARA	Mathématiques
11	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
12	Oumar	SAMASSEKOU	Génétique
13	Boubacar	ZOUBEÏROU	Physique

Bamako, le 26 avril 2024



P/Le Doyen PO
Le Secrétaire Principal

Seydou COULIBALY
Administrateur Civil

DÉDICACES

Au nom d'ALLAH le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux

« Louange à Allah, Seigneur de l'univers. Le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux Maître du Jour de la rétribution. C'est Toi [Seul] que nous adorons, et c'est Toi [Seul] dont nous implorons secours. Guide-nous dans le droit chemin. Le chemin de ceux que Tu as comblés de faveurs, non pas de ceux qui ont encouru ta colère, ni des égarés » Amine (Coran 1) ;

Gloire à ALLAH le créateur, l'omniscient, l'omnipotent, le sage celui qui nous a permis de réaliser ce modeste travail. Que la Paix, le salut et les bénédictions d'ALLAH soient sur son envoyé le prophète Mouhamad ainsi Que sur sa famille, ses compagnons et tous les musulmans. Amen

Merci seigneur pour tous les bienfaits que vous ne cessez de me procurer.

Je dédie ce travail,

A mon cher père **Elmadane Attaïb CISSE,**

Homme de foi, courageux, humble et sage, toi qui as toujours voulu le bonheur et la réussite pour tes enfants. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices consentis pour mon instruction et mon bien être. Tu as été pour moi durant toute ma vie le père exemplaire, l'ami et le conseiller. Tes prières ont été pour moi d'un grand soutien au cours de ce long parcours. Très tôt, tu as conduit mes premiers pas à l'école, tu m'as montré la voie à suivre, et tu m'as donné tout ce dont j'avais besoin jusqu'à ce jour. Tu as toujours aimé le travail bien fait et tu t'es ardemment battu et sacrifié pour nous tes enfants. Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, maman et toi, ni la gratitude que je vous témoigne. Qu'ALLAH, le Tout Puissant, te garde, te procure santé, bonheur et longévité pour que tu demeures le flambeau illuminant notre chemin. **Amina !**

A ma chère mère **Fadimata Hamadoun CISSE,**

Je ne trouve pas les mots pour traduire tout ce que je ressens envers une mère exceptionnelle dont j'ai la fierté d'être le fils. Ma très adorable maman, tu as toujours été mon exemple car je n'ai vu en toi que droiture, humanisme, sérieux et bonté. Tu m'as toujours donné de ton temps, de ton énergie, de la liberté, de ton cœur et de ton amour. En ce jour j'espère réaliser maman, un de tes rêves ; Sachant que tout ce que je pourrais faire ou dire ne pourrait égaler ce

que tu m'as donné et fait pour moi. Puisse ALLAH, le Tout Puissant, te préserver du mal, te combler de santé, de bonheur et te procurer longue vie afin que je puisse te combler à mon tour. **Amine !**

A mes **Frères et sœurs : Diahara, Mahamadoun, Hamidou, Kadidia, Mariam, Attaïb, Almoustapha CISSE**

Qu'ALLAH renforce les liens sacrés qui nous unissent, ce travail est le résultat de votre précieux soutien. Il est un devoir pour nous dans l'honneur, la dignité, et le respect d'être à la hauteur de nos admirables parents. Que ce travail soit le gage de mon amour et de mon affection indéfectible, qu'il puisse nous encourager à nous entraider les uns les autres pour consolider l'unité familiale précieuse. Qu'ALLAH nous donne une longue et heureuse vie pour profiter plus de ce lien. **Amine !**

A **Hadidjatou CISSE et Kadidia TIMBINÉ (les dames CISSE)**

Merci pour votre soutien et d'être toujours présente pour moi. Je prie pour que cette unité familiale se consolide davantage et qu'ALLAH, le Tout Puissant, veille sur vous et vous bénisse. **Amine !**

A mes **Oncles et Cousins : Mohamed AG, Idbaltanat AG, Baba DOUMBIA, Baba BORE, Hamidou BORE, Youssouf CISSE, Soumaïla CISSE,**

Merci pour vos bénédictions et encouragements. Que Dieu vous bénisse. **Amine !**

A mes **Neveux et Nièces : Attaïb CISSE, Hamadoun Y CISSE, Bintou CISSE, Aïssata ASCOFARE, Madina CISSE, Fatouma TOURE, Almadane CISSE, Boubacar YONFO, Assoumane YONFO, Abdramane CISSE, Amadou A CISSE, Kadidia CISSE, Fadimata TOURE, Aïssata TOURE, Hamadoun YONFO, Fadimata CISSE, Elmadane CISSE, Youssouf CISSE, Ibrahim DEMBELE, Elmadane DEMBELE, Fatoumata CISSE, Fatoumata SANGARE, Diahara SANGARE, Mohamed SANGARE, Abdoulaye YONFO, Elmadane KASSAMBARA, Elmadane AG MOHAMED**

Merci pour votre soutien. Que Dieu vous bénisse. **Amine !**

REMERCIEMENTS

A Mon pays le MALI,

Auquel je dois tout. Mon cher pays, tu m'as vu naître et évoluer et m'as donné l'éducation nécessaire. Je te dis merci et prie que le Seigneur continue de te bénir et de faire de toi la grande nation que tu as toujours été.

A Tous les maîtres de la FAPH

Merci pour la qualité des enseignements qu'ils nous ont prodigués et pour leur courage.

A ma directrice de thèse Pr Djeneba Koumba DABITAO

Aucun mot ne nous conviendra assurément pour faire valoir la récompense que vous méritez et les efforts que vous fournissez pour la propagation des acquis scientifiques en termes de recherche et de formation. Merci pour vos enseignements. Merci d'avoir, un soir, accueillie un étudiant qui s'est présenté de façon inopinée dans votre bureau pour solliciter votre encadrement pour sa thèse ; Et ce soir-là vous avez accepté de le rencontrer et de discuter avec lui. Je vous en serai éternellement reconnaissant car à partir de ce jour, vous m'avez ouvert la porte de la recherche biomédicale et je prie ALLAH pour qu'il vous accorde une longue et heureuse vie pour qu'on puisse profiter plus de vos connaissances. **Amina !**

A l'équipe ImmunoCore de l'UCRC : Nadiè COULIBALY, Dr Mamadou WAGUE, Dr Mariam COULIBALY, Dr Isaac KOLOMA, Dr Mohamed A NANTOUME, Mamadou PEROU, Dr Kadidia KONE, Djeneba COULIBALY, Dr BEHINAN Gnapo Janvier Stephane, Hawa Boukary DIARRA, Adama TESSOUGUE, Aissata SANOGO, Raïssa SIDIBE

Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous m'avez appris durant ma thèse, je retiens de vous des chercheurs acharnés qui ne cessent de lutter pour cultiver l'excellence, votre courage et dévouement et surtout votre disponibilité m'ont impressionné. Vos conseils et critiques n'ont permis de m'améliorer. Merci pour tout, Grande est ma reconnaissance.

A l'équipe du laboratoire d'immunogénétique et Hémoglobinopathie de l'ICER-Mali

Pr Mahamadou DIAKITE, Dr Drissa KONATE et à toute l'équipe

L'accès à vos échantillons a été la base de ce travail, recevez nos chaleureux remerciements.

A l'équipe de Biologie Moléculaire de l'UCRC : Pr Amadou KONE, Dr Dramane DIALLO, Tenin Aminatou COULIBALY, Daouda KEITA, Dr Souraley Emmanuel KOUAME

L'accès à votre unité et à vos appareils nous a facilité le travail, recevez nos chaleureux remerciements.

A tout le **personnel de l'UCRC : Pr Bassirou DIARRA, Pr Yéya dit Sadio SARRO** et à tout le personnel de l'UCRC

Merci pour votre accueil et votre collaboration tout au long de ce travail

A mes **Frères, ami(e)s de longue date : Ibrahim MAIGA, Amadou TOURE, Hassane DICKO, Oumar OUOLOGUEUM, Mahamadoun MAIGA, Yacouba ONGOIBA, Anapel SANGALBA, Boucary ONGOIBA, Beidi DIALLO, Aïcha WALLET HAIDARA, Fatoumata SANGARE, Aminata CISSE, Rokia MAIGA, Soumaï BARRY, Mohamed ONGOIBA, Abdoul Aziz AG AOUSSOUK**

Merci pour les bons moments que nous avons eu à partager. Je vous souhaite tout ce qu'il y a de meilleure. Les mots ne suffiraient jamais pour vous remercier. Grande est ma reconnaissance.

A ma famille de la Cité Verte et de la famille **DEMBELE du Point G : Dr Adama Famoussa TRAORE, Dr Seydou BENGALY, Boureima DEMBELE, Mme DEMBELE Aissata COULIBALY, Dr Modibo KAMIA, Dr Abdouramane TRAORE , Dr Youssouf COULIBALY, Dr Drissa SOGOBA, Dr Mahamadou OUEDRAEGO, Youssouf TRAORE, Seydou KONE, Mahamadou KONE, Magan BOUARE, Abdoulaye YONFO, Abdoulaye SOGOBA, Bouché TOGORA, Kadidia DENON, Mahamadou BALLO, Dr Moussa D KEITA, Dr Nonon K KEITA, Mahamadou BENGALY, Dr Ismaël COULIBALY, Dr Mamadou OUATTARA**

Merci pour toutes ces années passées à vos côtés et votre sincère collaboration, Que le Bon Dieu nous fasse la grâce d'être de bon praticien et qu'il nous accorde tous une bonne carrière professionnelle, **Amine !**

A tout le personnel du laboratoire du **Cabinet Bouba : Issa Anaissoum TOURE, Daouda SAMAKÉ, Djibril DIARRA** et à toute l'équipe

Merci pour votre soutien et votre collaboration. Que DIEU vous bénisse. **Amine !**

A mes Amis de la Faculté : Dr Abdouramane TRAORE, Dr Aviha Ismaël DIAKITE, Dr Souleymane KAMISSOKO, Dr Mohamed Cherif HAIDARA, Dr Barkissa NOMBRÉ, Dr Haled AGBERE, Dr Aboul Kader SANOGO, Dr Souleymane SOUMARE, Dr Abdoulaye GUINDO, Dr Rouhoulahi K BAH, Dr Loïc H NGANTCHOU, Dr Lemité SIDIBE, Dr Wesley Jefferson Maurice KONGBO GBASSINGA, Dr Josaphat Elie YAO :

Merci pour toutes ces années passées à vos côtés, pour ces nuits blanches à réviser, pour les fous rires, pour cette amitié qui s'est créée autour de cet objectif commun. Nous pouvons tous être fier et célébrer ensemble ce jour tant espérer. Que le Bon Dieu nous fasse la grâce d'être de bons praticiens et qu'il nous accorde tous une bonne carrière médicale. **Amine !**

A Dr Almoustapha CISSE (Mon jumeau),

Une fois de plus je tiens à te remercier pour ton soutien et ta présence. Tu as su m'accompagner dans cette épreuve, comme tu l'as fait à chaque étape de ma vie. Merci pour tout. Que DIEU te bénisse frère **HADJI. Amine !**

A mes Grands Frères : Yaya SANGARE, Abdoul TOURE, Ali ZOROME, Oumar DEMBELE, Amadou CISSE (Japonais), Amadou TOURE (Algérien), Amaketegnon dit Youssouf ISSABRE, Modibo DEMBELE

Merci pour votre soutien et votre collaboration. Que DIEU vous bénisse. **Amine !**

A Malado SIDIBE, Madina MAIGA, Dr Drissa DIABATE, Samba SACKO, Awa SISSOKO

Merci pour votre soutien et votre collaboration. Que DIEU vous bénisse. **Amine !**

A tout le personnel de la **Pharmacie du Marché à Douentza : Dr Abdramane GUINDO, Amadou GUINDO, Amadou MAIGA** et à toute l'équipe

Merci pour votre soutien et votre collaboration. Que DIEU vous bénisse. **Amine !**

A la 13^{ème} promotion du Numerus Clausus (Promotion Pr Mamadou KOUMARE)

Merci pour toutes ces années passées à vos côtés, pour cette amitié qui s'est créée autour de cet objectif commun. Que le Bon Dieu nous fasse la grâce d'être de bons praticiens et qu'il nous accorde tous une bonne carrière professionnelle. **Amine !**

Hommage Aux Membres Du Jury

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY

Professeur Souleymane DIALLO

- **Professeur Honoraire de Bactériologie - Virologie à la Faculté de Pharmacie ;**
- **Ancien Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux du Mali (CICM) ;**
- **Ancien Chef de Service du Laboratoire du Centre Hospitalier Universitaire Gabriel Touré ;**
- **Président du Comité National de Certification De l'Eradication de la Poliomyélite (CNC) pour le Mali ;**
- **Officier de l'Ordre National du Mali.**

Cher Maître,

L'opportunité nous est donnée de vous faire part de la grande estime et de l'admiration que nous portons à votre égard.

Vous êtes sans doute un bon éducateur, rigoureux, patient et très méthodique.

Votre esprit critique et votre rigueur scientifique font de vous un Maître respecté et admiré de tous.

Veillez trouver ici, cher Maître, le témoignage de notre sincère respect.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Professeur Yéya dit Sadio SARRO

- **Master en Santé Publique ;**
- **PhD en Epidémiologie ;**
- **Epidémiologiste au Centre de Recherche et de Lutte contre la Drépanocytose (CRLD) ;**
- **Chercheur au Centre Universitaire de Recherche clinique (UCRC) ;**
- **Maitre de Conférences en Epidémiologie à la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie.**

Cher Maître,

C'est un réel plaisir et un honneur que vous nous faites en acceptant spontanément de juger cette thèse.

Vos critiques, vos suggestions et vos encouragements seront d'un apport capital pour l'amélioration de la qualité de ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de notre considération la plus distinguée.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Professeur Yacouba CISSOKO

- **Médecin Infectiologue ;**
- **Titulaire d'un Master en Immunologie ;**
- **Praticien hospitalier au CHU du Point G ;**
- **Maître de conférences Agrégé en Maladies Infectieuses et Tropicales ;**
- **Membre du Collège Ouest Africain des Médecins ;**
- **Secrétaire général de la Société Malienne de Pathologies Infectieuses (SOMAPIT).**

Cher Maître,

C'est un honneur et un réel plaisir pour nous de vous avoir comme juge.

Vos critiques, vos suggestions seront d'un apport capital pour l'amélioration de la qualité de ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de l'admiration, de la reconnaissance et du respect d'un disciple pour son maître.

A NOTRE MAITRE ET JUGE

Docteur Mohamed Ag BARAIKA

- **Pharmacien Microbiologiste ;**
- **Maître-Assistant en Bactériologie -Virologie à la Faculté de Pharmacie ;**
- **Enseignant-chercheur à l'Institut National de Santé Publique (INSP)**

Cher Maître,

C'est un honneur et un réel plaisir pour nous de vous avoir comme juge.

Vos critiques, vos suggestions seront d'un apport capital pour l'amélioration de la qualité de ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de l'admiration, de la reconnaissance et du respect d'un disciple pour son maître.

A NOTRE MAITRE ET DIRECTRICE DE THESE

Professeur Djénéba Koumba DABITAO

- **Spécialiste en Biologie Moléculaire et en Immunologie ;**
- **Maître de Conférences en Biologie Moléculaire à la Faculté de Pharmacie ;**
- **Cheffe du Laboratoire ImmunoCore de l'UCRC de l'USTTB.**

Cher Maître,

Femme de principe, vos qualités humaines, votre rigueur scientifique et votre exigence pour le travail bien fait, font de vous la personne que nous admirons beaucoup.

Vous êtes une référence, chaque minute passée à vos côtés nous enrichit davantage.

Trouver dans ce modeste travail, cher Maître le très humble témoignage de notre profonde gratitude et sincère reconnaissance pour l'enseignement agréable et remarquable dont nous avons bénéficié.

Sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNe : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

BHQ : Black Hole Quenche (extincteur de trou noir)

BSL : Biosafety Level (niveau de biosécurité)

CDC : Centres pour le contrôle et la prévention de la maladie

DC-SIGN : Molécule d'adhésion intercellulaire spécifique aux cellules Dendritiques - 3-Saisissant la N sur l'intégrine

DENV : Virus de la Dengue

DO : Densité Optique

ELISA : Test d'immunoabsorption par enzyme liée

FAM : 6-carboxyfluorescéine

FAPH : Faculté de Pharmacie

FDA : Agence Américaine des produits alimentaires et médicamenteux

FMOS : Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie

HRP : Horseradish Peroxydase (peroxydase de raifort)

HEX : Hexachlorofluorescéine

IgG : Immunoglobuline de type G

IgM : Immunoglobuline de type M

Kb : Kilobase

MAC ELISA : Test immuno-enzymatique de capture d'anticorps d'immunoglobuline de type M

MDA-5 : Protéine 5 associée à la différenciation du mélanome

MVE : Virus de l'Encéphalite de Murray Valley

OMS : Organisation mondiale de la Santé

NIAID : Institut National des Allergies et des Maladies Infectieuses

Nbre : Nombre

NS1 : Non Structural 1

NS2 : Non Structural 2

NS3 : Non Structural 3

NS4 : Non Structural 4

NS5 : Non Structural 5

JEV : Virus de l'Encéphalite Japonaise

PCR : Reaction de polymérisation en chaîne

PRNT : Test de neutralisation par réduction de plaque

prM : Membrane précurseur

RE : Réticulum Endoplasmique

RIG-I : Gène I inductible par l'acide rétinoïque

RT : Transcription inverse

RT-PCR : la transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne

SGB : Syndrome de Guillain-Barré

TBEV : Virus de l'encéphalite transmise par les tiques

TIM-1 : Domaine 1 d'Immunoglobuline et de Mucine des Lymphocytes T

TMB : Tetramethylbenzidine

TLR3 : Récepteurs de type Toll 3

UCRC : Centre Universitaire de Recherche Clinique

USTTB : Université des Sciences, des Techniques, et des Technologies de Bamako

VNO : Virus du Nil Occidental

YFV : Virus de la Fièvre jaune

ZIKV : Virus Zika

μl : Microlitre

Liste des Figures :

Figure 1: Structure de la particule virale	5
Figure 2 : Organisation du génome viral.....	5
Figure 3 : Schéma de la structure de la protéine E du virus Zika	6
Figure 4: Cycle de réplication de ZIKV.....	8
Figure 5: Analyse phylogénétique du ZIKV	10
Figure 6 : Vecteurs impliqués dans la transmission du ZIKV	15
Figure 7: Cycles de transmission ZIKV	15
Figure 8: Cinétique de l'ARN viral et des anticorps au cours de l'infection par le ZIKV	18
Figure 9 : Diagramme schématique du diagnostic de la fièvre Zika.....	19
Figure 10: Représentation schématique de la méthode sérologique de capture d'anticorps pour la détection d'anticorps IgG et IgM.....	30
Figure 11: Résumé de la procédure.....	32
Figure 12: Spectrophotomètre (SpectraMax Plus 384) utilisé pour cette étude.....	32
Figure 13: AB 7500 utilisé pour RT-PCR.....	36
Figure 14: (A) Séropositivité IgM anti-ZIKV des échantillons par kit de sérologie. (B) Séropositivité IgM anti-ZIKV des échantillons par kit de sérologie et selon le statut palustre.	41
Figure 15: Séropositivité IgM anti-ZIKV obtenue à partir du kit Abcam en fonction des groupes d'étude.	42
Figure 16: Distribution de la densité optique obtenue à partir des deux kits ELISA en fonction de la parasitémie.	43
Figure 17: Distribution de la densité optique obtenue à partir des deux kits ELISA en fonction de l'âge des participants.....	45
Figure 18 : Disposition des plaques pour 8 échantillons et contrôles	66
Figure 19: Vues linéaires et logarithmiques des courbes PCR en notant chaque étape des diagrammes d'amplification.....	78
Figure 20: Courbe de RT-PCR des échantillons positifs ou équivoques par sérologie	80
Figure 21: Technique de la goutte épaisse et du frottis mince.....	82

Liste des Tableaux :

Tableau I : Protéines non structurales du virus Zika et leurs principales fonctions	7
Tableau II: Principaux arbovirus tropicaux selon la géographie.....	13
Tableau III : Caractéristiques des Kits ELISA utilisés	28
Tableau IV : Interprétation des résultats.....	31
Tableau V: Critères de validation d'un test	33
Tableau VI: Interprétation du résultat.....	33
Tableau VII : Interprétation du test Trioplex	36
Tableau VIII: Caractéristiques socio-démographiques et biologiques des participants de l'étude.....	39
Tableau IX: Validité des plaques.....	40
Tableau X: Test Trioplex rRT-PCR des échantillons positifs et équivoques à L'ELISA	46
Tableau XI : Interprétation des résultats MAC-ELISA de Zika.....	67
Tableau XII : Description des amorces et des sondes	73
Tableau XIII : Mélange réactionnel Trioplex rRT-PCR	74
Tableau XIV: Mélange réactionnel RP PCR.....	74
Tableau XV: Exemple de disposition de plaque Trioplex rRT-PCR pour 3 échantillons (option multiplex).....	75
Tableau XVI : Instructions d'interprétation et de déclaration de la rRT-PCR Trioplex pour le sang total, le plasma, le sérum et le LCR.....	79

Table des matières

1. INTRODUCTION :	1
2. OBJECTIFS :	3
2.1. Objectif général :	3
2.2. Objectifs spécifiques :	3
3. GENERALITES :	4
3.1. Définition :	4
3.2. Historique du virus Zika :	4
3.3. Caractéristiques du virus Zika :	5
3.3.1. Structure du virus Zika :	5
3.3.2. Cycle de réplication du virus Zika :	7
3.3.3. Phylogénie du virus Zika :	9
3.4. Epidémiologie du virus Zika :	11
3.4.1. Classification des arbovirus	13
3.4.2. Réservoirs du virus Zika	13
3.4.3. Transmission du virus Zika	14
3.5. Physiopathologie de l'infection au virus Zika :	16
3.6. Complications de l'infection au virus Zika :	16
3.7. Diagnostic de l'infection au virus Zika :	17
3.7.1. Diagnostic clinique de l'infection au virus Zika :	17
3.7.2. Diagnostic biologique de l'infection au virus Zika :	17
3.8. Diagnostic différentiel :	23
3.9. Traitement de l'infection au virus Zika :	23
3.10. Biosécurité :	23
3.11. Prévention de l'infection au virus Zika :	24
3.12. Paludisme :	24
4. MATÉRIELS ET MÉTHODES :	25
4.1. Cadre de l'étude :	25

4.2.	Site de l'étude :	25
4.3.	Type et période de l'étude :	26
4.4.	Echantillonnage :	26
4.4.1.	Critères d'inclusion	26
4.4.2.	Critères de non-inclusion	26
4.5.	Variables analysées :	27
4.5.1.	Quelques définitions opérationnelles	27
4.6.	Méthode de laboratoire :	28
4.6.1.	Test ELISA pour le diagnostic du virus ZIKA :	28
4.6.2.	Test moléculaire : La RT-PCR	33
4.6.3.	Technique de diagnostic du paludisme :	36
4.7.	Gestion et analyse des données :	36
4.8.	Considérations éthiques :	37
5.	RESULTATS :	38
5.1.	Résultats globaux :	38
5.2.	Résultats analytiques :	39
6.	COMMENTAIRES ET DISCUSSION :	47
7.	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS :	51
7.1.	Conclusion :	51
7.2.	Recommandations :	51
8.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :	53
	FICHE SIGNALÉTIQUE	60
9.	ANNEXES	62
10.	SERMENT DE GALIEN	85

1. INTRODUCTION :

Les *Flavivirus* constituent un groupe de virus de la famille *Flaviviridae* qui regroupe de nombreux pathogènes humains (1). Ils comprennent plus de 70 virus à acide ribonucléique (ARN) monocaténaire transmis par les arthropodes, en particulier les moustiques et les tiques. Il s'agit notamment d'agents pathogènes d'importance mondiale tels que le Virus du Nil Occidental (VNO), le virus de l'Encéphalite Japonaise (JEV), le virus de la Dengue (DENV), le virus de l'encéphalite de Murray Valley (MVE), le virus de l'Encéphalite transmise par les tiques (TBEV), le virus de la fièvre jaune (YFV) et le virus Zika (ZIKV). Ces virus sont responsables d'infections aiguës ou sévères chez l'homme pouvant provoquer des épidémies. De ce fait, ils constituent une grave menace pour la santé mondiale (1).

Le ZIKV est un flavivirus qui a été isolé pour la première fois en 1947 chez un macaque rhésus fébrile dans la forêt Zika en Ouganda et identifié plus tard chez des moustiques, notamment *Aedes africanus* de la même forêt (2). En 1954, les 3 premiers cas d'infection humaine ont été signalés au Nigeria. Des études de sérosurveillance chez l'homme suggèrent que le virus est répandu dans toute l'Afrique, l'Asie, et l'Océanie. Cependant, ces études peuvent surestimer la prévalence réelle du virus compte tenu du chevauchement sérologique entre le ZIKV et les flavivirus apparentés tels que le DENV et le VNO (3). Le ZIKV se subdivise en deux lignées phylogénétiques : lignée Africaine et lignée Asiatique. Il a provoqué quatre grandes épidémies ; en Micronésie (île de Yap) en 2007, en Polynésie française en octobre 2013, en Nouvelle-Calédonie en janvier 2014 et en Amérique du Sud - Amérique centrale - Antilles-Caraïbes à partir de mai 2015. Ces épidémies sont dues aux souches de lignée Asiatique et ont eu lieu dans des zones géographiques où le virus n'avait pas été identifié au sein de populations immunologiquement naïves (4).

Selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), plusieurs pays de la région africaine ont des preuves de transmission du ZIKV mais les données actuelles sur la prévalence et la tendance de la transmission du ZIKV sont limitées (5). Le ZIKV est transmis principalement à l'homme par la piqûre de moustiques *Aedes spp* mais les voies de transmission sexuelle et materno-fœtale ont aussi été identifiées lors de récentes épidémies (6). On pense que les infections à ZIKV sont souvent asymptomatiques ou paucisymptomatiques (fréquentes, légères, autolimites ; symptômes incluant des éruptions maculaires ou papillaires, fièvre, arthrites, conjonctivite et des céphalées) (7). Ces symptômes peuvent durer 2 à 7 jours (8). Pourtant de récentes épidémies en Polynésie et en Amérique ont montré de rares cas, avec de sérieuses complications comme des lésions oculaires (9), des problèmes neurologiques chez les adultes (myélites, encéphalites,

Syndrome de Guillain-Barré) (10) et des anomalies développementales chez les fœtus (incluant la microcéphalie) (11).

La circulation du ZIKV au Mali n'avait pas été clairement établie avant 2023. Une étude sérologique sur 793 volontaires asymptomatiques âgés de 15 ans ou plus (2016) et 637 donneurs de sang (2013) a permis d'établir une séroprévalence d'environ 12% qui augmentait avec l'âge sans différence statistique entre les participants masculins et féminins. Les données de cette étude suggèrent la circulation du ZIKV au Mali et fournissent la preuve d'une précédente épidémie non identifiée survenue dans les années 1990 (12).%

En décembre 2023, 17 cas confirmés de Zika ont été signalés dont 7 cas de coinfection avec le DENV au cours d'une augmentation des cas positifs au DENV et 1 cas de triple infection ZIKV, DENV, virus Chikungunya, le test Trioplex rRT-PCR a été utilisé pour la détection de ces virus au niveau du laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génomique du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) (Données UCRC non publiée).

Le diagnostic biologique du ZIKV se révèle difficile dû aux faits de la réactivité croisée avec les autres *Flaviviridae*. Le test de neutralisation par réduction de plaque (PRNT) a une spécificité plus élevée que les tests immunologiques, mais n'est pas disponible dans les pays en voie développement comme le Mali. Les tests moléculaires, notamment la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), sont fiables et peuvent être réalisés avec les échantillons obtenus moins de 10 jours après le début de la maladie. Par exemple, un patient des îles Yap avait toujours l'ARN viral détectable après 11 Jours (13). Cependant, au-delà de la phase aiguë, les tests moléculaires ne sont plus efficaces pour la recherche directe du ZIKV. D'où l'intérêt des techniques d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA) qui permettent une recherche indirecte du ZIKV par la détection d'anticorps spécifiques (IgM) aux virus. En effet, il existe sur le marché des kits commerciaux (comme Abcam's anti-Zika virus IgM μ -capture *in vitro* ELISA), mais aussi des kits non commerciaux (comme CDC Zika MAC ELISA) qui sont basés sur la détection des anticorps IgM dirigé contre le ZIKV. Mais ces kits ELISA peuvent être sujet à des réactivités croisée avec d'autres *Flavivirus* comme le DENV (14). Cependant une étude mené en 2016 a rapporté des cas de résultats de sérologie faussement positifs avec des échantillons de sérum de patients atteints de paludisme (15).

Ces kits pour la plupart n'ont pas été évalués au Mali ou dans la sous-région, où d'autres *Flavivirus* circulent et les infections parasitaires, tel que le paludisme, sont endémiques. Nous avons décidé de mener une étude comparative avec deux différents kits pour permettre de mettre

en évidence un moyen de diagnostic sérologique fiable du ZIKV en comparant les résultats de ces deux kits. Notre question de recherche était la suivante, quel est l'impact de l'infection palustre sur les résultats des kits de sérologies pour le diagnostic du ZIKV ?

Nous nous sommes fixés comme hypothèse que l'infection palustre a une influence sur les résultats des tests sérologiques développés pour le diagnostic du ZIKV.

2. OBJECTIFS :

2.1. Objectif général :

Etudier l'impact de l'infection palustre sur les résultats de deux kits de sérologie (Abcam et CDC MAC ELISA) utilisés dans le diagnostic du ZIKV au Mali.

2.2. Objectifs spécifiques :

- Déterminer la fréquence de séropositivité (IgM) anti-ZIKV des échantillons testés ;
- Comparer la fréquence de séropositivité (IgM) anti-ZIKV entre les deux kits ;
- Déterminer la présence ou l'absence d'association entre l'infection palustre et la séropositivité selon le test ;
- Calculer la corrélation entre la séropositivité (IgM) anti-ZIKV et la parasitémie ou l'âge ;
- Déterminer la fréquence des tests positifs à la RT-PCR de ZIKV parmi les échantillons séropositifs pour IgM anti-ZIKV.

3. GENERALITES :

3.1. Définition :

Le virus Zika (ZIKV) est l'agent infectieux, responsable de la maladie à virus Zika chez l'homme. Il appartient à la famille des *Flaviviridae*, genre *Flavivirus*. Le ZIKV est transmis principalement par les moustiques du genre *Aedes*. Il doit son nom à la forêt dans laquelle il a été découvert en Ouganda en 1947 « la forêt ZIKA » (2). Il est apparenté aux DENV, YFV, de JEV et VNO (16). Le ZIKV est passé au fil des ans d'un virus peu connu à une maladie dont l'association récente avec des cas de microcéphalie et d'autres troubles neurologiques constitue une menace déclarée comme une urgence de santé publique de portée internationale en 2016 par l'OMS (17).

3.2. Historique du virus Zika :

Les arbovirus (arthropod-borne virus) sont des virus transmis à l'homme par des arthropodes hématophages appelés vecteurs. Les principaux vecteurs d'arbovirus sont les moustiques, mais d'autres arthropodes hématophages comme les tiques, les phlébotomes ou les culicoïdes peuvent également les transmettre. Les plus importants en santé humaine sont les *Alphavirus* (famille des *Togaviridae*), les *Orthobunyavirus* et *Phlebovirus* (famille des *Bunyaviridae*) et les *Flavivirus* (famille des *Flaviviridae*) (16).

Le ZIKV a été découvert au cours d'une étude du vecteur responsable du cycle sylvatique du virus de la fièvre jaune en Ouganda. Comme beaucoup d'autres arbovirus, la découverte du ZIKV s'est faite à la suite de recherche sur la fièvre jaune parrainée par la Fondation Rockefeller de 1914 à 1970 (2). De 1937 à 1947, l'institut de recherche sur la fièvre jaune d'Entebbe, en Ouganda, a isolé 10 virus différents dont 7 nouveaux virus qui sont le VNO, le virus Bwanda, le virus de la forêt Semliki, le virus bunyamwera, le virus Ntaya, le virus S ougandais et le ZIKV. Tous ces virus portent le nom de la localisation de leur isolement à l'exception du virus S ougandais (18). Quatre de ces virus appartiennent au genre *Flavivirus* (VNO, Virus Ntaya, Virus S ougandais et ZIKV) (19).

Des cas humains du ZIKV apparaissent dans les années 1970 en Afrique (Ouganda, Tanzanie, Égypte, République centrafricaine, Sierra Leone, Gabon et Sénégal), ainsi qu'en Asie (Inde, Malaisie, Philippines, Thaïlande, Viêt Nam et Indonésie).

3.3. Caractéristiques du virus Zika :

3.3.1. Structure du virus Zika :

La structure du ZIKV est similaire à celle d'autres *Flavivirus* comme les virus de la Dengue, de la fièvre jaune et du Nil occidental. Ce sont des virus enveloppés à ARN simple brin non segmenté, de polarité positive d'environ 11 kilobases (kb). Les virions ZIKV ont un diamètre d'environ 40-60 nm avec une capsid à géométrie icosaédrique intégrée et des saillies de surface. Le génome code environ 3500 acides aminés. Il ne présente qu'un seul cadre ouvert de lecture codant pour une polyprotéine (5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3') avec des régions non traduites (UTR) flanquantes aux deux extrémités [5' et 3'] (20). Cette dernière est clivée pendant ou après la traduction par des protéases virales (protéines non structurales) ou cellulaires, de la cellule hôte, en trois protéines structurales [capsid (C), enveloppe (E) et membrane précurseur (prM) ou membrane (M)] et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) (20).

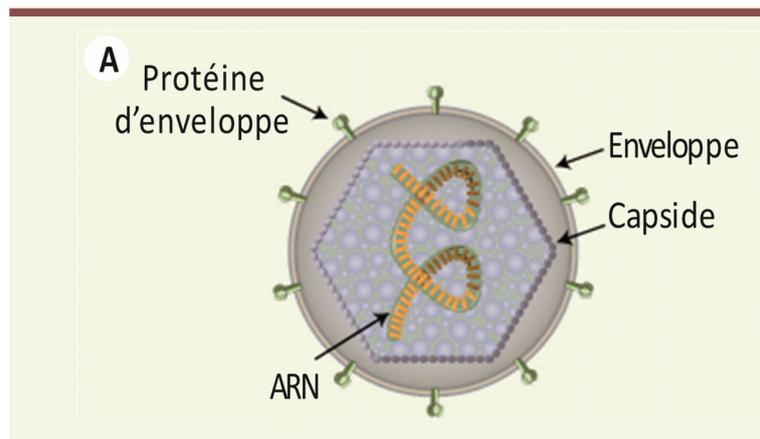


Figure 1: Structure de la particule virale (21).

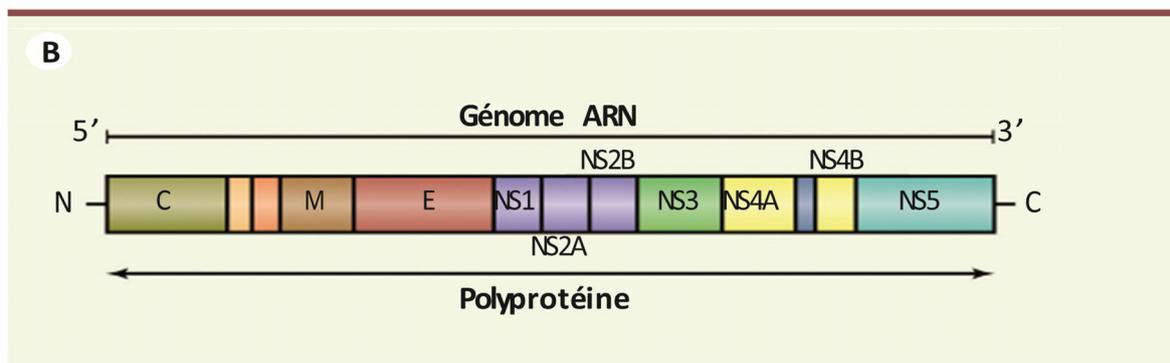


Figure 2 : Organisation du génome viral (21).

➤ Les protéines structurales

- La protéine de capsid (C) est composée de 122 acides aminés et forme en complexe avec l'ARN viral, la nucléocapside. Celle-ci correspond à une copie d'ARN génomique entouré par 60 dimères de C. La protéine est constituée de 5 hélices alpha. Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 3$ interagissent avec la membrane du virion tandis que l'hélice $\alpha 4$, dans la région N-terminal, interagit avec l'ARN viral. La dimérisation de la protéine de capsid est également essentielle pour l'étape d'assemblage (22).
- La protéine de membrane M ou de pré membrane prM est constituée de 178 acides aminés. Elle est Située sous la couche de protéines d'enveloppe E de la particule virale et forme avec celle-ci une symétrie icosaédrique. La surface du virus est constituée de 60 trimères de l'hétérodimère de E et prM. Elle est principalement impliquée dans l'étape de fusion et dans la stabilisation de la structure de la particule virale (22).
- La protéine d'enveloppe E, constituée d'environ 500 acides aminés contient 3 domaines : le domaine I impliqué dans la structure de l'enveloppe ; le domaine II contenant un peptide de fusion et un domaine de dimérisation ; le domaine III, impliqué dans l'attachement aux récepteurs cellulaires (AXL, DC-SIGN, tyro3) (Figure 5). Cette protéine virale joue un rôle majeur dans l'entrée et la fusion membranaire (22).



Figure 3 : Schéma de la structure de la protéine E du virus Zika (22)

DI : Domaine I ; DII : Domaine II ; DIII : Domaine III ; PF : Peptide de Fusion ; S : « Stalk » ; TM : domaine Transmembranaire.

➤ Les protéines non structurales

Les fonctions des protéines non structurales du virus Zika sont répertoriées dans le **Tableau II**.

L'activité protéase de NS3 permet le clivage de polyprotéine, en association avec son co-facteur NS2B, permettant la libération des protéines structurales et non structurales. La protéine NS4A est impliquée dans la formation du complexe de réplication transcription. La protéine NS5 possède deux activités : l'activité ARN polymérase ARN dépendante en C-terminal et l'activité méthyltransférase en N terminal. Les autres protéines participent aux étapes de réplication et de transcription du cycle viral et également à l'échappement immunitaire comme c'est le cas de la protéine NS1 qui peut être sécrétée de la cellule infectée et interagit avec des composants du système immunitaire (22).

Tableau I : Protéines non structurales du virus Zika et leurs principales fonctions (22)

Protéines	Fonctions principales
NS	
NS1	Réplication et assemblage
NS2A	Réplication et échappement au système immunitaire
NS2B	Co facteur de NS3 pour le clivage de la polyprotéine
NS3	Sérine protéase, Clivage polyprotéine, activité hélicase et triphosphatase
NS4A	Réplication, co facteur de NS3
NS4B	Formation du complexe de réplication, réplication et échappement au système immunitaire
NS5	Activité ARN polymérase ARN dépendante, activité méthyltransférase

3.3.2. Cycle de réplication du virus Zika :

Le ZIKV fait partie du genre des *Flavivirus* qui comprend également entre autres le virus de la dengue et celui de la fièvre jaune. Bien que différents, ils partagent le même cycle de multiplication (**Figure 4**) qui a lieu principalement dans le réticulum endoplasmique (RE) de la cellule (23). Les étapes du cycle de réplication sont :

- l'attachement de la protéine virale d'enveloppe (E) au récepteur de l'hôte induit l'internalisation du virus dans la cellule,
- la fusion de la membrane virale avec la membrane de la cellule hôte. L'ARN viral est alors relargué dans le cytoplasme,
- l'ARN génomique viral (simple brin positif) est alors traduit en une polyprotéine, qui est clivée pour produire les différentes protéines virales, dont celles essentielles à la réplication du virus,
- la réplication a ensuite lieu à la surface du réticulum endoplasmique dans des « sites de production » viraux cytoplasmiques. L'ARN génomique viral (double brin) est synthétisé à partir de l'ARN simple brin positif. L'ARN génomique viral (double brin) est ensuite transcrit et répliqué afin de fournir des ARN messagers pour produire de nouvelles protéines virales et de nouveaux ARN génomiques viraux simples brins positifs,

- l'assemblage du virus se déroule dans le RE. Les particules virales « bourgeonnent » à la surface du RE et sont transportées dans l'appareil de Golgi,
- la protéine précurseur de la membrane virale est clivée dans l'appareil de Golgi produisant par conséquent des virions matures capables de fusionner,
- relargage de particules virales matures et infectieuses par exocytose (23).

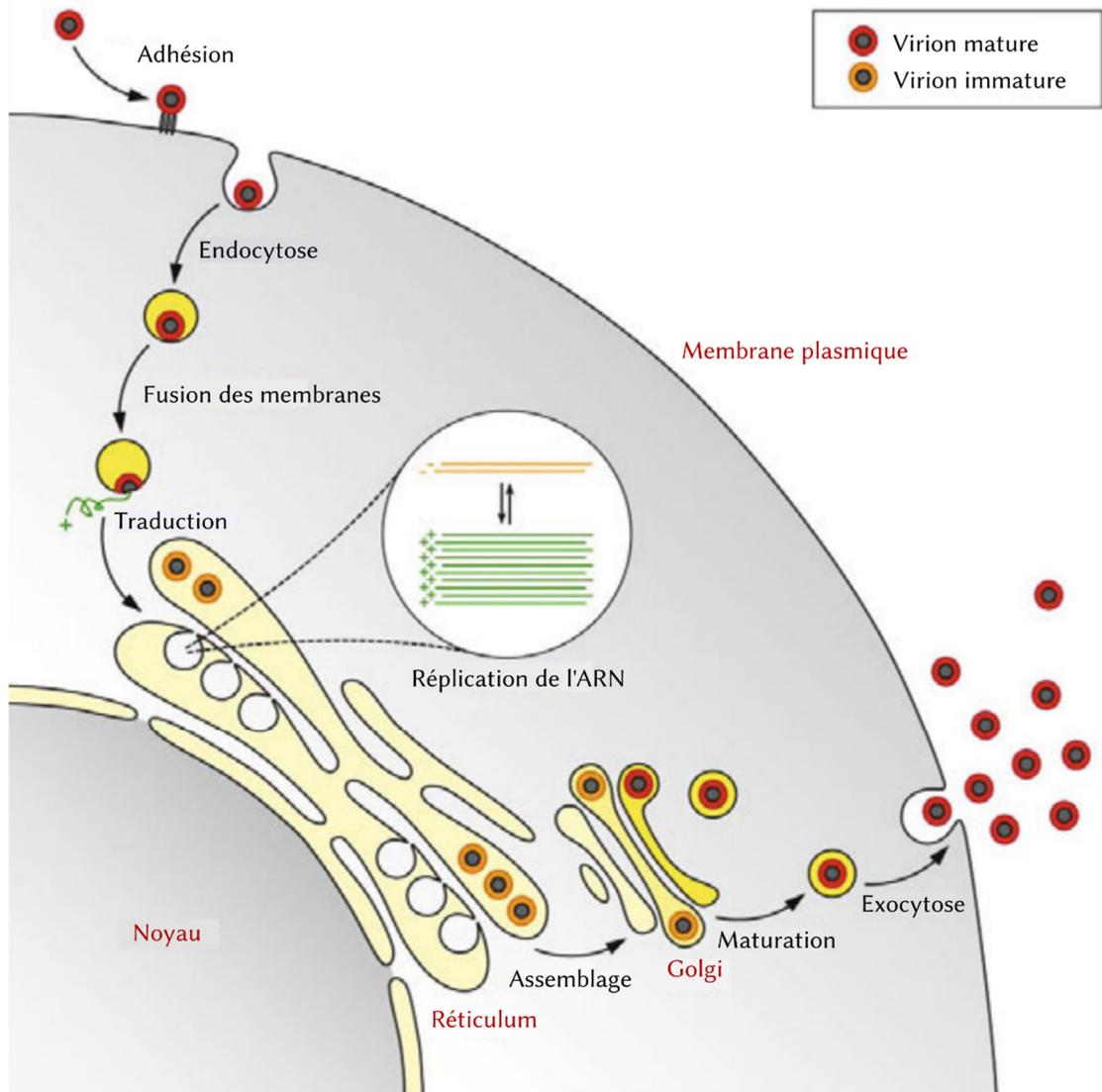


Figure 4: Cycle de réplication de ZIKV (23)

3.3.3. Phylogénie du virus Zika :

Les analyses phylogénétiques ont établi qu'il existe deux lignées principales du ZIKV : une lignée africaine qui se subdivise en deux sous-lignées (Afrique de l'Est et Afrique de l'Ouest) et une lignée asiatique (**Figure 5**) (20, 24).

Les souches humaines contemporaines ont une plus grande homologie avec la souche de moustique P6-740 (Malaisie, 1966) que les souches africaines, ce qui suggère que les souches actuellement en circulation ont évolué à partir de la lignée asiatique, ancêtre par la souche P6-740 (24, 25). De plus toutes les souches identifiées lors de l'épidémie de 2015-2016 sont plus étroitement liées à la souche H/PF/2013 de Polynésie française qu'à la souche isolée en Micronésie FSM/2007, ce qui suggère que ces sous-lignées peuvent avoir évolué indépendamment d'un ancêtre commun (**Figure 5**). Les analyses comparatives des souches historiques du ZIKV dans des modèles *in vitro* et *in vivo* sont susceptibles de répondre à des questions importantes concernant l'émergence et la pathogenèse du ZIKV (26).

Les analyses génétiques comparatives suggèrent qu'il existe plusieurs polymorphismes d'acides aminés communs aux isolats de lignée asiatique avec des résultats cliniques connus par rapport aux souches africaines [MR766, souche de référence du Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC)] et P6-740. (24, 25). L'acquisition récente de ces polymorphismes d'acides aminés pourrait potentiellement contribuer à l'augmentation de la pathogenèse et de la dissémination observée dans les épidémies actuelles. Sur la base de leur emplacement dans la polyprotéine ZIKV, ces mutations devraient contribuer à l'infection, à la réplication, à la pathogenèse et à la réponse immunitaire à l'infection (24, 25).

Bien qu'il s'agisse de lignées différentes, ils partagent plus de 95 % d'identités d'acides aminés avec un seul sérotype, contrairement aux *Flavivirus* étroitement apparentés tel que le virus de la Dengue, qui circule sous la forme de 4 sérotypes différents (27).

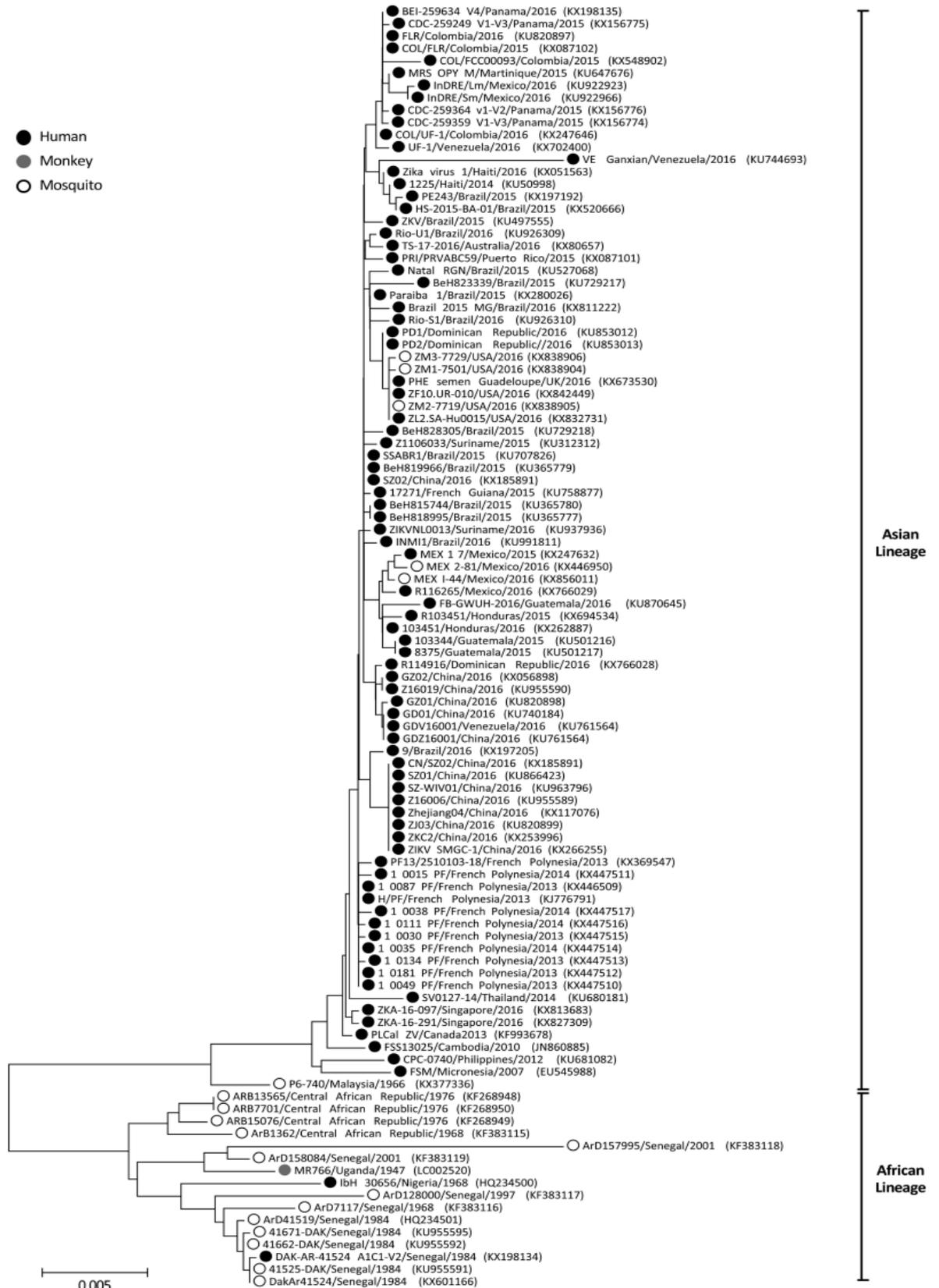


Figure 5: Analyse phylogénétique du ZIKV. Souches humaines (cercles noirs), souches de singe (cercles gris) et souches de moustiques (cercles noirs). Le nom de l'isolat, le pays d'origine et l'année d'isolement, ainsi que les numéros de chaque séquence sont indiqués (26).

3.4. Épidémiologie du virus Zika :

Après sa découverte pour la première fois en 1947 en Ouganda, il a été isolé un an plus tard chez un moustique du genre *Aedes* dans la même région (2).

Les premières grandes épidémies se produisent à Yap (Micronésie) en 2007 avec 5000 infections, puis en Polynésie en 2013 avec plus de 55 000 cas signalés. L'épidémie s'étend aux îles du Pacifique comme la Nouvelle-Calédonie, le Vanuatu, les îles Cook et l'île de Pâques (Chili). Une troisième épidémie touche l'Amérique latine à partir du Brésil en mai 2015, puis se propage à d'autres pays de la région (Colombie, Honduras, Paraguay, Mexique, Guatemala, El Salvador, Suriname) (28).

Le 1^{er} février 2016, l'OMS déclare que l'association récente de l'infection à Zika avec des foyers de microcéphalie et d'autres troubles neurologiques constitue une urgence de santé publique de portée internationale (17).

En 2020, un total de 22 885 cas de maladie à ZIKV a été signalé dans la région des Amériques, avec une incidence cumulée globale de 2,34 pour 100 000 habitants. Au cours de la même année, le Brésil a signalé 18 941 cas, soit 83 % de tous les cas signalés dans la région, dont 14 % ont été confirmés en laboratoire (5).

En décembre 2021, 89 pays et territoires présentaient des preuves documentées de transmission autochtone du ZIKV par des moustiques, répartis dans cinq des six régions de l'OMS (excepté la région de la méditerranée orientale).

Dans les régions d'Asie du Sud-Est, une épidémie de maladie à ZIKV a été signalée en Inde en juillet 2021 dans l'État du Kerala, marquant la première activité d'épidémie dans la région depuis l'épidémie de Jaipur, en Inde en 2018.

En Afrique, des preuves de transmission du ZIKV ont été identifiées dans plusieurs pays; Cependant, les informations sur l'incidence actuelle et les tendances de la transmission du ZIKV restent limitées. Au cours d'une étude de séroprévalence au Kenya, sur 877 échantillons testés, 127 ont été neutralisés avec au moins un des quatre flavivirus (14,5, IC à 95 % 12,3–17,0 %), avec une proportion plus élevée à Turkana (21,1 %, n = 87/413) qu'à West Pokot (8,6 %, n = 40/464), la séroprévalence globale du ZIKV à West Pokot était de 7,11 % et 0,24 % à Turkana. Ce qui correspondait à la circulation du ZIKV au Kenya, le seul pays africain avec des preuves sérologiques de transmission autochtone de la maladie (5).

Au Mali la circulation du ZIKV n'avait pas été clairement établie avant 2023. Une étude sur 793 volontaires asymptomatiques âgés de 15 ans ou plus (2016) et 637 donneurs de sang (2013)

a permis d'établir une séroprévalence d'environ 12%. Celle-ci prouve la circulation du ZIKV au Mali et pourrait fournir la preuve d'une précédente épidémie survenue dans les années 1990 (12). Le 1er décembre 2023, trois cas confirmés de Zika ont été signalés, suivis de 9 autres cas confirmés le 4 décembre 2023 au cours d'une augmentation des cas positifs au virus de la Dengue, le test Trioplex rRT-PCR (qui permet d'identifier les virus Dengue, le Chikungunya et le Zika) a été utilisé par le laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génomique de l'UCRC. A la date du 31 décembre 17 cas confirmés de Zika ont été signalés dont 7 cas de coïnfection avec le DENV au cours d'une augmentation des cas positifs au DENV et 1 cas de triple infection ZIKV, DENV, virus Chikungunya (Données UCRC non publiée).

3.4.1. Classification des arbovirus

Tableau II: Principaux arbovirus tropicaux selon la géographie (29).

Famille	Genre	Principaux arbovirus africains	Principaux arbovirus Asie du Sud-Pacifique	Principaux arbovirus américains
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Chikungunya, O' Nyong, Sindbis	Chikungunya, Sindbis, Ross River, Barmah Forest	Mayaro, Una, encéphalites équines américaines
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	Fièvre jaune, dengue, West Nile, Zika,	Dengue, encéphalite japonaise, West Nile, Murray Valley, Kunjin, Zika, forêt de Kyasanur	Fièvre jaune, dengue, West-Nile, Rocio, Ilheus, encéphalite de Saint Louis, maladie à virus Zika
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Bunyavirus</i> <i>Phlébovirus</i> <i>Nairovirus</i>	Bunyamwera, Ilesha, Bwamba, Tataguine Vallée du Rift Crimée-Congo		Oropouche
<i>Reoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	Orungo		

Ils regroupent plus de 530 virus décrits à travers le monde appartenant à plusieurs genres de virus à ARN dont cent dix virus environ sont pathogènes pour l'homme (29).

3.4.2. Réservoirs du virus Zika

Le cycle de transmission du ZIKV implique un ou plusieurs hôtes vertébrés et un ou plusieurs vecteurs. Les réservoirs du ZIKV ne sont pas clairement identifiés. En Afrique, le ZIKV serait principalement maintenu par un cycle sylvatique impliquant les primates non humains (30).

Des études sérologiques suggèrent que d'autres mammifères puissent être réservoirs (buffles, éléphants, chèvres, hippopotames, impalas, kongonis, lions, moutons, rongeurs, gnous, zèbres) (30).

3.4.3. Transmission du virus Zika

La transmission du ZIKV se fait principalement par piqûre de moustiques du genre *Aedes*, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Mais d'autres voies de transmission ont été découvertes lors de différentes épidémies. La transmission n'est possible que 14 jours après un repas sanguin contenant le ZIKV.

❖ Transmission vectorielle

Classiquement, le moustique s'infecte lorsqu'il prélève du sang sur un hôte virémique. Le virus ingéré avec le sang transite dans l'estomac ou l'intestin moyen du moustique où il se réplique. Cette étape définit la capacité du vecteur à infecter et permet de mesurer le taux d'infection propre au vecteur (31). Le virus peut se propager dans de nombreux autres organes du moustique, définissant sa capacité à porter le virus (31). Enfin, le virus colonise les glandes salivaires. La présence en grandes quantités du virus dans la salive permet un transfert vers un nouvel hôte, lors d'une nouvelle piqûre. Cette dernière étape correspond à la capacité de transmission du virus par le vecteur (31). L'ensemble caractérise donc 3 barrières à franchir pour le virus et finalement la capacité vectorielle de son hôte invertébré (31).

➤ Vecteurs impliqués dans la transmission de ZIKV

Les principaux vecteurs de ZIKV sont les moustiques du genre *Aedes*, et principalement les espèces *aegypti* et *albopictus*, bien que d'autres espèces de moustiques aient été identifiées comme pouvant porter le virus (32). Comme indiqué dans l'étude de Diallo et al au Sénégal qui ont mise en évidence la présence du ZIKV chez d'autres moustiques du genre *Aedes* notamment *Aedes furcifer*, *Aedes vittatus*... (33). L'espèce *Aedes aegypti* vit dans les régions tropicales tandis que *Aedes albopictus* vit dans les régions tempérées (34).

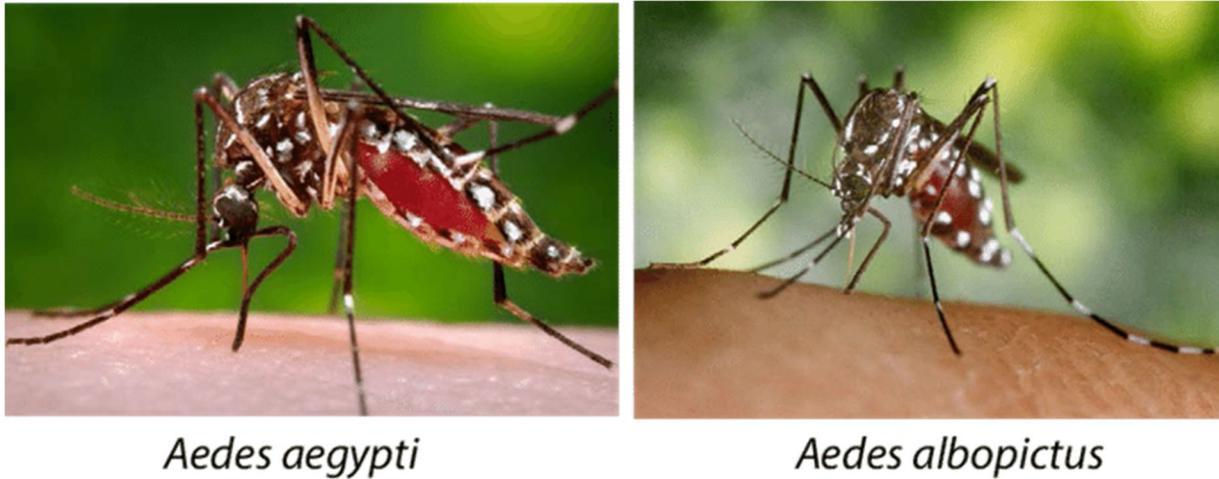


Figure 6 : Vecteurs impliqués dans la transmission du ZIKV (34).

❖ Transmission non vectorielle

Bien que le ZIKV soit principalement transmis par les moustiques, d'autres modes de transmission sont possibles. Ils comprennent :

- transmission maternelle,
- transmission sexuelle,
- transmission sanguine,
- contamination en laboratoire (35).

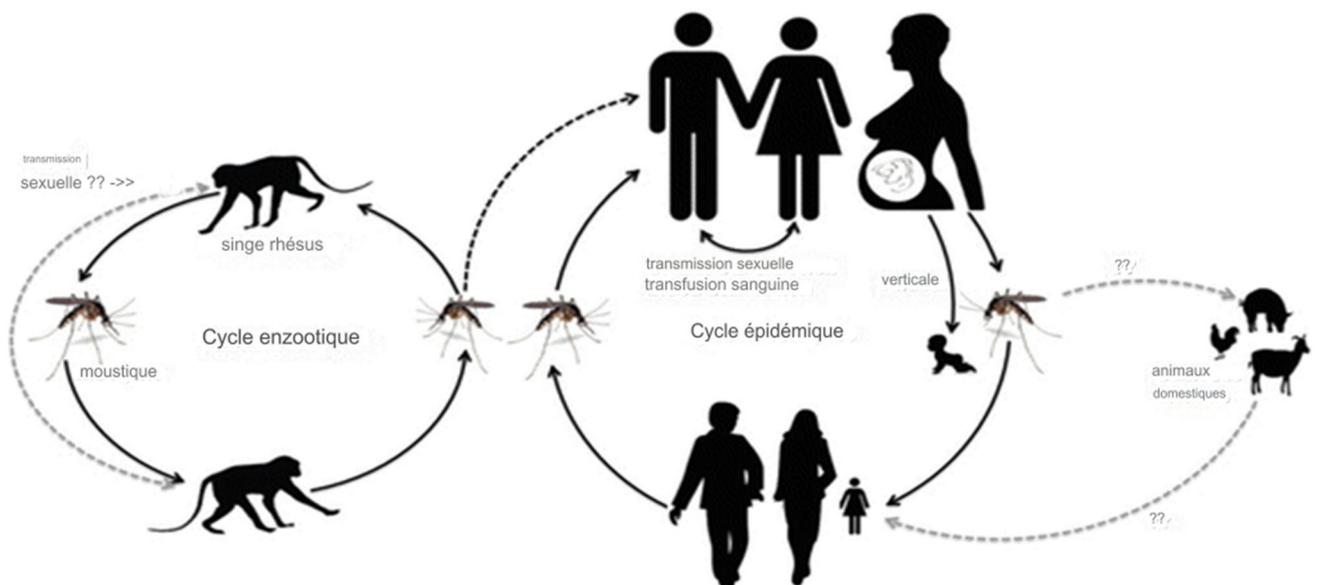


Figure 7: Cycles de transmission ZIKV (36)

3.5. Physiopathologie de l'infection au virus Zika :

Les données sur la pathogénèse du ZIKV sont rares. Les fibroblastes dermiques humains, les kératinocytes épidermiques et les cellules dendritiques immatures se sont révélés permissifs à l'infection par le ZIKV (37), les facteurs d'entrée/adhérence [molécule d'adhésion intercellulaire spécifique aux cellules Dendritiques - 3- Saisissant la N sur l' intégrine (DC-SIGN), récepteur AXL tyrosine kinase AXL, protéine tyrosine kinase Tyro et domaine 1 d'immunoglobuline et de mucine des lymphocytes T (TIM-1)] permettent l'entrée du ZIKV. La réplication du ZIKV active une réponse immunitaire antivirale et la production d'interféron de type I dans les cellules infectées. La formation d'autophagosomes est associée à une réplication virale améliorée et l'expression induite d'amas d'antigènes antiviraux [gène I inductible par l'acide rétinoïque (RIG-I), protéine 5 associée à la différenciation du mélanome (MDA-5) et récepteurs de type Toll 3 (TLR3)] capables de détecter la présence de profils moléculaires associés à des agents pathogènes, a été observée après l'infection des fibroblastes cutanés. L'infection par le ZIKV a induit un programme autophage confirmé par la présence de vésicules caractéristiques de types autophagosomes dans les fibroblastes infectés (37). Les lymphocytes T (LT) auxiliaires sont activés pendant la phase aiguë de la fièvre ZIKA (38).

Après une période d'incubation de 3 à 12 jours, bien que l'infection soit asymptomatique chez la majorité des personnes infectées (80%), certains individus développent des symptômes (20%) (3). Les manifestations cliniques les plus fréquentes sont peu sévères et non spécifiques à l'infection par ZIKV. Celles-ci comprennent de la fièvre, des douleurs articulaires, des maux de tête et des éruptions cutanées (3). Lors de récentes épidémies, il a été identifié que des symptômes neurologiques sévères sont également causés par l'infection par ZIKV. Ceux-ci peuvent affecter aussi bien les adultes que les nouveau-nés (39).

3.6. Complications de l'infection au virus Zika :

➤ Microcéphalie

Une microcéphalie est une anomalie du développement cérébral intra-utérin, caractérisée par une croissance trop faible du crâne et du cerveau (40).

➤ Syndrome de Guillain-Barré

Le syndrome de Guillain-Barré (SGB) est une polyneuropathie aiguë inflammatoire démyélinisante. Il s'agit d'une destruction de la gaine de myéline qui entoure les nerfs périphériques (sensitifs et moteurs), par le système immunitaire tel que les auto-anticorps du malade. La myéline permet la rapidité de l'influx nerveux, cela se traduit donc par un

ralentissement, voire un arrêt du message nerveux, pouvant parfois entraîner la mort, dans les cas les plus graves (40).

➤ **Autres complications**

- **La myélite** est un syndrome neurologique, au cours duquel il y a une inflammation de la moëlle épinière (40).
- **La méningo-encéphalite** est une inflammation cérébrale, touchant l'encéphale et les méninges. Ces dernières constituent l'enveloppe qui protège l'encéphale et sont constituées de la dure-mère, de l'arachnoïde et de la pie-mère (adhérant directement à l'encéphale) (40).
- **Arthrogrypose** se caractérise par des raideurs articulaires congénitales affectant au moins 2 régions du corps. Chez les nouveau-nés, elle se manifeste par des déformations au niveau des jambes (genoux fixés en flexion, hyperextension des genoux, pieds bots), de la hanche (fixée en position de flexion, adduction ou rotation externe) et des bras (poignets et doigts fixés en flexion, coude fixé en extension ou en flexion, adduction et rotation interne des épaules) (40).

3.7. Diagnostic de l'infection au virus Zika :

3.7.1. Diagnostic clinique de l'infection au virus Zika :

Les symptômes et les signes de l'infection par le ZIKV surviennent généralement 3 à 12 jours après la piqûre du moustique-vecteur et disparaissent dans les 2 à 7 jours (41). Bien que l'infection asymptomatique soit courante, environ 20% des humains infectés par le ZIKV deviennent symptomatiques avec l'apparition aiguë d'une fièvre, d'une éruption maculo-papuleuse, d'une conjonctivite (manifestations ophtalmologiques) et d'arthralgies. La maladie est généralement bénigne et ne dure qu'une semaine. Contrairement au virus Ebola, la mortalité est faible et les hospitalisations peu fréquentes (42). La présentation clinique du patient rappelant la symptomatologie d'autres infections virales comme la Dengue et le Chikungunya, associée aux antécédents de voyage appropriés, doit guider le clinicien à soupçonner une infection par le ZIKV (43).

3.7.2. Diagnostic biologique de l'infection au virus Zika :

Il repose sur la mise en évidence du génome (ARN) du virus dans le sang, les urines et d'autres liquides biologiques (examen direct par RT-PCR), ou la sérologie sur un prélèvement de sang (détection des anticorps spécifiques au virus Zika tels que les IgM et IgG anti-Zika). La virémie et la virurie sont précoces et transitoires, les anticorps (IgM puis IgG) apparaissent

secondairement (**Figure 8**). La stratégie de diagnostic impose une recherche simultanée d'infection par les virus de la dengue, du Chikungunya et du Zika (44) .

Le choix de la méthode employée dépend du moment où le prélèvement est réalisé par rapport à la date de début des symptômes (**Figure 8**).

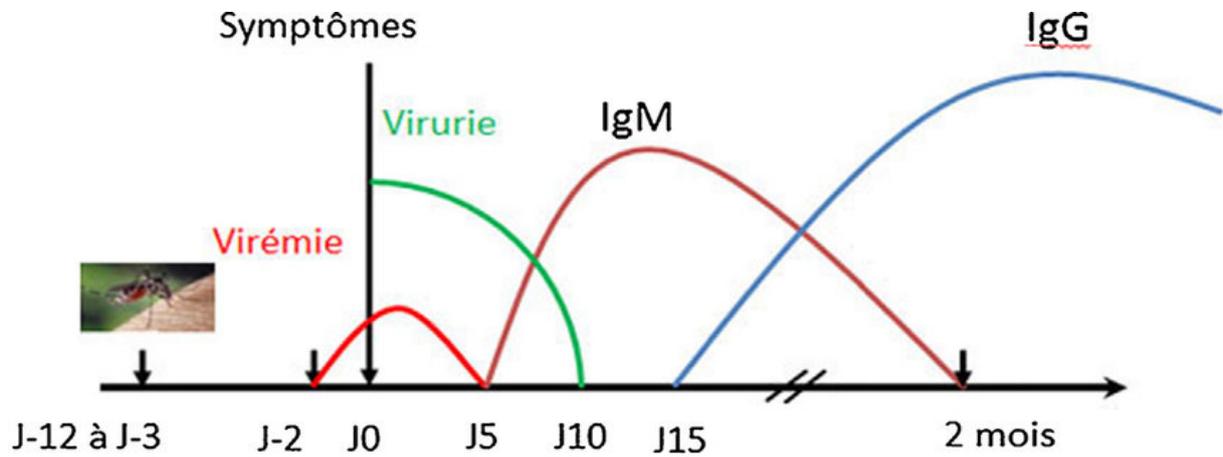


Figure 8: Cinétique de l'ARN viral et des anticorps au cours de l'infection par le ZIKV (45).

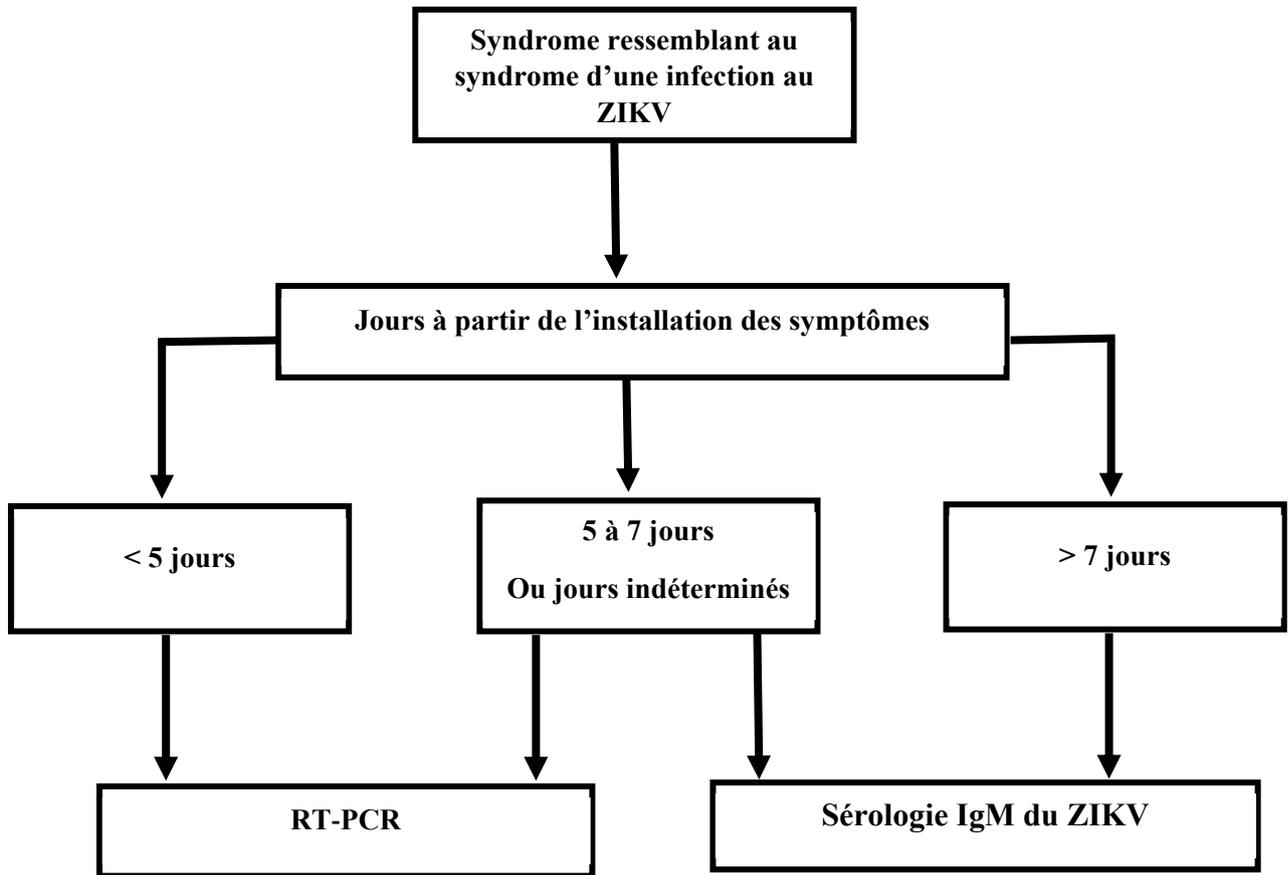


Figure 9 : Diagramme schématisé du diagnostic de la fièvre Zika.

La RT-PCR du ZIKV est effectuée sur du sang (ou sur de la salive s'il est impossible de prélever un échantillon de sang). Si les résultats de la RT-PCR du *Flavivirus* sont positifs, un séquençage est effectué. La sérologie IgM du ZIKV consiste en une détection par ELISA ou par immunofluorescence, avec confirmation par PRNT, si les résultats sont positifs ou équivoques. Adapté de Musso D et al (35).

➤ Diagnostic biologique direct de l'infection au virus Zika

Le diagnostic direct consiste à la recherche de l'ARN du ZIKV dans les échantillons comme le sang, les urines, le crachat, etc.

Le sérum sanguin est généralement le choix d'échantillon préféré pour la détection du ZIKV par des méthodes sérologiques basées sur la recherche d'anticorps ou le diagnostic moléculaire de l'ARN viral. Mais la virémie est de faible durée et des sérums obtenus plus de 10 jours après l'apparition des symptômes peuvent limiter la sensibilité des méthodes moléculaires (46, 47). Cependant, l'analyse comparative de différents types d'échantillons a révélé des charges virales plus élevées dans les échantillons d'urine (47). En plus du sérum et de l'urine, les liquides organiques comme le liquide amniotique, la salive, le liquide céphalo-rachidien, le sperme et le

tissu placentaire peuvent également être utilisés comme échantillons pour la détection du ZIKV (36).

Les *Flavivirus* sont des virus à ARN, leur amplification nécessite deux étapes, la transcription inverse (RT) de l'ARN génomique en acide désoxyribonucléique (ADN) simple brin (ADN complémentaire : ADNc), suivie de la conversion en ADN double brin et de l'amplification de l'ADN ; ces deux étapes peuvent être effectuées dans la même réaction (48).

Deux stratégies peuvent être utilisées pour la détection moléculaire du ZIKV :

- la détection de l'ARN du virus qui nécessite des tests supplémentaires afin d'identifier quel virus a été amplifié,
- la détection de l'ARN spécifique du ZIKV.

La détection moléculaire de l'ARN du *Flavivirus* utilise des « amorces consensuelles » conçues dans les régions du génome du *Flavivirus* qui possèdent un degré élevé de conservation des séquences. Les tests RT-PCR avec des « amorces consensuelles » permettent de détecter de nouveaux *Flavivirus* ou des variantes de *Flavivirus* connus, mais ils manquent parfois de sensibilité. Par exemple, ce test n'a pas réussi à amplifier l'ARN du ZIKV du sérum d'un patient infecté, tandis que l'ARN du ZIKV a été détecté avec des amorces spécifiques du ZIKV (49). La plupart des protocoles ciblent la partie terminale du gène codant pour NS5 ou le 3=NCR du génome du *Flavivirus* en raison des régions hautement conservées dans cette partie du génome (50). Le ZIKV a été détecté avec succès par des tests RT-PCR *Flavivirus* ciblant le gène codant pour E (51), le gène codant pour NS1 (52), le gène codant pour NS3 (53) et le gène codant pour NS5 (54). Après la détection de l'ARN du *Flavivirus*, l'identification au niveau de l'espèce nécessite des tests supplémentaires. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées, par exemple la RT-PCR avec des amorces spécifiques à l'espèce (mais des amorces-sondes spécifiques et des témoins positifs sont requis pour tous les *Flavivirus* suspectés); amplification de l'ADNc, suivi d'une digestion enzymatique de restriction (51); ELISA pour détecter l'ADN amplifié modifié par la digoxigénine (55); hybridation (56) et le séquençage des acides nucléiques. Le séquençage est maintenant une méthode de choix pour l'identification des espèces, car il est disponible dans la pratique courante aux laboratoires de Biologie Moléculaire (35). Le délai moyen entre l'apparition des symptômes et un test sanguin positif est en général de 3 jours. Pendant l'épidémie de l'Etat de Yap, un patient a été testé positif le jour 11 à la RT-PCR. Les patients peuvent être virémiques jusqu'au dixième jour (J10) avant l'apparition des symptômes, comme indiqué dans une étude sur des donneurs de sang asymptomatiques (57).

➤ **Diagnostic sérologique de l'infection au virus Zika**

En raison d'une réactivité croisée importante entre les anticorps déclenchés par différentes infections à *Flavivirus* ou par la vaccination, même pour les virus appartenant à différents sérogroupes, la sérologie des *Flavivirus* se révèle complexe. Les patients dans les zones actuelles de flambée de virus Zika sont plus susceptibles d'avoir une forte exposition de fond à d'autres virus tels que le DENV, YFV, VNO. En conséquence, une forte proportion des infections à ZIKV dans la région épidémique sera une infection secondaire à *Flavivirus* qui compliquera la sérologie. Un nombre limité de tests sérologiques du ZIKV ont été décrits dans la littérature. Les données, provenant d'étude sur la séroprévalence et le diagnostic du ZIKV, publiées de 1950 à 1980 montrent que les tests de fixation du complément et d'inhibition de l'hémagglutination montrent une réaction croisée étendue entre Zika et d'autres *Flavivirus* (58, 59). Malgré un certain risque de réactivité croisée, la méthode sérologique la plus spécifique pour les *Flavivirus* est le test de neutralisation des virus (60).

✓ **Tests non commerciaux**

Les Tests non commerciaux sont des tests développés par les laboratoires nationaux comme le CDC en vue d'aider au diagnostic rapide d'un pathogène émergent, et ces tests ne sont utilisés qu'en interne par ces mêmes laboratoires ou les laboratoires conformes à leurs recommandations à des fins de surveillances épidémiologiques.

Le test immuno-enzymatique de capture d'anticorps d'immunoglobuline M (MAC-ELISA) du CDC permet d'identifier qualitativement les anticorps IgM dans le sérum ou le liquide céphalo-rachidien. Néanmoins, comme des anticorps peuvent réagir de manière non spécifique, les données peuvent être difficiles à interpréter (61). Par conséquent le PRNT, un test sérologique basé sur la capacité d'anticorps particuliers présents dans le sérum des patients à neutraliser les virus en bloquant la formation de plaques dans une monocouche cellulaire, doit être utilisé pour confirmer les tests positifs, ambigus ou non concluants. En raison de sa grande spécificité, le PRNT est considéré comme « gold standard » pour le sérodiagnostic différentiel des *Flavivirus*. Cependant, ce test est coûteux, nécessite des laboratoires hautement spécialisés disposant d'un équipement suffisant pour maintenir la culture cellulaire et comporte des directives uniques pour travailler avec les virus vivants. Il est également difficile à réaliser et 5 à 10 jours sont nécessaires pour l'obtention de résultats (61).

✓ **Tests commerciaux**

Le premier test sérologique commercialement accessible pour la détection du ZIKV a été le test Euroimmun, qui a fait l'objet d'une évaluation approfondie dans la littérature (62, 63). Le test Euroimmun anti-Zika IgG/IgM est basé sur un ELISA pour la détection des IgG et IgM dans les échantillons de sérum en utilisant la protéine NS1 du ZIKV comme antigène. La sensibilité en prenant en compte les deux classes d'immunoglobulines (IgG et IgM), s'élève à 100% (IgG 100%, IgM 56%) pour une spécificité de 94% (IgG et IgM, chacune 97%) (64).

Le test Inbios encore appelé ZIKV Detect 2.0 utilise la protéine d'enveloppe virale (E) comme antigène. En mai 2019 l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) aux Etats-Unis a accordé à ce test une autorisation de mise sur le marché (65). Ce qui en fait le premier test sérologique commercial à obtenir cette autorisation. Le test Inbios présente une grande sensibilité (> 90%) et une grande spécificité (> 96 %). Tout en fournissant des résultats diagnostiques comparables à ceux du CDC MAC-ELISA comme l'ont montré Granger et al (66). La spécificité d'un test diagnostique est essentielle, car la sensibilité joue un rôle clé dans la détermination de son utilité et parce qu'une faible sensibilité peut donner lieu à des résultats faussement négatifs. Ces tests présentent un grand potentiel pour l'évaluation sérologique des infections par le ZIKV, avec un délai plus court pour la confirmation de l'infection, et ils pourraient réduire la nécessité de tests de confirmation PRNT, même si des recherches supplémentaires avec un panel plus large d'échantillons sont encore nécessaires (61).

Le test ADVIA Centaur Zika est le second test commercial autorisé par la FDA ; le troisième test autorisé est LIAISON XL Zika Capture IgM, le dernier test sérologique qui a été autorisé par la FDA est DPP ZIKA IgM Assay System de Chembio Diagnostic System (67).

Le test Abcam's anti-Zika virus IgM μ -capture (ab213327) a été développé par la société Abcam pour la recherche sur le diagnostic sérologique du ZIKV, il n'a pas été approuvé par la FDA et n'a pas non plus reçu l'autorisation d'utilisation d'urgence de la FDA (68).

La majorité des tests présente une sensibilité et une spécificité élevées. Toutefois, ces tests ne sont généralement validés qu'à l'aide d'échantillons provenant des pays ou régions du Nord, ce qui limite leur applicabilité pour le diagnostic de routine du ZIKV dans les pays du Sud.

En raison des différentes souches de ZIKV qui circulent actuellement, leur utilisation devrait être large et universelle. Différents isolats du ZIKV peuvent présenter des changements génotypiques et phénotypiques qui affectent la façon dont le système immunitaire réagit et, par

conséquent, la façon dont le virus déclenche une réponse anticorps (69). Si ces tests sont soumis à un examen clinique approfondi, ils ont de bonnes chances d'être utilisés dans les laboratoires de diagnostic standard (61).

3.8. Diagnostic différentiel :

Il est important d'effectuer un diagnostic différentiel d'une infection par le ZIKV, car d'autres causes possibles engendrent des manifestations cliniques semblables : la Dengue, le Chikungunya et les autres *Alphavirus* (Ross River virus, virus O'nyong-nyong, virus de Mayaro...), le paludisme, les bactéries *Rickettsies*, le Streptocoque du groupe A, la Rubéole, la Rougeole, les *Parvovirus*, les *Entérovirus*, les *Adénovirus*, la Leptospirose (70).

D'autres infections fréquentes comme (la cytomégalie, la toxoplasmose et la syphilis) peuvent présenter les mêmes symptômes qu'une infection au virus Zika (71).

3.9. Traitement de l'infection au virus Zika :

Présentement il n'y a pas de traitement spécifique ou antiviral pour les infections à virus Zika (72). Les guides de traitement actuellement utilisés sont basés sur des traitements symptomatiques notamment le paracétamol pour la fièvre et la douleur, un antihistaminique pour le rash et hydratation (35). Le traitement avec l'acide acétylsalicylique et les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont à éviter en raison des risques de syndrome hémorragique avec d'autres *Flavivirus* (35). Dans les premiers jours après l'apparition, isoler le patient pour éviter les piqûres de moustiques et prévenir la contamination d'autres personnes (72).

3.10. Biosécurité :

Le ZIKV est classé comme agent pathogène de niveau 2 dans l'Union européenne (à l'exception du Royaume-Uni) et aux Etats-Unis (35). De ce fait les tests de diagnostic en laboratoire, notamment la méthode de la RT-PCR et les tests sérologiques sur des prélèvements cliniques issus de cas suspectés ou confirmés d'infection par le virus Zika, doivent être réalisés dans une enceinte de sécurité biologique niveau 2 (BSL-2) (44).

Il n'existe aucune donnée concernant les caractéristiques physico-chimiques et la sensibilité aux désinfectants du ZIKV. Cependant, les *Flavivirus* sont généralement sensibles à la chaleur humide (121°C au moins 15 min), à la chaleur sèche (160-170°C pendant 1 heure) et sont inactivés dans des solutions de pH 3 (44). Ils sont également sensibles à la lumière ultraviolette et le rayonnement Gamma. Ils sont connus pour être sensibles aux désinfectants tels que

l'hypochlorite de sodium à 1% (eau de javel), le glutaraldéhyde à 2%, l'éthanol à 70%, le peroxyde d'hydrogène 3-6% et le formaldéhyde à 3-8% (73).

Les virus de la dengue sont inactivés par le phénol-guanidine isothiocyanate (TRIzol® LS) et les sels chaotropiques (AVL Buffer), qui sont des réactifs utilisés pour l'extraction de l'ARN viral. Ces réactifs inactivent les *Flavivirus* et, par conséquent, la procédure de diagnostic pourrait se poursuivre dans un laboratoire avec des niveaux de sécurité standard après l'ajout de ces réactifs (74).

3.11. Prévention de l'infection au virus Zika :

Il n'existe pas de vaccin contre le ZIKV, mais plusieurs sont en phase de développement utilisant la technologie du vaccin contre la dengue (35).

Les mesures de prévention sont les mêmes que pour toutes les maladies transmises par les moustiques et comprennent des stratégies individuelles de prévention des piqûres et les approches générales de lutte antivectorielle (75).

3.12. Paludisme :

Le paludisme est une maladie potentiellement mortelle transmise à l'homme par la piqûre de moustique femelle du genre *Anopheles*. L'infection est causée par un parasite du genre *Plasmodium* dont il existe 5 espèces (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* ; *Plasmodium vivax* ; *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi*) (76).

Selon l'OMS, en 2022 on estime à 249 millions le nombre de cas paludisme et à 608000 le nombre de décès dus au paludisme dans 85 pays. La région africaine est la plus touchée avec 94 % des cas de paludisme (233millions) et 95% des décès dus à la maladie ont été enregistré dans cette région. Les enfants de moins 5 ans représentaient 80 % des décès dans cette région(76).

La réponse immunitaire au cours du paludisme met d'abord en œuvre la réponse immunitaire naturelle qui est suivi de la réponse immunitaire adaptative avec la production par les lymphocytes B d'immunoglobuline de type M (IgM) anti-plasmodium ; cette production peut entraîner des cas de réactivité croisée au cours de la détection par technique ELISA d'IgM dirigé contre des virus notamment ZIKV. Ainsi cette réactivité peut entraîner des résultats faussement positifs(15).

4. MATÉRIELS ET MÉTHODES :

4.1. Cadre de l'étude :

Notre étude s'inscrit dans le cadre d'une initiative entreprise au sein du laboratoire ImmunoCore de l'UCRC sur l'évaluation de l'impact de l'infection palustre sur les différents tests ELISA utilisés pour le diagnostic des pathogènes émergents comme le SRAS-CoV-2, le ZIKV, le virus Ebola ...

4.2. Site de l'étude :

Les échantillons et les données cliniques ont été collectés dans les villages de Dangassa et de Niono.

Les Analyses biologiques ont été effectués au sein du laboratoire ImmunoCore et du laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génomique de l'UCRC.

Le Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) est une initiative entre le Ministère chargé de la Santé ; le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique à travers l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) du Mali ; et l'Institut National des Allergies et de Maladies Infectieuses des Etats-Unis (NIAID). Cette collaboration a pour but d'améliorer les ressources nécessaires pour faciliter la recherche. Il fournit des capacités de recherche de base et du personnel à la recherche scientifique, à la régulation, à la gestion des données, à la pharmacie pour la recherche clinique et au diagnostic (avec un laboratoire d'Immunologie « ImmunoCore », un laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génomique, un laboratoire Clinique, et un laboratoire de niveau de biosécurité 3 (BSL-3) pour le diagnostic de la tuberculose et des fièvres hémorragiques. Notre étude s'est déroulée plus précisément au sein du laboratoire ImmunoCore de l'UCRC où les échantillons ont été testé par ELISA et au sein du laboratoire de Biologie Moléculaire et Génomique où le test Trioplex rRT-PCR a été réalisé.

Les sites de collecte des échantillons et des données cliniques étaient le village de Dangassa et Niono.

Dangassa est un village situé à 82 km au sud-ouest de Bamako sur la route nationale 7 (RN7), dans la commune rurale de Niagadina, dans le district sanitaire de Ouelessebougou, région de Koulikoro, c'est une zone de forte endémicité palustre où plusieurs études sur le paludisme ont été menés.

Niono est une ville et une commune du Mali, chef-lieu du cercle de Niono dans la région de Ségou, elle est située à 343 km de Bamako et comme Dangassa c'est une zone d'endémie palustre.

4.3. Type et période de l'étude :

Il s'agissait d'une étude transversale ayant pour objectif d'étudier l'effet de l'infection palustre sur les résultats de deux tests de diagnostic sérologique du virus Zika au Mali en utilisant des échantillons de plasma provenant d'un protocole de recherche sur le paludisme. L'étude s'est déroulée sur une période de six mois entre Janvier 2023 et Juin 2023 sur des échantillons collectés de 2013 à 2021 à Niono et Dangassa, deux zones d'endémie palustre.

4.4. Echantillonnage :

Au total 100 échantillons de plasma ont été analysés au cours de cette étude. Ces échantillons proviennent d'un protocole de recherche sur le paludisme au Mali. La sélection des échantillons a été faite au hasard et le nombre 100 a été choisi sur la base d'une étude réalisée au sein du laboratoire ImmunoCore sur l'évaluation clinique des tests sérologiques commerciaux du SRAS-CoV-2 dans un contexte d'endémie palustre (77)

Ainsi les 100 échantillons ont été classés en deux groupes :

- Groupe 1 : 50 échantillons sans infection palustre (groupe des contrôles)
- Groupe 2 : 50 échantillons avec infection palustre (groupe des cas)

4.4.1. Critères d'inclusion

Nous avons inclus dans notre étude tous les échantillons des participants répondant aux critères suivants :

- Echantillons de plasma archivés qui ont été collectés chez des participants avec une infection palustre dont les données socio-démographiques et cliniques étaient disponibles,
- Echantillons de plasma archivés qui ont été collectés chez des participants ne présentant pas une infection palustre dont les données socio-démographiques et cliniques étaient disponibles.

4.4.2. Critères de non-inclusion

Les échantillons des participants ne répondant pas aux critères d'inclusion cités ci-dessus n'ont pas été inclus dans notre étude.

4.5. Variables analysées :

Les variables incluses dans l'analyse sont les suivantes :

- Variables sociodémographiques : l'âge et le sexe
- Variables biologiques : la séropositivité à l'IgM anti-ZIKV, la parasitémie du *Plasmodium* et le taux d'hémoglobine.
- Variables cliniques : la fièvre et la sévérité de l'infection palustre.

4.5.1. Quelques définitions opérationnelles

Taux d'hémoglobine : C'est le paramètre qui permet d'évaluer la présence ou l'absence de l'anémie. Ainsi une baisse de la concentration d'hémoglobine fonctionnelle en dessous des valeurs normales indique une anémie. Selon l'OMS

- 12 g/dl chez la femme
- 13g/dl chez l'homme
- 14g/dl chez le nouveau-né
- 11g/dl chez la femme enceinte
- 11,5g/dl chez l'enfant de plus de 2 ans

Paludisme simple : Cas positif par un test de diagnostic rapide (TDR) ou une goutte épaisse sans signe de gravité.

Paludisme grave : Selon les critères de l'OMS, il s'agit d'un accès palustre confirmé associé à au moins un signe de danger (convulsions, détresse respiratoire, perte de conscience...).

Parasitémie : Nombre de trophozoïtes du *Plasmodium* dans le sang observé par microscopie sur une goutte épaisse.

Nous avons regroupé nos participants en 3 catégories :

- Les participant avec une parasitémie : < 1000 Trophozoïtes/ μ l
- Les participant avec une parasitémie : comprise entre 1000 et 10000 Trophozoïtes/ μ l
- Les participant avec une parasitémie : > 10000 Trophozoïtes/ μ l.

4.6. Méthode de laboratoire :

4.6.1. Test ELISA pour le diagnostic du virus ZIKA :

Tableau III : Caractéristiques des Kits ELISA utilisés

1. Nom	Abcam's anti-Zika virus IgM μ-Capture in vitro ELISA	CDC Zika MAC ELISA
2. Fabricant	Abcam	CDC
3. Principe du test	Détermination qualitative des anticorps IgM	Détection qualitative des anticorps IgM
4. Format du test	96 puits	96 puits
5. Antigène cible	NS1	E
6. Isotype d'anticorps	IgM	IgM
7. Dilution de l'échantillon	1 :100	1 :400
8. Instrument	Spectrophotomètre (450/620nm)	Spectrophotomètre (450/620nm)
9. Mode de lecture	Densité optique [■]	Densité optique [■]
10. Durée du test	2 heures 30 minutes	72 heures
11. Interprétation résultat	Positif : >11 ⁺ Négatif : <9 Equivoque : 9-11	Positif : P/N ≥ 3 ⁺⁺ Négatif : P/N < 2 Equivoque : 2 ≤ P/N < 3
12. Sensibilité*	100%	N/A
13. Spécificité*	98,3%	N/A
14. Performance clinique (Comparaison avec le test de référence) **	Pourcentage d'agrément Positif : 98,3%	Pourcentage d'agrément Positif : 97,8% (95 % IC : 88,7% -99,6%) Pourcentage d'agrément Négatif : 45,5% (95% IC : 36,0% - 55,3 %)

* Sensibilité et spécificité déterminées par les fabricants des kits

** Test de neutralisation par réduction de plaque (PRNT) est le test de référence pour les deux kits

+ les valeurs ont été obtenues à partir du calcul suivant

DO moyenne (échantillon) X 10 / Contrôle de seuil = [Abcam Unit : AU]

++ les valeurs ont été obtenues à partir du rapport de la densité optique moyenne (DO) de l'échantillon de patient (P) divisée par la DO moyenne du contrôle négatif (N), chacun ayant réagi avec l'antigène ZIKV.

■ La Densité optique pour le Kit Abcam est mesurée entre 450 et 620 nm.

▣ La Densité optique pour le Kit Abcam est mesurée à 450 nm.

4.5.1.1. CDC Zika MAC-ELISA

Le dosage immuno-enzymatique de capture d'anticorps IgM (MAC-ELISA) offre une alternative utile à l'immunofluorescence pour la documentation d'une réponse sérologique. Elle semble être la méthode de choix pour de nombreux dosages spécifiques et sensibles des anticorps IgM contre les maladies infectieuses. MAC-ELISA a été développé au niveau du Centers of Disease Control and Prevention (CDC) des USA. Cette approche donne généralement une amélioration significative de la spécificité d'un test ELISA. Dans le test MAC-ELISA, un support en phase solide tel qu'une plaque de microtitration est recouverte d'anticorps IgM anti-humains (l'anticorps de capture) qui peuvent se lier aux anticorps de type IgM présents dans l'échantillon. Une fois la liaison effectuée, un anticorps spécifique de l'antigène marqué par une enzyme est ajouté. Si des anticorps IgM spécifiques de l'antigène en question sont présents, un complexe est alors produit entraînant un changement de couleur enzymatique proportionnel à la concentration d'anticorps spécifiques IgM présents (78).

4.6.1.1.1. Principe

Le CDC Zika MAC-ELISA est une méthode de détection qualitative des anticorps IgM du virus Zika dans le sérum humain ou le liquide céphalo-rachidien (LCR) (78). Dans le Zika MAC-ELISA, l'anti-IgM (l'anticorps de capture) est enduit sur des plaques de micropuits. Ensuite, le sérum du patient est ajouté séquentiellement aux puits, suivi d'un antigène viral non infectieux connu. La présence d'antigène est détectée en utilisant un anticorps antiviral conjugué à une enzyme. Un résultat colorimétrique est généré par l'interaction de l'enzyme et d'un substrat chromogénique. Ce changement colorimétrique est détecté par un spectrophotomètre ou un lecteur ELISA (61).

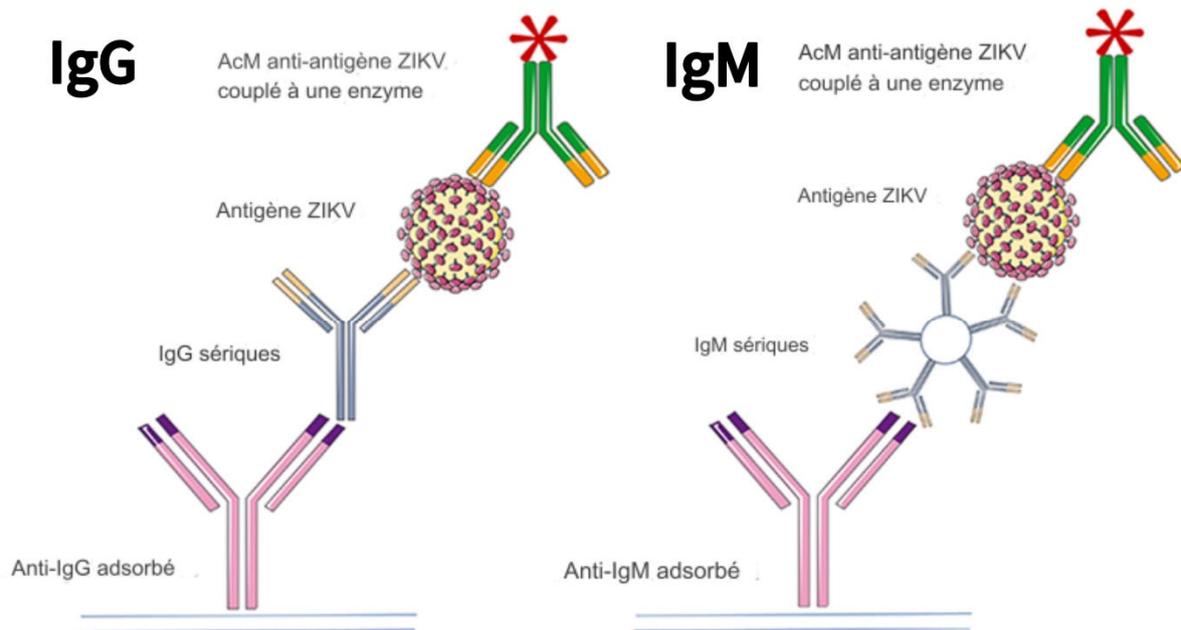


Figure 10: Représentation schématique de la méthode sérologique de capture d'anticorps pour la détection d'anticorps IgG et IgM (61).

4.6.1.1.2. Equipement, matériel et réactifs pour les tests ELISA :

- **Equipement :**
 - SpectraMax Plus 384, spectrophotomètre utilisé pour la lecture des microplaques
 - Microplates washer Biotek TS 450 (laveur de microplaques)
 - Incubateurs de 37°C
- **Matériels/Réactifs**
 - Kit CDC Zika MAC ELISA
 - Kit Abcam's anti-Zika virus IgM μ -Capture in vitro ELISA
 - Hotte à flux laminaire
 - Micropipettes monocanales ou multicanaux
 - Vortexeur
 - Eau distillée
 - Minuteur
 - Réservoirs de réactifs
 - Logiciel d'acquisition et d'analyse des données (SoftMax Pro 3.0)
 - Microsoft Pack Office 2019

- Flacons pour le mélange des réactifs
- Tubes Eppendorf 1,5ml
- Papier absorbant
- Balance électronique

4.6.1.1.3. Procédure pour le test CDC Zika virus

La procédure a été faite selon les recommandations du fabricant. Les détails de la procédure sont décrits dans l'Annexe 1. Pour qu'un test soit valide, le rapport P/N doit être $\geq 2,0$. Il s'agit du P/N du contrôle positif, où P est la densité optique (DO) moyenne des contrôles positifs ayant réagi avec l'antigène ZIKV et N est la DO moyenne du sérum de contrôle négatif ayant réagi avec l'antigène ZIKV.

Les résultats ont été déterminés sur la base du rapport P/N, où P est la DO moyenne de l'échantillon de test ayant réagi avec l'antigène ZIKV et N la DO moyenne du contrôle négatif ayant réagi avec l'antigène ZIKV.

Tableau IV : Interprétation des résultats

P/N de l'échantillon	Résultat
< 2	Négatif
$2 \leq P/N < 3$	Équivoque
≥ 3	Présumé Positif

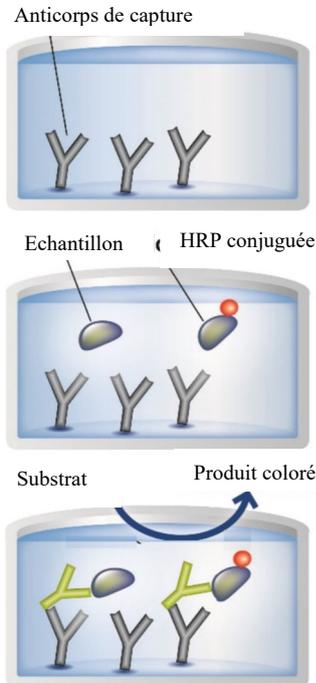
4.6.1.2. Abcam anti-Zika virus IgM μ -capture ELISA kit

Le kit ELISA anti-Zika virus IgM μ -capture in vitro d'Abcam est conçu pour la détermination qualitative des anticorps IgM contre le virus Zika dans le sérum ou le plasma humain (citrate, héparine).

4.6.1.2.1. Principe du test :

La détermination immuno-enzymatique qualitative des anticorps spécifiques de classe IgM est basée sur la technique de μ -capture ELISA. Des microplaques sont recouvertes d'anticorps anti-humains de classe IgM pour lier les anticorps correspondants de l'échantillon. Après avoir lavé les puits pour éliminer tout le matériel d'échantillon non lié, un antigène du virus Zika marqué à la peroxydase de raifort (HRP) est ajouté. Cet antigène conjugué se lie aux anticorps IgM spécifiques capturés. Dans une deuxième étape de lavage, le conjugué non lié est éliminé. Le complexe immunitaire formé par le conjugué lié est visualisé en ajoutant un substrat de

tetramethylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est proportionnelle à la quantité d'anticorps IgM spécifiques dans l'échantillon. L'absorbance à 450/620nm est lue à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA à micropuits.



Préparer tous les réactifs, échantillons, contrôles et étalons selon les instructions.

Ajouter les échantillons, des contrôles et étalons aux puits utilisés.

Ajouter Horseradish Peroxydase Conjugué à chaque puits. Incuber à 37°C.

Après le lavage, ajouter la solution de substrat Tetramethylbenzidine à chaque puits. Incuber à température ambiante. Ajoutez la Solution d'arrêt à chaque puits. Lire immédiatement.

Figure 11: Résumé de la procédure

4.6.1.2.2. Procédure du test Abcam anti-Zika virus IgM μ -capture ELISA kit

Elle a été réalisée selon les recommandations du fabricant (voir Annexe 2).



Figure 12: Spectrophotomètre (SpectraMax Plus 384) utilisé pour cette étude.

Les critères de validation de la plaque sont :

Tableau V: Critères de validation d'un test

Contrôle	Critères
Substrat blanc	DO < 0,100
Contrôle négatif	DO < DO Cut-off
Contrôle de seuil	DO comprise entre 0,150 et 1,300
Contrôle positif	DO > DO Cut-off

Si ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valable et doit être répété.

Les résultats sont exprimés en Unités Abcam [AU]

DO moyenne de l'échantillon X 10 / Contrôle de Seuil = [Abcam Unit : AU]

Tableau VI: Interprétation du résultat

Résultat	Valeur
Contrôle de Seuil	10 AU
Positif	> 11 AU
Equivoque	9 – 11 AU
Négatif	< 9 AU

4.6.2. Test moléculaire : La RT-PCR

La PCR est une technique de Biologie Moléculaire qui consiste à amplifier une petite quantité d'un fragment d'ADN afin d'obtenir de grandes quantités de la même molécule d'ADN. Elle consiste en une succession de cycles de températures comprenant chacun une étape de dénaturation de l'ADN, une étape d'hybridation des amorces spécifiques de la séquence à amplifier, et une étape d'élongation de l'ADN par une ADN polymérase.

La RT-PCR est une technique adaptée de la PCR qui permet d'obtenir des concentrations élevées d'ADN à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétro-transcrit grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR classique. Son principe est similaire à celui de la PCR classique, excepté qu'elle nécessite l'utilisation de colorants ou de

sondes fluorescentes spécialisées (Taqman®) qui permettent la surveillance et la mesure continue du processus d'amplification au fur et à mesure qu'il se produit, fournissant ainsi des données quantitatives en temps réel sur la quantité d'acide nucléique cible présente dans l'échantillon. Pour cette thèse nous avons utilisé le test Trioplex rRT-PCR comme méthode moléculaire de diagnostic du ZIKV. Le r en minuscule signifie « real time » ou en temps réel en français.

Au cours de cette thèse le test par RT-PCR n'a été réalisé que sur les échantillons testés positif ou indéterminés par les deux Kits ELISA et dont le volume était suffisant pour la réalisation du test. Au total 21 échantillons ont été testés par Trioplex rRT-PCR

4.6.2.1.1. Equipement, matériel et réactifs

- **Equipement**

- AB 7500 Real-Time PCR System
- Mini centrifugeuse

- **Matériel/réactif**

- Kit QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit (250)
- Kit CDC Trioplex Real-time RT-PCR Assay
- Microplaques 96 puits
- Hotte à flux laminaire
- Micropipettes
- Vortexeur

4.6.2.1.2. Extraction de l'ARN viral avec le kit QIAGEN QIAmp® Viral RNA Mini KIT

Extraction de l'ARN viral a été effectuée avec le Kit QIAGEN selon les recommandations du fabricant (**Annexe 3**). Il consistait à lyser les cellules dans des conditions hautement dénaturantes et à une température élevée pour inactiver les RNases et assurer l'isolement de l'ARN viral intact. Cette étape de lyse est effectuée en présence du tampon de lyse (AL) et de la protéase QIAGEN (QP). Les conditions de mise en mémoire tampon sont alors ajustées pour fournir une liaison optimale de l'ARN à la membrane QIAamp et à l'échantillon qui est chargé sur la colonne de rotation QIAamp Mini. L'ARN se lie à la membrane, et les contaminants sont éliminés efficacement en deux (2) étapes à l'aide de deux (2) tampons de lavage différents (AW1 et AW2). L'ARN de haute qualité est élué dans un tampon spécial sans RNase, prêt à être utilisé directement et en toute sécurité.

4.6.2.1.3. Test Trioplex RT-PCR

Le Trioplex Real-time RT-PCR est un test qui permet de détecter, et de différencier qualitativement l'ARN des virus de la dengue, du chikungunya et du Zika dans le sérum, le sang total sur EDTA et le liquide céphalo-rachidien. Il peut également détecter l'ARN du virus Zika dans l'urine et le liquide amniotique.

4.6.2.1.3.1. Principe du dosage :

Le Trioplex rRT-PCR est un test qui comprend des amorces et des sondes d'hydrolyse à double marquage (Taqman®). Le test utilise une étape de transcription inverse produisant de l'ADNc à partir de l'ARN présent dans l'échantillon. La sonde se lie à l'ADN cible entre les deux amorces PCR non marquées. Il existe des sondes spécifiques au virus pour les trois virus (dengue, chikungunya, et Zika virus. Pour la sonde spécifique au virus de la dengue, le signal du colorant fluorescent (FAM : 6-carboxyfluorescéine) à l'extrémité 5' est désactivé par BHQ-1 (Black Hole Quenche : qui est un extincteur noir) à son extrémité 3'. Pour la sonde spécifique au virus du chikungunya, le signal du colorant fluorescent (HEX : Hexachlorofluorescéine) à l'extrémité 5' est désactivé par BHQ-1 (Black Hole Quenche - 1) à son extrémité 3'. Pour la sonde spécifique au virus Zika, le signal du colorant fluorescent (CAL Fluor Red 610) à l'extrémité 5' est désactivé par BHQ-2 à son extrémité 3'. Pendant le processus d'extension PCR, la polymérase Taq étend les amorces non marquées en utilisant le brin matrice comme guide, et lorsqu'elle atteint la sonde, elle clive la sonde en séparant le colorant de l'extincteur, ce qui lui permet de devenir fluorescent. L'instrument de PCR en temps réel détecte cette fluorescence à partir du colorant non désactivé. A chaque cycle de PCR, il y a une augmentation de la fluorescence qui est proportionnelle à la quantité d'acide nucléique cible présente.

4.6.2.1.3.2. Procédure du test Trioplex Real-time RT-PCR

La procédure a été faite selon les directives du CDC qui sont décrites dans l'**Annexe 3**.

- **Interprétation du test Trioplex**

Les courbes d'amplification sont évaluées individuellement pour chaque virus cible et la ligne de seuil est placée au-dessus du signal de fond manifeste dans la phase initiale de la phase exponentielle de la courbe. La position de la ligne seuil est placée individuellement pour chaque virus cible et le point (cycle) dans lequel la courbe d'amplification coupe la ligne de seuil est appelé la valeur Ct (Seuil de cycle). Bien que les courbes d'amplification avec des valeurs Ct > 38 puissent représenter une véritable détection d'ARN spécifique au virus, ces valeurs élevées sont reproductibles à moins de 95% ou peuvent représenter des courbes d'amplification

erratiques et sont donc considérées comme négatives. Les données du test Trioplex sont interprétées comme suit :

Tableau VII : Interprétation du test Trioplex

Ct du virus et contrôle RP	Interprétation
Ct du virus cible < 38 et Ct de la réaction RP < 38	Positif
Ct du virus cible \geq 38 et Ct de la réaction RP < 38	Négatif
Ct du virus cible < 38 et Ct de la réaction RP \geq 38	Positif
Ct du virus cible \geq 38 et Ct de la réaction RP \geq 38	Invalide

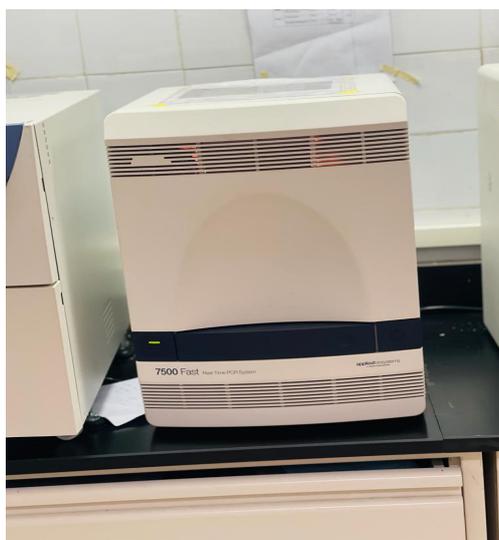


Figure 13: AB 7500 utilisé pour RT-PCR

4.6.3. Technique de diagnostic du paludisme :

Le diagnostic du paludisme a été fait par la technique de la goutte épaisse/frottis mince. C'est une technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites dans le sang (goutte épaisse) et l'identification des différentes espèces (frottis sanguin). Une goutte de sang d'environ 1 centimètre de diamètre est déposée sur une lame de verre. Après séchage, la goutte colorée au Giemsa, est examinée au microscope à l'objectif 100 à l'huile d'immersion.

Cette technique est décrite dans l'**Annexe 4**.

4.7. Gestion et analyse des données :

Les paramètres sociodémographiques et cliniques étaient enregistrés dans un fichier Excel par double saisie. De même, les données ELISA étaient exportées du logiciel SoftmaxPro (version 3.0) vers un fichier Excel. Ensuite, ces données étaient copiées sur GraphPad Prism (version 9.3) pour générer des figures et faire des analyses statistiques. Une analyse descriptive était faite pour déterminer les caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude et la

séropositivité des anticorps IgM anti-ZIKV. Une analyse analytique a été faite pour déterminer les relations entre l'âge, la parasitémie et la séropositivité. Les résultats ont été présentés sous forme de tableaux et de figures. Le test de Khi2 a été utilisé sur le site web OpenEpi (version 3.01) pour comparer les proportions de séropositivités fournies par le kit Abcam, et la corrélation de Spearman pour déterminer la relation entre la DO, la parasitémie et l'âge. Une valeur de $p < 0.05$ était considérée statistiquement significative.

4.8. Considérations éthiques :

Les données et les échantillons traités au cours de cette thèse ont été obtenus à partir de protocole de recherche clinique approuvé par le comité d'éthique de l'USTTB (N°09–39/FMOS ; N°2016/144/ CE/FMOS). Nous avons pris soin de respecter les bonnes pratiques cliniques (GCP) et de laboratoires (GLP) au niveau de toutes les procédures de laboratoires. Et des références bibliographiques sont également ajoutés au document.

5. RESULTATS :

5.1. Résultats globaux :

Globalement, les résultats de cette étude peuvent être résumés comme suit :

- L'âge médian était de 11 ans avec des extrêmes de 2 et 58 ans.
- Le sexe masculin était majoritaire avec un sex-ratio (H/F) de 1,86.
- La parasitémie médiane était de 13 925 trophozoïtes/ μ L avec des extrêmes de 1200 et 42600 trophozoïtes/ μ L dans le groupe des cas.
- La séroprévalence IgM globale était de 22% pour le Kit ELISA Abcam IgM contre 1% pour le Kit ELISA CDC MAC-ELISA.
- Pour le groupe contrôle (groupe 1), nous avons observé une séroprévalence de 12% pour le Kit Abcam IgM contre 0% pour le Kit CDC MAC-ELISA.
- La séroprévalence chez les sujets avec infection palustre (groupe 2) était de 32% pour le Kit Abcam IgM contre 1% pour le Kit CDC MAC-ELISA.
- Nous n'avons pas observé de corrélation entre la DO moyenne obtenue avec les deux kits et la parasitémie.
- De même nous n'avons pas observé de corrélation entre la DO moyenne obtenue avec les deux kits et l'âge des participants.

5.2. Résultats analytiques :

Tableau VIII: Caractéristiques socio-démographiques et biologiques des participants de l'étude

Caractéristiques	Groupe 1	Groupe 2	Total
	(Contrôle) Nombre (%)	(Paludisme) Nombre (%)	Nombre
Age (ans)			
< 15	46 (92)	32 (64)	78
≥ 15	4 (8)	18 (36)	22
Sexe			
Masculin	34 (68)	31 (62)	65
Féminin	16 (32)	19 (38)	35
Taux d'hémoglobine (g/dL)			
< 12	38 (76)	35 (70)	73
≥ 12	12 (24)	15 (30)	27
Parasitémie (Trophozoïtes/μl)			
< 1000	-	0 (0)	0
1000-10000	-	18 (36)	18
> 10000	-	32 (64)	32
Gravité du Paludisme			
Simple	-	46 (92)	46
Grave	-	4 (8)	4

- Les participants âgés de moins de 15 ans étaient majoritaires dans les deux groupes, l'âge médian était de 11 ans avec des extrêmes allant de 2 à 58 ans. Par groupe d'étude, l'âge médian était de 10 ans (Groupe 1) et 13 ans (Groupe 2).
- Le sexe masculin était majoritaire par rapport au sexe féminin avec un sexe ratio de 1,86 en faveur du sexe masculin.
- La majorité des participants avaient un taux d'hémoglobine basse (<12 g/dL), spécifiquement 70% des cas de paludisme clinique et 76% des contrôles.
- Dans le groupe atteint de paludisme, les participants avec une parasitémie supérieure à 10000 trophozoïtes/μl étaient les plus représentés avec 64% des cas. La parasitémie médiane était de 13 925 trophozoïtes/μL avec des extrêmes de 1200 et 42600 trophozoïtes/μL dans le groupe des cas
- Après catégorisation des participants du groupe atteint de paludisme en fonction de la forme clinique (paludisme simple, modéré, et sévère), nous avons observé que 8% souffraient de paludisme grave.

Tableau IX: Validité des plaques

	Abcam anti-Zika IgM μ -capture				CDC MAC-ELISA	
	Blanc	Négatif	Cut-off	Positif	P/N \geq 2	P/N < 2
	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)	Nbre (%)
Plaques Validées	5 (83,3)	6 (100)	6 (100)	6 (100)	14 (93,3)	0 (0)
Plaques non validées	1 (16,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6,7)
Total de plaques validées		5 (83,3)			14 (93,3)	
Total de plaques		6 (100)			15(100)	

Nous pouvons observer que pour Abcam, au total six plaques ont été nécessaires pour les 100 échantillons et parmi ces plaques seulement une plaque n'était pas valide à cause du contrôle du blanc de plaque. Et pour le kit CDC, quatorze plaques ont été nécessaires pour les 100 échantillons et parmi ces plaques, seulement une plaque n'a pas rempli les critères de validation à cause du contrôle positif.

Les échantillons des plaques non validées ont été retester sur de nouvelles plaques.

Il est important de noter que seules les données des plaques validées ont été utilisées.

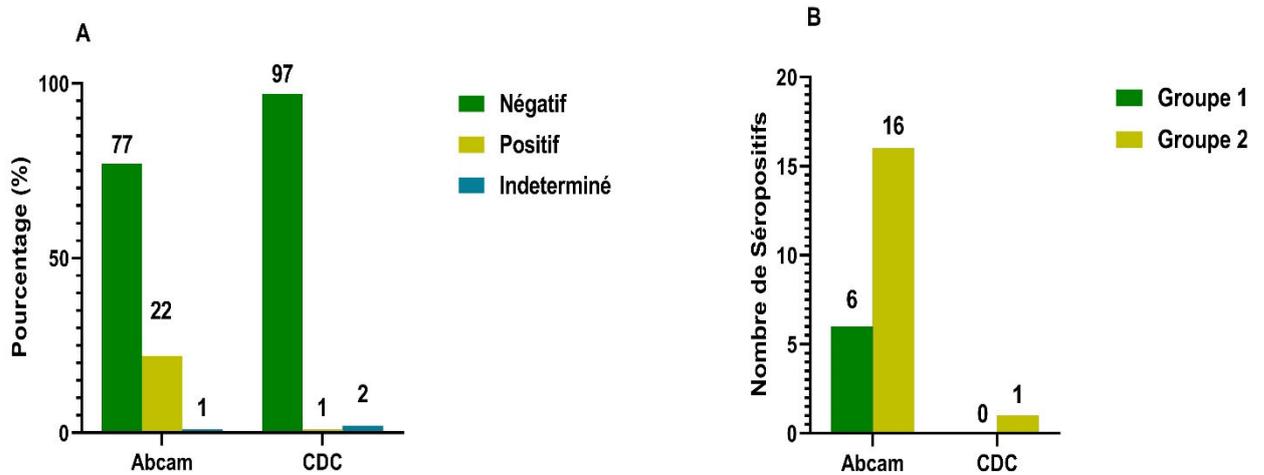


Figure 14: (A) Séropositivité IgM anti-ZIKV des échantillons par kit de sérologie. (B) Séropositivité IgM anti-ZIKV des échantillons par kit de sérologie et selon le statut palustre.

Parmi les 100 échantillons, nous avons observé un taux de séropositivité globale de 23% soit 22% obtenu à partir du kit Abcam contre seulement 1% obtenu à partir du kit CDC (**Fig. 14A**). Sur les 22 échantillons testés positifs par Abcam, nous avons identifié 16 cas positifs dans le groupe avec infection palustre (Groupe 2) (**Fig.14B**). Il en était de même pour le seul échantillon identifié comme positif avec le kit CDC (**Fig. 14B**).

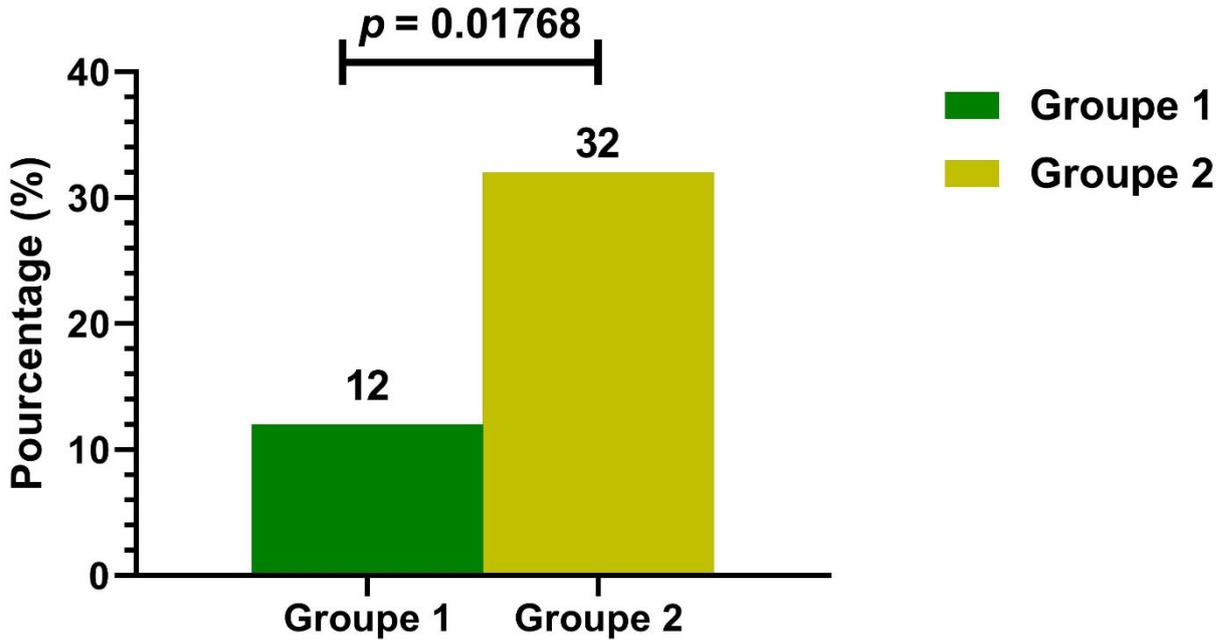


Figure 15: Séropositivité IgM anti-ZIKV obtenue à partir du kit Abcam en fonction des groupes d'étude.

Pour rappel : le Groupe 1 regroupe les échantillons sans infection palustre et le Groupe 2 regroupe les échantillons avec infection palustre. L'analyse de cette figure montre que parmi les cas de paludisme, 16 échantillons sur 50 testés (32%) étaient séropositifs contre 6 échantillons sur 50 (12%) parmi les contrôles. Cette différence de séropositivité entre les deux groupes était statistiquement significative ($p=0,01768$).

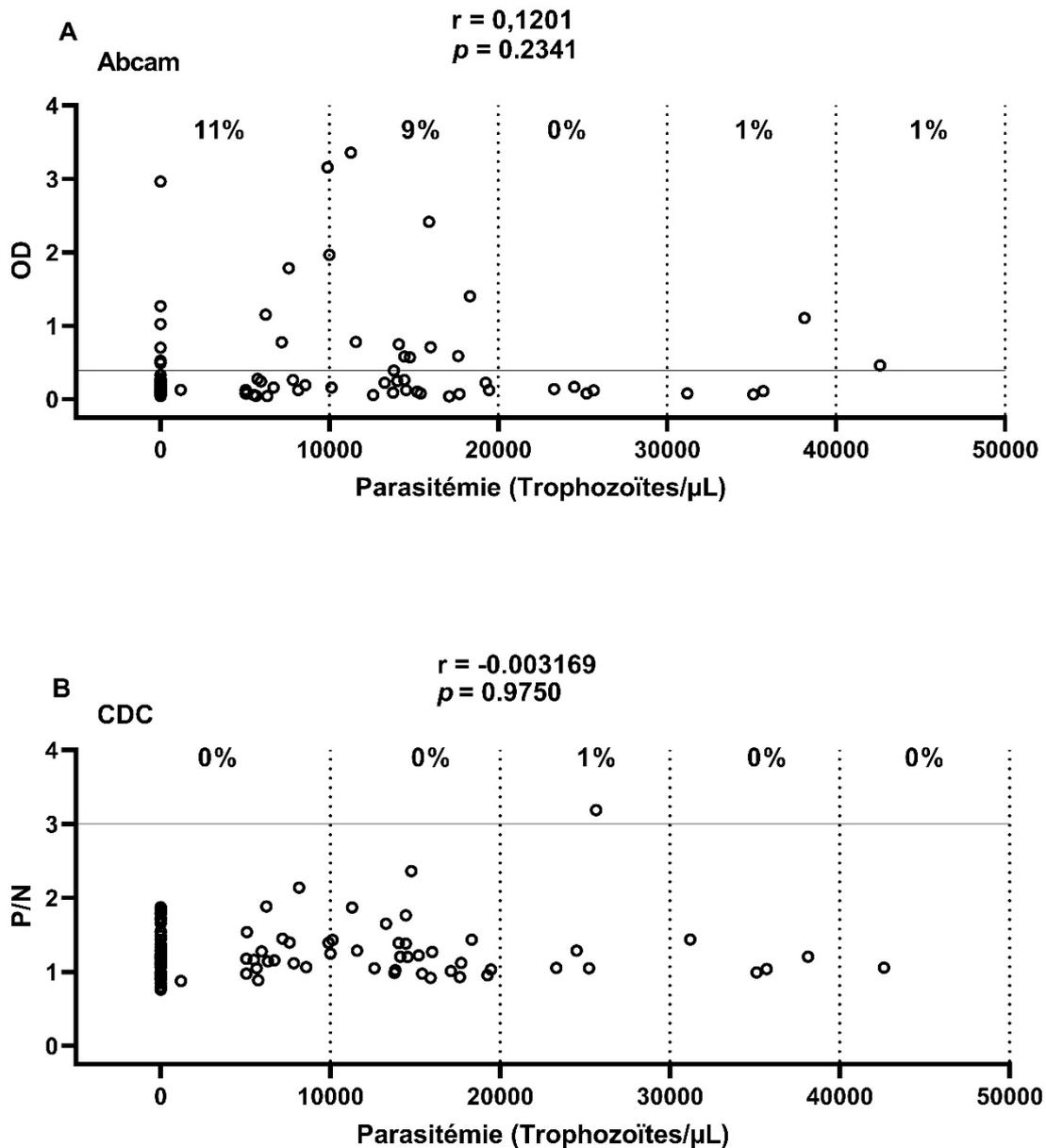


Figure 16: Distribution de la densité optique obtenue à partir des deux kits ELISA en fonction de la parasitémie.

Nous avons examiné le lien entre la parasitémie et les densités optiques des échantillons testés positifs avec les deux tests sur l'ensemble des échantillons. Chaque point indique un échantillon donné analysé par les kits Abcam et CDC MAC-ELISA. Nous avons représenté la parasitémie sur l'axe des abscisses en fonction de la DO moyenne de l'échantillon sur l'axe des ordonnées. La ligne horizontale indique la ligne de positivité au-dessus de laquelle nous avons des échantillons positifs et les lignes verticales en pointillé indiquent les catégories de parasitémie. Les valeurs en pourcentage dans chaque catégorie représentent la proportion d'échantillons

positifs détectés dans chaque catégorie de parasitémie. La proportion des résultats positifs semble diminuée en fonction de l'augmentation de la parasitémie pour le kit Abcam (**Fig.16A**). En revanche pour le kit CDC, nous avons observé que le seul échantillon positif se situe entre 20000 et 30000 Trophozoïtes/ μ L (**Fig.16B**). Globalement, une corrélation significative n'a pas été trouvée entre la densité optique des deux tests évalués et la parasitémie.

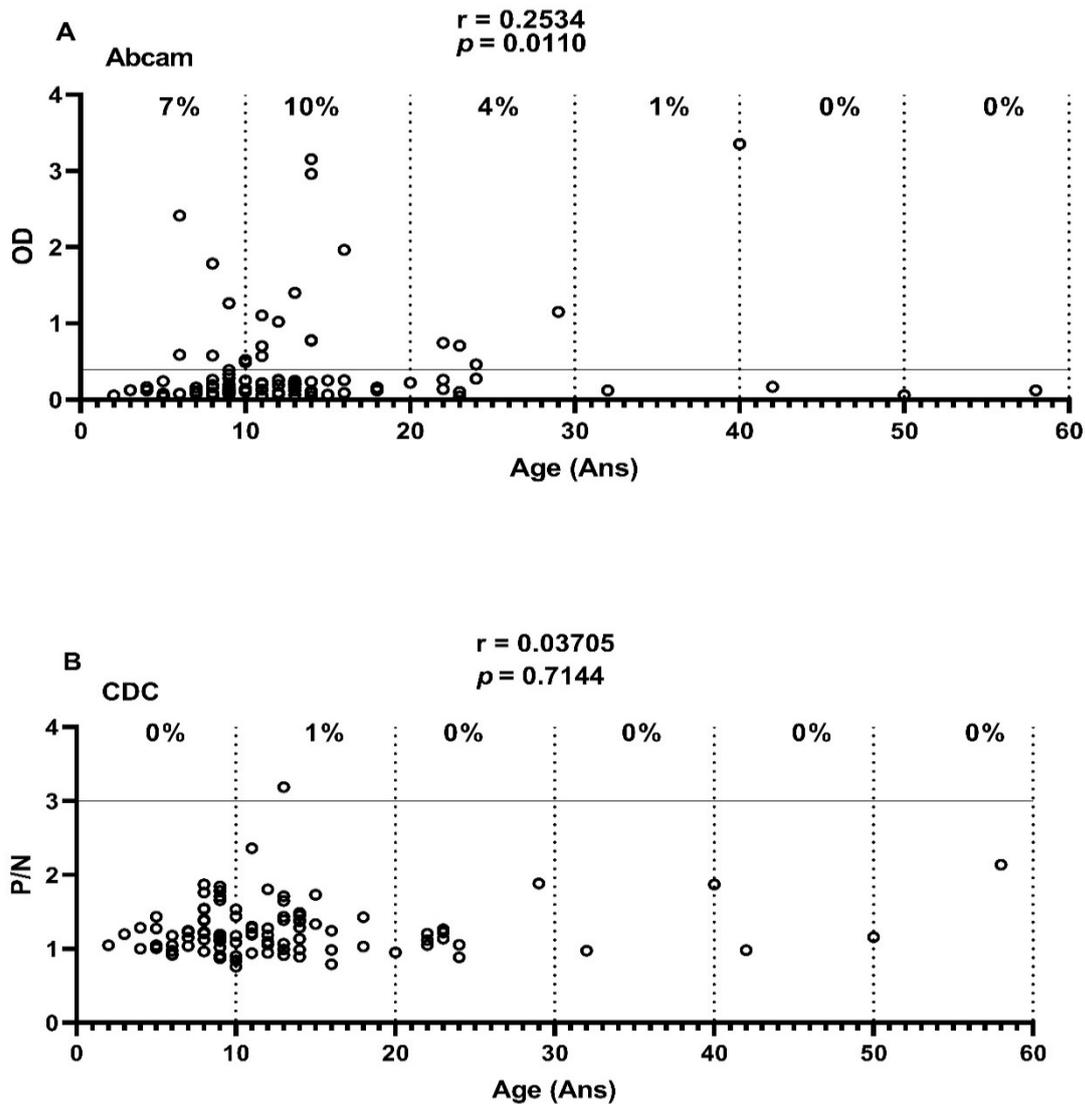


Figure 17: Distribution de la densité optique obtenue à partir des deux kits ELISA en fonction de l'âge des participants.

Comme pour la figure précédente, nous avons examiné le lien entre les groupes d'âge en fonction des densités optiques des échantillons testés positifs avec le kit Abcam (**Fig.17A**) et le kit CDC (**Fig.17B**) sur l'ensemble des échantillons. La ligne horizontale indique la ligne de positivité au-dessus de laquelle nous avons des échantillons positifs et les lignes verticales en pointillé indiquent les catégories d'âge. Les valeurs en pourcentage dans chaque catégorie représentent la proportion d'échantillons positifs détectés dans chaque catégorie d'âge. Pour le kit Abcam, des proportions de résultats positifs ont été observées entre différentes catégories d'âge, cependant la proportion du seul échantillon positif pour le kit CDC se situait entre 10 et 20 ans.

Tableau X: Test Trioplex rRT-PCR des échantillons positifs et équivoques à L'ELISA

Test ELISA	RT-PCR Négative	RT-PCR Positive
	Nbre (%)	Nbre (%)
Abcam	20 (100)	0 (0)
CDC	1 (100)	0 (0)

Au total 21 échantillons (qui avaient un volume suffisant) ont été testé avec le test trioplex rRT-PCR. Ces échantillons étaient repartis comme suit : 19 positifs et 1 indéterminé obtenus à partir du kit Abcam ; 1 positif obtenu à partir du kit CDC.

Aucun des échantillons positifs ou indéterminés avec les deux kits sérologiques n'ont été testé positifs avec le test Trioplex rRT-PCR.

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION :

Dans le cadre de cette étude, nous avons comparé les résultats de deux tests de diagnostic sérologique du virus Zika sur des échantillons répartis en deux groupes. A savoir un groupe sans infection palustre ou groupe de contrôle (50 échantillons) et un groupe avec infection palustre (50 échantillons). Nos résultats ont révélé une séroprévalence globale des anticorps IgM de 22% pour le Kit ELISA Abcam IgM contre 1% pour le Kit CDC MAC-ELISA. La séroprévalence des anticorps IgM obtenue par le kit Abcam et le Kit CDC était respectivement de 32% et 1% chez les cas de paludisme. Pour le groupe contrôle, nous avons observé respectivement une séroprévalence de 12% et 0% obtenue à partir du Kit Abcam et du kit CDC. Nous avons trouvé une association notable entre la séropositivité obtenue à partir du kit Abcam et la présence du paludisme. Cependant, une corrélation significative n'a pas été détectée entre la densité optique obtenue à partir du kit Abcam et la parasitémie ou l'âge.

Dans notre étude, parmi les 100 participants, le sexe masculin (65/100) était majoritaire par rapport au sexe féminin (35/100). Otu et al avaient au contraire rapporté que, sur 100 participants, le sexe féminin (65/100) était majoritaire par rapport au sexe masculin (34/100) au cours de leur étude sur la prévalence du ZIKV et du paludisme chez les patients fébriles dans les établissements de soins secondaires au Nigeria en 2020 (79). De même Ankrah et al avaient également observé, sur 160 participants, une prédominance du sexe féminin (119/160) par rapport au sexe masculin (41/160) et ils ont également rapporté la détection d'IgM anti-ZIKV chez 36,7 % (11/30) des hommes contre chez 63,3 % (19/30) des femmes au cours de leur étude sur le ZIKV chez des patients fébriles au Ghana en 2019 et ils ont émis l'hypothèse ce taux élevé chez les femmes pourrait être dus à la différence d'exposition, l'activité des femmes pendant les premières heures de la journée expose une plus grande proportion de femmes aux *Aedes spp.* porteurs du ZIKV(80).

La différence du taux de séropositivité observée entre les deux kits dans notre étude pourrait s'expliquer d'une part par l'antigène utilisé pour la détection des anticorps IgM dans les échantillons comme indiqué dans le **Tableau III**. D'autre part à une possibilité accrue du kit Abcam à fournir des résultats faussement positifs. Ces résultats sont similaires à ceux de l'étude de Safronetz et al. en 2017 qui ont également observé une grande différence entre les deux Kits pour les échantillons testés positifs à la RT-PCR. Cependant la concordance était bonne pour les échantillons testés négatifs à la RT-PCR (81).

Nos données obtenues à partir du kit Abcam sont comparables à celles obtenues par Ankrah et al. en 2019 qui ont rapporté une séroprévalence de 20% au cours d'une étude sur l'infection au virus Zika chez des patients fébriles au Ghana (80). Cependant nos données ne sont pas alignées à celles de Diarra et al. en 2020 qui avaient trouvé une séroprévalence globale de 12 % (12). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans notre étude nous avons utilisé un kit ELISA qui cible les anticorps IgM anti-ZIKV tandis que l'anticorps IgG anti-ZIKV était ciblé dans l'autre étude. Cette différence était prévisible du fait du temps d'apparition des deux anticorps au cours d'une infection au ZIKV du Jour 5 au Jour 15 (infection aiguë) après l'apparition des symptômes pour IgM et du Jour 15 à 2 mois après l'apparition des symptômes pour IgG (phase de convalescence) (45).

Nos résultats de séropositivité dans les deux groupes sont comparables à ceux de l'étude réalisée par Otu et al. en 2020 au Nigeria qui ont trouvé une séroprévalence de 27% (15/55) chez les patients faisant un accès palustre et de 11% (5/45) chez les sujets sans infection palustre (79). En revanche l'étude de Mac et al. en 2023 au Nigeria sur la co-circulation du virus Zika et du paludisme avait observé une séropositivité des anticorps co-circulants contre le virus Zika et le Paludisme de 4,3% (soit 37/871) (82). La différence pourrait être due d'une part à la population d'étude qui était composée de patients ambulatoires se présentant à l'hôpital. Et d'autre part aux cibles des tests ELISA utilisés. Van Esbroeck et al. en 2016 ont rapporté la probabilité d'une interférence entre les anticorps contre le *Plasmodium*, responsable du paludisme, et le virus Zika (15). Selon une des hypothèses citées, cette interférence pourrait être due à la capacité du *Plasmodium* à induire des lymphocytes B producteurs d'anticorps polyclonaux non spécifiques, ce qui pourrait provoquer une augmentation du nombre de faux positifs pour les tests ELISA contre le ZIKV (15). Ce mécanisme lié au parasite du paludisme a été également évoqué dans d'autres études comme celle de Dabita et al. en 2023 sur l'évaluation clinique des tests sérologiques commerciaux du SRAS-CoV-2 dans un contexte d'endémie palustre (77). Scharwz et al. en 2017 ont rapporté que sur 1216 échantillons de plasma collectés en 2010 au Madagascar, 6 échantillons étaient positifs par ELISA ZIKV et 4 de ces 6 échantillons étaient également positifs au *Plasmodium falciparum*, et ils ont émis l'hypothèse que ces positifs pourraient être des faux positifs (14). Cependant Sow et al. 2016 ont trouvé une coïnfection paludisme-ZIKV chez 8 des 9 cas testés positifs au ZIKV par ELISA IgM au cours de leur étude à Kédougou au Sénégal. Et selon eux cette coïnfection pourrait être due soit à la capacité des moustiques à porter les parasites du paludisme et des arbovirus en même temps, ou soit par la piqûre consécutive de deux moustiques infectés différents (83).

Nous n'avons pas observé de corrélation entre la DO des deux kits avec respectivement la densité parasitaire et l'âge. Ces données nous montrent une distribution non dépendante des caractéristiques socio-démographiques des résultats des tests ELISA. Ces résultats sont similaires à ceux de Van Esbroeck et al. en 2016 qui n'ont pas aussi trouvé de corrélation entre les résultats faussement positifs et la densité parasitaire (15). Cependant la majorité des séropositifs se situaient dans la tranche d'âge de 10 à 20 ans. Ankrah et al avaient rapporté que 8 sur 30 cas de séropositifs soit [26,7%] étaient situés dans la tranche d'âge de 21 à 30 ans au cours de leur étude, selon eux une explication possible de cette observation pourrait être l'activité du groupe d'âge de 21 à 30 ans pendant les premières heures de la journée, ce qui les expose aux piqûres d'*Aedes spp.* porteurs du ZIKV (80).

Aucun des échantillons positifs ou indéterminés avec les deux kits n'a été testé positif avec le test Trioplex rRT-PCR. Ceci pourrait conforter notre hypothèse que les résultats positifs obtenus avec les kits ELISA pourraient être des faux positifs, mais comme indiqué dans des études antérieures l'ARN du ZIKV n'est détectable que quelques jours avant l'apparition des symptômes et quelques jours après l'apparition des premiers symptômes. Donc, nous ne pouvons pas écarter la possibilité que la RT-PCR a peut-être raté des vrais positifs. Nos données sont similaires à celles obtenues par Ba M. en 2021 à Bamako qui n'a également pas détecté le matériel génétique du virus Zika au cours de sa thèse sur les risques de transmission des virus de la dengue, de la fièvre de la vallée du rift, de Zika à travers le don de sang au centre national de transfusion sanguine (CNTS) (84). Une autre possibilité est que les amorces du kit Trioplex ne reconnaissent pas toutes les souches de Zika qui circulent au Mali ou dans la sous-région, d'où l'intérêt de faire une surveillance génomique plus poussée de ce virus dans les zones où le vecteur est déjà présent et de développer des amorces à partir des séquences des souches détectées localement.

Notre étude présente plusieurs points forts, mais également quelques insuffisances à prendre en compte au cours d'études ultérieures. La taille de notre échantillonnage était limitée pour une extrapolation dans une population générale. Un échantillonnage plus large pourrait permettre de généraliser les résultats obtenus. Les deux groupes ne sont pas si comparables en ce qui concerne l'âge alors que l'âge influence la réponse immunitaire surtout contre le paludisme. La nécessité de tester des échantillons fraîchement collectés pour éviter les cycles répétés de congélation et décongélation qui peuvent avoir des effets sur les résultats des tests sérologiques. Mais aussi, l'évaluation de la performance avec des échantillons de sérum pour déterminer la présence ou pas d'une influence du type de matrice utilisée pour faire les tests. Le total

d'échantillons testés par RT-PCR n'est pas représentatif de notre population d'étude par manque de volume suffisant. La non-inclusion d'autres kits ELISA qui ont d'autres cibles comme le peptide (NS2B) du virus Zika, dont la spécificité a été établie par une équipe à Colombia (85), ceux-ci pourraient donner plus de précision sur les résultats obtenus. La non-disponibilité d'un panel d'échantillons positifs obtenus localement pour les utiliser comme contrôles internes.

Une étude future sur la performance (spécificité et sensibilité) de ces kits dans notre contexte sera la prochaine étape pour donner plus de poids aux différents résultats.

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS :

7.1. Conclusion :

Notre étude a montré une grande différence entre les résultats obtenus à partir des deux kits ELISA utilisés. La séroprévalence obtenue avec le kit Abcam était associée avec la présence du paludisme contrairement au kit CDC MAC-ELISA.

Cette étude montre la nécessité d'une évaluation locale des différents kits ELISA utilisés pour la détection du virus Zika dans un contexte d'endémie palustre.

7.2. Recommandations :

Au terme de notre étude et au regard de nos résultats, nous formulons les recommandations suivantes :

Aux autorités sanitaires et politiques

- Encourager et financer les activités de recherche sur le virus Zika dans un contexte de réémergence des *Flavivirus*.
- Mettre en place un système de validation des différents kits ELISA utilisés pour le diagnostic sérologique des flavivirus en général et du virus Zika en particulier.

Aux chercheurs et à l'UCRC

- Approfondir la recherche sur les éventuelles interférences de certains pathogènes endémiques (comme le paludisme) sur la performance de kits commerciaux de sérologie ;
- Evaluer l'impact de la diversité génétique des pathogènes qui circulent au Mali sur la performance des kits de diagnostic moléculaire.

Aux praticiens

- Améliorer leur pratique de prise en charge des syndromes fébriles en intégrant les infections virales émergentes ;

A la population

- Participer comme volontaire aux activités de recherche pour faciliter l'obtention de solution locale aux maladies infectieuses émergentes ;
- Respecter les mesures de protection dictées (comme l'utilisation de moustiquaire imprégné,) par les autorités sanitaires dans l'optique de limiter la propagation des maladies infectieuses émergentes et de lutter contre ces maladies.

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. Laureti M, Narayanan D, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kedzierski L. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2180.
2. Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952;46(5):509-20.
3. Plourde AR, Bloch EM. A Literature Review of Zika Virus. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(7):1185-92.
4. Institut Pasteur de Lille. Zika : symptômes, traitement et prévention 2022 [14 Novembre 2022]. Disponible sur : <https://pasteur-lille.fr/centre-prevention-sante-longevite/vaccins-et-voyages/zika/>.
5. Organisation mondiale de la Santé. Mise à jour épidémiologique Zika - Février 2022. 2022.
6. Boeuf P, Drummer HE, Richards JS, Scoullar MJ, Beeson JG. The global threat of Zika virus to pregnancy: epidemiology, clinical perspectives, mechanisms, and impact. *BMC Med*. 2016;14(1):112.
7. Petersen LR, Jamieson DJ, Honein MA. Zika Virus. *The New England journal of medicine*. 2016;375(3):294-5.
8. Organisation mondiale de la Santé. Zika (maladie à virus) 2018 [14 Novembre 2022]. Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus/>.
9. De Paula Freitas B, Ventura CV, Maia M, Belfort R, Jr. Zika virus and the eye. *Curr Opin Ophthalmol*. 2017;28(6):595-9.
10. Muñoz LS, Barreras P, Pardo CA. Zika Virus-Associated Neurological Disease in the Adult: Guillain-Barré Syndrome, Encephalitis, and Myelitis. *Seminars in reproductive medicine*. 2016;34(5):273-9.
11. De Araújo TVB, Ximenes RAA, Miranda-Filho DB, Souza WV, Montarroyos UR, de Melo APL, et al. Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):328-36.
12. Diarra I, Nurtop E, Sangare AK, Sagara I, Pastorino B, Sacko S, et al. Zika Virus Circulation in Mali. *Emerging infectious diseases*. 2020;26(5):945-52.
13. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(8):1232-9.
14. Schwarz NG, Mertens E, Winter D, Maiga-Ascofaré O, Dekker D, Jansen S, et al. No serological evidence for Zika virus infection and low specificity for anti-Zika virus ELISA in

malaria positive individuals among pregnant women from Madagascar in 2010. PloS one. 2017;12(5):e0176708.

15. Van Esbroeck M, Meersman K, Michiels J, Ariën KK, Van den Bossche D. Letter to the editor: Specificity of Zika virus ELISA: interference with malaria. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2016;21(21).

16. Gubler DJ. Human arbovirus infections worldwide. Annals of the New York Academy of Sciences. 2001;951:13-24.

17. Organisation mondiale de la Santé. Déclaration sur la 1ère réunion du Comité d'urgence du Règlement sanitaire international concernant le virus Zika. 2016.

18. Dick GW. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda; Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1953;47(1):13-48.

19. Gubler DJ. Flaviviruses. Fields virology. 2007:1153-252.

20. Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. Archives of virology. 2007;152(4):687-96.

21. Javed F, Manzoor K, Ali M, Haq I, Khan A, Zaib A, et al. Zika virus: what we need to know? Journal of Basic Microbiology. 2017;58.

22. Softic L. Characterization of a new broad spectrum molecules , inhibitors of cyclophilins, on Zika virus and coronavirus replication Caractérisation de l'activité anti-zika et anti-coronavirus d'une nouvelle classe de petites molécules à large spectre antiviral, inhibitrices des cyclophilines: Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12; 2021.

23. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. Nature reviews Microbiology. 2005;3(1):13-22.

24. Ye Q, Liu ZY, Han JF, Jiang T, Li XF, Qin CF. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2016;43:43-9.

25. Wang L, Valderramos SG, Wu A, Ouyang S, Li C, Brasil P, et al. From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. Cell Host Microbe. 2016;19(5):561-5.

26. Rajah MM, Pardy RD, Condotta SA, Richer MJ, Sagan SM. Zika Virus: Emergence, Phylogenetics, Challenges, and Opportunities. ACS Infectious Diseases. 2016;2(11):763-72.

27. Dowd KA, DeMaso CR, Pelc RS, Speer SD, Smith ARY, Goo L, et al. Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. *Cell reports*. 2016;16(6):1485-91.
28. Institut Pasteur. Zika 2016 [Disponible sur : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/zika>].
29. Aubry P, Gaüzère B-A. Arboviroses tropicales: *Medecine tropicale*; 2020 [10 Juin 2023]. Disponible sur : <http://medecinetropicale.free.fr/enseignement.html>.
30. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(2):e1477.
31. Turpin J. Mechanisms deployed by Zika virus to control apoptosis during infection
Mécanismes déployés par le virus Zika dans le contrôle de l'apoptose lors de l'infection: Université de la Réunion; 2021.
32. Boyer S, Calvez E, Chouin-Carneiro T, Diallo D, Failloux AB. An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes and infection*. 2018;20(11-12):646-60.
33. Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y, et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PloS one*. 2014;9(10):e109442.
34. Okafor IIJD, Health Ei, Care. Zika virus: The emerging global health challenge. 2016;13(6).
35. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clinical microbiology reviews*. 2016;29(3):487-524.
36. Sharma V, Sharma M, Dhull D, Sharma Y, Kaushik S, Kaushik S. Zika virus: an emerging challenge to public health worldwide. *Canadian journal of microbiology*. 2020;66(2):87-98.
37. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of virology*. 2015;89(17):8880-96.
38. Tappe D, Pérez-Girón JV, Zammarchi L, Rissland J, Ferreira DF, Jaenisch T, et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Medical microbiology and immunology*. 2016;205(3):269-73.
39. Desgraupes S. Transmission of arboviruses during breastfeeding: Zika virus and yellow fever virus
Transmission des arbovirus par allaitement : le virus Zika et le virus de la fièvre jaune: Université Paris Cité; 2022.
40. Ruby J. Stratégies innovantes de lutte anti-Zika 2017.

41. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *The New England journal of medicine*. 2009;360(24):2536-43.
42. Wojda TR, Valenza PL, Cornejo K, McGinley T, Galwankar SC, Kelkar D, et al. The Ebola Outbreak of 2014-2015: From Coordinated Multilateral Action to Effective Disease Containment, Vaccine Development, and Beyond. *Journal of global infectious diseases*. 2015;7(4):127-38.
43. Sikka V, Chattu VK, Popli RK, Galwankar SC, Kelkar D, Sawicki SG, et al. The Emergence of Zika Virus as a Global Health Security Threat: A Review and a Consensus Statement of the INDUSEM Joint working Group (JWG). *Journal of global infectious diseases*. 2016;8(1):3-15.
44. Haut Conseil de la Santé Publique. Prise en charge médicale des personnes atteintes par le virus Zika 2015 [Disponible sur : <https://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clef=517>].
45. Chidiac C, Ferry T. Agents infectieux émergents. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2016;23.
46. Theel ES, Hata DJ. Diagnostic Testing for Zika Virus: a Postoutbreak Update. *Journal of clinical microbiology*. 2018;56(4).
47. St George K, Sohi IS, Dufort EM, Dean AB, White JL, Limberger R, et al. Zika Virus Testing Considerations: Lessons Learned from the First 80 Real-Time Reverse Transcription-PCR-Positive Cases Diagnosed in New York State. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(2):535-44.
48. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(3):545-51.
49. Wæhre T, Maagard A, Tappe D, Cadar D, Schmidt-Chanasit J. Zika virus infection after travel to Tahiti, December 2013. *Emerging infectious diseases*. 2014;20(8):1412-4.
50. Lanciotti RS. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. *Advances in virus research*. 2003;61:67-99.
51. Gaunt MW, Gould EA. Rapid subgroup identification of the flaviviruses using degenerate primer E-gene RT-PCR and site specific restriction enzyme analysis. *Journal of virological methods*. 2005;128(1-2):113-27.

- 52.** Meiyu F, Huosheng C, Cuihua C, Xiaodong T, Lianhua J, Yifei P, et al. Detection of flaviviruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction with the universal primer set. *Microbiology and immunology*. 1997;41(3):209-13.
- 53.** Chow VT, Seah CL, Chan YC. Use of NS3 consensus primers for the polymerase chain reaction amplification and sequencing of dengue viruses and other flaviviruses. *Archives of virology*. 1993;133(1-2):157-70.
- 54.** Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(5):1922-7.
- 55.** Chang GJ, Trent DW, Vorndam AV, Vergne E, Kinney RM, Mitchell CJ. An integrated target sequence and signal amplification assay, reverse transcriptase-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay, to detect and characterize flaviviruses. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32(2):477-83.
- 56.** Pierre V, Drouet MT, Deubel V. Identification of mosquito-borne flavivirus sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. *Research in virology*. 1994;145(2):93-104.
- 57.** Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2014;19(14).
- 58.** Rodhain F, Gonzalez JP, Mercier E, Helynck B, Larouze B, Hannoun C. Arbovirus infections and viral haemorrhagic fevers in Uganda: a serological survey in Karamoja district, 1984. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989;83(6):851-4.
- 59.** Monath TP, Wilson DC, Lee VH, Stroh G, Kuteyi K, Smith EA. The 1970 yellow fever epidemic in Okwoga District, Benue Plateau State, Nigeria. I. Epidemiological observations. *Bulletin of the World Health Organization*. 1973;49(2):113-21.
- 60.** Cleton N, Koopmans M, Reimerink J, Godeke GJ, Reusken C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2012;55(3):191-203.
- 61.** Silva IBB, da Silva AS, Cunha MS, Cabral AD, de Oliveira KCA, Gaspari E, et al. Zika virus serological diagnosis: commercial tests and monoclonal antibodies as tools. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. 2020;26:e20200019.

62. Huzly D, Hanselmann I, Schmidt-Chanasit J, Panning M. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(16).
63. L'Huillier AG, Hamid-Allie A, Kristjanson E, Papageorgiou L, Hung S, Wong CF, et al. Evaluation of Euroimmun Anti-Zika Virus IgM and IgG Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Zika Virus Serologic Testing. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(8):2462-71.
64. Euroimmun. Anti-Zika virus ELISA (IgM) 2017 [Disponible sur: https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Infections/Zika-virus/EI_2668_D_UK_B.pdf].
65. InBios. ZIKV Detect™ 2.0 IgM Capture ELISA Kit: Inbios; [20 JUNE 2023]. Available from: <https://inbios.com/zikv-detecttm-igm-capture-elisa-kit-usa/>.
66. Granger D, Hilgart H, Misner L, Christensen J, Bistodeau S, Palm J, et al. Serologic Testing for Zika Virus: Comparison of Three Zika Virus IgM-Screening Enzyme-Linked Immunosorbent Assays and Initial Laboratory Experiences. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(7):2127-36.
67. Food and Drug Administration. Zika Virus Response Updates from FDA: FDA; 2023 [06 Juin 2023]. Disponible sur : <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-issues/zika-virus-response-updates-fda>.
68. Abcam. Abcam's anti-Zika virus IgM μ -capture (ab213327) [04 Janvier 2024]. Disponible sur : <https://www.abcam.com/products/elisa-kits/zika-virus-igm-elisa-kit-mu-capture-ab213327/>
69. Strottmann DM, Zanluca C, Mosimann ALP, Koishi AC, Auwerter NC, Faoro H, et al. Genetic and biological characterisation of Zika virus isolates from different Brazilian regions. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2019;114:e190150.
70. CDC. Clinical Evaluation & Disease 2019 [updated 28 January 2019]. Disponible sur : <https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/preparing-for-zika/clinicalevaluationdisease.html>.
71. Bahlmann AS, Theilacker C, Hirsch HH. Virus Zika: mise à jour. *FORUM MÉDICAL SUISSE*. 2016;16(30–31):600–4.
72. Pan American Health Organization. Zika 2023 [06 Juin 2023]. Disponible sur : <https://www.paho.org/en/topics/zika>.
73. Fang Y, Brault AC, Reisen WK. Comparative thermostability of West Nile, St. Louis encephalitis, and western equine encephalomyelitis viruses during heat inactivation for

serologic diagnostics. The American journal of tropical medicine and hygiene.

2009;80(5):862-3.

74. Blow JA, Dohm DJ, Negley DL, Mores CN. Virus inactivation by nucleic acid extraction reagents. Journal of virological methods. 2004;119(2):195-8.

75. Tu-Xuan N, Didier M. Émergence du virus Zika. Virologie. 2015;19(5):225-35.

76. Organisation mondiale de la Santé. Paludisme 2023 [28 Mars 2024]. Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/malaria>.

77. Dabito D, Shaw-Saliba K, Konate DS, Highbarger HC, Lallemand P, Sanogo I, et al. Clinical evaluation of commercial SARS-CoV-2 serological assays in a malaria endemic setting. Journal of Immunological Methods. 2023;517:113488.

78. CDC. ZIKA MAC-ELISA 2016 [updated 26 Septembre 2018. Disponible sur : <https://www.cdc.gov/zika/pdfs/zika-mac-elisa-protocol-eua-english.pdf>.

79. Otu AA, Udoh UA, Ita OI, Hicks JP, Ukpeh I, Walley J. Prevalence of Zika and malaria in patients with fever in secondary healthcare facilities in south-eastern Nigeria. Tropical doctor. 2020;50(1):22-30.

80. Ankrah GA, Bonney JHK, Agbosu EE, Pratt D, Adiku TK. Serological evidence of Zika virus infection in febrile patients at Greater Accra Regional Hospital, Accra Ghana. BMC Research Notes. 2019;12(1):326.

81. Safronetz D, Sloan A, Stein DR, Mendoza E, Barairo N, Ranadheera C, et al. Evaluation of 5 Commercially Available Zika Virus Immunoassays. Emerging infectious diseases. 2017;23(9):1577-80.

82. Mac PA, Kroeger A, Daehne T, Anyaike C, Velayudhan R, Panning M. Zika, Flavivirus and Malaria Antibody Cocirculation in Nigeria. Tropical medicine and infectious disease. 2023;8(3).

83. Sow A, Loucoubar C, Diallo D, Faye O, Ndiaye Y, Senghor CS, et al. Concurrent malaria and arbovirus infections in Kedougou, southeastern Senegal. Malaria journal. 2016;15:47.

84. Ba M. Etude des risques de transmission des virus de la dengue, de la fièvre de la vallée du rift, de Zika à travers le don de sang au centre national de transfusion sanguine (CNTS) de Bamako [Thèse de Pharmacie]: USTTB; 2021.

85. Mishra N, Caciula A, Price A, Thakkar R, Ng J, Chauhan Lokendra V, et al. Diagnosis of Zika Virus Infection by Peptide Array and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. mBio. 2018;9(2):10.1128/mbio.00095-18.

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : CISSE
Ville de soutenance : Bamako
Prénom : Boubacar Elmadane
Secteur d'intérêt : Biologie et Santé publique
Nationalité : Malienne
Section : Pharmacie
Tel : +223 70 03 29 70/+223 60 68 47 84
Pays d'origine : Mali
Courriel : amiricisse@gmail.com
Année universitaire : 2023-2024

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie (FMOS) et de la Faculté de Pharmacie (FAPH), Bamako, Mali.

Titre de la thèse : Challenge du diagnostic sérologique des *Flavivirus* : cas du virus Zika au Mali

Résumé

L'expansion de l'infection par le virus Zika dans les régions tropicales a été déclarée comme une urgence de santé publique de portée internationale en 2016 par l'OMS. Comme d'autres *Flavivirus*, son diagnostic se révèle difficile dans le contexte de la circulation d'autres *Flavivirus*, mais aussi de pathogènes endémiques tels que le Plasmodium. L'objectif de ce travail était d'évaluer les caractéristiques de performance de deux tests de diagnostic sérologique du virus Zika au Mali. L'échantillonnage comprenait de 50 échantillons sans infection palustre (Groupe 1) et 50 échantillons avec infection palustre (Groupe 2). Ces échantillons ont été tous testés avec les deux kits ELISA utilisés à savoir le CDC MAC-ELISA kit et l'Abcam anti-Zika μ -capture ELISA kit. Les échantillons positifs par ELISA ont ensuite été testés par la RT-PCR, spécifiquement le test Trioplex qui permet de détecter l'ARN des virus Zika, Dengue, et Chikungunya de façon simultanée. Nous avons trouvé une séroprévalence IgM globale de 22 % (22/100) avec le kit Abcam et 1% (1/100) avec le kit CDC. Les participants faisant une infection palustre présentaient une séropositivité élevée de 32% (16/50) avec le kit Abcam contre seulement 12 % (6/50) chez le groupe contrôle, suggérant une association entre la séropositivité et le paludisme ($p = 0.01768$). Le seul échantillon positif avec le kit CDC était un cas d'accès palustre. Aussi, aucun échantillon n'a été testé positif avec la RT-PCR, ce qui suggère que le paludisme pourrait influencer les résultats générés à partir du kit Abcam par des réactions croisées entre les anticorps et ou antigènes de ces deux pathogènes. Cette étude démontre la nécessité de la validation des différents kits sérologiques commerciaux utilisé pour la détection du virus Zika dans un contexte d'endémie palustre.

Mots clés : Virus Zika, Séropositivité, IgM, ELISA, Paludisme, *Flavivirus*, RT-PCR, Mali

INFORMATION SHEET

Name: CISSE **City of defense:** Bamako
First name: Boubacar Elmadane **Sector of interest:** Biology and Public Health
Nationality: Malian **Section:** Pharmacy
Tel: +223 70 03 29 70 / +223 60 68 47 84 **Country of origin:** Mali

Email: amiricisse@gmail.com

Academic year: 2023-2024

Deposit: Library of the Faculty of Medicine and Odonto-Stomatology (FMOS) and the Faculty of Pharmacy (FAPH), Bamako, Mali.

Title of the thesis: Challenge of *Flaviviruses* serological diagnosis: the case of Zika virus in Mali

Summary

The spread of Zika virus infection in tropical regions was declared a Public Health Emergency of International Concern in 2016 by the WHO. Like other Flaviviruses, its diagnosis is difficult in the context of the circulation of other Flaviviruses but also endemic pathogens such as Plasmodium. The objective of this work was to evaluate the performance characteristics of two serological diagnostic tests for Zika virus in Mali. Sampling included of 50 specimens without malaria infection (Group 1) and 50 specimens with malaria infection (Group 2). These samples were all tested with the two ELISA kits used, namely the CDC MAC-ELISA kit and the Abcam anti-Zika μ -capture ELISA kit. The ELISA-positive samples were then tested by RT-PCR, specifically the Triplex assay that detects RNA from Zika, Dengue, and Chikungunya viruses simultaneously. We found an overall IgM seroprevalence of 22% (22/100) with the Abcam kit and 1% (1/100) with the CDC kit. Group 2 had a seropositivity of 32% (16/50) with the Abcam kit compared to 12% (6/50) in Group 1 ($p = 0.01768$). The only positive sample with the CDC kit was in Group 2. Also, no samples tested positive with RT-PCR, suggesting that malaria could influence the results generated from the Abcam kit by cross-reactions between the antibodies and/or antigens of these two pathogens. This study demonstrates the need for validation of the different ELISA kits used for the detection of Zika virus in a malaria-endemic context.

Keywords: Zika virus, Seropositivity, IgM, ELISA, Malaria, *Flavivirus*, RT-PCR, Mali

9. ANNEXES

Annexe 1 : Kit CDC MAC-ELISA

a. Matériaux requis fournis

- **Antigène viral Zika** (l'un ou l'autre des produits suivants peut être utilisé dans l'essai)
 - Antigène de culture tissulaire Zika Vero E6
 - Antigène recombinant Zika COS-1 ;
- **Antigène normal**
 - Antigène Vero E6 normal
 - Antigène recombinant COS-1 de contrôle normal ;
- **Contrôle *Flavivirus* IgM positif.**

b. Matériaux requis, mais non fournis

Note : pour les matériaux nécessitant une dilution/titrage, voir Formulations ci-dessous.

- Anticorps conjugué de détection : anticorps monoclonal conjugué à la peroxydase de raifort 6B6C-1.
- IgM anti-humain de chèvre
- Eau désionisée ; Acide chlorhydrique (pour ajuster le pH de la solution de revêtement)
- Carbonate de sodium (Na_2CO_3) ; Bicarbonate de sodium (NaHCO_3) ; Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) ; Tween 20 ; Lait écrémé en poudre ; Acide sulfurique (H_2SO_4) ;
- Immulon II HB plaque à fond plat de 96 puits (Remarque : Il s'agit de la seule plaque de 96 puits approuvée pour ce test) ;
- Substrat K-Blue TMB amélioré (3,3', 5, 5' tetramethylbenzidine base) ;
- Sérums humains normaux testés négatifs pour les anticorps du virus Zika

c. Équipement et consommables

- Laveur de microplaques ;
- Lecteur de microplaques avec filtre de 450 nm ;
- Hotte à flux laminaire;
- Incubateur réglé à 37°C ;
- Pipettes monocanal et multicanaux (100 μL et/ou 200 μL monocanal, 100 μL et/ou 200 μL 12 canaux) ;
- Réservoirs à réactifs ;
- Chronomètre ;
- Tubes à microfuge pour diluer le sérum du patient ;

- Balance

d. Formulations

NB : Les dilutions indiquées sont un point de départ pour le titrage. Les laboratoires doivent déterminer la dilution optimale pour leur laboratoire individuel.

- Solution de revêtement : tampon carbonate/bicarbonate, pH 9,6
1,59 g Na₂CO₃ + 2,93 g NaHCO₃ dilué dans 1L d'eau.
- Solution de lavage : solution saline tamponnée au phosphate (PBS) ; 0,05 % Tween 20, pH 7,2.
- PBS
- Solution de blocage : PBS / 5% lait / 0,5% Tween 20
- Solution d'arrêt : 1 N H₂SO₄
- Anticorps conjugué de détection : le conjugué peut-être diluer jusqu'à 1 :5000 dans la solution de blocage
- Contrôle *Flavivirus* IgM positif : contrôle *Flavivirus* IgM positif dilué jusqu'à 1 :3000 dans la solution de lavage
- Antigène viral Zika :
 - Antigène Zika Vero E6 : dilué jusqu'à 1 :160 dans la solution de lavage
 - Antigène recombinant Zika COS-1 : dilué de 1 :400 à 1 :1600 dans la solution de lavage
- Antigène normal :
 - Antigène Vero E6 normal : dilué jusqu'à 1 :160 dans la solution de lavage
 - Antigène recombinant COS-1 de contrôle normal : dilué de 1 :400 à 1 :1600 dans la solution de lavage.
- IgM anti-humain de chèvre : dilué au 1 :2000 dans la solution de revêtement (un titrage peut être nécessaire).
- Sérum patient : dilué au 1 :400 dans la solution de lavage (aucun titrage requis)
- Contrôle négatif : sérums humains normaux dilués à 1 :400 (aucun titrage requis)

e. Procédure du test ELISA

Remarque : la procédure suivante comprend des renseignements sur le contrôle de la qualité et l'interprétation. Chaque échantillon de sérum est testé en triple exemplaire sur les antigènes Zika et normal. Huit (8) spécimens d'essai peuvent être analysés par plaque.

1. Préparation de la plaque :

Déterminer le nombre de puits ELISA nécessaires. À l'aide d'un marqueur permanent à pointe fine, numéroté et étiqueter les plaques de 96 puits. Identifier l'emplacement de chaque échantillon (S1 à S8) à l'aide d'un modèle correspondant (voir Fig.18). Pour maintenir un timing d'ajout de réactif cohérent, traitez les plaques dans l'ordre dans lequel elles sont numérotées pendant toutes les étapes de la procédure. Les plaques doivent être conservées dans un environnement clos et humidifié pendant toutes les périodes d'incubation, à l'exception de l'étape du revêtement.

2. Revêtement des plaques :

- Diluer l'anticorps IgM anti-humain de chèvre au 1 :2000 dans la solution de revêtement, pH 9,6.
- Enduire les 60 puits intérieurs de la plaque de 96 puits avec 75 µL (par puits) d'anticorps IgM anti-humains de chèvre dilué. Laissez-les lignes/colonnes extérieures vides (voir Fig.18).
- Incuber à **2-8°C pendant la nuit**. Les plaques doivent rester entre 2 et 8 °C jusqu'à leur utilisation pour les tests, validité des plaques : une semaine.

3. Blocage des plaques :

- Après une nuit d'incubation, verser le contenu de la plaque.
- Éponger les plaques sur des serviettes en papier ou un autre matériau absorbant.
- Bloquer les plaques avec une solution de blocage de 200 µL par puits.
- Incuber à température ambiante pendant 30 minutes.

4. Lavage des plaques :

- Laver les puits 5 fois avec la solution de lavage en utilisant une laveuse automatique de plaques.
- Les puits doivent être remplis jusqu'au sommet à chaque cycle (300 µL/puits).

5. Ajout d'échantillons/contrôles :

- Diluer au 1 :400 le sérum du patient dans la solution de lavage.
- Ajouter 50 µL (par puits) de sérum du patient dilué (S) à un bloc de 6 puits.
- Ajouter 50 µL du contrôle *Flavivirus* IgM positif (Ref) dilué dans la solution de lavage selon un titrage préalablement déterminé.

- Diluer le contrôle de sérum humain négatif (N) au 1 :400 dans la solution de lavage.
 - Ajouter 50 µL du contrôle de sérum humain négatif (N) dilué à un bloc de 6 puits.
 - Incuber les plaques pendant **1 heure à 37°C** dans une chambre humidifiée.
6. Répéter l'étape 4 (Lavage des plaques)
7. Ajout d'antigènes :
- Diluer l'**antigène** viral Zika dans la solution de lavage selon un titrage préalablement déterminé.
 - Diluer l'antigène **normal** dans la solution de lavage à la même concentration que l'antigène viral Zika.
 - Ajouter 50 µL (par puits) d'antigène viral **Zika** dilué aux trois puits de gauche de chaque bloc sérique (**voir Fig.18**).
 - Ajouter 50 µL (par puits) d'antigène **normal** dilué aux trois puits de droite de chaque bloc (**voir Fig.18**).
 - Incuber les plaques pendant toute la nuit à 2-8°C dans une chambre humidifiée.
8. Répéter l'étape 4 (Lavage des plaques)
9. Ajout du conjugué :
- Diluer l'anticorps monoclonal conjugué à la peroxydase de raifort dans la solution de blocage selon un titrage préalablement déterminé.
 - Ajouter 50 µL (par puits) d'anticorps monoclonal conjugué à la peroxydase de raifort dilué.
 - Incuber les plaques pendant **1 heure à 37°C** dans une chambre humidifiée.
10. Allumer le lecteur de plaques pour réchauffer
11. Retirer le TMB-ELISA du réfrigérateur.
12. Lavage des plaques :
- Laver les puits en **deux séries** de 5 lavages avec la solution de lavage en utilisant une laveuse automatique de plaques.
 - Tourner les plaques de 180° dans la rondelle après la première série de 5 cycles. Cela favorise des résultats cohérents.

- Les puits doivent être remplis jusqu'au sommet à chaque cycle.

13. Ajout du substrat :

- Avec la plaque à température ambiante (20-25°C), ajouter 75 µL (par puits) de substrat TMB dans tous les puits.
- Couvrir immédiatement les plaques pour la protéger de la lumière. Incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
- Une couleur bleue se développera dans les puits positifs aux anticorps.

14. Ajout de la solution d'arrêt :

- Ajouter 50 µL (par puits) de solution d'arrêt dans tous les puits, y compris les rangées extérieures de puits sur la plaque. Le lecteur de plaques doit être mis à zéro sur certains de ces puits.
- Les puits qui étaient bleus vont maintenant passer à une couleur jaune.
- Laisser les plaques reposer à température ambiante pendant 1 minute.
- Lire les plaques dans un lecteur de plaques de microtitrage à l'aide d'un filtre de 450 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY
B	EMPTY	Viral Antigen	Normal Antigen	EMPTY								
C	EMPTY	Viral Antigen	Normal Antigen	EMPTY								
D	EMPTY	Viral Antigen	Normal Antigen	EMPTY								
E	EMPTY	Viral Antigen	Normal Antigen	EMPTY								
F	EMPTY	Viral Antigen	Normal Antigen	EMPTY								
G	EMPTY	Viral Antigen	Normal Antigen	EMPTY								
H	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY	EMPTY

Figure 18 : Disposition des plaques pour 8 échantillons et contrôles

f. Interprétation des résultats

▪ Détermination de la validité du test

Pour qu'un test soit valide, le rapport suivant doit être supérieur ou égal à 2,0. Il s'agit du **P/N** du contrôle positif.

La DO moyenne du contrôle Flavivirus IgM positif ayant réagi avec l'antigène viral Zika (P)

La DO moyenne du sérum humain normal ayant réagi avec l'antigène viral Zika (N)

La validité doit être déterminée pour chaque plaque. Les résultats des échantillons cliniques ne peuvent être déterminés que si le test est valide. Si le test n'est pas valide, cette plaque doit être répétée.

▪ Détermination de l'échantillon P/N :

Pour déterminer si les échantillons cliniques (S1-S8) contiennent des IgM du virus Zika (ce qui indiquerait des infections récentes par ce virus), il faut calculer ce qui suit :

La DO moyenne de l'échantillon du test ayant réagi avec l'antigène viral Zika (P)

La DO moyenne du sérum humain normal ayant réagi avec l'antigène viral Zika (N)

Il s'agit du **P/N** des échantillons du test.

Tableau XI : Interprétation des résultats MAC-ELISA de Zika

P/N de l'échantillon	Interprétation
< 2	Négatif
$2 \leq P/N < 3$	Equivoque
≥ 3	Présumé Positif

Annexe 2 : Kit ELISA anti-Zika virus IgM μ -capture

a. Matériaux fournis

- Microplaque revêtue d'IgM anti-humain (12 x 8 puits)
- Diluant pour échantillon d'IgM
- Conjugué contre le virus Zika
- Contrôle positif aux IgM du virus Zika
- Contrôle Seuil (Cut-off) des IgM du virus Zika
- Contrôle négatif aux IgM du virus Zika
- Tampon de lavage concentré 20X
- Solution d'arrêt
- Solution de substrat TMB
- Film adhésif

b. Matériaux requis, non fournis

Ces matériaux ne sont pas inclus dans le kit, mais seront nécessaires pour effectuer avec succès ce test :

- Lecteur de plaques ELISA, équipé pour la mesure de l'absorbance à 450/620 nm ;
- Incubateur 37°C ;
- Laveur de plaque pour le rinçage des puits ;
- Pipettes de 10 μ L, 1000 μ L ;
- Mélangeur à tubes vortex ;
- Eau distillée ;
- Tubes jetables.

c. Préparation des réactifs

- Mettre les réactifs à température pendant au moins 30 min avant utilisation.
- Centrifuger brièvement les petits flacons à basse vitesse avant ouverture.
- Solution de lavage concentré (20X): un (1) flacon contenant 50 ml d'un tampon phosphate concentré 20 fois (0,2 M) ; pH $7,2 \pm 0,2$; pour le lavage des puits et stocké à 4°C. Solution de lavage diluée 1 + 19 ; par exemple 10 ml de solution de lavage + 190 ml d'eau distillée. Le tampon dilué est stable pendant 5 jours à température ambiante.

d. Prélèvement et préparation des échantillons

- Utiliser des échantillons de sérum ou de plasma humain (citrate ou héparine) avec ce test. Si le dosage est effectué dans les 5 jours suivants le prélèvement de l'échantillon,

les échantillons doivent être conservés à 4 °C ; sinon, ils doivent être aliquotes et conservés surgelés (-70 °C à -20 °C). Si les échantillons sont entreposés congelés, mélanger les échantillons décongelés bien avant l'analyse. Évitez le gel et la décongélation répétés.

- L'inactivation thermique des échantillons n'est pas recommandée.
- Avant le dosage, tous les échantillons doivent être dilués à 1/100 avec un diluant d'échantillon IgM. Distribuer 10 µL d'échantillon et 1 ml de diluant d'échantillon dans des tubes pour obtenir une dilution de 1/100 et bien mélanger avec un vortex.

e. Procédure de dosage

1. Distribuer des étalons/témoins de 100 µL et des échantillons dilués dans leurs puits respectifs. Laisser bien le puit A1 pour le substrat vide.
2. Couvrir les puits avec la feuille fournie dans le kit.
3. Incuber pendant 1 heure ± 5 min à 37°C ± 1°C.
4. Une fois l'incubation terminée, retirez la feuille, aspirez le contenu des puits et lavez chaque puits trois fois avec 300 µL de solution de lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. L'intervalle entre le lavage et l'aspiration doit être supérieur (>) à 5 secondes. À la fin, retirez soigneusement le liquide restant en tapotant des bandes sur du papier de soie avant l'étape suivante. Le lavage est important ! Un lavage insuffisant entraîne une mauvaise précision et de faux résultats.
5. Distribuer 100 µL de conjugué dans tous les puits, à l'exception du puits A1.
6. Incuber pendant 30 min à température ambiante. Ne pas exposer à la lumière directe du soleil.
7. Répéter l'étape 4
8. Distribuer 100 µL de solution de substrat TMB dans tous les puits.
9. Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante dans l'obscurité. Une couleur bleue se produit en raison d'une réaction enzymatique.
10. Distribuer 100 µL de solution Stop dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour le substrat TMB, ce qui entraîne un changement de couleur du bleu au jaune.
11. Mesurer l'absorbance à 450/620 nm dans les 30 minutes suivant l'addition de la solution d'arrêt.

f. Calculs

Vérifier les critères de validation

- **Substrat Blank** : Valeur d'absorbance < **0,100**
- **Contrôle négatif** : valeur d'absorbance < **seuil (Cut-off)**
- **Contrôle de seuil (Cut-off)** : Valeur d'absorbance **0,150 – 1,300**
- **Contrôle positif** : valeur d'absorbance > **seuil (Cut-off)**

Si ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être répété.

Calcul des résultats

Le seuil (Cut-off) est la valeur moyenne d'absorbance des déterminations du contrôle de seuil.

Résultats en Unités Abcam [AU]

$$\frac{\text{Valeur d'absorbance (moyenne) de l'échantillon} \times 10}{\text{Contrôle de Seuil (Cut-off)}} = [\text{Unités Abcam} = \text{UA}]$$

Exemple :
$$\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ UA (unités)}$$

Interprétation des résultats (voir Tableau 4)

Annexe 3 : Trioplex RT-PCR

a. Matériels fournis par le CDC

L'ensemble comprend 4 flacons avec amorce et sondes pour chaque agent combiné dans un flacon.

- 1 flacon, DENV-F, DENV-R1, DENV-R2 et P
 - 1 flacon, CHIKV-F, R et P
 - 1 flacon, ZIKV-F, R et P
 - 1 flacon, RP-F, R et P (il s'agit d'un ensemble d'amorces/sondes pour l'ARNase P humaine et utilisé pour vérifier une extraction réussie)
- Trioplex rRT-PCR Assay Positive Control Set
 - DENV Positive Control (PC) : Virus de la Dengue inactivé
 - CHIKV Positive Control (PC) : Virus Chikungunya inactivé
 - ZIKV Positive Control (PC) : Virus Zika inactivé
 - Contrôle des échantillons humains (CSH) : contrôle de l'extraction et contrôle positif pour la RP

b. Matériel requis, mais non fourni

- Kits d'extraction d'ARN:
 - Kit Qiagen QIAamp Viral RNA Mini
 - Kits de master mix rRT-PCR :
 - SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit
 - Kit qRT-PCR en une étape qScript™, Low Rox™

- Eau de qualité moléculaire, sans nucléase.

c. Equipement

- Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx Real-Time PCR;
- Kit d'étalonnage, Fast 96-well;
- Kit d'étalonnage ROI et arrière-plan, Fast 96-well;
- 7500 Fast Real-Time PCR Systems Spectral Calibration Kit II;
- Mélangeur vortex;
- Microcentrifugeuse;
- Bloc froid (ou glace) à 96 puits;
- Micropipettes (2 ou 10 µL, 20 µL, 200 µL et 1000 µL),
- Multichannel micropipettes (5-50 µL)

d. Consommables

Alcool 70° ; Gants jetables sans poudre et blouses jetables ; Stylo marqueur de laboratoire ; Embouts de pipettes stériles barrière aérosol pour P2/P10, P40, P200 et P1000 ; Tubes microcentrifugeuses de 1,5 ml ; Racks pour tubes microcentrifuges de 1,5 ml ; Plaques de réaction PCR de 0,1 ml et capuchons optiques ; Kit de film adhésif optique MicroAmp®, Masques.

e. Contrôles de dosage

Les contrôles de dosage doivent être exécutés en même temps que tous les échantillons d'essai.

Contrôle de l'extraction

- ❖ Contrôle d'échantillons humains (HSC)
- ❖ Contrôles positifs pour l'ensemble des amorces et des sondes spécifiques à l'agent
 - PC DENV : virus de la dengue inactivé
 - CHIKV PC : Virus chikungunya inactivé
 - ZIKV PC : virus Zika inactivé
- ❖ RNase P Primer and Probe Set (RP)
- ❖ Aucun contrôle de modèle (NTC)

Le NTC est un contrôle de la contamination ou du mauvais fonctionnement des réactifs de dosage entraînant des résultats faussement positifs.

f. Extraction du matériel génétique (ARN) : protocole du kit QIAamp Viral RNA

- ❖ Inactivation des échantillons

- Transférer 140µl de l'échantillon dans un microtube Eppendorf® de centrifugation stérile de 1.5ml
 - Ajouter 560µl de tampon AVL dans chaque tube contenant 140ul de notre échantillon ;
 - Mélanger bien avec le Vortex ;
 - Laisser incuber à température ambiante pendant 10 minutes
 - Ajouter 560µl de l'éthanol absolu et mélanger à l'aide du vortex
- ❖ Extraction de l'ARN Viral (lavages et élution)
- Transférer le contenu du tube Eppendorf® dans des tubes en colonne silica gel et centrifuger à 12.000xg pour 1 minute et jeter la colonne de rechange ;
 - Ajouter 600 µl de tampon AW1 dans la colonne et centrifuger pendant 1 minute, et répéter la même action que précédemment et jeter la colonne de rechange pour utiliser une nouvelle colonne ;
 - Ajouter 600µl de tampon AW2 et centrifuger pendant 3 minutes puis jeter la colonne de rechange pour utiliser une nouvelle colonne ;
 - Centrifuger à vide pour enlever toute trace d'éthanol dans le tube ;
 - Placer la colonne dans un tube Eppendorf® stérile de 1.5ml et y ajouter 80µl de tampon d'élution AVE et laisser incuber à température ambiante pour 3 minute ;
 - Faire centrifuger à 12,000xg pendant 2 minute pour faire l'élution de l'échantillon ;
 - Conserver l'ARN purifié à -80°C (pour une meilleure conservation).

g. Test RT-PCR en temps réel

Préparation des réactifs de stock

- ❖ Préparation d'amorces/sondes en temps réel
- Avant la réhydratation, conservez les trousse entre 2 et 8 °C dans l'obscurité.
- Précautions : Ces réactifs ne doivent être manipulés que dans un endroit propre et stockés à des températures appropriées dans l'obscurité. Les cycles de gel-dégel doivent être évités. Maintenir au froid lorsqu'il est décongelé.
- Réhydrater soigneusement les réactifs lyophilisés dans 250 µL de Tris 10 mM, pH 7,4 à 8,2 ou eau de qualité PCR (sans nucléase) et laisser réhydrater pendant 15 min à température ambiante dans l'obscurité.
- Vortexer chaque tube pour obtenir un mélange uniforme et un mélange aliquote/sonde en volumes de 50 µL dans 5 tubes préétiquetés.

- Conservez les aliquotes réhydratées des amorces et des sondes à -20 °C ou moins. Ne pas conserver dans des congélateurs à l’abri du gel.
- Les amorces et les sondes réhydratées peuvent être conservées congelées jusqu’à 24 mois.
- Les aliquotes décongelées des sondes et amorces peuvent être conservées dans l’obscurité jusqu’à 4 mois à une température de 2 à 8 °C lors d’une utilisation fréquente.
- Ne pas recongeler les aliquotes décongelées.

Tableau XII : Description des amorces et des sondes

Indicateur de séquence	Numéro de pièce	Localisation des gènes
DENV-F	SO3684	5'-UTR
DENV-R1		
DENV-R2		
DENV-P	SO3685	nSP1
CHIKV-F		
CHIKV-R		
CHIKV-P	SO3686	Gène de l’enveloppe
ZIKV-F		
ZIKV-R		
ZIKV-P	SO3687	Humain Ribonucléase P
RP-F		
RP-R		
RP-P		

❖ Contrôles des essais

- Acide nucléique extrait du virus inactivé de la dengue
- Acide nucléique extrait du virus du chikungunya inactivé
- Acide nucléique extrait du virus Zika inactivé

❖ Aucun contrôle de modèle (NTC) (non fourni)

- Eau stérile et sans nucléase
- Aliquote en petits volumes
- Utilisé pour vérifier la contamination pendant l’extraction de l’échantillon et/ou la mise en place de la plaque

❖ Contrôle de l’extraction HSC

- Le contrôle des échantillons humains doit être extrait et traité avec chaque lot d’échantillons à analyser selon la même procédure qu’avec les échantillons de patients.
- Ne pas diluer l’ARN extrait avant le test

❖ Mélange principal

Tableau XIII : Mélange réactionnel Trioplex rRT-PCR

TRIOPLEX Mélange réactionnel			
Option Multiplex		Option Singleplex	
Composant	Quantité/réaction (µL)	Composant	Quantité/réaction (µL)
Eau	N x 0.5 µL	Eau	N x 1.5 µL
2x Mélange de réaction PCR	N x 12.5 µL	2x Mélange de réaction PCR	N x 12.5 µL
Mélange DENV	N x 0.5 µL	Mélange d'apprêt/sonde (DENV, CHIKV ou ZIKV)	N x 0.5 µL
CHIKV Mélange	N x 0.5 µL		
ZIKV Mélange	N x 0.5 µL		
Mélange d'enzymes	N x 0.5 µL	Mélange d'enzymes	N x 0.5 µL
Subtotal	N x 15 µL	Subtotal	N x 15 µL
Exemple d'ARN	10 µL	Exemple d'ARN	10 µL (par tube de réaction)
TOTAL	25 µL	TOTAL	25 µL

Tableau XIV: Mélange réactionnel RP PCR

Mélange de réactions de contrôle interne RP	
Composant	Quantité/réaction (µL)
Eau	1,5 µL
2x Mélange de réaction PCR	12,5 µL
Mélange RP	0,5 µL
Mélange d'enzymes	0,5 µL
Subtotal	15µL
Exemple d'ARN	10 µL
TOTAL	25 µL

h. Configuration de la plaque PCR

1. Dans la hotte propre de la salle de configuration des réactifs, tout en maintenant la plaque de PCR sur de la glace (ou un bloc froid), ajoutez 15 µL de mélange réactionnel à tous les puits utilisés.
2. Avant de déplacer la plaque vers la zone de manipulation des acides nucléiques, ajoutez 10 µL d'eau exempte de nucléases dans les puits NTC ;
3. Appliquer de manière lâche des bouchons de bandes optiques ou du ruban optique sur le dessus des puits de réaction et déplacez la plaque vers la zone de manipulation des acides nucléiques sur un bloc froid ou de la glace.

4. Retirer les capuchons de bande optique ou la bande optique et ajoutez 10 µL d'ARN extrait à chaque puits d'échantillon correspondant. Modifiez les conseils après chaque ajout d'échantillon.
5. Ajouter 10 µL de témoin positif DENV-1-4, témoin positif CHIKV, témoin positif ZIKV et HSC (contrôle positif RP) pour séparer les puits comme indiqué dans le tableau

Tableau XV: Exemple de disposition de plaque Trioplex rRT-PCR pour 3 échantillons (option multiplex)

Mise en page Master mix

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
U	Trioplex	Trioplex	Trioplex	Trioplex	Trioplex							
B	RP	RP	RP	RP	RP							
C												
D												
E												Trioplex
F												Trioplex
G												Trioplex
H												

Mise en page du modèle

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S2	S3	Le	H2O NTC							
B	S1	S2	S3	Le	H2O NTC							
C												
D												
E												DENV PC
F												CHIKV PC
G												ZIKV PC
H												

Contrôles positifs : E12-H12

6. Plaque d'étanchéité avec ruban optique ou capuchons et plaque de charge sur l'instrument de PCR en temps réel Applied Biosystems 7500 Fast Dx.
- h. **Exécution de la PCR**
- i. **Analyse des données**

Une fois l'exécution terminée, sauvegardez et analysez les données en suivant les instructions du fabricant de l'instrument. Bien que certaines versions du logiciel pour l'AB 7500 Fast Dx et le QSDx puissent sembler similaires, les fichiers de données ne sont pas compatibles entre eux. Suivez le même guide d'analyse des données pour les deux instruments. Les analyses doivent être effectuées séparément pour chaque cible à l'aide

d'un seuil manuel. Les seuils doivent être ajustés pour se situer au début de la phase exponentielle des courbes de fluorescence et au-dessus de tout signal de fond. La procédure choisie pour fixer le seuil devrait être utilisée de manière cohérente. Les résultats de la valeur CT sont affichés dans l'onglet Rapport du logiciel AB 7500 Fast Dx ou dans l'onglet Table des puits du logiciel QSDx. Les résultats finaux peuvent être exportés depuis l'AB 7500 Fast Dx sous forme de fichier *.csv ou en les copiant et collant depuis l'écran QSDx Well Table dans une feuille de calcul.

j. **Interprétation des résultats des tests**

➤ **Détermination de la validité du test**

Pour qu'un test soit valide, les contrôles doivent donner les résultats attendus :

- Les contrôles (acide nucléique extrait du DENV, du CHIKV et du ZIKV inactivés) doivent être positifs et se situer dans la plage de valeurs C_T attendue.
- Les CNT devraient être négatives.
- HSC (contrôle d'extraction) doit être :
 - Positif avec l'amorce / sonde RP réglée en raison de l'ADN humain dans le HSC
 - Négatif avec des ensembles d'amorces / sondes virales. Un résultat positif avec le CSH et l'amorce/sonde virale indiquerait qu'il y a eu contamination croisée.
- Le test RP pour chaque échantillon doit être **positif**.
 - Si le test RP pour un échantillon est *négatif* et que les tests Trioplex rRT-PCR sont tous *négatifs* pour les échantillons à analyser :
Suivez les instructions ci-dessous :

Tous les types de spécimens

1. Répéter le test rRT-PCR de l'échantillon en utilisant le test RP et Trioplex.

 2. Extraction répétée à partir d'une nouvelle aliquote d'échantillon si le test RP est *négatif* pour les échantillons après des essais répétés.

 3. Après une extraction répétée et un test rRT-PCR répété, si DENV, CHIKV et / ou ZIKV est positif, considérez le résultat comme un vrai *positif* et continuez à suivre l'algorithme de test.

 4. Si vous n'êtes pas en mesure de résoudre les résultats d'un échantillon, testez d'autres échantillons du patient, s'ils sont disponibles, ou demandez le prélèvement d'échantillons supplémentaires.

 5. Signaler le résultat comme *non concluant* au bureau du programme LRN. Les laboratoires membres du LRN doivent produire des rapports via LRN Results Messenger ou l'intégration LIMS.
-

○ Si le test RP pour un échantillon est *négatif*, mais que DENV, CHIKV et/ou ZIKV est *positif* pour les échantillons de test :

- Ne répétez pas le test rRT-PCR et considérez les résultats du Trioplex rRT-PCR valides.

Si tous les contrôles ont été effectués de manière appropriée, procéder à l'analyse de chaque cible.

- Les vrais positifs devraient produire des courbes exponentielles avec des phases logarithmiques, linéaires et de plateau.

(Remarque : les positifs faibles produiront des valeurs C_T élevées qui sont parfois dépourvues d'une phase de plateau ; cependant, le graphique exponentiel sera vu.)

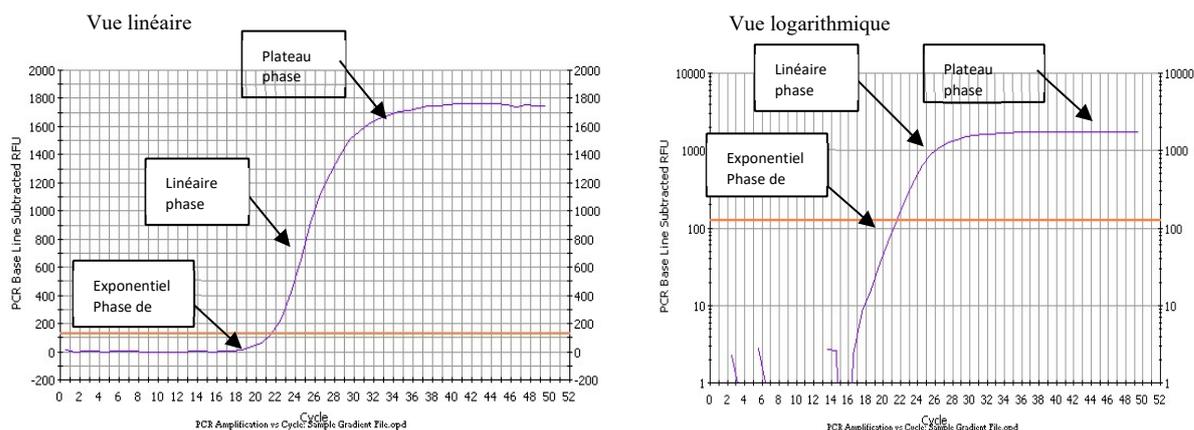


Figure 19: Vues linéaires et logarithmiques des courbes PCR en notant chaque étape des diagrammes d'amplification.

- Pour qu'un échantillon soit vraiment positif, la courbe doit franchir le seuil. Il ne doit PAS franchir le seuil puis replonger en dessous du seuil.

Les échantillons contenant de fortes concentrations d'ARN pourraient générer des courbes d'amplification atypiques qui commencent à croître exponentiellement aux premiers cycles ($C_T < 12$) et présentent des modèles atypiques.

Instructions pour l'interprétation des spécimens

Le résultat généré pour un jeu d'amorces et de sondes est interprété comme positif si la réaction génère une courbe de croissance de fluorescence qui franchit le seuil dans ($<$) 38 cycles.

Le résultat généré pour un jeu d'amorces et de sondes est interprété comme négatif si :

- La réaction génère une courbe de croissance de fluorescence qui franchit le seuil à (\geq) 38 cycles, ou
- La réaction ne parvient pas à générer une courbe de croissance de fluorescence qui franchit le seuil.

Tableau XVI : Instructions d'interprétation et de déclaration de la rRT-PCR Trioplex pour le sang total, le plasma, le sérum et le LCR

Spécimens

ZIKV	DENV	CHIKV	RP	Interprétation
-	-	-	+	Négatif
-	-	-	-	Peu concluant
-	+	-	+/-	Positif pour DENV, mais négatif pour ZIKV et CHIKV.
-	-	+	+/-	Positif pour le CHIKV, mais négatif pour le ZIKV et le DENV.
+	-	-	+/-	Positif pour le ZIKV, mais négatif pour le DENV et le CHIKV.
-	+	+	+/-	Positif pour le DENV et le CHIKV, mais négatif pour le ZIKV.
+	+	-	+/-	Positif pour le ZIKV et DENV, mais négatif pour CHIKV
+	-	+	+/-	Positif pour le ZIKV et CHIKV, mais négatif pour DENV
+	+	+	+/-	Positif pour ZIKV, DENV et CHIKV



Figure 20: Courbe de RT-PCR des échantillons positifs ou équivoques par sérologie

La ligne horizontale représente notre ligne de seuil. Chaque courbe représente la courbe d'amplification des échantillons testés. Toute courbe dépassant cette ligne donne une valeur de seuil du cycle (Ct). Nous voyons qu'une seule courbe dépasse cette ligne et elle représente la courbe d'amplification du contrôle positif du ZIKV du kit Trioplex rRT-PCR.

Annexe 4 : Technique des frottis sanguins

a. Principe :

C'est une technique de concentration permettant un repérage rapide des parasites dans le sang (goutte épaisse) et l'identification des différentes espèces (frottis sanguin).

b. Matériel :

Deux (2) lames porte-objet propres et bien dégraissées, vaccinostyle stérile, alcool 70°, colorant de Giemsa pur, coton hydrophile sec, eau tamponnée (PH=7,2), boîte à lames, chiffon de coton propre, crayon noir à mine grasse ou marqueur indélébile, stylo à bille, bacs de coloration, éprouvette graduées, râtelier, chronomètre, huile d'immersion, registre ou formulaire de notification, un compteur manuel et gant.

c. Site du prélèvement :

Face latérale à l'extrémité d'un doigt (en général gauche, 3e doigt après le pouce), sur le lobe de l'oreille après avoir réchauffé avec les doigts, au niveau du talon ou gros orteil chez le nourrisson.

d. Réalisation de la goutte épaisse :

Après avoir noté les renseignements relatifs sur le formulaire ou le registre approprié, ainsi que l'identité du patient sur la lame, réaliser la goutte comme suite :

- En tenant la main gauche du malade la paume tournée vers le haut, choisir le troisième doigt après le pouce (le gros orteil peut être utilisé chez les nourrissons. Le pouce ne doit jamais être utilisé chez les adultes ou les enfants) ;
- Avec un tampon de coton légèrement imbibé d'alcool, nettoyer le doigt en appuyant fermement pour enlever la saleté et la graisse du bout du doigt ;
- Avec le chiffon de coton propre, essuyer le doigt en appuyant fermement pour stimuler la circulation du sang ;
- Avec un vaccinostyle stérile, piquer le bout du doigt d'un seul geste ;
- Essuyer la première goutte de sang avec du coton sec. S'assurer qu'il ne reste pas de fibres de coton sur le doigt, qui pourraient se mélanger au sang ;
- Appuyer doucement sur le doigt et recueillir une petite goutte de sang au milieu de la lame.

- Essuyer le sang restant sur le bout du doigt avec un tampon de coton ;
- Tenir la lame supérieure par les bords ;
- Placer le coin de l'autre lame au centre de la goutte de sang ;
- Étendre légèrement la surface de la goutte par des mouvements spiralés appuyés de la lame.
- Assurer cette défibrination mécanique pendant quelques secondes et étendre la goutte sur environ 1 cm de diamètre ;
- Laisser la préparation à plat, à l'abri de la poussière, de la chaleur et des mouches pendant deux heures en zone sahélienne. Respecter ce long temps de séchage sinon il y a risque de décollement de la préparation lors de la coloration.

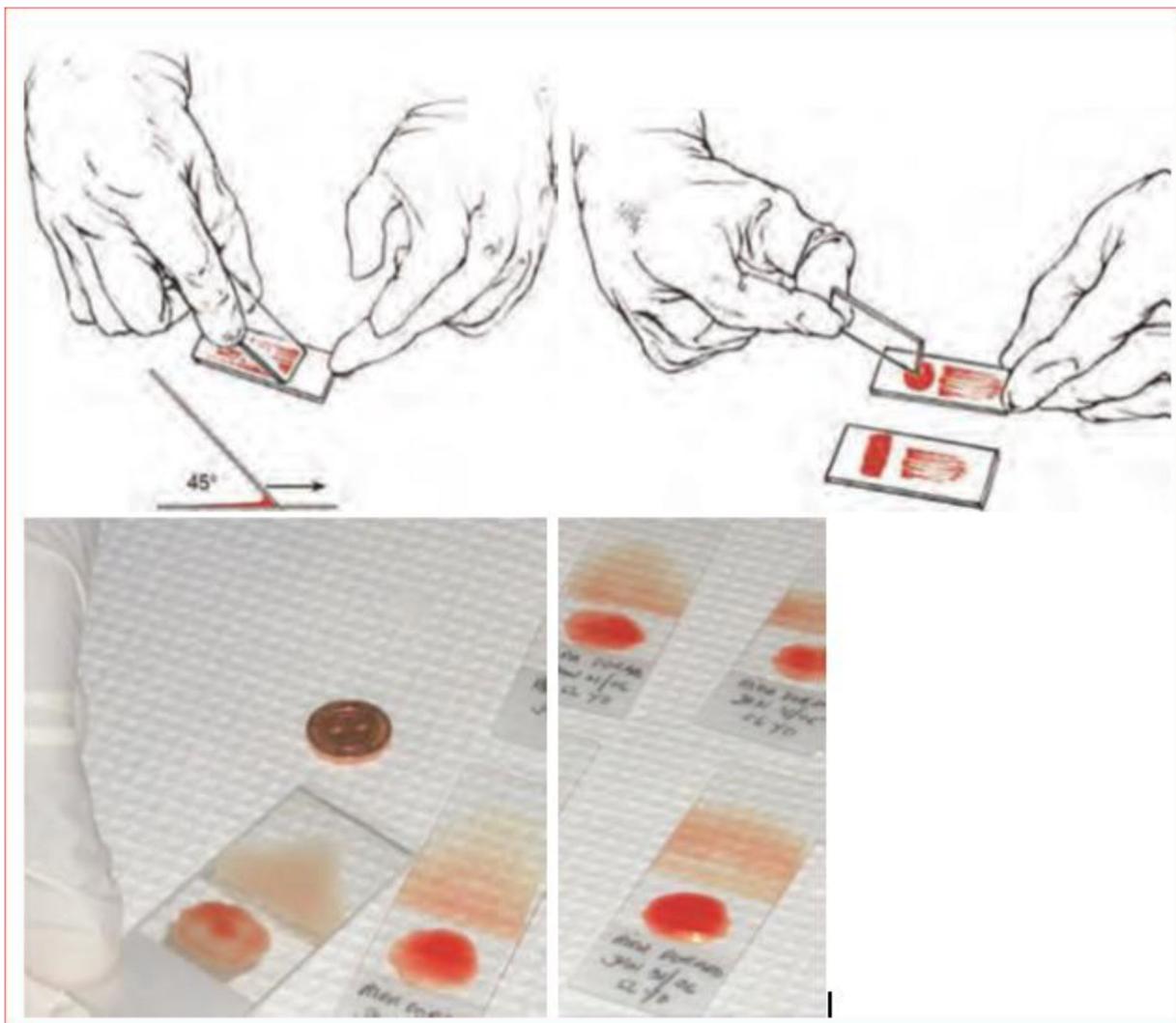


Figure 21: Technique de la goutte épaisse et du frottis mince

Source: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/164472/9789242547825_fre.pdf/

e. Coloration au Giemsa

C'est une méthode de coloration classique employée en routine pour la coloration des étalements sanguins et pour le diagnostic du paludisme.

Toujours maintenir la bouteille bien fermée dans un endroit frais, à l'abri de la lumière solaire directe. Les bouteilles en verre blanc peuvent être recouvertes d'une enveloppe de papier noir épais pour les protéger de la lumière.

- Fixer le frottis mince en le tapotant doucement avec un tampon de coton imbibé de méthanol, ou en le trempant dans un récipient de méthanol pendant quelques secondes.
- Préparer la solution de Giemsa à 3 ou 5 dans l'eau tamponnée (pH 7,2) et bien mélanger le colorant ;
- Verser doucement le colorant dans la bague jusqu'à ce que la lame soit entièrement recouverte ;
- Laisser colorer pendant 30 à 45 mn pour 30 (15mn pour 10), à l'abri de la lumière solaire et de la poussière ;
- Les lames sont ensuite rincées et séchées sur un râtelier.

f. Aspects

La lecture se fait au microscope à l'objectif 100 à l'huile d'immersion

- Le fond doit être propre, exempt de débris, coloré en bleu ;
- Les noyaux des leucocytes sont en violet foncé ;
- Les parasites du paludisme sont bien définis, avec une chromatine rouge foncé et un cytoplasme bleu pâle. Dans les infections à *P. vivax* et *P. ovale*, on peut voir un semis de granulations de Schuffner dans le fantôme de l'érythrocyte hôte, en particulier sur les bords du frottis.

g. Méthodes de numération des parasites du paludisme dans les gouttes épaisses :

On trouvera ci-dessous une méthode pratique de précision suffisante. Elle consiste à dénombrer les parasites par μl de sang dans un frottis épais, par rapport à un nombre prédéterminé de leucocytes. On prend comme norme une moyenne de 7 500 leucocytes par μl de sang Malgré l'imprécision due aux variations du nombre de leucocytes parmi des personnes en bonne santé

et aux variations encore plus grandes observées chez les malades, cette valeur permet des comparaisons valables. Avant de commencer à compter, on examinera l'équivalent de 0,25gr de sang (environ 100 champs, avec un oculaire 7 X (ou 10X) et un objectif à immersion dans l'huile 100X) dans le frottis épais pour déterminer l'espèce de parasite et les stades présents. Ensuite, on appliquera la méthode suivante qui convient pour les frottis positifs :

1. Un compteur manuel à 4 chiffres est nécessaire pour dénombrer séparément les parasites et les leucocytes.

2. a) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié 10 parasites ou plus, noter les résultats sur le formulaire de notification, en indiquant le nombre de parasites par 300 leucocytes.

b) Si, après avoir compté 300 leucocytes, on a identifié neuf parasites ou moins, continuer de compter jusqu'à 500 leucocytes et noter le nombre de parasites par 500 leucocytes.

3. Dans chaque cas, le nombre de parasites par rapport au nombre de leucocytes peut être converti en nombre de parasites par μ par la simple formule mathématique suivante :

$$\frac{\text{Nombre de parasites} \times 7\,500}{\text{Nombre de leucocytes}} = \text{parasites par } \mu\text{l}$$

10. SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres 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 !