



UNIVERSITE DES SCIENCES DES TECHNIQUES ET DES
TECHNOLOGIES DE BAMAKO
FACULTE DE PHARMACIE(FAPH)



ANNEE UNIVERSITAIRE 2023-2024

N°.....

THEME

Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali

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

Par :

M. AMIDOU DIARRA

Pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

Jury :

Président : M. Ibréhima Guindo, Maître de Conférences agrégé (FAPH)

Directeur : M. Antoine Dara, Maître de Conférences agrégé (FAPH)

Membres : M. Yacouba Cissoko, Maître de Conférences agrégé (FMOS)

Mme. Aminatou Koné, Maître de Conférences (FAPH)

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

Ma très chère mère Feu Satou Traoré,

Prématurément arrachée à notre affection, je retiens de vous une femme battante, dévouée et avec d'excellents caractères. L'éducation et les principes moraux que vous m'avez inculqués continuent de guider mes pas jusqu'à ce jour. Par-dessus tout, les sacrifices que vous avez consentis pour assurer mon bien-être n'auraient pas été vains. Vous n'avez pas cessé de nous aimer durant toute votre vie, même pendant les moments les plus pénibles de votre existence. Je vous remercie pour cet amour inconditionnel, votre tendresse indéfectible et vos prières.

Mon très cher père Mamadou Diarra,

Papa, je vous remercie d'avoir toujours cru en moi, cette confiance a été ma source d'inspiration tout au long de mes études. Dans une contrée où envoyer ses enfants à l'école était considéré comme un gaspillage de bras-valide, vous avez été l'un des rares parents à braver ce tabou populaire en scolarisant presque tous les vôtres. En outre, vous n'avez ménagé aucun effort pour assurer nos réussites scolaires : Je vous en serai éternellement reconnaissant. J'espère vous avoir honoré à travers ce travail. Que Dieu le Tout- Puissant vous donne santé, longévité et satisfaction vis-à-vis de toutes vos progénitures.

Mes frères et sœurs,

La fraternité n'a pas de prix, comme on le dit. J'espère qu'elle restera toujours un lien sacré pour nous. Trouvez tous ici l'expression de mon fraternel amour ! Ce travail est tout à fait à votre honneur ! Puissions-nous demeurer unis par la Grace de Dieu !

Remerciements

Nos remerciements vont à l'endroit de :

Mr Noumou Yakhoubou Keita, bio technologiste de formation. Il n'est jamais trop assez pour vous remercier de par votre gentillesse, votre courtoisie et votre esprit de collaboration. Vous avez toujours été là à mes côtés du début jusqu'à la fin de ce travail. Sachez que je suis profondément touché par votre service rendu durant ce travail.

Docteur Aladji Dicko, Pharmacien. Je vous remercie pour vos conseils, vos enseignements, votre rigueur dans le travail. Sachant profiter de votre bonne volonté, j'ai pu comprendre beaucoup de choses en ce qui concerne les logiciels et le traitement des données.

Je tiens à remercier également :

Tous les autres membres de ma famille et plus précisément à mon oncle Dramane Diarra. Je tiens à vous remercier pour votre hospitalité et vos conseils qui m'ont orienté vers la réussite.

Tous les autres membres de l'unité de virologie de l'INSP. Merci pour vos conseils, vos encouragements, votre disponibilité, ainsi que vos contributions lors de la rédaction et les manipulations pendant ce travail.

Toute l'équipe de la Pharmacie KAHIRA sise à Yirimadio 700 Logement.

Merci pour vos encouragements, vos conseils, votre patience, et surtout le temps accordé pour la réalisation de ce travail.

Hommages aux membres du jury



❖ **A notre maître et Président de jury** Professeur Ibréhima GUINDO

- ✓ Docteur en Pharmacie,
- ✓ PhD en Bactériologie et Virologie
- ✓ Maître de Conférences agrégé en Bactériologie et virologie à la Faculté de Pharmacie
- ✓ Directeur Général de l'Institut National en Santé Publique (INSP)
- ✓ Point focal de la résistance aux antimicrobiens au Mali

Cher maître,

C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Votre qualité d'homme de science, votre simplicité et votre rigueur dans le travail bien fait sont des qualités que nous apprécions chez vous. Recevez ici, l'expression de nos sentiments de profonde gratitude.

❖ **A notre maître et Directeur de thèse Professeur Antoine DARA**

- ✓ Docteur en Pharmacie,
- ✓ PhD en Microbiologie Moléculaire et Immunologie
- ✓ Maître de Conférences agrégé en Biologie Moléculaire à la Faculté de Pharmacie,
- ✓ Responsable du laboratoire de génomique au MRTC-Parasitologie

Cher maître,

Nous sommes très honorés de vous avoir comme directeur de thèse. Nous sommes fiers d'avoir bénéficié de votre formation.

Professeur, nous vous envions et souhaiterions suivre vos pas, bien que difficile.

Vous nous avez impressionnés tout au long de ces années d'apprentissage : par la qualité de votre pédagogie, l'humilité, disponibilité dont vous faites preuve.

C'est un grand honneur et une grande fierté pour nous d'être compté parmi vos élèves. Nous, vous prions cher maître, d'accepter nos sincères remerciements.

❖ **A notre maître et Membre du jury Professeur Yacouba CISSOKO**

- ✓ Médecin spécialiste des Maladies Infectieuses et Tropicales ;
- ✓ Praticien hospitalier au CHU du Point G ;
- ✓ Titulaire d'un master en immunologie ;
- ✓ Maître de Conférences agrégé en Infectiologie ;
- ✓ Membre de la Société Ouest Africaine des Médecins (WACP).

Cher maître,

Nous avons l'honneur et le privilège de vous avoir parmi les juges de ce travail.

Votre disponibilité, votre abord facile, votre serviabilité et votre modestie nous ont particulièrement marqué.

Veillez trouver ici l'expression de toute notre reconnaissance et de notre gratitude.

❖ **A notre maître et Membre du jury Professeur Aminatou KONE**

- ✓ PhD en Sciences Médicales ;
- ✓ Enseignante Chercheuse à la Faculté de Pharmacie ;
- ✓ Maître de conférences en Biologie moléculaire.

Cher maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Nous avons été impressionnés par votre modestie, votre sympathie mais surtout votre rigueur dans le travail bien fait.

Trouver ici cher maître l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

Liste des abréviations

A	Adénine
ECA-2	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine 2
Ac	Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ag	Antigène
ARN	Acide Ribonucléique
ARNt	ARN de Transfert
ATP	Adénosine Triphosphate
C	Cytosine
COVID-19	Maladie Coronavirus de 2019
CTD	Domaine C-Terminal
CTL	Control de liaison
dATP	Désoxyadénosine Triphosphate
dTTP	Désoxythymidine Triphosphate
dCTP	Désoxycytidine Triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine Triphosphate
ddATP	Didesoxyadenosine Triphosphate
ddTTP	Didesoxythymidine Triphosphate
ddCTP	Didesoxycytidine Triphosphate
ddGTP	Didesoxyguanosine Triphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DMV	Double Membrane Vesicul (Vésicule Double Membrane)
dNTP	Dinucleotide Triphosphate
CEMC	Centre Européen des maladies et de control
TE	Tampon d'élution
EP	Embolie Pulmonaire
ETOH	Ethanol
FC	Flow Cell
FDA	Food and Drug Administration (administration des aliments et médicaments)
g	Gramme

Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali

G	Guanine
GISAID	Initiative Global pour le Partage des Données de Virus Influenza
HCoV-229 E	Coronavirus Humain-229E
HCoV-OC43	Culture d'organe de Coronavirus Humain 43
HCoV-NL63	Netherland Coronavirus Humain 63
HCoV-HKU1	Coronavirus Humain de l'Université 1 de Hong Kong
HT1	Tampon d'hybridation
IgA	Immunoglobuline A
IgM	Immunoglobuline M
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
IF	Interféron
INSP	Institut National de Santé Publique
L	Litre
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
MIL	Mix de liaison
MERS-CoV	Coronavirus du Syndrome Respiratoire Du Moyen-Orient
Min	Minute
mM	Milli-Molaire
ml	Millilitre
MVTE	Maladie Veineuse Thromboembolique
NaOH	Hydroxyde de Sodium
Ng	Nano gramme
nM	Nano-Molaire
Nsp	Protéine Non Structurale
NTD	Domaine N Terminal
OMS	Organisation Mondiale de La Santé
ORF	Open Reading Fragment (Cadre de lecture ouvert)
Pb	Paire de Base
PCR	Polymérase Chain Reaction (Réaction en chaine par polymérisation)
PIB	Produit Intérieur Brut
MMP	Master Mix de PCR
PP1a	Polyprotéine 1 A

Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali

PP1ab	Polyprotéine 1ab
MA	Mix d'amorces de PCR
PM	Poids Moléculaire
DLR	Domaine de liaison des Récepteurs
rRNA	ARN Ribosomal
TS	Température de la salle
RT-LAMP	Reverse Transcription et Amplification isotherme en boucle
RT-PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne en Temps Réel
SBS	Séquençage par Synthèse
SDRA	Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme Seul Nucleotide)
SARS-CoV	Coronavirus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
SARS-CoV-2	Coronavirus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère 2
STL	Stop Tampon Lysis (Tampon d'arrêt de la liaison)
TAAN	Tests d'Amplification des Acides Nucléiques
TDR	Tests de Diagnostic Rapide
TNF	Tumor Necrosis Factor (Facteurs de tumeurs nécrosés)
TVP	Thrombose Veineuse Profonde
TMPRSS2	Protéase Transmembranaire de Type Serine
Tr	Tour
Ug	Microgramme
µl	Microlitre
USI	Unité de Soins Intensifs
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des matières

Liste des tableaux	XIV
Liste des figures	XV
I. Introduction	1
I. Objectifs	2
1. Objectif général	2
2. Objectifs spécifiques	2
2.1. Décrire les caractéristiques sociodémographiques des individus positifs à COVID-19 ;	2
2.2. Identifier les types de variants circulant au Mali pendant la vague 5 par séquençage ;	2
2.3. Décrire la distribution temporo-spatiale des variants circulants au Mali pendant la vague 5 ;.....	2
2.4. Décrire la fréquence des mutations chez les individus positifs à COVID-19.....	2
II. Généralités	3
1. Historique et épidémiologie	3
1.1. Historique	3
1.2. Epidémiologie : transmission et circulation	5
2. Structure et organisation du génome du SARS-CoV-2	6
3. Classification des coronavirus	8
4. Cycle de réplication virale des coronavirus	10
5. Mode de transmission de la maladie	11
6. Mécanismes de pathogénicité de la maladie	12
7. Manifestations cliniques	13
8. Diagnostic des infections au coronavirus	14
8.1. Diagnostic clinique	14
8.2. Diagnostic biologique	14
8.2.1. Diagnostic biologique direct	17
8.2.2. Diagnostic indirect	19
8.2.3. Séquençage	23
8.2.3.1. Méthode de Maxam & Gilbert (1977)	23
8.2.3.2. Méthode de Sanger	24
8.2.3.3. Séquençage de nouvelle génération (next-generation sequencing, NGS) et de troisième génération (third generation sequencing, TGS)	26
8.2.3.4. Les séquenceurs capillaires	28
8.2.3.5. Le pyroséquençage: Méthode non sanger de séquençage	28

9. Prise en charge de la maladie à coronavirus	29
10. Mode Prévention	31
10.1. Les mesures barrières	31
10.2. Vaccins	32
11. Diversité génétique	34
12. Les variants	35
III. Méthodologie	37
1. Site d'étude	37
2. Type et Période	38
3. Population d'étude	38
4. Echantillonnage	38
5. Critère d'inclusion	38
6. Critère de non inclusion	38
7. Procédure de l'étude et données sociodémographiques	38
7.1- Méthode de collecte et acheminement au laboratoire	38
7.2- Données sociodémographiques	39
7.2.1- Données cliniques	39
7.2.2- Données biologiques	39
7.2.3- Prélèvement	39
7.2.4- Extraction de l'acide nucléique	39
7.2.5. Détection moléculaire	39
7.2.6- Séquençage du génome entier	40
8. Analyse biostatistique des séquences ?	43
9. Aspects éthiques	43
IV. Résultats	44
1. Répartition des participants en fonction des caractères sociodémographiques	45
2. Séquençage du génome	47
3. Profils de mutations	49
V. Commentaires et discussions	52
1. Répartition des participants en fonction des caractères sociodémographiques	52
2. Distribution des variants	52
3. L'impact des mutations sur les stratégies de contrôle	53
4. Limites	54
Conclusion	55
VI. Recommandations	56

VII. Références	57
VIII. Annexes	60

Liste des tableaux

Tableau I: Liste des vaccins homologués par l’OMS. 34

Tableau II: Répartition des participants en fonction de l’âge. 45

Tableau III: Répartition des participants en fonction de la profession. 46

Tableau IV: Répartition des participants en fonction de la résidence 46

Tableau V: Répartition des échantillons en fonction des clades. 48

Tableau VI: Répartition des échantillons en fonction des sous lignées. 47

Tableau VII: Préparez les plaques pour le traitement conformément au tableau suivant. 64

Tableau VIII: Préparation de Binding Bead 64

Tableau IX: Programme la Cours méthode comme suit 70

Liste des figures

Figure 1: Spectre d’hôtes des différentes espèces de coronavirus	5
Figure 2: Structure du virus SARS-CoV-2	7
Figure 3: Organisation du génome des coronavirus	8
Figure 4: Classification et taxonomie des coronavirus humains	9
Figure 5: Arbre phylogénétique construit à partir de 51 génomes complets de coronavirus (Cov) par la méthode de Neighbour-joining (plus proche voisin)	10
Figure 6: Cycle de réplication du SARS-CoV-2	11
Figure 7: Schéma illustrant la transmission des coronavirus	12
Figure 8: Cinétique des marqueurs diagnostiques en fonction du stade de l’infection	14
Figure 9: Coupe sagittale des voies aériennes supérieures illustrant les modalités de réalisation d’un prélèvement rhino-pharyngé avec un écouvillon.	15
Figure 10: Présentation du triple emballage.	17
Figure 11: Le niveau approximatif d'anticorps IgM et IgG générés contre le SARS-CoV-2 à différentes semaines après l'infection.	21
Figure 12: Illustration schématique des tests sérologiques pour le diagnostic COVID-19.	22
Figure 13: Schéma illustrant les étapes de séquençage de Maxam et Gilbert.	24
Figure 14: Séquençage par la méthode de Sanger.	25
Figure 15: Illustration des étapes du séquençage du matériel génétique.	26
Figure 16: Brin d’ADN fragmenté	27
Figure 17: Principe de fonctionnement de la Technologie Nanopore.	28
Figure 18: Illustration des mutations les plus fréquentes de SARS-CoV-2.	35
Figure 19: Répartition des participants en fonction du sexe.	45
Figure 20: Répartition des variants en fonction du Mois.	47
Figure 21: Répartition des participants en fonction de la résidence.	48
Figure 22: Arbre phylogénétique de distribution des mutations.	49
Figure 23: Fréquence des mutations sur différentes régions.	50
Figure 24: Les mutations les plus fréquentes sur le gène S.	50
Figure 25: Fréquence des mutations.	51
Figure 26: Kit d’extraction QIAGEN.	62
Figure 27: Kit d’amplification TaqPath	70

I. Introduction

La maladie à coronavirus de 2019 (en anglais coronavirus disease 2019) ou COVID-19 est une affection des voies respiratoires supérieures et inférieures causée par un virus de la famille Coronaviridae. Ce nouveau coronavirus (2019-nCoV), appelé encore le SARS-CoV-2 par le Comité international de taxonomie virale (ICTV) [3], appartenant à la famille Coronaviridae du genre β etacoronavirus a été transmis à l'homme probablement par le pangolin, sur un marché de fruits de mer à Wuhan, dans la province du Hubei, en Chine, en décembre 2019 [4]. La découverte de cette pneumonie d'étiologie inconnue a poussé les chercheurs chinois à isoler rapidement l'agent pathogène en janvier 2020.

A cause de la rapidité de la transmission interhumaine, cette maladie a causé une pandémie dans le monde. L'OMS a nommé, le 11 février, la maladie respiratoire provoquée par le SARS-CoV-2 : le COVID-19. Elle est considérée comme urgence de sante publique a portée internationale. Le COVID-19 a commencé en décembre 2019 et s'est répandu très rapidement partout dans le monde surtout à travers les voyages. Il a fallu seulement environs deux mois pour qu'il se retrouve au Mali ici. C'est au 25 Mars 2020 que le Mali a enregistré son premier cas de Coronavirus. Dès lors le nombre de cas ne faisait que grimper du jour au jour et de façon exponentielle.

A l'échelle mondiale 775 552 191 cas ont été confirmé par l'OMS le 12 juin 2024 avec 7 050 201 décès [5]. Au 29 Février 2024, selon le Centre Africain de Contrôle et de Prévention des maladies, en Afrique il y'a eu 12 553 199 cas cumulés et un total de 259 265 décès. Selon le ministère de la santé le Mali comptait au total 33 164 cas positif de COVID-19 avec 743 décès en juin 2024. Du début de COVID-19 à nos jours il y'a eu cinq (5) vagues de contamination de Coronavirus avec des variants qui diffèrent par le nombre de mutations associées soit à un échappement au système immunitaire, une augmentation d'affinité du virus pour les récepteurs ACE2 ou un échappement aux anticorps monoclonaux contenus dans les vaccins. Après la première vague de contamination le Mali a bénéficié d'un certain nombre de vaccins contre cette maladie à savoir le vaccin COVID-19 Jansen, Pfizer-BioNtech et Astra Zeneca.

La surveillance génomique a permis de détecter plusieurs variants durant les vagues précédentes. Selon les séquences déposées dans la base de données GISAID il y'a eu des études sur les quatre premières vagues (vague 1, vague2, vague 3 et vague 4) qui ont fourni comme résultat les variants Alpha, Beta, Gamma et Delta.

Mais il n'y a pas eu d'études sur la cinquième vague selon les données déposées dans la base de données GISAID pour voir si c'est le même variant que pour la quatrième vague, ou même pour enquêter sur les éventuelles mutations et l'efficacité des vaccins sur ces variants. Donc pour pouvoir identifier les variants associés à cette vague nous allons réaliser la technologie NGS (*Next generation sequencing*) ou séquençage de nouvelle génération en français qui est une technique extrêmement sophistiquée qui permet de séquencer l'ensemble du génome et d'identifier les différentes modifications génétiques sur le génome du virus et par conséquent identifier les variants associés à cette vague.

Question de recherche

Quels sont les variants qui circulaient au Mali pendant la cinquième vague ?

Hypothèse de recherche

Le variant Omicron du SARS-CoV-2 circulaient au Mali pendant la cinquième vague.

I. Objectifs

1. Objectif général

Caractériser la distribution des variants de SARS-CoV-2 durant la cinquième vague.

2. Objectifs spécifiques

- 2.1. Décrire les caractéristiques sociodémographiques des individus positifs à COVID-19 ;
- 2.2. Identifier les types de variants circulant au Mali pendant la vague 5 par séquençage ;
- 2.3. Décrire la distribution temporo-spatiale des variants circulants au Mali pendant la vague 5 ;
- 2.4. Décrire la fréquence des mutations chez les individus positifs à COVID-19.

II. Généralités

1. Historique et épidémiologie

1.1. Historique

Le genre « coronavirus » a été identifié en 1967 et a regroupé à partir de critères essentiellement morphologiques des virus animaux connus depuis les années 1930.

Ce virus donne l'aspect d'une couronne en microscopie électronique d'où le nom coronavirus. Selon la taxonomie virale ce virus appartient à l'ordre des Nidovirales, créé en 1996 et regroupant trois familles, les Coronaviridae, les Arteriviridae, et les Roniviridae.

Tous ces virus partagent des points communs tels que l'organisation du génome ARN et la stratégie de réplication, mais ils diffèrent dans leur morphologie, la structure de leur capsid, et la taille de leur génome, qui varie selon les types de virus.

La famille des Coronaviridae se divise deux genres, les coronavirus et les torovirus dont le seul genre identifiés chez l'homme est le coronavirus. Ces coronavirus ont été divisés en trois groupes distincts nommés 1, 2 et 3, sur la base de données d'abord sérologiques, puis moléculaires.

Depuis 2003 les chercheurs ont mentionné une augmentation considérable du nombre d'espèces de coronavirus et la classification s'est affinée. Les coronavirus des groupes 1 et 2 infectent les mammifères, dont l'homme contrairement au groupe 3 qui constitue un groupe de virus aviaires. La place du SARS-CoV dans cette classification a fait l'objet de débat, les différentes analyses phylogéniques proposaient soit de le placer dans un quatrième groupe, soit dans un groupe « élargi ». Finalement, cette dernière solution a été adoptée ; actuellement, le groupe 2 est subdivisé en 2a et 2b, et comprend le SARS-CoV-2 ainsi que tous les virus « SARS-CoV-like » ou SL-CoV décrits chez les différentes espèces animales.

Les coronavirus humains sont au nombre de cinq : HCoV-229E et HCoV-OC43, décrits dans les années 1960 ; le SARS-CoV, identifié en 2003 lors de l'épidémie de SARS ; HCoVNL63, décrit en 2004 aux Pays-Bas, et enfin HCoV-HKU1, découvert en 2005 à Hong-Kong.

La chronologie des événements et l'histoire font que les coronavirus 229E et OC43 sont considérés comme les coronavirus « classiques » alors que les HCoV NL63 et HKU1 sont désignés comme les « nouveaux » coronavirus. Le SARS-CoV-2 et tous les SL-CoV, forment un groupe à part, et sont à l'origine de la majorité des publications scientifiques.

Les HCoV 229E et NL63 appartiennent au groupe 1, les HCoV OC43 et HKU1 au groupe 2a, et les SARS-CoV et SL-CoV au groupe 2b. Tous ces virus ont été identifiés à partir de

prélèvements respiratoires, soit après isolement en culture, soit directement à partir des prélèvements cliniques, par biologie moléculaire. HCoV-229E a été isolé en 1966 sur cellules rénales embryonnaires humaines et a été adapté à plusieurs types de cellules, dont les MRC5, cellules largement utilisées dans les laboratoires de virologie. HCoV-OC43 a été isolé en 1967 sur culture de trachée, puis, après passages sur cerveaux de souris, à la lignée HRT18 (carcinome rectal humain) ; HCoV-NL63 (souche Amsterdam 1) a été isolé en 2004 sur la lignée LLC-MK2, le SARS-CoV-2 sur cellules Vero E6 ; seul HCoV-HKU1 à ce jour n'a jamais été isolé en culture cellulaire et a été uniquement caractérisé par biologie moléculaire. Il est important de noter qu'en dehors des souches prototypes, les coronavirus restent très difficiles à cultiver et il existe peu d'isolats. Rappelons enfin que ces virus sont des agents de classe 2, qui nécessitent un laboratoire de confinement de niveau 2 pour leur manipulation [4].

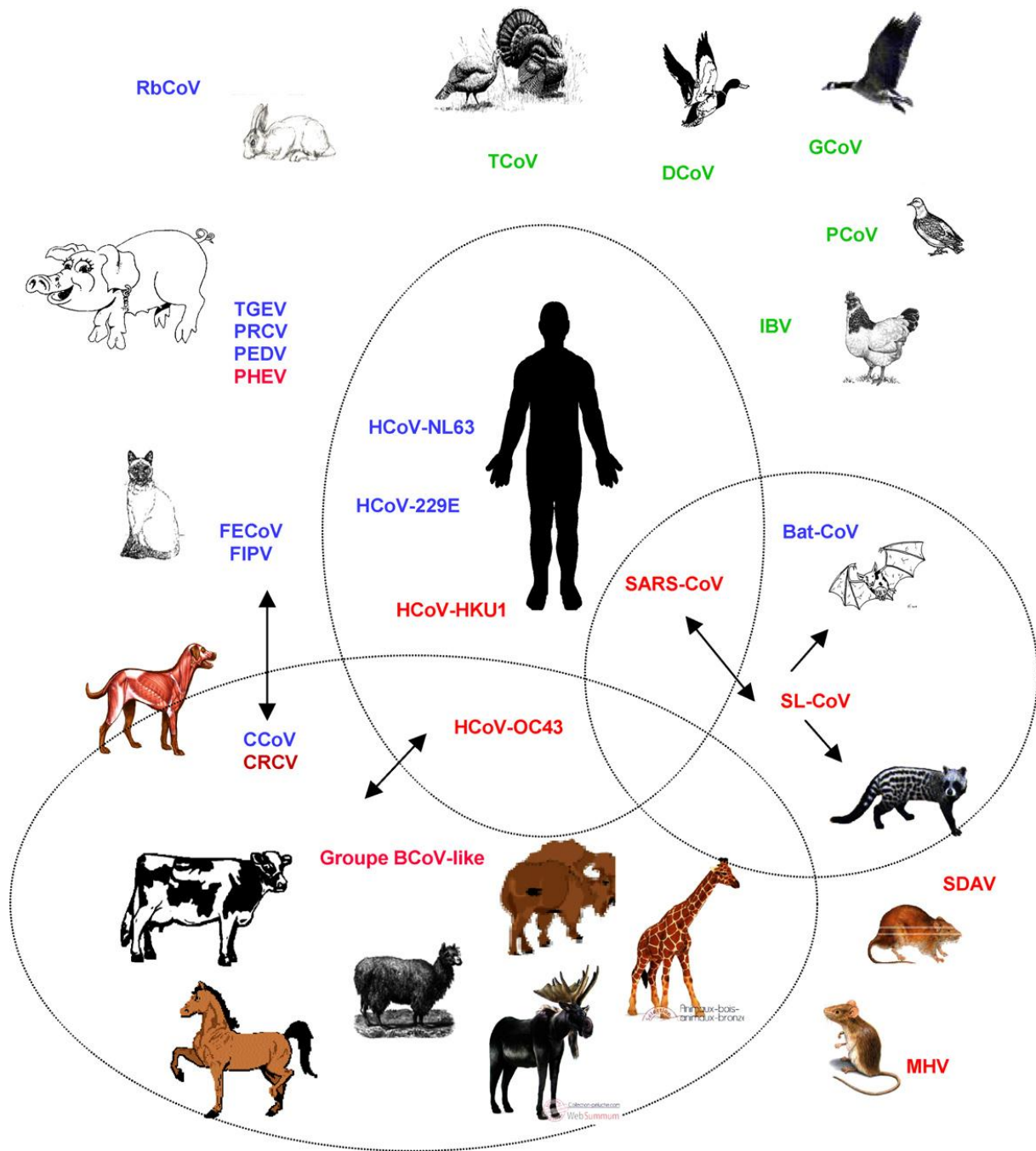


Figure 1: Spectre d'hôtes des différentes espèces de coronavirus [6].

NB : Les flèches indiquent les hypothétiques franchissements de barrières d'espèces avec réussite émergente.

1.2. Épidémiologie : transmission et circulation

La connaissance des modes de transmission constitue l'un des éléments les plus importants pour la prévention des infections respiratoires virales, et cela d'autant plus qu'il n'existe pas encore de traitement spécifique pour beaucoup d'entre elles. Les durées d'incubation des infections à coronavirus humains sont courtes : de l'ordre de trois jours pour les CoV classiques,

et de deux à dix jours pour le SARS-CoV-2. Les durées d'excrétion virale dans les voies respiratoires sont moins bien connues, l'ARN du SARS-CoV-2 est détectable pendant environ 14 jours dans les voies respiratoires.

La transmission du SARS-CoV-2 se fait principalement de façon directe par les gouttelettes de sécrétions oropharyngées dispersées par la toux d'une personne infectée et symptomatique. Au cours du SARS-CoV-2, les personnes infectées étaient essentiellement celles qui avaient eu un contact rapproché avec un cas (vie commune ou prise en charge). Le port de masque et le lavage des mains sont les mesures de prévention les plus efficaces.

La dissémination virale aérienne semble peu fréquente ainsi que la transmission indirecte « manu-portée » ; cependant, ces voies de transmission doivent être prises en compte pour le contrôle des épidémies, notamment en milieu de soins. Les études de « survie » ou de maintien de l'infectiosité dans l'air sont rares et difficiles.

Le SARS-CoV-2 perd son infectiosité au contact des désinfectants et les fixateurs communément utilisés. Ce virus est modérément contagieux, avec un nombre moyen de cas secondaires estimé de 2,2 à 3,6. Le SARS-CoV-2 constitue une histoire particulière au sein des infections à coronavirus ; cette épidémie a été particulièrement bien documentée. Elle a été divisée rétrospectivement en trois périodes décrites plus haut. La phase précoce consiste en l'émergence de plusieurs cas de pneumopathies atypiques chez des individus sans lien épidémiologique dans la province de Hubei. La phase intermédiaire débute par une épidémie nosocomiale hospitalière (106 cas secondaires à partir d'un patient index). La phase tardive correspond à la diffusion mondiale de l'épidémie à partir de l'hôtel Métropole à Hong Kong. Dans cet hôtel, un patient index contaminera 12 personnes logeant au même étage, et en transfert vers des destinations variées [7].

2. Structure et organisation du génome du SARS-CoV-2

Le SARS-CoV-2 possèdent un génome comparativement volumineux approchant 30 kb [8], c'est un virus sphérique et pléomorphe avec 80 à 160 nm de diamètre [9]. Le séquençage génétique permet la lecture des génomes viraux étant donné que chaque agent pathogène possède une séquence génomique unique, cette méthode peut être utilisée pour identifier de nouveaux agents pathogènes (comme dans le cas du SARS-CoV-2). Le génome du SARS-CoV-2 code pour des protéines non structurales, quatre protéines structurales (spicule ou « Spike » (S), enveloppe (E), membrane (M), nucléocapside (N) et plusieurs protéines accessoires putatives [10].

La protéine S est une grande protéine transmembranaire de type I [11], c'est une glycoprotéine de la surface du SARS-CoV-2 qui peut se fixer aux récepteurs cellulaires. Elle forme des homotrimères qui émergent à la surface du virus et facilite sa liaison aux cellules hôtes par attraction avec l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE2) se trouvant dans les voies respiratoires inférieures de l'homme [12].

La nucléocapside connue sous le nom de protéine N est le composant structural de la localisation du SARS-CoV-2 dans la région du réticulum endoplasmique-Golgi qui est structurellement liée au matériel génétique (acide nucléique) du virus. Parce que la protéine est liée à l'ARN, pour former une ribonucléoprotéine, elle s'implique dans les processus liés au génome viral, au cycle de réplication virale, et la réponse cellulaire des cellules hôtes aux infections virales. La protéine N est également fortement phosphorylée et elle est supposée être impliquée aux changements structuraux améliorant l'affinité pour l'ARN viral [13].

Une autre partie importante de ce virus est la membrane ou protéine M, qui est la protéine la plus structurée et joue un rôle dans la détermination de la forme de l'enveloppe du virus. Cette protéine peut se lier à toutes les autres protéines structurales. La protéine M aide à stabiliser les nucléocapsides ou les protéines N et favorise l'achèvement de l'assemblage viral en stabilisant la protéine N-ARN complexe, à l'intérieur du virion interne [13].

Le dernier composant est l'enveloppe ou protéine E qui est la plus petite protéine de la structure SARS-CoV-2 qui joue un rôle dans la production et la maturation de ce virus [14], elle aide à l'assemblage des virions et comprend les actions des canaux ioniques (Figure 2).

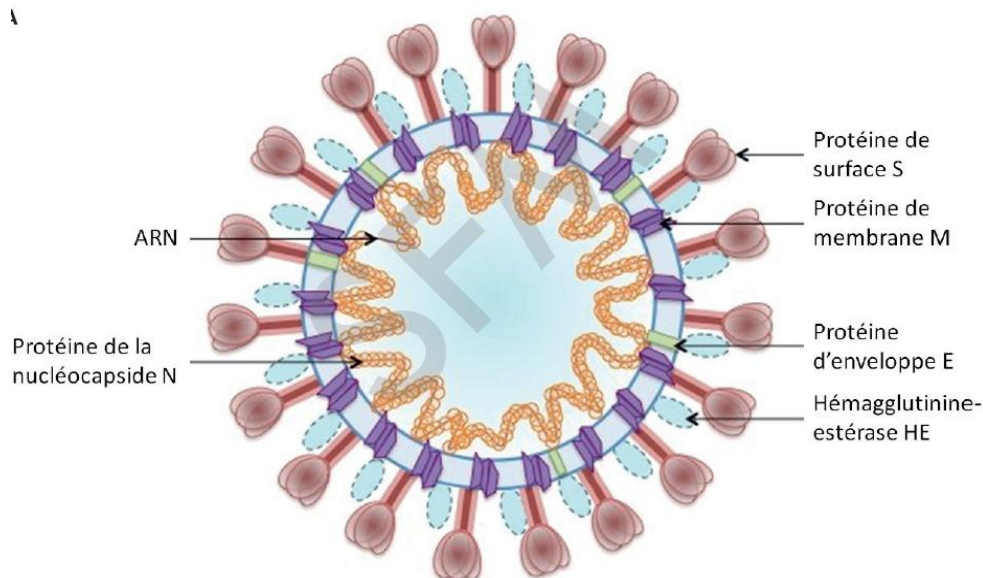


Figure 2: Structure du virus SARS-CoV-2 [15].

Comme les autres CoV, le génome est dans la forme d'acide ribonucléique simple brin (ARN) avec polarité positive, ce qui signifie que la séquence de base de l'ARN est dans l'orientation 5' → 3' et correspond au dernier ARN messager (ARNm) [13].

A la différence de tous les autres virus à ARN connus le génome du SARSCoV-2 est le plus grand génome ARN d'une longueur de 26,4 à 31,7 kilo bases, et comprend 6 à 11 cadres de lecture ouverts (ORF) codant pour un nombre important de poly protéines d'acides aminés [8].

Le génome du SARS-CoV-2 comprend 2 régions non traduites (UTR) à l'extrémité 5' (265 nucléotides) et à l'extrémité 3' (358 nucléotides) et une région codante divisée en plusieurs ORF. Les deux premiers ORF comprennent environ 67% du génome qui code pour 16 protéines non structurales (NSPs), tandis que les ORF restants codent pour des protéines accessoires et structurelle [8]. La variation de séquence entre le SARS-CoV-2 et le SARS-CoV n'a révélé aucune différence significative dans les ORFs et les NSPs [16].

Le NSP comprend deux cystéine protéases virales, y compris la protéase de type papaine (NSP3), la protéase de type chymotrypsine, de type 3C ou principale (NSP5), l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (NSP12), l'hélicase (NSP13) et d'autres probables d'être impliqué dans la transcription et la réplication du SARS-CoV-2 (Figure 3) [17].

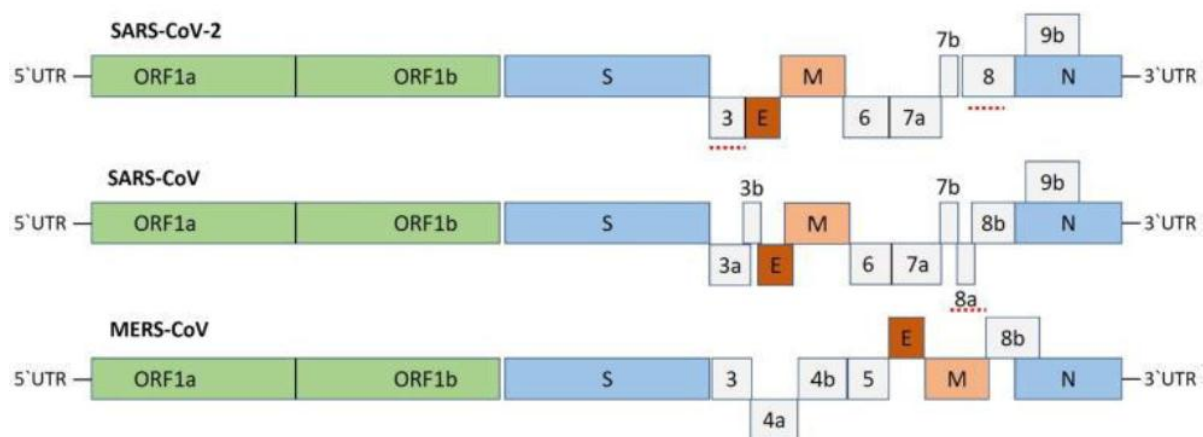


Figure 3: Organisation du génome des coronavirus [18].

3. Classification des coronavirus

Depuis les années 2000, la taxonomie des CoV a été régulièrement revue par l'ICTV. Actuellement, les CoV y compris le SARS-CoV-2 appartiennent à l'ordre des Nidovirales et à la famille des *Coronaviridae*, elle-même subdivisée en 2 sous-familles, les *Coronavirinae* et les *Torovirinae*. En 2009, les *Coronavirinae* ont été divisés en 4 genres appelés Alpha-, Beta-,

Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali

Gamma-, et Deltacoronavirus. Les Alpha-, Beta- et Gammacoronavirus remplacent les anciens CoV de types 1, 2 et 3. Le genre Deltacoronavirus a été défini en 2011 et regroupe essentiellement des virus aviaires. Le genre Beta coronavirus est subdivisé en 4 clades nommés « a, b, c et d » ou « A, B, C, et D » selon les auteurs. (Figures 4 et 5).

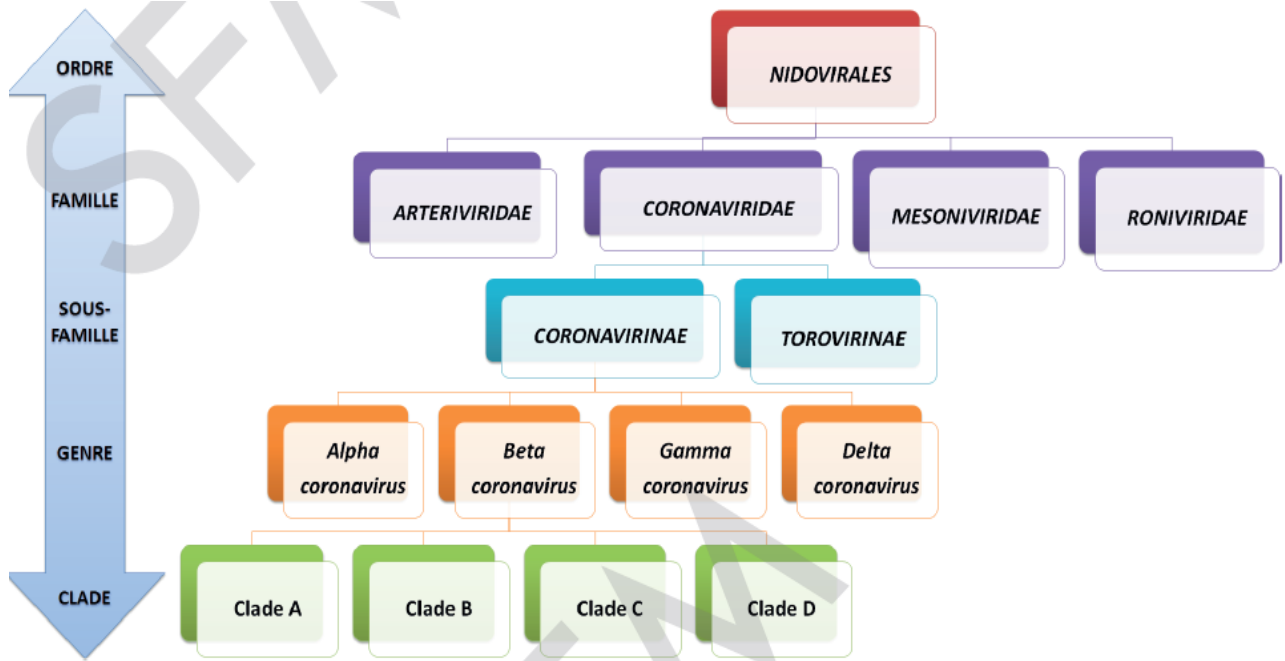


Figure 4: Classification et taxonomie des coronavirus humains [19].

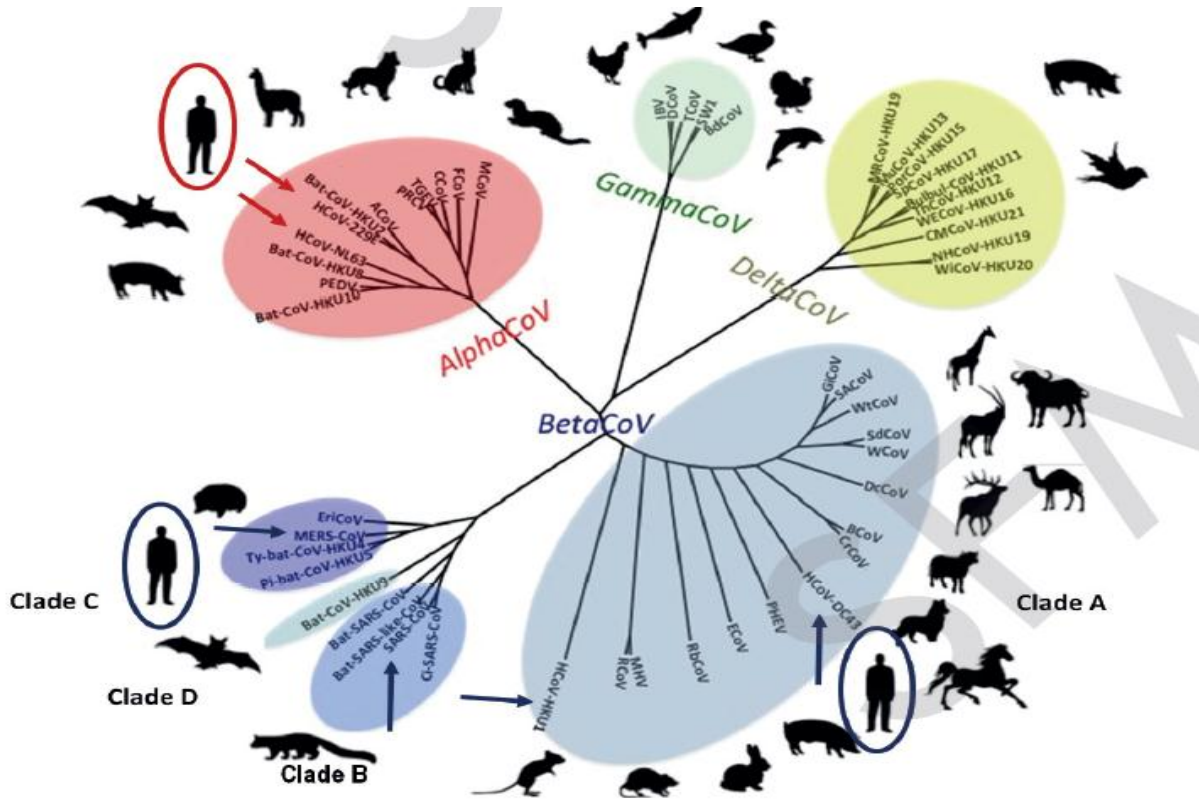


Figure 5: Arbre phylogénétique construit à partir de 51 génomes complets de coronavirus (Cov) par la méthode de Neighbour-joining (plus proche voisin) [20].

4. Cycle de réplication virale des coronavirus

Le cycle de multiplication du SARS-CoV-2 se déroule sur une durée contenue entre 8 à 10 heures. Cette réplication du génome viral est strictement cytoplasmique.

Elle s'effectue en 10 étapes :

1. Activation de la protéine S par clivage par la protéase sérine 2 transmembranaire TMPRSS2 cellulaire en sous-unités S1 et S2.
2. Fixation de la sous-unité S1 sur le récepteur ACE2 via la région RBD. La sous-unité S2 facilite la fusion entre la membrane plasmique et l'enveloppe virale.
3. Entrée du virion par endocytose.
4. Fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la vésicule d'endocytose puis la décapsidation et libération de l'ARN génomique.
5. Traduction des gènes ORF1a et 1b en polyprotéine pp1ab.
6. Clivage de la pp1ab en 16 protéines non structurales NSP1 à NSP16 par une protéase virale et formation du complexe réplicase/transcriptase.
7. Réplication de l'ARN génomique viral de polarité positive grâce à l'ARN polymérase ARN dépendante avec passage par un ARN intermédiaire de réplication de polarité négative.

8. Synthèse des ARN subgénomiques messagers à partir de l'ARN intermédiaire de réplication.

9. Traduction des ARN subgénomiques messagers en protéines de structure.

10. Maturation et assemblage des nouveaux virions à partir des génomes et des protéines néoformées dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Sortie des nouveaux virions de la cellule par exocytose [21].

La régulation de la transcription/réplication est complexe et en grande partie méconnue. Elle fait intervenir la protéine N de nucléocapside et probablement un grand nombre de protéines cellulaires [22].

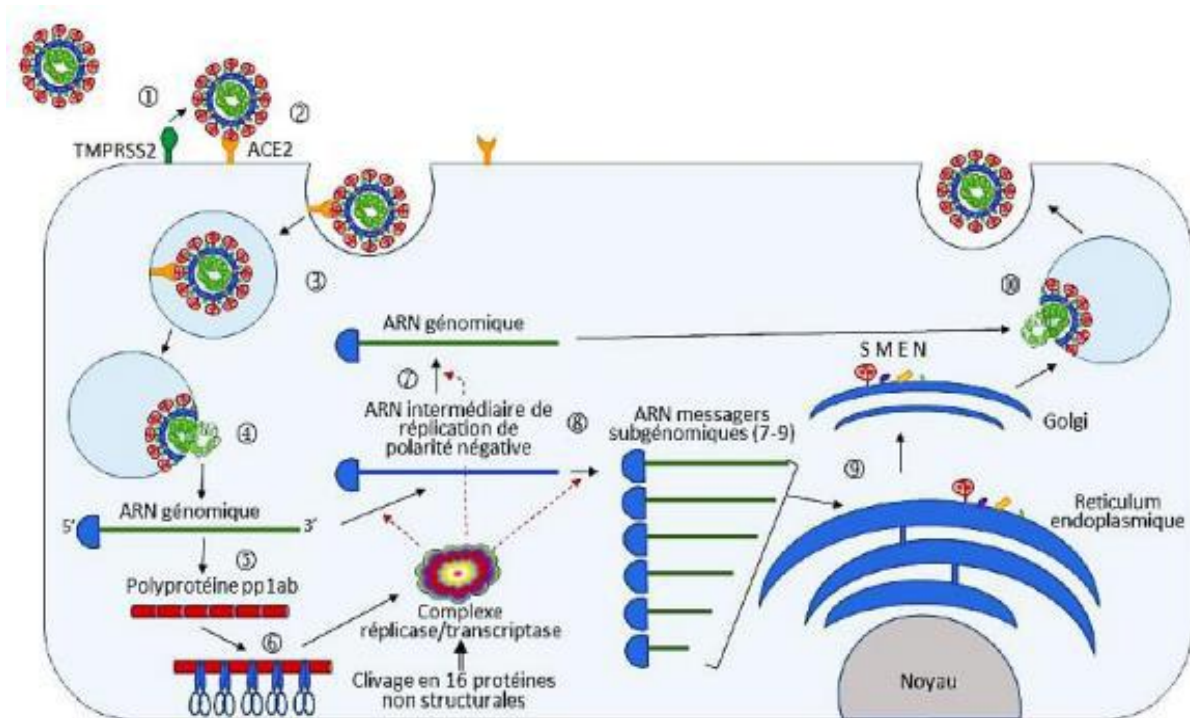


Figure 6: Cycle de réplication du SARS-CoV-2 [21].

5. Mode de transmission de la maladie

La majorité des cas initialement décrits concernait des personnes ayant fréquentées un marché d'animaux vivants. L'hypothèse d'une zoonose (maladie transmise par les animaux) est donc privilégiée. La transmission interhumaine a été établie plus tard et on estime qu'en l'absence de mesures de contrôle et de prévention, chaque patient infecte entre 2 et 3 personnes.

La transmission se fait essentiellement par voie aérienne (gouttelettes de postillons émises au cours des efforts de toux mais aussi lors de la parole) et passe par un contact rapproché (moins d'un mètre) et durable (au moins 15 minutes) avec un sujet contagieux. Des particules de plus petite taille peuvent aussi être émises sous formes d'aérosols au cours de la parole, ce

qui expliquerait que le virus puisse persister en suspension dans l'air dans une pièce non ventilée (et justifie dans ces circonstances le port du masque). Enfin le virus peut conserver une infectiosité pendant quelques heures sur des surfaces inertes d'où il peut être transporté par les mains ce qui justifie une bonne hygiène des mains [23], [24].

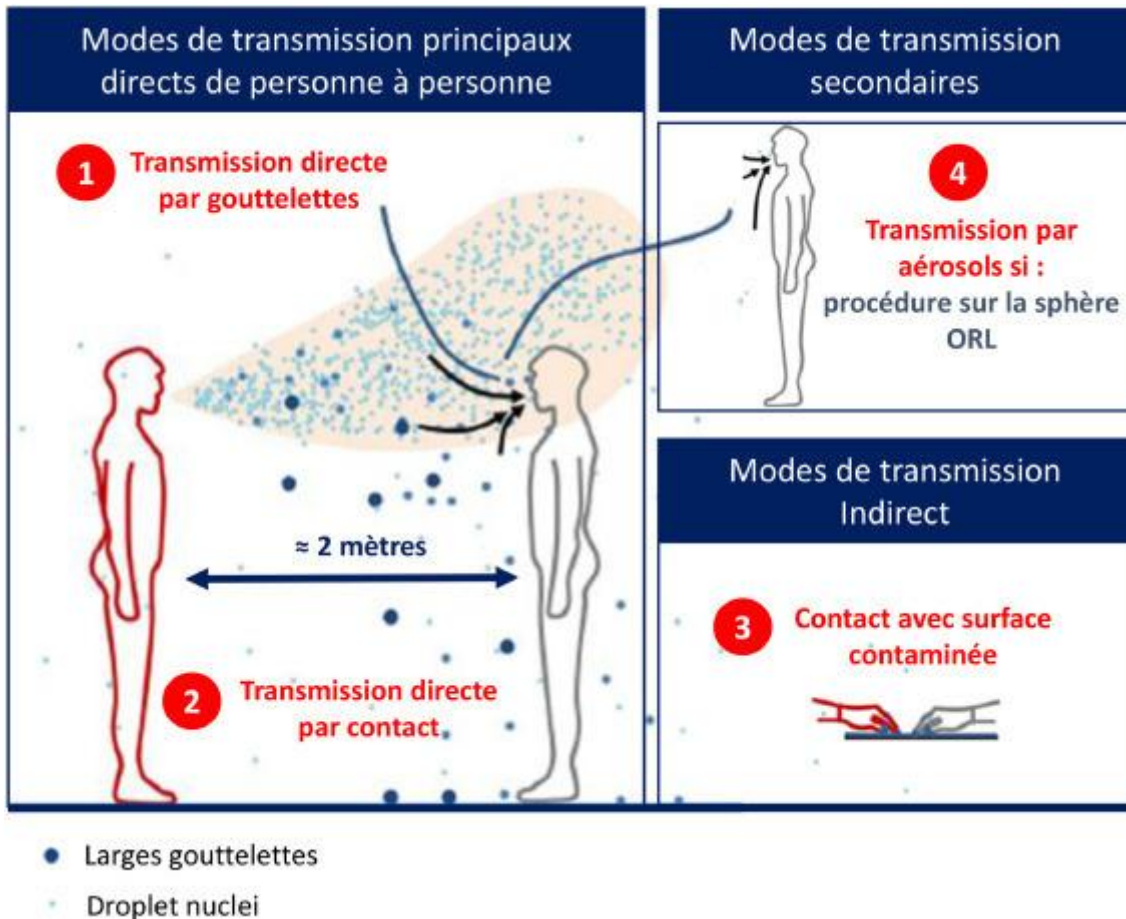


Figure 7: Schéma illustrant la transmission des coronavirus [25].

6. Mécanismes de pathogénicité de la maladie

On peut distinguer deux phases dans la maladie qui se superposent un temps.

La première phase est celle de la réplication virale. Le virus pénètre dans les cellules cibles grâce à la liaison de la protéine de surface du virus (protéine « S » pour spicule) avec la membrane externe des cellules possédant à leur surface le récepteur ACE2. Après fixation au récepteur ACE2, les autres étapes du cycle viral comprennent la réplication de l'ARN par l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp), la protéolyse, puis la production de virions.

Chez 10 à 20 % des patients, la maladie respiratoire évoluera dans les 10 jours après le début des symptômes en un syndrome de détresse respiratoire aiguë. Il s'y associe des troubles

de la coagulation. Ce phénomène d'hyper-inflammation est lié à une réponse excessive du système immunitaire. Elle fait intervenir des cytokines inflammatoires (TNF alpha, interleukine 1...) et d'autres médiateurs de l'inflammation. Elle semble plus grave en cas de déficit en interféron (IF) de type 1 (IF alpha et IF bêta).

Les cellules endothéliales activées par le TNF synthétisent des facteurs de coagulation à l'origine d'une coagulation disséminée dans tous les petits vaisseaux de l'organisme et de phénomènes de thrombose avec obstruction capillaire, voire de plus gros vaisseaux.

Le système immunitaire met en œuvre deux systèmes de défense pour combattre le COVID-19. L'immunité humorale est médiée par des lymphocytes B produisant des anticorps spécifiques contre le virus et notamment des anticorps neutralisants qui semblent diminuer assez rapidement après l'infection. L'immunité cellulaire est médiée par des lymphocytes T. Ces deux lignes de défense immunitaire coopèrent et possèdent une mémoire de l'infection qui permet de gagner en efficacité pour limiter les réinfections [26].

7. Manifestations cliniques

La durée d'incubation est en moyenne 5 jours, avec des extrêmes de (2 à 12 jours). L'installation des symptômes se fait progressivement sur plusieurs jours, contrairement à la grippe qui débute brutalement.

Les premiers symptômes sont peu spécifiques : maux de tête, douleurs musculaires, fatigue. La fièvre et les signes respiratoires arrivent secondairement, souvent deux ou trois jours après les premiers symptômes.

Dans les premières études descriptives provenant de Chine, il s'écoule en moyenne une semaine entre l'apparition des premiers symptômes et l'admission à l'hôpital à la phase d'état de la maladie. A ce stade, les symptômes associés : fièvre, toux, douleurs thoraciques et gêne respiratoire et la réalisation d'un scanner thoracique montrent presque toujours une pneumonie touchant les deux poumons.

D'autres signes cliniques ont été décrits depuis les premières études : des signes d'atteinte du système nerveux central s'exprimant en particulier chez les personnes âgées sous la forme d'une désorientation ; une perte du goût et/ou de l'odorat, qui survient chez 30 à 50% des adultes infectés, avec une prédominance féminine, est très évocatrice du diagnostic de COVID-19.

La gravité des signes cliniques nécessite le maintien à l'hôpital d'environ 20% des malades et 5% nécessitent une admission en réanimation. Les formes les plus graves sont observées principalement chez des personnes vulnérables en raison de leur âge (plus de 70 ans)

ou de maladies associées, en particulier l'obésité. Des études observationnelles privilégiées ainsi que des travaux de modélisation ont montré que l'infection peut être asymptomatique ou pauci symptomatique (entraîner pas ou peu de manifestations cliniques) chez 30 à 60 ans des sujets infectés, en particulier chez les jeunes enfants (moins de 12 ans) [27].

8. Diagnostic des infections au coronavirus

8.1. Diagnostic clinique

La tomodensitométrie thoracique

La tomodensitométrie (TDM) thoracique a aussi joué un rôle majeur dans la prise en charge initiale des patients. La TDM thoracique permet non seulement une évaluation de l'importance de l'atteinte pulmonaire, mais elle a aussi une bonne valeur prédictive négative pour le diagnostic de la COVID-19 dans le contexte précédemment décrit.

Les signes radiologiques caractéristiques de la COVID-19 sont les suivants : des opacités en verre dépoli, non systématisées, multifocales, bilatérales, et asymétriques, de localisation sous pleurale à prédominance basale et postérieure [27].

8.2. Diagnostic biologique

Le prélèvement doit prendre en compte la dynamique de l'excrétion respiratoire. Elle atteint son maximum à la fin de la première semaine après contamination, juste avant et pendant les trois premiers jours qui suivent l'apparition des symptômes. Elle diminue ensuite lorsque la réponse immunitaire (IgM puis IgG) apparaît. Au-delà de la première semaine, on observe une meilleure détection au niveau des prélèvements profonds et des selles [28].

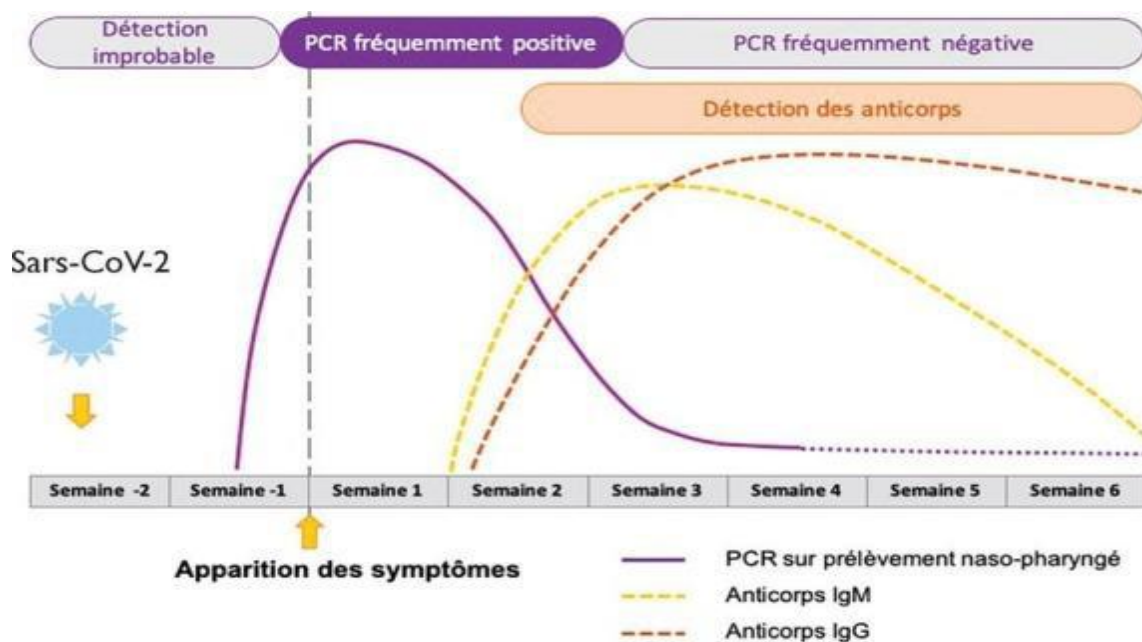


Figure 8: Cinétique des marqueurs diagnostiques en fonction du stade de l'infection [28].

Types de prélèvements

Il est recommandé de prélever des échantillons des voies respiratoires supérieures, tels que des écouvillonnages nasopharyngés, des écouvillonnages oropharyngés, des lavages nasopharyngés et des aspirations nasales.

Cependant, chez les patients présentant une toux, l'échantillon est généralement prélevé dans les voies respiratoires inférieures, y compris les expectorations, le liquide de lavage broncho alvéolaire (LBA).

Autres types de prélèvement

Les aspirations trachéales, la salive, les larmes, le sang, les voies génito-urinaires pour les tests rapides. Les prélèvements salivaires ont été envisagés car moins désagréables mais leurs sensibilités sont variables selon les études ; ne permettant pas encore de les recommander de façon large [28].

1. En position assise, inclinez la tête du patient vers l'arrière à un angle de 70 °.
2. Insérez l'écouvillon souple à pointe fine dans la narine en ligne droite vers l'arrière (et non vers le haut) jusqu'à sentir une résistance (environ à la moitié de la distance entre la narine et l'oreille).
3. Faites tourner délicatement l'écouvillon plusieurs fois en frottant la paroi nasale et laissez-le en place quelques secondes afin d'absorber les sécrétions.
4. Retirez lentement l'écouvillon et déposez-le immédiatement dans le tube à essais.

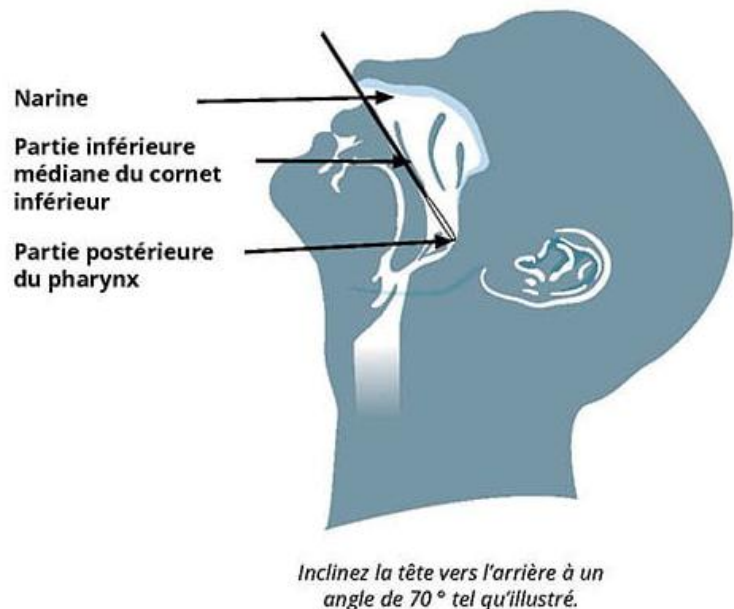


Figure 9: Coupe sagittale des voies aériennes supérieures illustrant les modalités de réalisation d'un prélèvement rhino-pharyngé avec un écouvillon [28].

Quant aux prélèvements plus profonds (expectorations, lavages broncho-alvéolaires), ils ne peuvent être envisagés qu'en cas d'hospitalisation. Une excrétion virale a été démontrée dans les selles mais le lien entre la positivité dans les selles et le risque de contamination n'a pas été établi [28].

Milieux de transport VTM et UTM

- VTM

Le milieu de transport viral permet le transfert en toute sécurité de virus pour des recherches ultérieures, y compris les méthodes conventionnelles de culture cellulaire, les tests de diagnostic et les techniques de biologie moléculaire.

Les milieux de transport viraux préparés commercialement sont disponibles dans un tube plastique à bouchon à vis contenant des protéines tamponnées (sérum, albumine ou gélatine) et des antibiotiques. Les antibiotiques sont généralement incorporés dans le milieu de transport viral pour supprimer la croissance des bactéries et des champignons contaminants, de sorte que des échantillons séparés du même site doivent être collectés si des cultures bactériennes ou fongiques sont également demandées [28].

➤ UTM

Le milieu UTM (Universal Transport Medium) est un milieu de conservation unique à de multiples applications culture, immuno-enzymologie, PCR pour virus et autres agents pathogènes. L'UTM permet d'en utiliser qu'un seul.

Condition de transport des échantillons

Les échantillons collectés pour la détection de la maladie à virus SARS-CoV-2 doivent être conditionnés et expédiés sans tenter d'ouvrir les emballages, tubes de prélèvements ou les aliquotes.

Les échantillons à expédier doivent être conditionnés suivant le système de base du triple emballage.

Triple emballer les spécimens dans :

Réceptacle primaire étanche : plusieurs réceptacles primaires doivent être emballés individuellement ou séparés

Réceptacle secondaire étanche : qui peut avoir la capacité de contenir plusieurs conteneurs primaires.

Emballage extérieur rigide ou solide : qui protège les conteneurs de l'intérieur pendant le transport

Si l'échantillon est un liquide, placez un matériau absorbant entre le réceptacle primaire et le réceptacle secondaire.

Placez une liste du contenu et des documents entre le récipient secondaire et l'emballage extérieur [29].

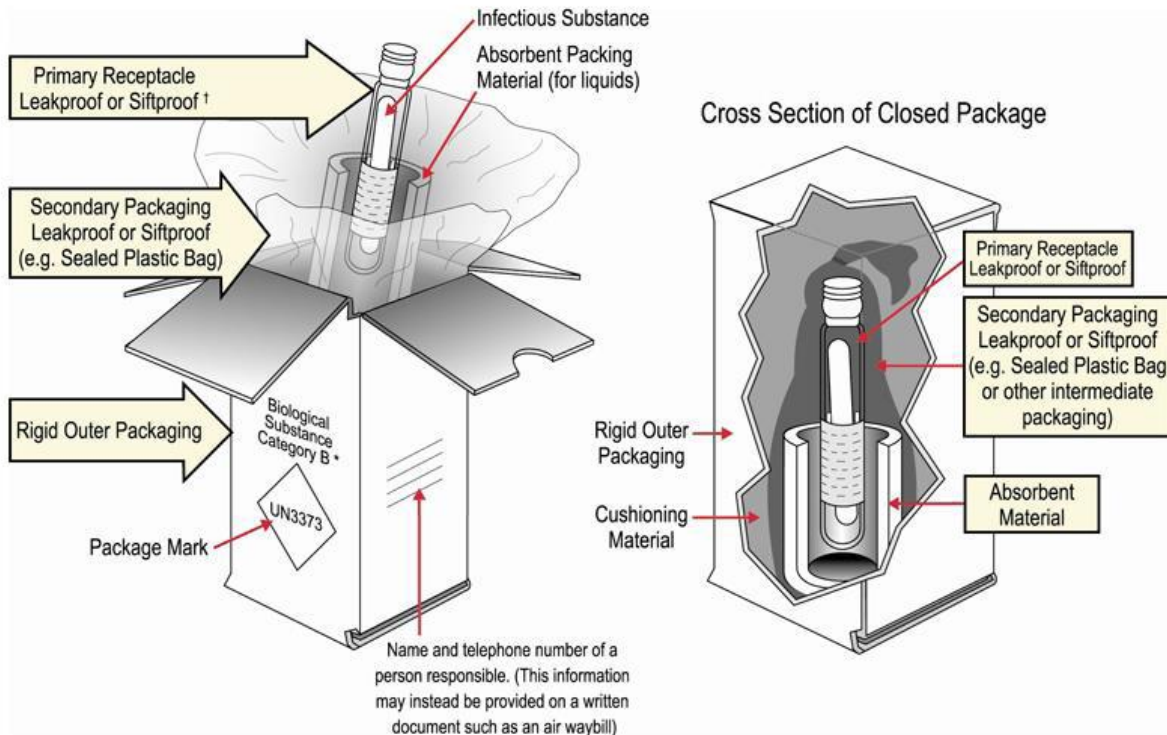


Figure 10: Présentation du triple emballage [30].

Dictionnaire : Primary receptacle : receptacle primaire ; infectious substance : substance infectieuse ; Secondary package : emballage secondaire ; rigid package outer : emballage extérieur rigide ; Cushioning material : Matériau de rembourrage ; Cross section of close package : Coupe d'un emballage transversale proche ; Absorbent material : matériel absorbent ;

8.2.1. Diagnostic biologique direct

➤ RT-qPCR

Le diagnostic d'infection au SARS-CoV-2 repose sur une recherche directe quantitative du génome viral par la technique de RT-qPCR. La réaction quantitative en chaîne par polymérase de la transcription inverse (RT-qPCR), est une modification de la stratégie PCR qui permet de surveiller la progression de la PCR en temps réel.

Les ingrédients nécessaires comprennent l'ARN matrice, les amorces, les nucléotides (dNTP) et l'ADN polymérase thermostable. En plus d'améliorer la précision, la sensibilité et la rapidité, l'un des principaux avantages de la PCR en temps réel par rapport à la PCR de base est que cette technique fournit une relation de quantification fiable entre le nombre de séquences cibles de départ (avant l'amplification par PCR) et la quantité d'amplicons accumulée dans un cycle de PCR particulier [31].

Principe

La technique RT-qPCR est basée sur la détection et la quantification d'un « reporter » fluorescent. Lors de la conception des réactifs d'amplification, il y'a deux sondes qui sont ajoutées aux réactifs qui vont se lier spécifiquement au brin à amplifier : sonde fluorescent émetteur et sonde inhibitrice qui empêche l'émission de la lumière fluorescente par excitation de sonde fluorescent. Lorsque la polymérisation arrive au niveau de la sonde fluorescente elle coupe cette sonde (excitation) qui conduit à l'émission de la lumière fluorescente. Cette lumière fluorescente est directement captée par la machine.

L'intensité du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de RT-qPCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction RT-qPCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dont la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible. Cette technique spécifique du SARS-CoV-2 cible les régions du virus : deux présentes dans le gène RdRp (nommées IP2 et IP4), propres au SARS-CoV-2, une située sur le gène de l'enveloppe (*E*), retrouvé chez d'autres coronavirus tels que le SARS-CoV. Mais aussi les gènes *N*, *S* ou de l'ORF1 du SARS-CoV-2 [29].

Avant l'amplification RT-qPCR en temps réel, les échantillons sont lysés pour donner accès à l'ARN du SARS-CoV-2, et l'extraction des acides nucléiques est effectuée pour éliminer les inhibiteurs potentiels qui pourraient entraver l'amplification de la cible.

La lyse/extraction et l'amplification RT-qPCR peuvent être effectuées de manière séquentielle via un traitement manuel sur des instruments individuels, ou l'ensemble du processus peut être automatisé [32]. Avec cette technique, un échantillon est déclaré positif lorsque la valeur de Ct est inférieure à 40 Ct.

➤ RT-LAMP

L'amplification isotherme à médiation par boucle (LAMP) est une réaction d'amplification isotherme en une étape qui couple l'amplification d'une séquence cible avec 4 à 6 amorces, pour assurer une sensibilité et une spécificité élevées, dans des conditions isothermes (63-65°C), en utilisant une polymérase avec une activité de déplacement de brin élevée [33].

Dans le cas d'un échantillon d'ARN, LAMP est précédé de la transcription inverse de l'échantillon d'ARN. La RT-LAMP a déjà été utilisée pour la détection de divers agents pathogènes, y compris le SARS-CoV-2 et d'autres virus respiratoires [32].

➤ **Test antigénique**

Les tests antigéniques sont des dosages immunologiques qui détectent la présence d'un antigène viral spécifique, ce qui implique une infection virale actuelle. Les tests antigéniques sont actuellement autorisés à être effectués sur des échantillons d'écouvillonnage nasopharyngé ou nasal placés directement dans le tampon ou le réactif d'extraction du test pour la COVID-19. La plupart des tests actuellement autorisés renvoient les résultats en 15 à 30 minutes environ. Les tests antigéniques pour le SARS-CoV-2 sont généralement moins sensibles que la réaction en chaîne par polymérase à transcription inverse (RT-qPCR) en temps réel et d'autres tests d'amplification d'acide nucléique (NAAT) pour détecter la présence d'acide nucléique viral [34].

8.2.2. Diagnostic indirect

➤ **Tests sérologiques**

Lorsque notre corps est infecté par un agent pathogène tel que le SARS-CoV-2, le système immunitaire est déclenché pour lutter contre cet agent pathogène. L'un de ces mécanismes du système immunitaire global produit des anticorps qui se fixent aux agents pathogènes pour les inactiver et contribuer à leur élimination ultérieure. Par conséquent, une méthode de diagnostic de COVID-19 dans les cas suspects est un test sérologique où la présence et le niveau d'anticorps dans le sang sont mesurés.

Contrairement aux tests moléculaires qui détectent le génome du SARS-CoV-2, les tests sérologiques détectent la réponse immunitaire du corps dans les cas où l'individu est porteur du SARS-CoV-2, et la réponse immunitaire a été développée. Comme la réponse du système immunitaire au virus prend du temps à se développer, les tests sérologiques offrent un délai plus large pour le diagnostic de COVID-19.

Habituellement, deux types d'anticorps sont recherchés dans un test sérologique : l'immunoglobuline M (IgM) et l'immunoglobuline G (IgG). La présence et le niveau d'immunoglobuline A (IgA) sont également étudiés et mesurés dans les bilans sérologiques. Les IgA sont principalement présentes dans les muqueuses telles que les voies respiratoires et digestives. Ils peuvent également être trouvés dans la salive, les larmes, le sang, les voies génito-urinaires et le nasopharynx. L'IgM est un anticorps général développé en tant que réponse immunitaire initiale du corps à de nombreux agents pathogènes ; l'IgM est un signe d'infection récente ou active. Alors que notre corps essaie de développer des réponses immunitaires plus spécifiques à une infection telle que COVID-19, l'anticorps IgG contre l'infection est développé.

Les IgA peuvent favoriser les mécanismes de cave à médiation par les anticorps qui conduisent à un contrôle et à une inhibition supplémentaire des infections par les micro-organismes. Démontre le niveau approximatif d'anticorps IgM et IgG à différentes semaines après l'infection. Comme les IgG sont plus spécifiques aux agents pathogènes, la plupart des tests sérologiques mesurent la quantité d'anticorps IgG. Cependant, le développement de l'anticorps IgG peut prendre plus de temps, voire jusqu'à trois semaines. Toutes les informations susmentionnées sur les anticorps IgM, IgG et IgA permettent de conclure que les tests sérologiques sont plus pratiques dans la surveillance du COVID-19 et peuvent fournir des informations utiles sur les individus luttant contre la COVID-19 ou ceux qui en ont survécu.

En revanche, l'un des inconvénients des tests sérologiques est la possibilité d'imprécision, car il existe un potentiel de réactivité croisée entre les anticorps générés contre le SARS-CoV-2 et ceux générés contre d'autres coronavirus. Une étude a illustré la réactivité croisée entre les anticorps contre la protéine S du SARS-CoV-2 et du SARS-CoV, respectivement. Pour pallier cette limitation, plusieurs techniques peuvent être mises en œuvre pour améliorer la spécificité des tests sérologiques. Par exemple, des anticorps ciblant d'autres épitopes du SARS-CoV-2 peuvent être utilisés pour réduire la possibilité de réactivité croisée.

Une double stratégie de sélection peut être utilisée pour améliorer la précision des tests sérologiques. De plus, certaines étapes de préparation des échantillons peuvent être ajoutées avant le test sérologique. Ceux-ci incluent l'ajout de certains réactifs de blocage pour inhiber une interaction supplémentaire du SARS-CoV avec l'anticorps ou rendre l'environnement compétitif pour le SARS-CoV-2 et le SARS-CoV afin de favoriser une affinité plus élevée envers le SARS-CoV-2, le rendant plus attrayant pour son interaction avec l'anticorps. Plus important encore, diverses technologies d'intelligences artificielles (IA), y compris l'apprentissage automatique et l'apprentissage en profondeur, peuvent être mises en œuvre pour développer des anticorps avec des affinités plus élevées envers le SARS-CoV-2 par rapport au SARS-CoV [35].

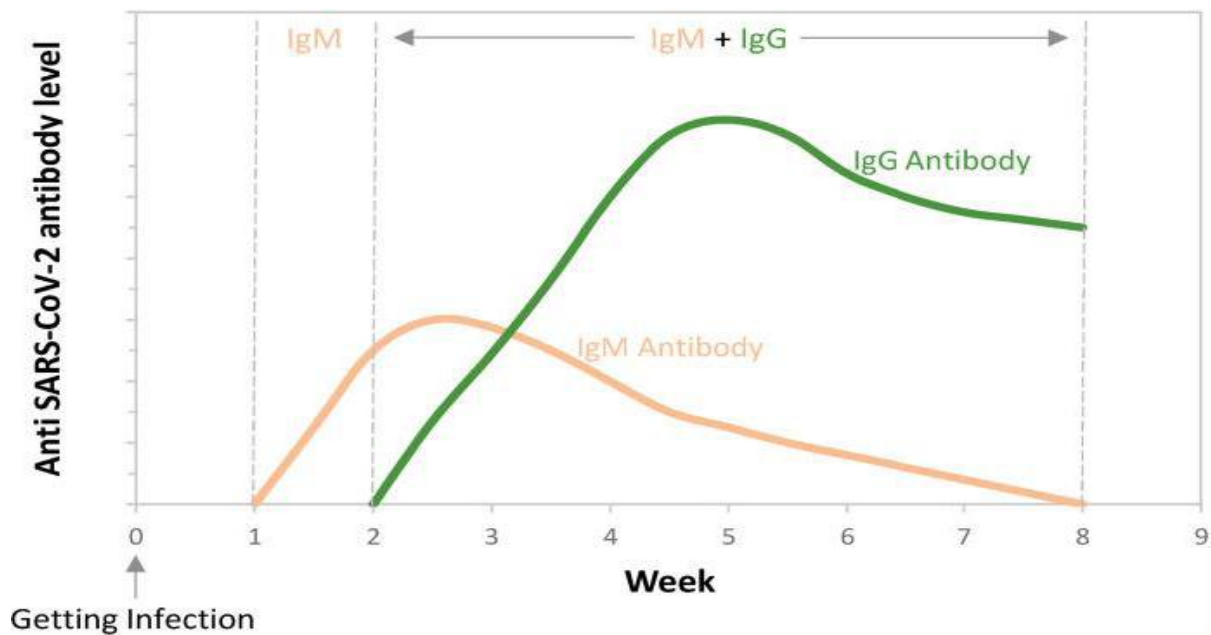


Figure 11: Le niveau approximatif d'anticorps IgM et IgG générés contre le SARS-CoV-2 à différentes semaines après l'infection [35].

Dictionnaire :

Anti SARS-CoV-2 antibody level : niveau des anticorps anti SARS-CoV-2.

Getting infection : Premier jour d'entrée en infection.

Week: semaine.

IgG antibody: anticorps IgG.

Sur la base des études menées, il y aurait une ou deux semaines sans symptômes et sans anticorps dans l'échantillon de sang, c'est-à-dire pendant le temps d'incubation. Ensuite, les anticorps IgM sont produits en tant que réponse immunitaire initiale suivie de la formation d'anticorps IgG pour développer une réponse immunitaire plus spécifique.

De nombreux chercheurs ont développé des tests sérologiques pour la détection du SARS-CoV-2.

➤ ELISA

Un dosage immuno-enzymatique (ELISA) développé pour détecter les IgM et IgG dans le sérum de patients COVID-19, a déterminé que la concentration d'anticorps IgM et IgG augmente au cours de la première semaine d'infection. Les entreprises se sont également efforcées de développer des tests sérologiques pour contrôler la propagation du virus. Le principe de base de la détection des anticorps anti-SARS-CoV-2 dans les tests sérologiques développés est résumé dans la figure 12 [35].

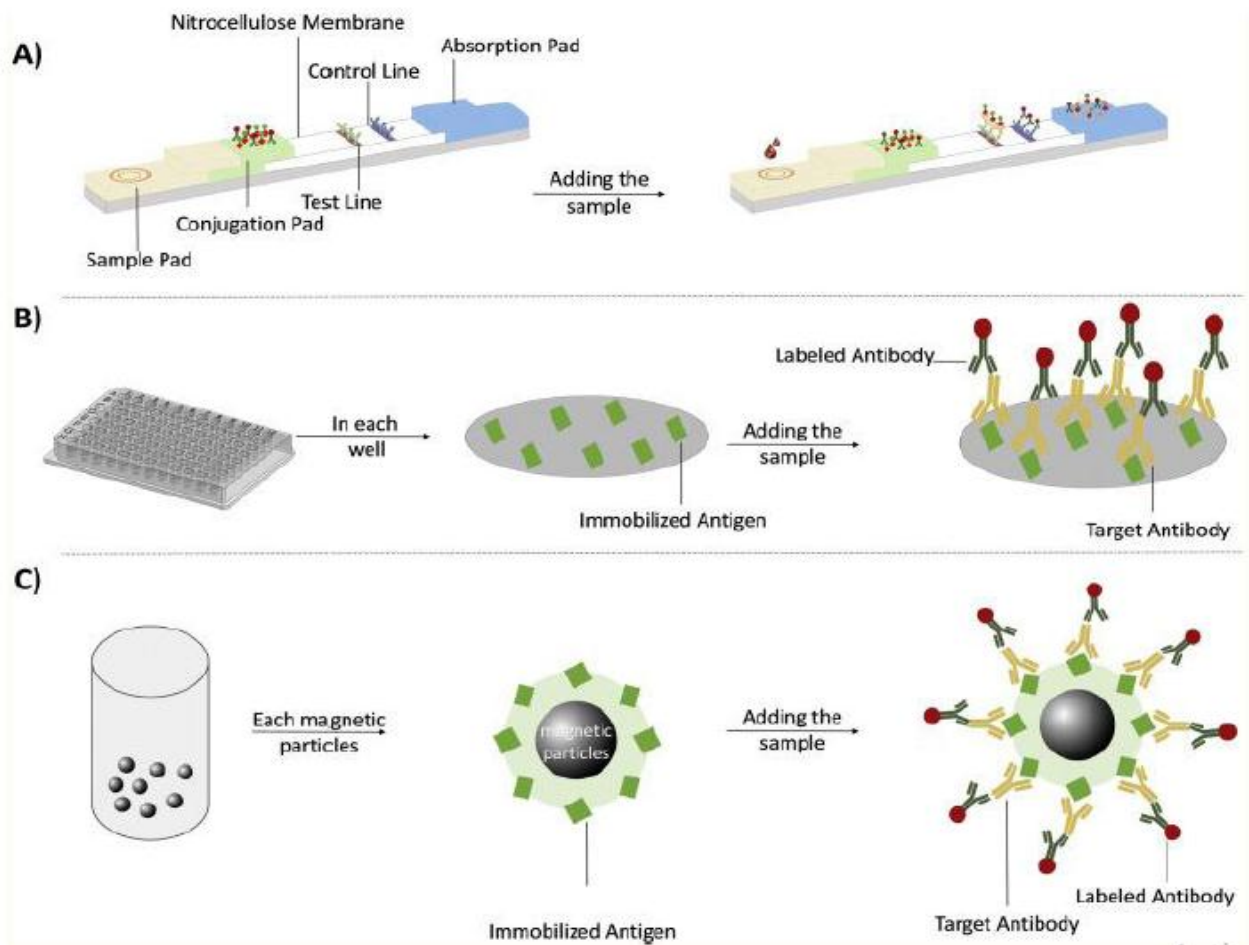


Figure 12: Illustration schématique des tests sérologiques pour le diagnostic COVID-19 [36].

Dictionnaire : Nitrocellulose membrane : membrane nitrocellulose ; Control line : ligne de contrôle ; Absorption pad : tampon d'absorption ; Sample pad : tampon d'échantillon ; Conjugation pad : bloc de conjugaison ; Test line : ligne de test ; Adding sample : addition d'échantillon ; Immobilized antigen : antigène immobilisé ; Target antibody : cible d'anticorps ; Labeled antibody étiquette d'anticorps ; Each magnetic particles : chaque particule magnétique.

A. Le principal principe de détection de l'anticorps anti-SARS-CoV-2 sur une bandelette à flux latéral est qu'après avoir ajouté l'échantillon, le sang se déplace à travers la bandelette réactive et les anticorps présents dans l'échantillon atteignent la ligne de test et la ligne de contrôle, conduisant à un changement de couleur dans ces lignes.

B. Une illustration de la plaque ELISA et la composition de chaque puits. Après avoir ajouté l'échantillon, les anticorps anti-SARS-CoV-2 se fixent à l'antigène immobilisé, après quoi les anticorps marqués sont ajoutés pour obtenir un signal.

C. Une illustration du dosage immunologique des microparticules chimiluminescences (CMIA) ; des antigènes spécifiques sont immobilisés sur chaque particule pour interagir avec l'anticorps cible après l'ajout de l'échantillon, puis des anticorps marqués sont utilisés pour fournir un signal indiquant la présence de l'anticorps cible.

➤ **Test rapide**

Les tests sérologiques d'orientation rapide (TROD) : il s'agit de tests d'orientation diagnostique. Ils sont indiqués dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques ou chez des patients ayant des difficultés d'accès à un laboratoire de biologie médicale.

Ils peuvent être utilisés à partir du 7^e jour après le début des symptômes et de façon optimale au 14^e jour. En présence de résultats positifs, il convient de réaliser un test sérologique de confirmation en laboratoire [32].

8.2.3. Séquençage

Le séquençage de l'ADN a été inventé dans la deuxième moitié des années 1970. Deux méthodes ont été développées indépendamment, l'une par l'équipe de Walter Gilbert, (Maxam et Gilbert 1977) aux États-Unis, et l'autre par celle de Frederick Sanger en Grande-Bretagne.

Ces deux méthodes sont fondées sur des principes diamétralement opposés : l'approche de Sanger est une méthode par synthèse enzymatique sélective, tandis que celle de Maxam et Gilbert est une méthode par dégradation chimique sélective. Pour cette découverte, Gilbert et Sanger ont été récompensés par le prix Nobel de chimie en 1980. Par ailleurs, la première méthode non Sanger ayant fait ses preuves dans le domaine de séquençage a été introduites en 1988, il s'agit de pyroséquençage, une technique principalement basé sur l'addition d'un seul nucléotide qui est révélé en temps réel par détection de la luminescence [37].

8.2.3.1. Méthode de Maxam & Gilbert (1977)

Cette méthode utilise des échantillons d'ADN double brin et ne nécessite donc pas le clonage de l'ADN dans un vecteur pour produire de l'ADN simple brin comme c'est le cas pour la méthode de Sanger. Cette méthode est basée sur une dégradation chimique de l'ADN et utilise les réactivités différentes des quatre bases A, T, G et C, pour réaliser des coupures sélectives. En reconstituant l'ordre des coupures, on peut remonter à la séquence des nucléotides de l'ADN correspondant[37].

On peut décomposer ce séquençage chimique en six étapes successives :

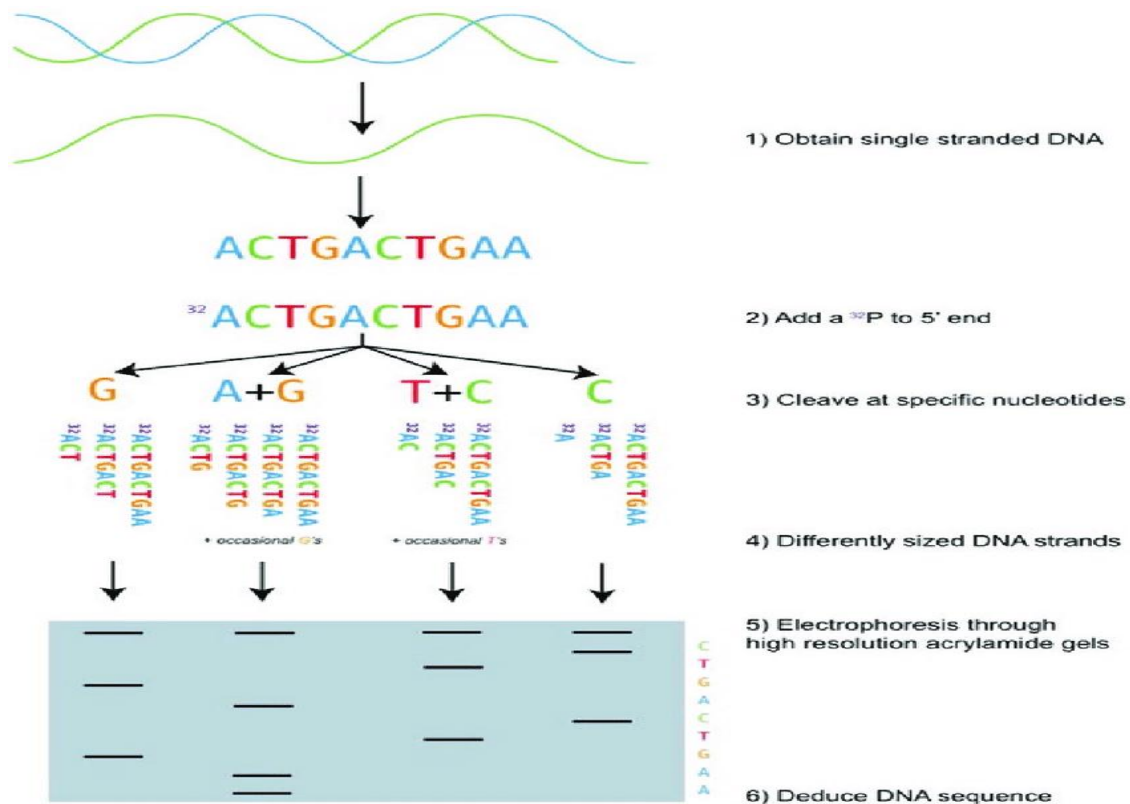


Figure 13: Schéma illustrant les étapes de séquençage de Maxam et Gilbert

[1].

Dictionnaire :

- 1- Dénaturation de l'ADN ;
- 2- Ajout de Phosphore marqué isotope 32 ;
- 3-Clivage du brin d'ADN à partir des nucléotides spécifiques par des agents chimiques ;
- 4- Différentiation des fragments en fonction de leur taille ;
- 5- Electrophorèse sur gel acrylamide ;
- 6- Dédution de la séquence d'ADN.

Limite

Cette méthode nécessite des réactifs chimiques toxiques et reste limitée quant à la taille des fragments d'ADN qu'elle permet d'analyser (<250 nucléotides). Moins facile à robotiser, son usage est devenu aujourd'hui confidentiel.

8.2.3.2. Méthode de Sanger

Le séquençage Sanger d'un fragment d'ADN nécessite d'abord de le cloner dans un plasmide, qui est ensuite introduit dans une cellule hôte, en général une bactérie ou une levure. En se multipliant, cette cellule hôte produit un grand nombre de copies de chaque fragment

d'ADN d'origine. Après purification, cet ADN peut être séquencé en utilisant une polymérase qui synthétise un brin complémentaire à partir d'un brin matrice du fragment d'ADN d'intérêt ; quand la polymérase incorpore un des quatre « didésoxynucléotides » (ddATP, ddCTP, ddGTP, ou ddTTP présents séparément dans quatre réactions individuelles), la synthèse s'arrête. Cela génère un mélange de molécules qui se terminent à chaque position où se trouve un A, un C, un G, ou un T (selon le type de didésoxynucléotide présent).

Les fragments dans ce mélange sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel. La connaissance du didésoxynucléotide qui a été incorporé dans chaque réaction permet ainsi de déduire la séquence du fragment d'ADN d'intérêt [29].

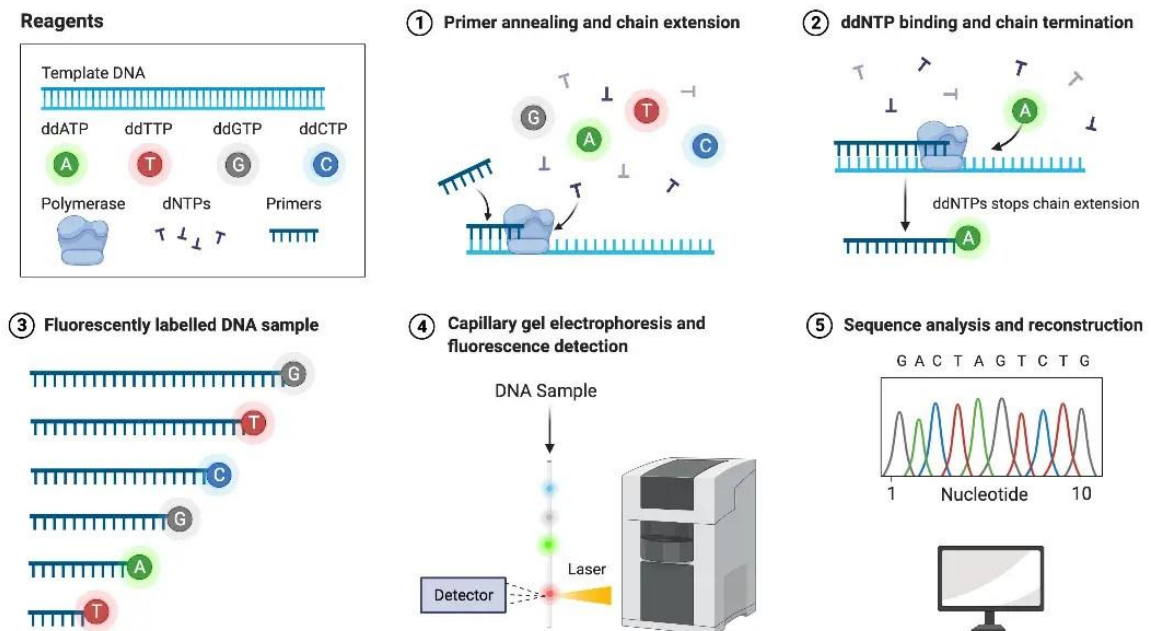


Figure 14: Séquençage par la méthode de Sanger [38].

Dictionnaire :

Reagents : réactifs ;

1- Primer annealing and chain extension : recuit d'amorce et extension de la chaîne ;

2- ddNTP binding and chain termination : liaison de ddNTP et terminaison de la chaîne ;

3- Fluorescently labeled : marquage par fluorescence de l'échantillon d'ADN ;

4- Capillary gel electrophoresis and fluorescence detection: électrophorèse sur gel capillaire et détection de la fluorescence;

5- Sequence analysis and reconstruction : analyse de séquence et reconstruction.

8.2.3.3. Séquençage de nouvelle génération (next-generation sequencing, NGS) et de troisième génération (third generation sequencing, TGS)

Après la complétion du projet de séquençage du génome humain, l'ambition était de séquencer un grand nombre de génomes afin d'étudier la variation génétique et de réaliser des études d'association pangénomique, dans lesquelles on essaye d'identifier des liens entre des maladies génétiques et des profils génétiques spécifiques. Dans ce but, des méthodes de séquençage de troisième génération (*third generation sequencing*, TGS) et de nouvelle génération (*next-generation sequencing*, NGS) ont été développées.

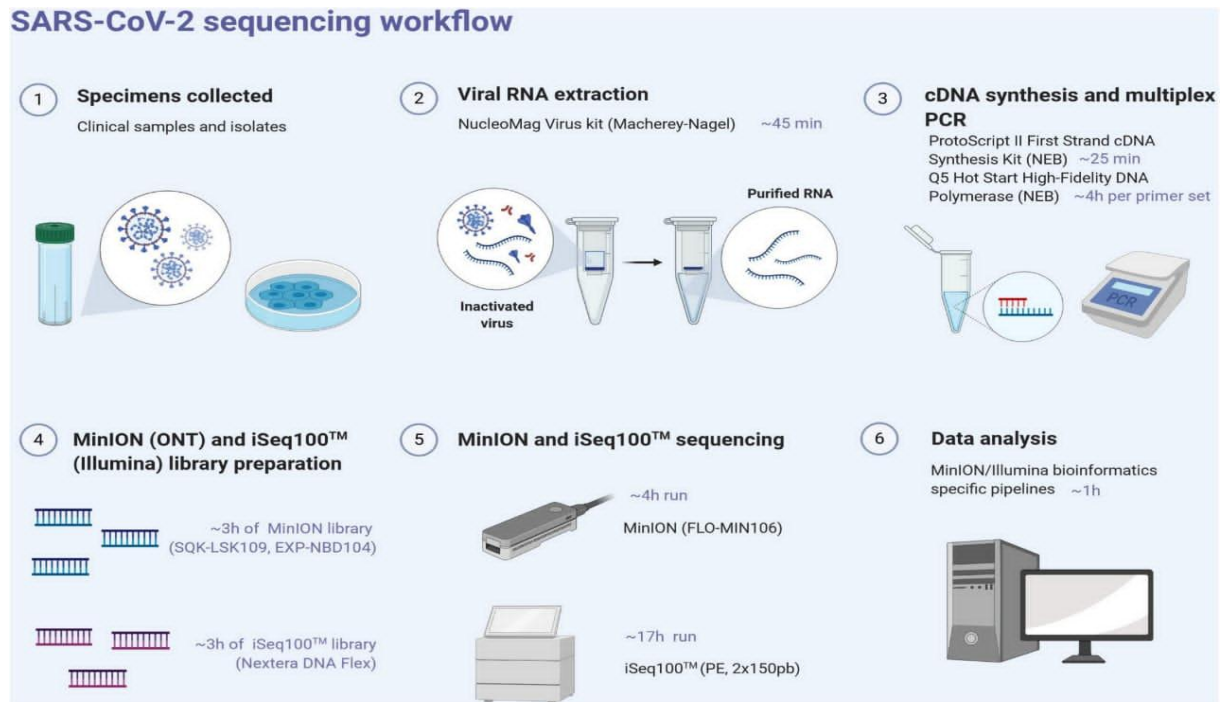


Figure 15: Illustration des étapes du séquençage du matériel génétique [39].

Dictionnaire : Specimen collected : spécimen collecté ; Viral RNA extraction : extraction de l'ARN viral ; cDNA synthesis and multiplex PCR : synthèse de l'ADNc et PCR multiplex ; MinION and Illumina labrarry preparation : préparation de la librairie de MinION et Illumina.

MinION and Iseq 100TM sequencing : séquençage MinION et Iseq 100TM ; Data analysis : analyse des données.

Technique Illumina

Principe

Cette technologie se base d'abord sur l'acquisition d'une librairie. Les brins d'ADN sont fragmentés en segments de 100 à 500 pb et sont couplés à leurs extrémités à des

séquences particulières (une séquence permettant la liaison, des séquences index et une région complémentaire aux oligonucléotides de la plaque).



Figure 16: Fragment d'ADN à séquencé [1].

Ces fragments sont amplifiés en PCR « bridge » en phase solide. Le séquençage est réalisé grâce à un émetteur fluorescent fixé aux nucléotides (un type de nucléotide est associé à un type de longueur d'onde qui lui est propre).

La technologie Illumina s'appuie sur différentes techniques dont le SBS (*sequencing by synthesis*), la *patterned flow cell technology* et l'acquisition de données de plusieurs téraoctets [1].

Technique Nanopore

Le séquençage Nanopore a été découvert en 1995 et a pour objectif de séquencer des échantillons d'ADN, c'est-à-dire de déterminer l'ordre dans lequel se trouvent les 4 bases Adénine (A), Cytosine (C), Thymines (T) et Guanine (G) des nucléotides sur le brin d'ADN.

Principe

Le principe du séquençage par Nanopore est de déterminer la séquence de la molécule d'ADN par l'utilisation de nanopores (pores avec un diamètre de l'ordre d'un nanomètre). Lorsqu'un nanopore est placé dans un milieu conducteur et soumis à un voltage, il est traversé par un courant électrique issu de la conduction d'ions. Ce courant est mesurable et dépend de :

- la taille et la forme du nanopore,

- la nature et concentration des particules traversant ou passant à proximité du nanopore.

Le courant est ainsi modifié de manière caractéristique lorsque le pore est traversé ou obstrué par un nucléotide contenant les bases A, C, T ou G. En faisant passer un brin d'ADN par le Nanopore, il est donc possible de déterminer la séquence de la molécule.

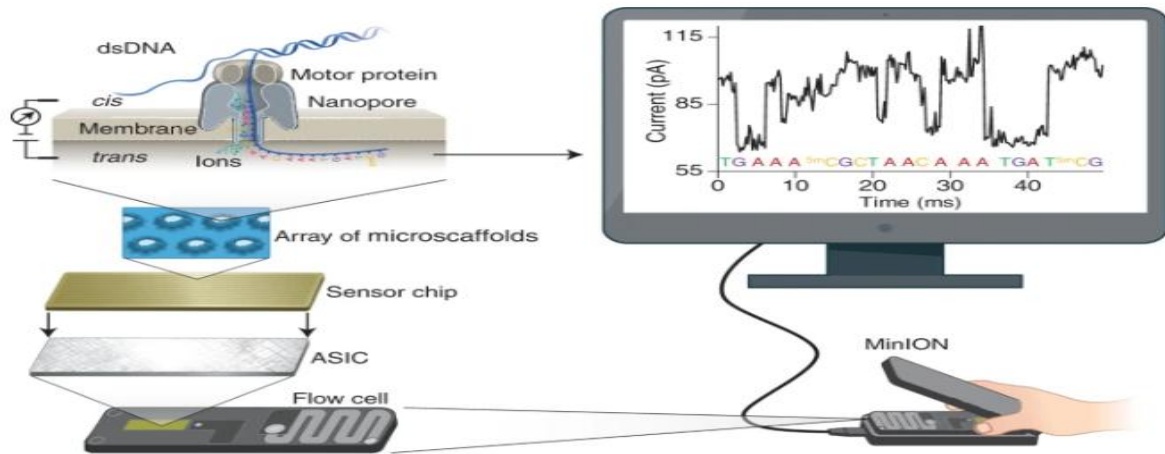


Figure 17: Principe de fonctionnement de la Technologie Nanopore [2].

Dictionnaire : Array of microscaffolds : réseau de microécaffaudages ;

Motor protein nanopore : protéine moteur nanopore ; Sensor chip : puce capteur.

Les séquenceurs NGS et TGS peuvent faire des millions voire des milliards de réactions de séquençage en parallèle. Dans les technologies NGS et TGS, la détection des nucléotides incorporés par la polymérase est faite directement après chaque cycle d'incorporation [40].

Les préparations des banques NGS et TGS suivent globalement les mêmes procédures, sauf que pour le TGS les étapes de fragmentation de l'ADN génomique et d'amplification par PCR sont optionnelles [29].

8.2.3.4. Les séquenceurs capillaires

Un séquenceur de gène à capillaire utilise des tubes capillaires de verre ayant quelques microns de diamètre, sur plusieurs dizaines de centimètres de longueur (30 à 50 cm en général), pour réaliser la séparation des brins d'ADN durant l'électrophorèse. Avec généralement un nombre de capillaires multiples de 2 (2, 4, 8, 16...). On multiplie ainsi le nombre de migrations simultanées, ce qui permet de passer un plus grand nombre d'échantillons dans le même laps de temps. Les instruments à capillaire les plus modernes de séquençage automatique de l'ADN sont capables de lire jusqu'à 384 échantillons d'un coup (1 run) et réaliser jusqu'à 24 runs en une journée. Ces instruments ne réalisent que la séparation des brins et la lecture des pics ; les réactions de séquençage, la purification et la suspension dans un tampon approprié doivent être réalisées séparément, de façon manuelle ou à l'aide d'un robot pipeter[41].

8.2.3.5. Le pyroséquençage: Méthode non sanger de séquençage

Le pyroséquençage est de loin la technique non Sanger qui a connu le plus de succès. Cette technique de séquençage d'ADN introduite depuis 1988, par Hyman et al. (Hyman 1988), et amélioré par un groupe suédois (Ronaghi, Karamohamed et al. 1996; Ronaghi, Pettersson et

al. 1998 ; Ronaghi, Uhlen et al. 1998) par introduction de la PCR. Il s'agit d'un séquençage par synthèse (sequencing by synthesis, SBS) et qui se caractérise par la révélation en temps réel de l'activité de l'ADN polymérase (real time sequencing) qui ajoute un seul nucléotide non fluorescent à la fois[37].

Le pyroséquençage se déroule en 5 étapes qui suivent :

Etape 1 : Consiste à préparer le mélange réactionnel, avec les enzymes clefs et les différents substrats

Etape 2 : Ici, les nucléotides ne sont pas ajoutés tous ensemble comme dans une réaction de séquençage normale mais l'un après l'autre. Si le Nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la Polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse (d'élongation) et libère un Pyrophosphate.

Etape 3 : L'ATP sulfurylase vient alors transformer ce Pyrophosphate (PPi) en ATP qui est alors utilisé, couplé à une Luciférine, par une Luciférase. On a alors production d'Oxyluciférine et d'un signal Lumineux

Etape 4 : L'Apyrase dégrade les nucléotides en surplus.

Etape 5 : Le signal lumineux est capté par un capteur CCD (Charge-Coupled Device) puis reproduit sous forme d'un pic sur le Pyrogramme. La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité

9. Prise en charge de la maladie à coronavirus

Plusieurs médicaments ont été étudiés ou font actuellement l'objet d'essais cliniques pour évaluer leur sécurité et leur efficacité en tant qu'agents potentiels pour la prophylaxie pharmaceutique ou le traitement de COVID-19, inclus les corticostéroïdes, l'analogue nucléotidique antiviral remdesivir, les interférons systémiques, les anticorps monoclonaux contre les composants du système immunitaires tels que l'interleukine-6, d'autres modulateurs immunitaires et les anticorps monoclonaux contre les composants du SARS-CoV-2. Les essais cliniques d'interventions thérapeutiques pour COVID-19 se sont concentrés sur des patients adultes, et donc des données limitées existent sur le traitement de COVID-19 chez les enfants.

Les traitements potentiels doivent être soigneusement évalués dans des essais contrôlés randomisés. En 2020, plusieurs essais multicentriques à grande échelle ont été organisés en utilisant une méthodologie suffisamment robuste pour l'évaluation des thérapies potentielles. Y compris l'essai de solidarité de l'OMS, plusieurs études des National Institutes of Health (NIH) des États-Unis, ainsi que des études internationales et nationales [42].

Selon le ministère de la santé au Mali la prise en charge de la maladie COVID-19 se fait en fonction de la gravité. Cependant, en l'absence de traitement prouvé efficace contre le

COVID-19, au regard de la pratique de plusieurs pays de la sous-région et des recommandations de l'organisation ouest africaine de la santé (OOAS) sur l'utilisation de l'Hydroxychloroquine (HCQ) ou de la chloroquine dans la prise en charge des cas de COVID-19 dans les centres hospitaliers, le Mali a adopté l'introduction de ces deux molécules dans le protocole de traitement de COVID-19 [29].

Cas de COVID-19 simple

Absence de difficulté respiratoire

Absence de comorbidités (insuffisance respiratoire, bronchopathies chroniques obstructives BPCO, insuffisance cardiaque, Asthme, insuffisance rénale, infection à VIH, Hépatite virale B et C, diabète, obésité...)

Absence de traitement immunosuppresseur, corticothérapie, anti-cancéreux

Protocole :

Paracétamol 500 mg comprimé toutes les 6 heures sans dépasser 4 g/24H.

Apports hydriques et nutritionnels normaux

Phosphate de chloroquine 100 mg 2 comprimés toutes les 8h pendant 10jours

Azithromycine comprimé

500 mg en dose unique le 1er jour

250mg par jour du 2ème au 4ème jour

Cas sévères chez les adultes

Polypnée (fréquence respiratoire > 30/min)

Saturation en oxygène (SpO₂) < 92% en air ambiant

Pression artérielle systolique < 90 mm Hg

Signes d'altération de la conscience, confusion, somnolence

Signes de déshydratation

Présence de comorbidités (Insuffisance respiratoire, BPCO, insuffisance cardiaque, Asthme, Insuffisance rénale, infection à VIH, Hépatite virale B et C, diabète, obésité...).

Traitement immunosuppresseur, corticothérapie, traitement anti-cancéreux en cours

Cas sévères chez les enfants

Saturation en oxygène (< 92%)

Détresse respiratoire sévère (battement des ailes du nez, tirage intercostal, Entonnoir xiphoïdien, balancement thoraco-abdominal...)

Signes d'encéphalopathie (agitation, convulsion, coma...)

État de choc (TRC<3 secondes, pouls filant, extrémités froides)

Insuffisance rénale (oligurie, anurie)

Insuffisance cardiaque (orthopnée, dyspnée, tachycardie, souffle...)

CIVD (saignements anormaux...)

Protocole

Oxygénothérapie : Lunette nasale ou Masque avec 3 à 4 l/min

Paracétamol 1 g en perfusion toutes les 6 heures sans dépasser 4 g/24H.

Phosphate de chloroquine 100 mg 2 comprimés toutes les 8h pendant 10 jours

Azithromycine

- 500 mg en dose unique le 1er jour

- 250mg par jour du 2ème au 4ème jour

Thromboprophylaxie

Enoxaparine 0,4 UI/24h

Repos au lit

Apport hydro-électrolytique et Nutritionnel,

Monitoring clinique (Cardioscope, SPO2, TA, Diurèse, Température),

Examens complémentaires : Biologie (NFS, Urée, créatinine, ASAT, ALAT, Bilirubine, TP-TCA, Troponine, Gazométrie Artérielle, lactatémie,) et

Radiologique (Rx thorax, échographie pulmonaire, TDM thoracique C+)

Pour les enfants :

Traitement de la fièvre avec du paracétamol 60 mg/kg/jour en 4 prises

Désinfection rhinopharyngée avec du sérum physiologique

Apports hydriques et nutritionnels adaptés à l'âge

Zinc : 10 mg par jour par voie orale

Le traitement se justifie en cas d'apparition de symptômes modérés ou sévères

Antibiotique à large spectre en IV.

Phosphate de Chloroquine : voie orale : 10 mg/kg/jour en 2 prises (toutes les 12 heures) pendant 10 jours

10. Mode Prévention

10.1. Les mesures barrières

Il existe un certain nombre de mesures efficaces pour prévenir l'infection à SARS-CoV-2 :

- Se laver les mains régulièrement (eau + savon) ou utilisez une solution hydro alcoolique.
- Tousser ou éternuer dans votre coude, ou dans un mouchoir.
- Eviter de se toucher le visage.

- Utiliser des mouchoirs à usage unique (et les jeter à la poubelle après le premier usage).
- Saluer sans serrer la main, sans embrassades.
- Conserver une distance d'au moins 1.5 mètre avec tout interlocuteur.
- Bien aérer les pièces.

En l'absence de traitement, la meilleure des protections pour vous et pour vos proches est, en permanence, le respect des mesures barrières et de la distanciation physique. En complément, portez un masque quand la distance d'un mètre ne peut pas être respectée [24].

Les équipements de protection individuelle EPI pour les agents de la santé

Selon OMS et Center for Disease Control (CDC) (les centres pour le contrôle et la prévention des maladies forment ensemble la principale agence fédérale des Etats-Unis en matière de protection de la santé publique).

Protection respiratoire : masques respiratoires filtrants (FFP), masques faciaux (masques chirurgicaux) ;

- Protection des yeux : lunettes de protection ou écrans faciaux et doivent être compatibles avec le respirateur ;
- Protection du corps : blouses imperméables à manches longues ; si des blouses résistantes à l'eau ne sont pas disponibles, un tablier en plastique à usage unique porté par-dessus la blouse non résistante à l'eau peut être utilisé ;
- Protection des mains : des gants doivent être utilisés lors de la prise en charge des patients suspectés ou confirmés de COVID-19 [43].

10.2. Vaccins

Les vaccins contre COVID-19 classés selon leurs compositions :

COVID-19 ARNm, Deux vaccins inactivés à ARN messager contre la COVID-19 : Spikevax (Moderna) et Comirnaty (Pfizer-BioNTech). Ces vaccins sont à base d'ARN messager hautement purifié qui encode la protéine S du virus SARS-CoV-2, responsable de la COVID-19. L'ARN messager est entouré de particules lipidiques [44].

COVID-19 PRA (protéine recombinante avec adjuvant), Deux vaccins inactivés à protéine recombinante avec adjuvant contre la COVID-19 : Covifenz (Medicago) et Nuvaxovid (Novavax) [29].

Le Covifenz est préparé avec la protéine S du virus responsable de la COVID-19, le SARS-CoV-2, à laquelle est ajouté l'adjuvant AS03. La protéine S est produite par recombinaison génétique à l'aide de feuilles de tabac (*Nicotiana benthamiana*, variété

différente du tabac commercial) et d'une bactérie (*Agrobacterium tumefaciens*). Les protéines S s'auto-assemblent pour former des particules pseudo-virales.

Le Nuvaxovid est préparé avec la protéine S du virus responsable de la COVID-19, le SARS-CoV-2, à laquelle est ajouté l'adjuvant Matrix-M. La protéine S est produite par la technique de l'ADN recombinant à l'aide d'un vecteur d'expression du baculovirus dans une lignée cellulaire dérivée des cellules Sf9 de l'espèce *Spodoptera frugiperda* [29].

COVID-19 VV(vecteur viral), Trois vaccins inactivés à vecteur viral contre la COVID-19 : Vaxzevria (AstraZeneca); Covishield (SII); JAN COVID-19 (Janssen) [29].

Les vaccins Vaxzevria et Covishield sont fabriqués selon la même technologie, car AstraZeneca a transféré sa technologie au SII. L'immunogénicité et l'innocuité des 2 produits sont jugés comparables par Santé Canada. Les vaccins Vaxzevria et Covishield utilisent un adénovirus simien non pathogène pour l'humain et non répliatif, qui a été modifié pour encoder la protéine S du virus SARS-CoV-2, responsable de la COVID-19. L'adénovirus a été cultivé sur des cellules rénales humaines.

Le vaccin JAN COVID-19 utilise un adénovirus humain non répliatif, qui a été modifié pour encoder la protéine S du virus SARS-CoV-2, responsable de la COVID-19. L'adénovirus a été cultivé sur des cellules rétinienne humaines [29].

Tableau I : Liste des vaccins homologués par l’OMS.

Noms des vaccins	Date d’homologation
Commirnaty	09 Octobre 2020
Vaccin moderne COVID-19	21 Octobre 2020
Vaxzevria	04 Novembre 2020
Vaccin COVID-19 Jansen	22 Janvier 2021
Le Pfizer-BioNtech	31 Décembre 2020
Les deux sérums Astra Zeneca fabriqués en inde et en Corée du sud	15 Février 2021
Le sérum de Johnson et Johnson, appelé janssen	12 Mars 2021
Le vaccin de moderna	30 Avril 2021
Le vaccin Sinopharm	07 Mai 2021
Sinovac-Corona vac	01 Juin 2021

11. Diversité génétique

Dans le cas des variants du SARS-CoV-2 largement médiatisés ; les mutations sont essentiellement des substitutions qui sont à l’origine de la diversité génétique. Par exemple, la mutation N501Y signifie qu’en position du 501e acide aminé de la protéine S, une tyrosine (Y) a remplacé une asparagine (N). De la même manière, E484K signifie qu’une lysine (K) a remplacé un acide glutamique (E) comme 484e acide aminé de la protéine S. Les mutations les plus connus sont les D614G, E484K/Q, K417N/T, N501Y, L452R, P681H, 501Y.V [45].

Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali

Lorsqu'on suit le devenir de ces mutations dans le temps (leur transmission, l'ajout de nouvelles mutations, etc.), on obtient des « lignées » de virus que l'on peut visualiser comme des branches dans l'arbre phylogénétique de SARS-CoV-2. Sur ces branches, un groupe de virus partageant un même ensemble de mutations est appelé « variant ». Lorsque suffisamment de mutations s'accumulent chez un variant au point que celui-ci commence à se comporter de manière particulière, on parle de « souche » [46].

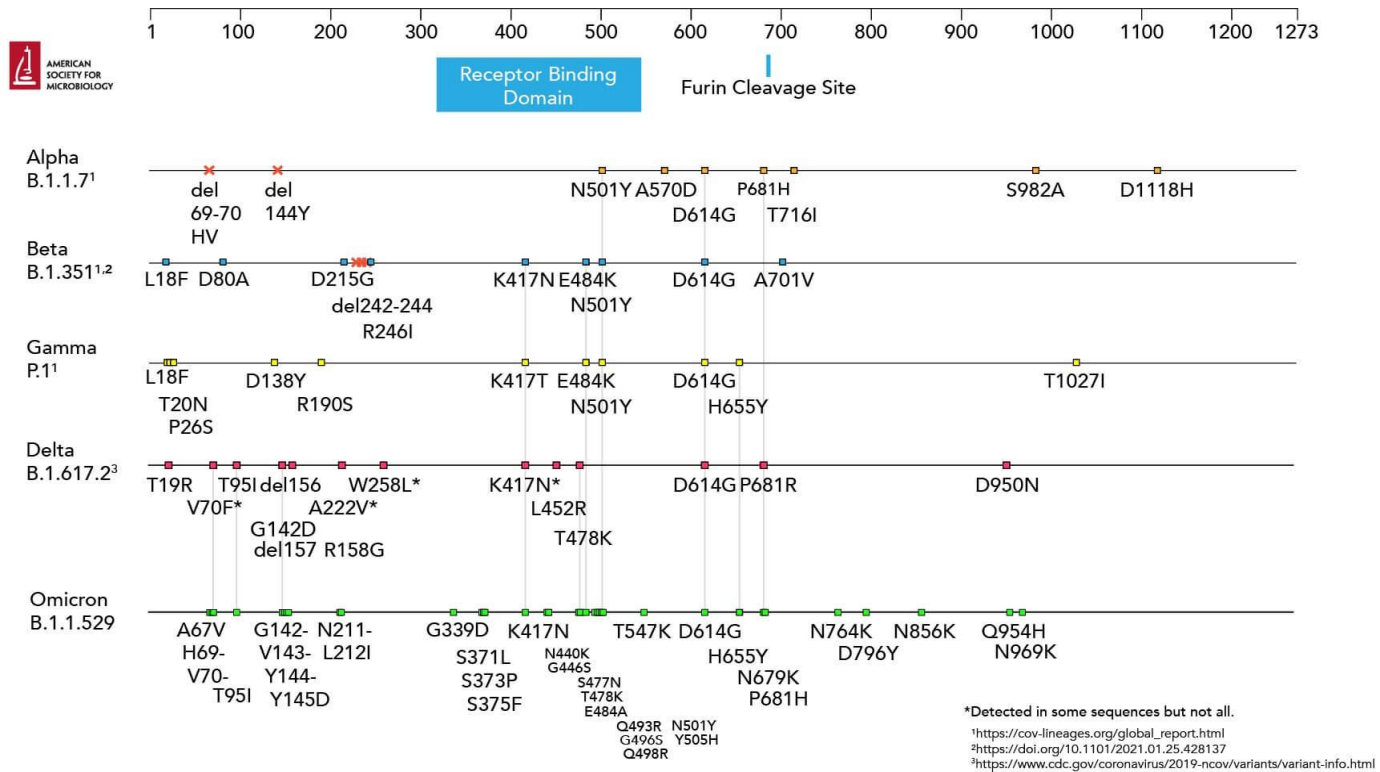


Figure 18: Illustration des mutations les plus fréquentes de SARS-CoV-2.

12. Les variants

Les nombreuses mutations au sein du génome de SARS-CoV-2 peuvent avoir des conséquences aboutissant à l'apparition de nouveaux variants pouvant être :

➤ Variant préoccupant

S'il est associé à :

- ✓ Augmentation de la virulence
- ✓ Augmentation de la transmissibilité
- ✓ Diminution de l'efficacité des méthodes de diagnostic, des vaccins et des traitements.

Exemples : variant Alpha, Bêta, Gamma et Delta

➤ Variant d'intérêt

S'il est associé à :

- ✓ Augmentation modérée de l'épidémiologie
- ✓ Augmentation modérée de la virulence
- ✓ Nécessité d'être suivi par l'OMS pour ne pas devenir variant préoccupant.

Exemples : Eta, Iota, Kappa et Lambda.

III. Méthodologie

1. Site d'étude

L'étude s'est déroulée à l'Institut National de Santé Publique (INSP), à BAMAKO pour les analyses de laboratoire. Les visites et les prélèvements ont été effectués dans les salles de prélèvement de l'INSP.

Présentation de l'Institut National de santé publique (INSP)

L'Institut National de Santé Publique (INSP) est un établissement public à caractère scientifique et technologique, créé par la loi N°2019-023/AN du 3 juillet portant ratification de l'ordonnance N°2019-011/P-RM du 27 mars, portant création de l'Institut National de Santé Publique (INSP).

Il a pour mission la mise en place d'un système de veille sanitaire et de surveillance épidémiologique et la promotion de la recherche sur les politiques et systèmes de santé.

L'INSP est structuré en sept départements, deux postes de conseillers et une Agence Comptable :

Département Administration et Ressources Humaines ; Département Communication, Documentation et Technologie de l'Information ; Département Etudes et Recherches Médicale et Communautaire ; Département Laboratoire et Recherche Médicale ; Département Nutrition et Sécurité Sanitaire des Aliments ; Département des Opérations d'Urgences en Santé Publique ; Département Qualité, Sécurité et Sûreté Biologique

En outre, l'Institut dispose de centres de formation et de recherche en zone rurale qui sont : Centre de Sélingué et de Kolokani, rattaché au Département Etudes, Recherches Médicale et Communautaire ;

Les modalités d'organisation et de fonctionnement de l'Institut National de Santé Publique sont fixées par le Décret N°2019-0247/P-RM du 27 mars 2019, par le Conseil d'Administration de l'Institut qui exerce, dans les limites des lois et règlements en vigueur, les attributions spécifiques. Constituer du Directeur, le comité scientifique-technique, le Comité de Gestion et le Comité d'Ethique.

2. Type et Période

Il s'agit d'une étude rétrospective qui s'est déroulée de février en mars 2023 dans le cadre de la surveillance épidémiologique de Covid-19.

3. Population d'étude

La population d'étude était constituée d'individus de tout âge et des deux sexes, testés positifs par RT-qPCR au SARS-COV-2 dans le cadre de la surveillance de routine et des voyages.

4. Echantillonnage

L'échantillonnage était exhaustif et concernait tous les prélèvements naso et oropharyngés acheminés de plusieurs sites dans le milieu de transport viral (VTM) et accueillis au laboratoire de virologie de l'INSP.

5. Critère d'inclusion

Nous avons inclus dans notre étude tout échantillon positif à la RT-qPCR pour la recherche de SARS-COV-2 avec une valeur de Ct inférieur à 30 Ct. Les échantillons avec des Ct supérieur à 40 Ct étaient considérés comme négatif.

6. Critère de non inclusion

N'ont pas été inclus dans notre étude tout échantillon positif à la RT-qPCR pour la recherche de SARS-COV-2 avec une valeur de Ct supérieur ou égal à 30 Ct.

7. Procédure de l'étude et données sociodémographiques

7.1- Méthode de collecte et acheminement au laboratoire

Les échantillons prélevés à l'INSP ont été acheminés au laboratoire de virologie dans des portoirs dédiés. Au niveau des sites externes tels que l'hôpital du Mali et l'hôpital de dermatologie de Bamako, les échantillons ont été prélevés et conservés entre +2°C et +8°C. Ces derniers ont été acheminés au laboratoire de virologie de l'INSP une fois par jour dans une glacière isothermique contenant des accumulateurs.

7.2- Données sociodémographiques

7.2.1- Données cliniques

Les données cliniques ont été obtenues par des interrogatoires lors des consultations.

7.2.2- Données biologiques

Techniques de laboratoires

7.2.3- Prélèvement

Les prélèvements ont été effectués par des écouvillons naso et oropharyngé dans le milieu de transport viral (VTM).

7.2.4- Extraction de l'acide nucléique

Deux types de réactifs ont été utilisés pour l'extraction d'acide nucléique. Le réactif d'extraction manuelle QIAamp Viral RNA Kits (Qiagen, Allemagne) est composé de Tampon AVL de lyse avec RNA carrier permettant d'augmenter le rendement de capture de l'ARN, de tampons de lavage AW1 et AW2) et de solution d'élution (tampon AVE) (voir mode opératoire en annexes).

Le kit d'extraction Magmax™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation a été utilisé pour automate Kingfisher (ThermoFisher scientifique, France). Il est composé de solution de lyse, de bille de capture 34 des acides nucléiques, de solution de lavage et d'élution. Ce kit utilise des plaques à puits profonds et des peignes de pipetage comme consommables (voir mode opératoire en annexes).

7.2.5. Détection moléculaire

Nous avons utilisé deux kits de détection moléculaire utilisant le PCR en temps réel après l'extraction virale d'acide nucléique. L'essai comprend tous les réactifs nécessaires pour détecter le SARS-COV-2. Les kits ARGENE ® et TaqPath™ COVID-19 sont composés de Master-mix prêt à l'emploi (y compris Taq polymérase), Reverse Transcriptase, Contrôle positif et négatif, un contrôle interne (IC1) vérifie le processus d'extraction et la présence d'inhibiteurs d'amplification dans l'échantillon et un contrôle cellulaire vérifie la qualité du prélèvement initiale.

ARGENE ® permet de cibler les gènes N, RdRp, et E. La plateforme d'amplification est le LightCycler 480 (System II).

Le kit TaqPath™ cible trois zones du virus SARS- CoV-2 : ORF1a et ORF1b ; le gène S et le gène N. L'instrument compatible avec le kit est le Instrument de PCR en temps réel QuantStudio 5 ; 96 puits, bloc de 0,2 ml (voir détails annexe).

7.2.6- Séquençage du génome entier

Préparation de la librairie

Illumina

❖ Synthèse d'ADNc du premier brin

Cette étape inverse transcrit les fragments d'ARN amorcés avec des hexamères aléatoires en premier brin d'ADNc en utilisant la transcriptase inverse et exécuter selon le programme COVIDSeq FSS sur le thermocycleur.

Les kits utilisés : FSM HT (First Stand Mix HT), RVT HT (Transcriptase inverse HT).

❖ Amplification d'ADNc

Cette étape utilise deux réactions distinctes pour amplifier

Réactifs utilisés : CPP1 HT (COVIDSeq Primer Pool 1 HT), CPP2 (COVIDSeq Primer Pool 2 HT), IPM (Illumina PCR Mix HT)

Lancer le programme COVIDSeq PCR sur le thermocycleur

❖ Marquage PCR des amplicons

Cette étape utilise EBLTS HT pour marquer les amplicons PCR, qui est un processus qui fragmente et marque les amplicons PCR avec des séquences d'adaptateur.

Kits utilisés : EBL TS HT (Enrichissement BLTS HT), TB1 HT (Tapon de Tagmentation HT), Eau PCR.

Exécuter le programme COVIDSeq TAG sur le thermocycleur.

❖ Netoyage post-tagmentation

Cette étape lave les amplicons étiquetés par l'adaptateur avant l'amplification par PCR.

Les réactifs : ST2 (Stop Tagmentation Buffer 2 HT), TWB HT (Tampon de lavage de Tagmentation HT) ;

❖ Amplification des amplicons marqués

Cette étape amplifie les amplicons marqués à l'aide d'un programme PCR. L'étape de PCR ajoute les adaptateurs d'index1 (i7) de 10 paires de bases, des adaptateurs d'index2 (i5) et des séquences nécessaires pour la génération de clusters de séquençage.

Kits utilisés : EPM HT (Enhanced PCR Mix HT), adaptateurs index (IDT pour Illumina PCR Indexes Set), Eau sans nuclease.

Cette étape est réalisée selon le programme COVIDSeq TAG PCR.

❖ **Pooling et lavage de la librairie**

Cette étape combine des bibliothèques de chaque plaque d'échantillons à 96 puits dans un tube de 1,7 ml. Les bibliothèques de taille optimale sont ensuite liées à des billes magnétiques et les fragments trop petits ou trop gros sont éliminés.

Les kits utilisés : ITB (Illumina Tune Bead), RSB HT (Tampon de Ré suspension HT), Ethanol à 80%, Barrette de 8 tubes PCR

❖ **Quantification de la librairie**

Cette étape consiste à déterminer la teneur de la librairie en matière génétique à l'aide de la machine Qubit.

Les kits utilisés : RSB HT, kit de test QubitdsDNA HS Assay.

Cette étape regroupe et dilue la librairie à la concentration de départ du système de séquençage. Après dilution à la concentration de départ, la librairie est prête à être dénaturées et diluées à la concentration finale de chargement.

❖ **Préparation pour le séquençage**

Le test Illumina COVIDSeq est compatible avec les cellules à circulation SP et S4 du système de séquençage NovaSeq 6000, le système de séquençage NextSeq 2000, les systèmes de séquençage NextSeq 500/550 et le NextSeq 550DX instrument.

❖ **Analyse des données**

Chargement des données sur BV-BRC (Bacterial and Viral Bioinformatic Ressource Center)

Plusieurs étapes :

- Création d'un compte sur le site BV-BRC
- Cliquer sur Tools and Services
- Choisir SARS-CoV-2 Genome analysis
- Sélectionner la plateforme
- Charger les échantillons à analyser
- Cliquer sur submit

Technologie Nanopore

Préparation de la librairie s'effectue sur plusieurs étapes qui sont :

❖ **Rétro transcription**

Cette étape consiste à convertir l'ARN en ADN double brin avec le réactif LS-RT sur une nouvelle plaque dénommée « RT_date », selon le programme RT_1 (pre-heated to 25°C).

❖ **Amplification**

Cette étape permet la synthèse de l'ADN complémentaire avec un complexe de réactifs indiqués dans le protocole (voir annexe). Selon le programme Amp enregistré dans le thermo cycler.

❖ **Ajout de Barres codes**

L'ajout des Barres codes permet de différencier les échantillons lors de l'analyse des données en utilisant le kit RB96 selon le programme «Run Lig_3 »

❖ **Pooling de la librairie et purification**

Pooling est une étape consiste à mettre ensemble l'ensemble des échantillons dans un seul tube après l'ajout de code Barre.

Quant à la purification, elle permet d'éliminer les agents contaminent tels que les protéines, les agents infectieux tout en conservant intégrité du matériel génétique en utilisant le kit AMPure XP beads (capture du matériel génétique), le kit Elution Buffer (pour l'élution) et un portoir magnétique.

❖ **Quantification de la librairie**

Cette étape permet de déterminer la quantité du matériel génétique contenu dans la librairie préparée par absorption par fluorescence par utilisation d'une solution de travail QubitdsDNA HS kit.

❖ **Addition des adaptateurs**

Les adaptateurs sont des courtes séquences de nucléotide utilisés pour faciliter la fixation du matériel génétique au *flow cell* avec le kit RAP-F.

❖ **Séquençage**

Consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides qui constitue le génome en utilisant le mélange de réactif suivant :

-Flow cell priming mix sur MinION MKC1

- Librairie mix.

❖ **Analyse de données sur Epi2ME**

EPI2ME est un outil bio-informatique permettant d'analyser le génome séquencé par Nanopore par plusieurs étapes à savoir :

- Sélection de la source
- Choix de l'analyse
- Chargement
- Analyse
- Rapport de l'analyse.

8. Analyse biostatistique des séquences ?

Les données brutes ont été traitées sur le BV-BRC et analysées sur Nextclade pour voir les différents variants. Ces données ont été soumises à un contrôle de qualité des séquences QC. Format des fichiers d'entrée sont des formats Pod5, Fast5 et BCL. Format des fichiers de sortie est le format Q. Les calculs statistiques ont été faits avec IBM SPSS et EXCEL.

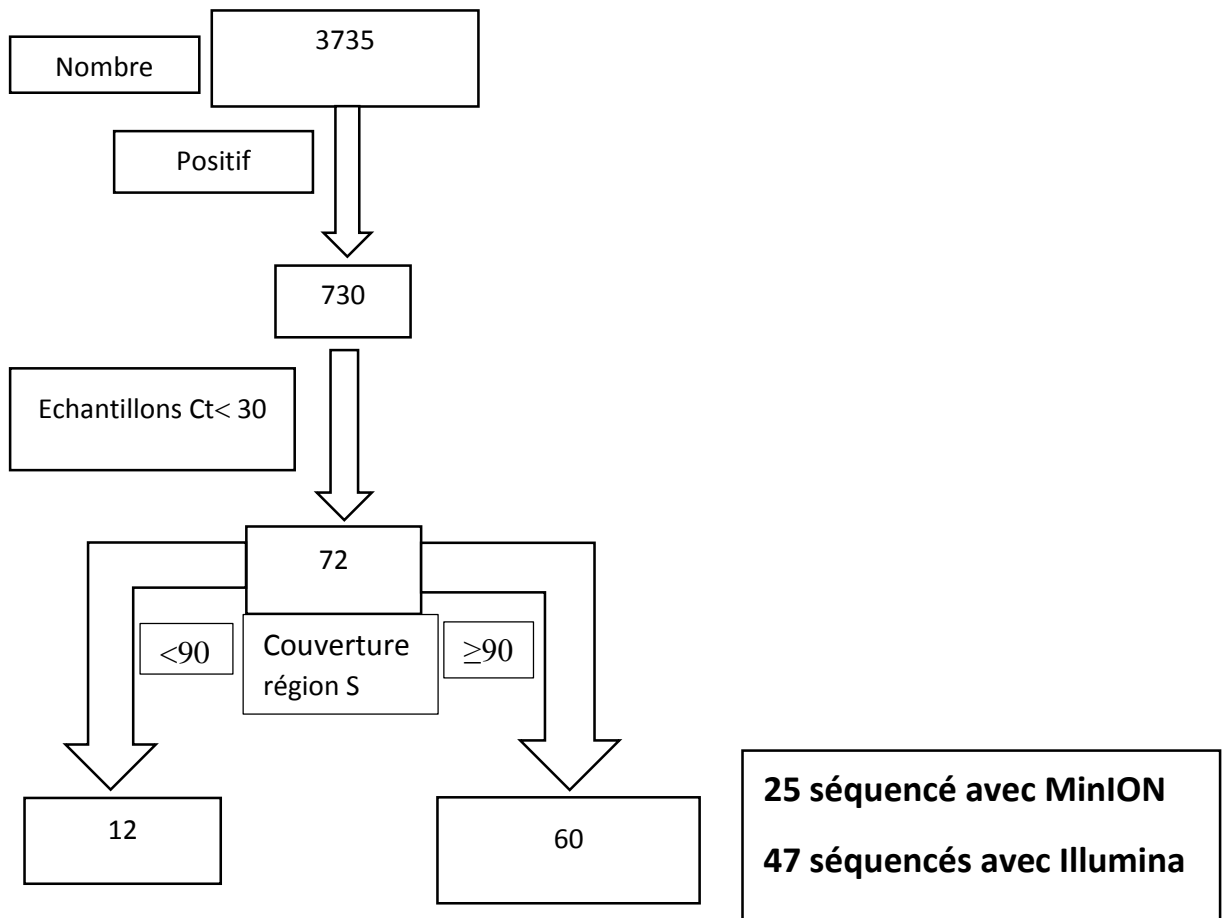
9. Aspects éthiques

Notre étude a été menée à l'INSP dans le cadre de la surveillance épidémiologique de la maladie à coronavirus ce qui nous a permis d'avoir l'approbation du Directeur Général de l'INSP. L'anonymat et la confidentialité ont été respectés tout au long de l'étude.

IV. Résultats

Au total soixante-douze librairies ont été préparées dont 60 échantillons ont été séquencés avec succès.

Pour procéder au choix d'échantillon nous avons numéroté tous les échantillons par ordre de numérotation et nous avons fait la sélection de façon aléatoire par nombre pair c'est-à-dire les nombres divisibles par 2 et cette démarche méthodologique nous a permis de préparer nos librairies :



1. Répartition des participants en fonction des caractères sociodémographiques

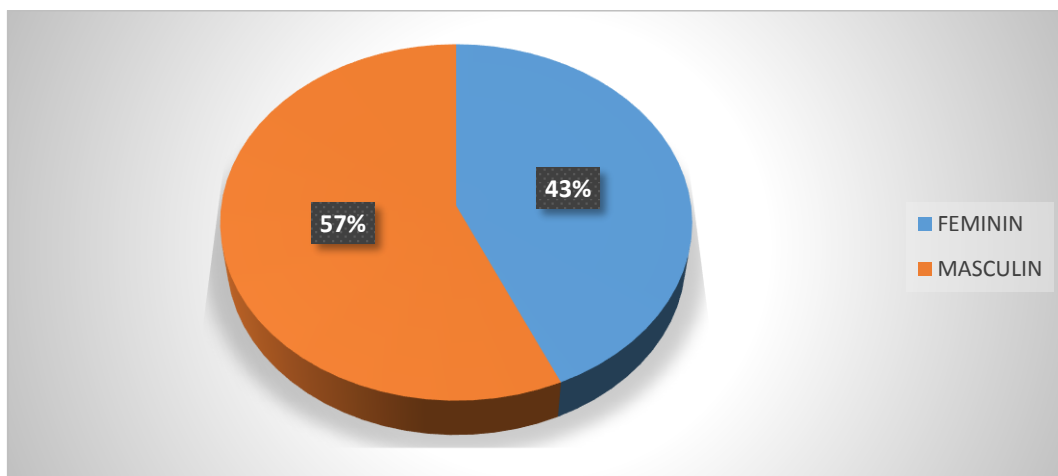


Figure19 : Répartition des participants en fonction du sexe.

Dans notre étude le sexe masculin représentait en moyenne 57% avec un ratio (H/F) de 1,32 en faveur du sexe masculin.

Tableau II : Répartition des participants en fonction de l'âge.

Tranches d'âges	Effectifs	Pourcentage
0-15 ans	2	3,3
16-30 ans	16	26,7
31-45 ans	21	35,0
46-60 ans	11	18,3
61 ans et +	10	16,7
Total	60	100,0

La tranche d'âge la plus représentée dans notre étude était comprise entre [31-45] ans avec une fréquence de 35% suivie des [16-30] ans avec 26,7%.

Tableau III : Répartition des participants en fonction de la profession.

Profession	Effectifs	Pourcentage
Agents de Santé	6	10,0
Elèves/Etudiants	8	13,3
Entrepreneurs/Commerçants	36	60,0
Missionnaires	3	5,0
Autres	7	11,7
Total	60	100,0

La profession la plus touchée était les entrepreneurs/commerçants avec une fréquence de 60% suivi par les élèves/étudiants avec 13,3%.

Tableau IV : Répartition des participants en fonction de la résidence

Résidence	Effectifs	Pourcentage	
District de Bamako	Commune I	11	18,3
	Commune II	5	8,3
	Commune III	5	8,3
	Commune IV	7	11,7
	Commune V	7	11,7
	Commune VI	2	3,3
Région de Koulikoro	Koulikoro	4	6,7
	Kalanban-coro	10	16,7
	Kati	8	13,3
	Sikasso	1	1,7
Total	60	100,0	

La partie importante de nos échantillons provenaient des différentes communes du district de Bamako avec une fréquence cumulée de 61,6% suivi de Koulikoro avec une fréquence de 6,7% dont 6,7% pour la ville de Koulikoro, 16,7% pour Kalaban-coro et 13,3% pour Kati.

2. Séquençage du génome

Les variants obtenus après séquençage étaient tous des variants Omicron avec ses sous-variants.

Tableau V : Répartition des échantillons en fonction des sous-variants

Sous lignées	Effectifs	Pourcentage
B.1.1.529	1	1,7
BA.2	4	6,7
GA.10	1	1,7
GA.5(XBB.1.17.1.5)	2	3,3
GA.8	1	1,7
XBB.1	3	5,0
XBB.1.17.1	38	63,3
XBB.1.22.1.1	1	1,7
XBB.1.5	8	13,3
XBB.2	1	1,7
Total	60	100,0

La sous lignée la plus représentée dans notre étude était XBB.1.17.1 avec 38 cas (63,3%) suivie par XBB.1.5 avec 8 cas (13,3%).

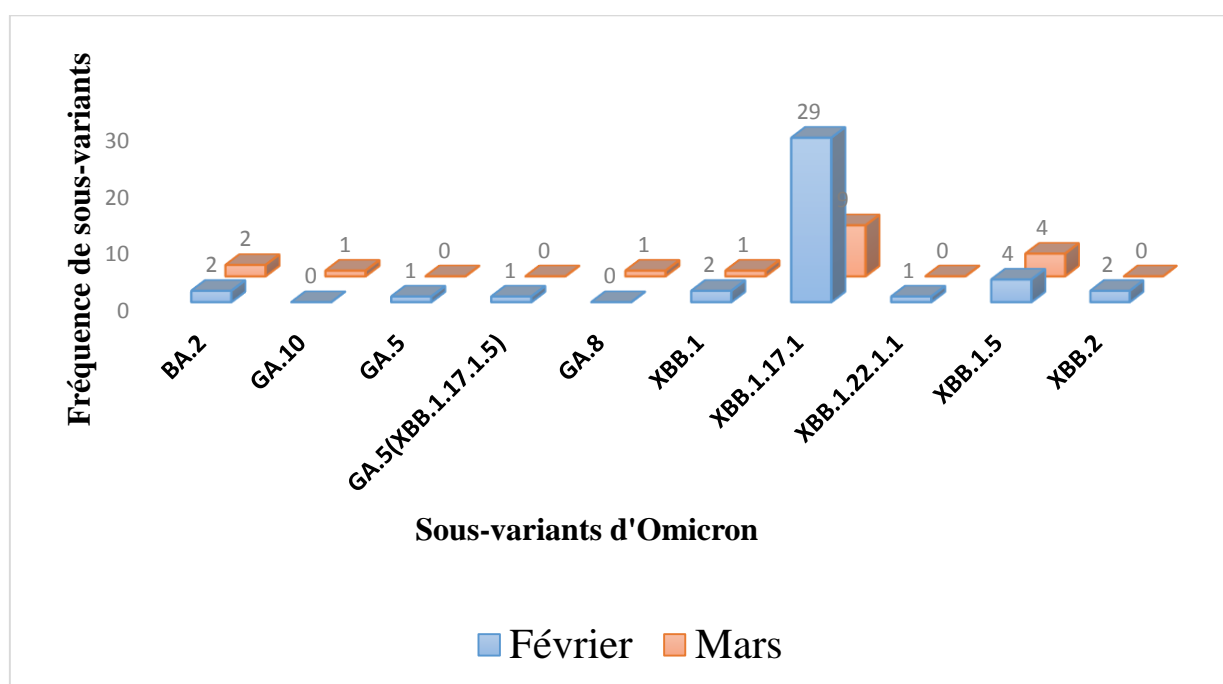


Figure 20 : Répartition des sous-variants en fonction du Mois.

Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali

Les sous-variants d’Omicron BA.2, XBB.1.5, XBB.1 et XBB.1.17.1 circulaient ensemble au Mali pendant notre période d’étude avec une prédominance absolue de XBB.1.17.1 pendant le mois de février.

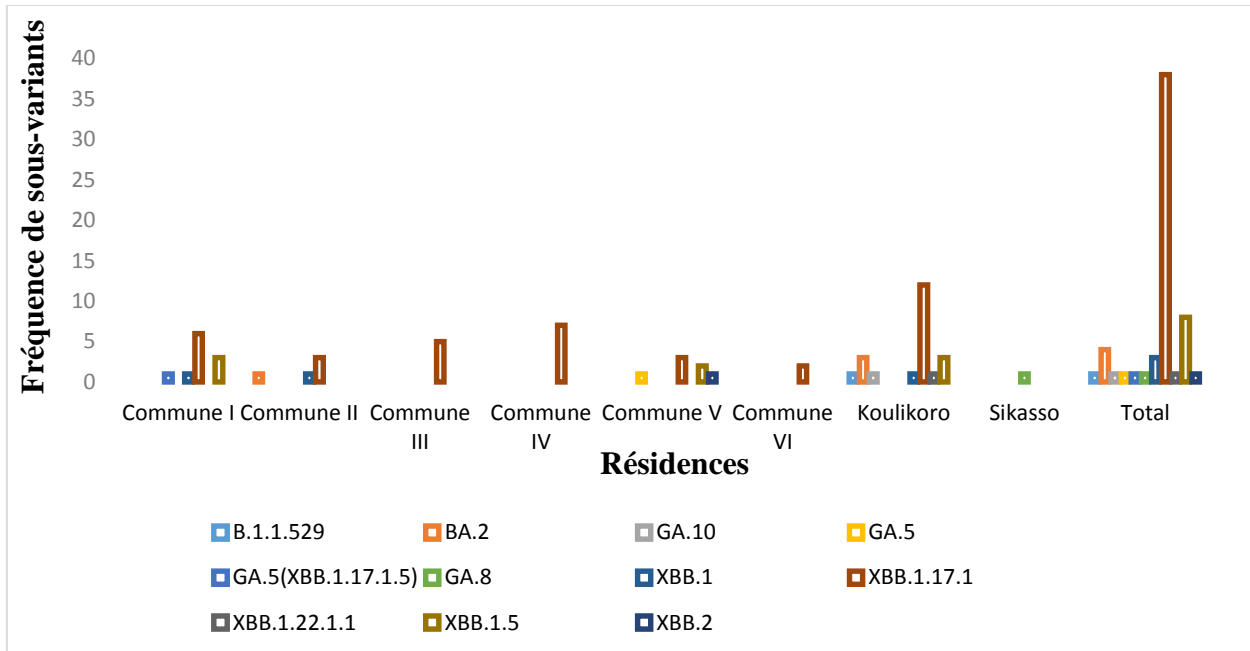


Figure 21 : Répartition des sous-variants en fonction de la résidence des participants.

Cette figure nous renseigne sur une co-circulation des sous-variants dans ces différentes localités durant notre période étude par exemple les sous-variants B.1.1.529 ; GA.5 ; XBB.1.17.1 et XBB.1.5 circulaient ensemble dans la commune I à Bamako. De la même manière les sous-variants B.1.1.529, BA.2, GA.10, XBB.1.17.1 et XBB.1 circulaient ensemble dans la région de Koulikoro.

Tableau VI : Répartition des échantillons en fonction des clades.

Clades	Effectifs	Pourcentage
21L	4	6,7
21M	1	1,7
22F	47	78,3
23A	8	13,3
Total	60	100,0

Le clade le plus représenté dans notre étude était le 22F avec une fréquence de 78,3%.

La sous-lignée la plus représentée dans notre étude était XBB.1.17.1 avec 38 cas (63,3%) suivie de XBB.1.5 avec 8 cas (13,3%).

3. Profils de mutations

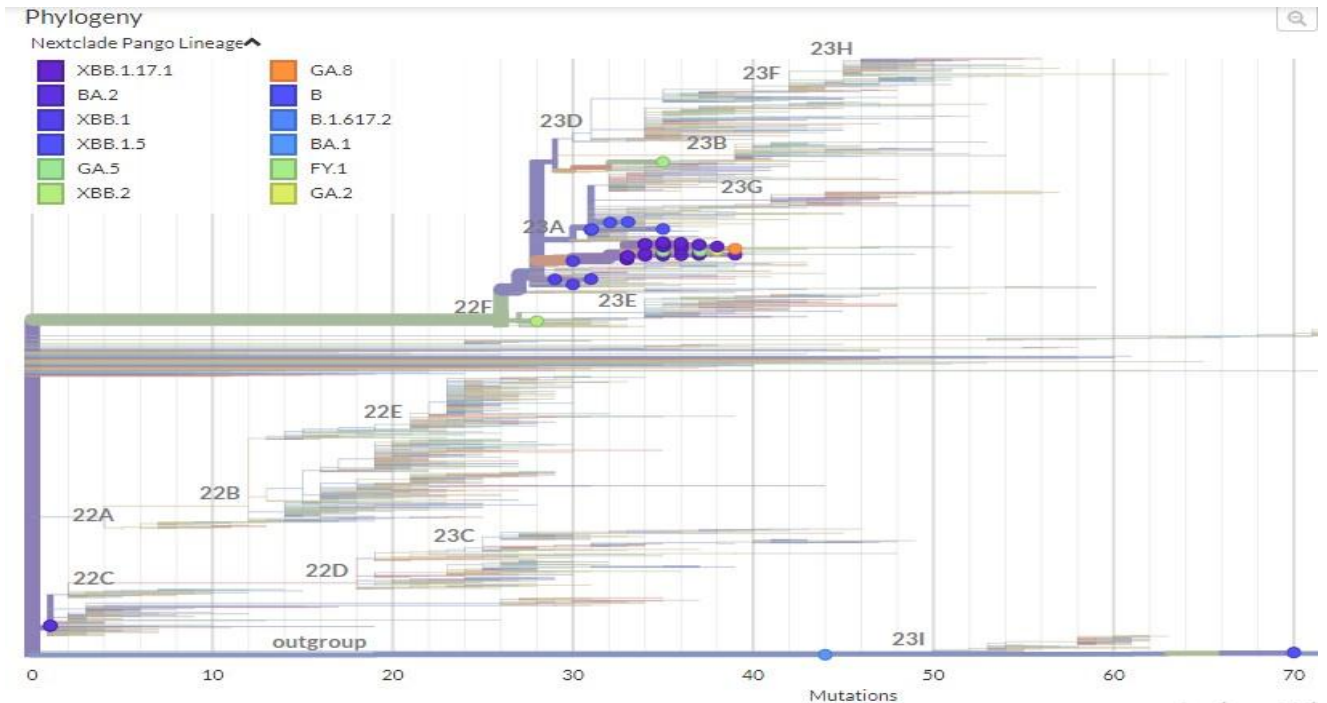


Figure 22 : Arbre phylogénétique.

De nouvelles mutations sont venues s'ajouter aux mutations préexistantes (figure 22) et ces nouvelles mutations commencent à partir de 22F. Les points de colorations variées au-dessus de 22F représentent les différentes mutations dans nos échantillons.

Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali

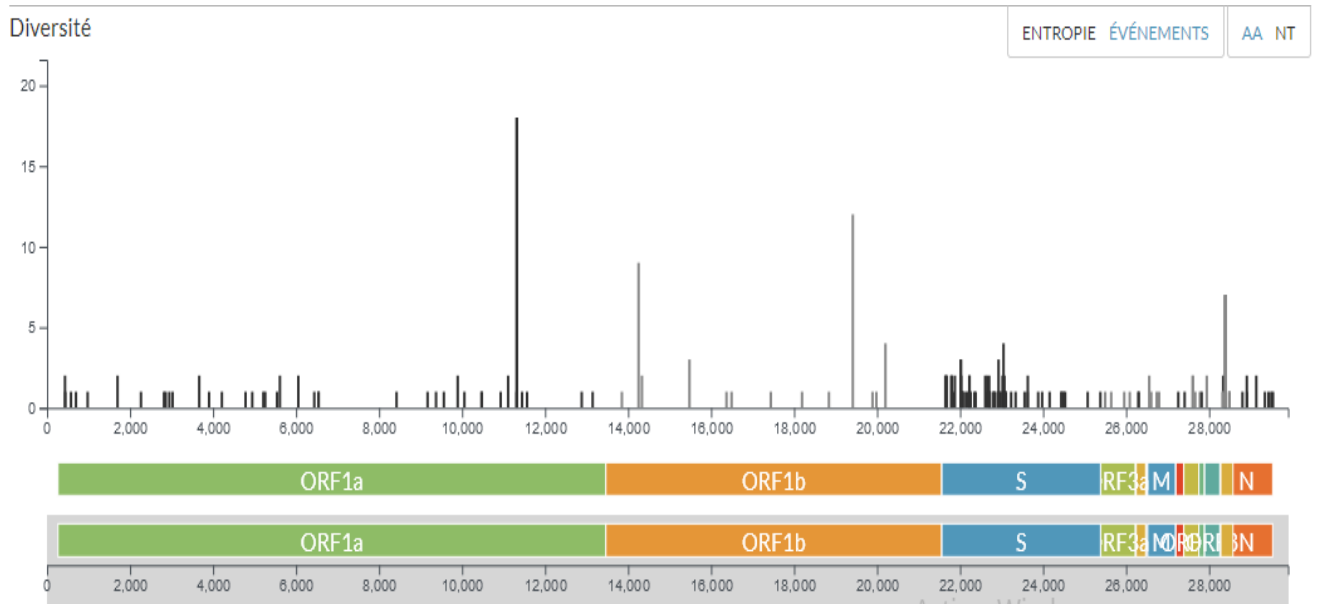


Figure 23 : Fréquence des mutations sur différentes régions du gène.

Cette figure nous renseigne sur la fréquence des mutations sur le gène S qui devient remarquable d'environ la 22,000^{ème} position sur cette région du gène.

Le variant Omicron possède plusieurs mutations surtout sur le gène S dont les plus fréquentes sont représentées sur la figure suivante.

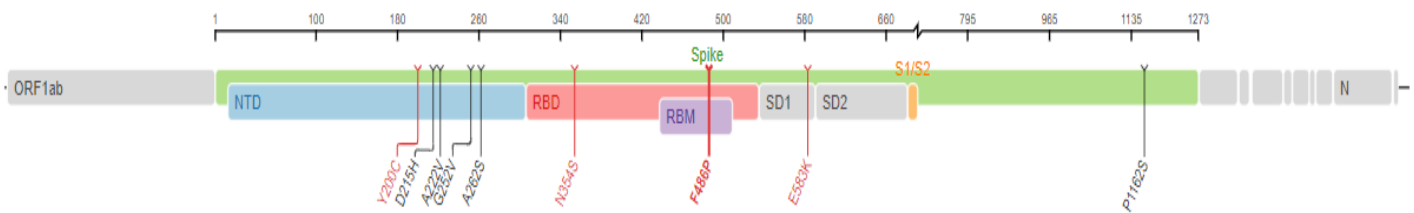


Figure 24 : Les mutations les plus fréquentes sur le gène S.

Les mutations en rouge sont des nouvelles mutations et celles en noire sont des mutations préexistantes toutes localisées sur le gène S du génome viral.

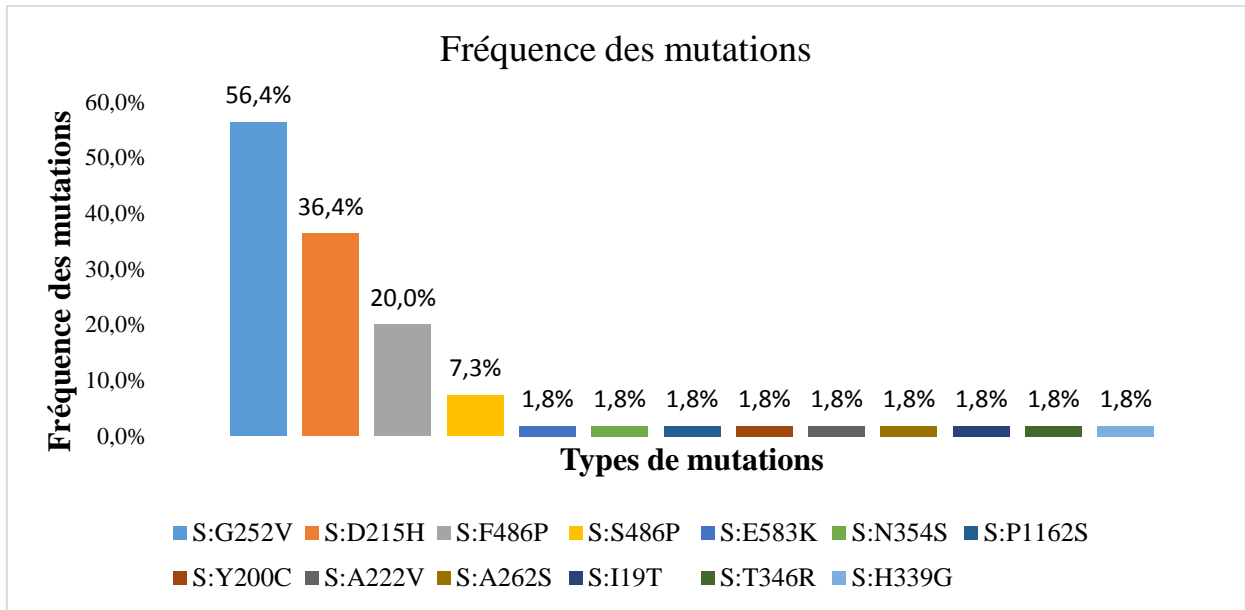


Figure 25 : Fréquence des mutations.

Les mutations trouvées durant notre étude sont représentées sur cette figure par ordre de fréquence c'est-à-dire de la mutation la plus fréquente à la mutation la moins fréquente.

V. Commentaires et discussions

1. Répartition des participants en fonction des caractères sociodémographiques

Dans notre étude le sexe masculin était prédominant (57%) par rapport au sexe féminin (43%). Cette prédominance masculine a été observée dans certaines études notamment celle menée par Guan *et al.* (Caractéristique clinique de COVID-19 en Chine), dont 58,1 % des patients étaient des hommes [47], et celles de Zhou *et al.* (Cours clinique et facteurs de risque de mortalité des patients adultes atteints de COVID-19 à Wuhan, en Chine : une étude cohorte rétrospective) et de Wu *et al.* (Facteurs de risque associés au syndrome de détresse respiratoire aiguë et au décès chez les patients atteints de pneumonie à coronavirus 2019 à Wuhan, Chine, respectivement 62% et 63,7% [48],[49]. Cette différence peut s'expliquer par le fait que les hommes viennent plus fréquemment pour le test que les femmes car leur déplacement est facile et ils voyagent beaucoup.

La tranche d'âge la plus représentée était comprise entre [31-45] ans avec une fréquence de 35% suivi de la tranche [16-30] ans. Ce résultat est proche de celui d'Y. Coulibaly *et al.* [29] (Caractéristiques virologiques et cliniques du SARS-CoV-2 dans les centres de prise en charge de la COVID-19 au Mali et en Guinée) qui avait trouvé 47% dans l'intervalle 16-40 ans. Cela s'explique par le fait que les Hommes à ces intervalles d'âges font beaucoup de déplacements à la recherche de revenus pour subvenir à leurs besoins.

Les professionnels les plus exposés étaient les entrepreneurs et les commerçants. Ce résultat est différent de celui de R. Sanogo *et al.* [50] (Etude de la diversité des variants SARS-CoV-2 par la RT-PCR de criblage au Mali de Novembre 2021 à Janvier 2022) qui avaient trouvé les ouvriers comme les plus exposés. Cette différence est peut-être due à la taille de l'échantillon.

La plupart de nos échantillons provenaient des différentes communes du district de Bamako avec une fréquence cumulée de 61,7%. Ce résultat est différent de celui d'O. Sangho *et al.* (2021) [51] qui avaient trouvé Tombouctou comme l'épicentre de la maladie à coronavirus au Mali avec une fréquence de 40,3%. Cette différence peut être expliquée par le fait que notre étude n'a pas été menée sur toutes les localités du Mali par manque d'échantillons en provenance de ces localités.

2. Distribution des variants

Au début du mois de janvier 2023 à l'échelle mondiale c'est la souche originale d'Omicron B.1.1.529 qui prédominait mais de février en mars 2023 le sous variant XBB.1.5 a pris le dessus

avec une fréquence de 53,22% selon la base de données GISAID [52], cela qui correspond à notre période d'étude et confirmé également par notre étude.

Selon les données fournies par GISAID, la prédominance du sous-variant XBB a été observée au Sénégal en cette même période avec une fréquence de 55,56% confirmant ainsi les résultats de notre étude. Au même moment, les données fournies par les chercheurs Burkinabé sur la base de données GISAID confirment une prédominance absolue du sous-variant XBB en cette période [52]; ce qui confirme la circulation du variant omicron au Burkina en son temps.

3. L'impact des mutations sur les stratégies de contrôle

Sur la base des données actuellement disponibles, le risque global associé à Omicron, malgré une baisse observée de l'incidence de la COVID-19, reste très élevé. À ce jour, il s'agit de la seule variante de préoccupation en circulation, suivie par l'OMS [53]. Un certain nombre d'études ont confirmé que le variant Omicron a une capacité significativement plus grande à échapper à la réponse immunitaire. Les sujets vaccinés et les convalescents sont facilement réinfectés, ce qui est différent d'autres souches de SARS-CoV-2 [54-57]. L'omicron présente également un avantage significatif en matière de transmissibilité. Après l'émergence en Afrique du Sud, en quelques semaines, il s'est répandu de manière exponentielle dans le monde entier; la vitesse d'expansion d'Omicron a été plus rapide que les autres variantes précédentes [58].

- Mutation G252V : l'impact de cette mutation n'est pas très bien connu mais elle est beaucoup impliquée dans la résistance de XBB.1.5 contre les anticorps monoclonaux neutralisants et une augmentation du pouvoir infectieux [59]. En considérant l'effet engendré par cette mutation, il est évident qu'elle soit retrouvée chez la plupart de nos patients parce que les sous-lignées possédant cette mutation peuvent persister même après le traitement de ces patients par les médicaments contenant des anticorps polyclonaux.
- Mutation D215H : cette mutation augmente l'affinité du virus pour les récepteurs ACE2 en interagissant avec les sous-unités de la protéine Spike [60]. Ceci s'explique par le fait qu'avec cette mutation le virus devient beaucoup plus transmissible donc il peut infecter beaucoup de personnes.
- Mutation P1162S : cette mutation est associée à une diminution de la stabilité de la protéine de pointe ce qui rend difficile la reconnaissance de la protéine de pointe par les anticorps monoclonaux donc échappement du virus aux vaccins [61].

- Mutation F486P : confère au virus une résistance accrue aux anticorps monoclonaux et améliorant la liaison du virus au récepteur ACE2 [59].

Les mutations P1162S et F486P sont bien associées à d'autres propriétés de ces virus telles que diminution de stabilité de la protéine S et l'échappement aux anticorps monoclonaux mais n'étaient pas fréquentes chez nos patients durant cette étude donc ces mutations ne vont pas faire trop d'impact car elles sont moins représentées.

4. Limites

- Durant notre étude, nous avons été confrontés à un problème de conservation des échantillons ce qui a joué sur la qualité de nos matériels génétiques.
- Les informations sur les patients étaient incomplètes.
- Notre étude n'a pas été menée sur toutes les localités du Mali par manque d'échantillons en provenance de ces localités.

Conclusion

Notre étude portant sur la distribution des variants pendant la cinquième vague par des techniques de séquençage a confirmé que tous les variants circulant pendant la vague 5 au Mali étaient des variants Omicron qui était le variant préoccupant en cette période dans le monde. Cette étude sur la distribution des variants pendant la vague 5 nous a permis de détecter plusieurs mutations notamment sur la région Spike (S) d'où la nécessité de mettre en place une surveillance génomique de routine pour suivre régulièrement l'évolution des variants de SARS CoV-2 afin de mettre en place des mesures de prévention et de contrôle efficaces contre la COVID-19 et des maladies infectieuses émergentes en général.

VI. Recommandations

Nous formulons les recommandations suivantes :

❖ Aux autorités sanitaires

Investir dans la recherche pour une surveillance génomique réussite.

Mesures prévention et contrôle efficaces contre la COVID-19.

❖ Aux chercheurs

D'implanter des protocoles de recherche pour mieux comprendre la COVID-19.

Mettre l'accent sur la surveillance génomique de routine.

❖ A la population

D'aller se faire dépister et à temps également pour faciliter la surveillance des variants de COVID-19.

De participer aux études sur la COVID-19.

VII. Références

1. FRASLIN, J.-M., par Morgane ROUL, jeudi 13 avril 2017, 21: 58.
2. Rosenthal, S.H., et al., Development and validation of a high throughput SARS-CoV-2 whole genome sequencing workflow in a clinical laboratory. *Scientific Reports*, 2022. **12**(1): 2054.
3. Amir, I.J., Z. Lebar, and M. Mahmoud, Covid-19: virologie, épidémiologie et diagnostic biologique. *Option/Bio*, 2020. **31**(619): 15.
4. Boudabbous, M., et al., A survey to explore the psychological and professional impact of change imposed by COVID-19. *Future Science OA*, 2023(0): p. FSO879.
5. Chavda, V.P. and V.N. Uversky, SARS-CoV-2 Variants and COVID-19 Pandemic: Future Perspectives, in *SARS-CoV-2 Variants and Global Population Vulnerability*. 2024, Apple Academic Press. 557-563.
6. Turner, S., et al., Global variation in prior exposure shapes antibody neutralization profiles of SARS-CoV-2 variants up to BA. 2.86. *bioRxiv*, 2024: p. 2024.03.27.586820.
7. Vabret, A., et al., Human coronaviruses. *Pathologie-biologie*, 2008. **57**(2): p. 149-160.
8. Meryem, K. and L. Sara, Etude phylogénétique du SARS-CoV-2 à la base du génome complet (2021). 2021, university center of abdalhafid boussouf-MILA.
9. MEFLAH, A., Mémoire de fin d'études.
10. mondiale de la Santé, O., Séquençage génomique du SARS-CoV-2 à des fins de santé publique: orientations provisoires, 8 janvier 2021. 2021, Organisation mondiale de la Santé.
11. Mahdjoub, S. and R. Boulcina, Accès rapide à des hétérocycles polyfonctionnalisés biologiquement actifs via des réactions multicomposants. Université Frères Mentouri-Constantine 1.
12. Ludwig, S. and A. Zarbock, Coronaviruses and SARS-CoV-2: a brief overview. *Anesthesia and analgesia*, 2020.
13. BENCHIKH AYMEN, B.H., Prévalence des mesures de protection personnelle, des problèmes potentiels et des symptômes associés au COVID-19 pendant le confinement en Algérie. 2020.
14. Yasmine, C.M.-D., Évaluation de l'efficacité et l'innocuité de quelques vaccins anti-COVID-19.
15. Brant, A.C., et al., SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell & bioscience*, 2021. **11**(1): p. 1-17.
16. Gadhave, K., et al., NSP 11 of SARS-CoV-2 is an intrinsically disordered protein. *BioRxiv*, 2020: p. 2020.10.07.330068.
17. Kumar, S., et al., Morphology, genome organization, replication, and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), in *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)*. 2020, Springer. 23-31.
18. Juckel, D., J. Dubuisson, and S. Belouzard, Les coronavirus, ennemis incertains. *médecine/sciences*, 2020. **36**(6-7): 633-641.
19. Lamia, H.R.-N., Contribution à l'étude épidémiologique de COVID-19 dans la wilaya de Biskra cas de Zeribet El Oued.
20. Souhaila, G. and T. Hanane, Epidémiologie De Covid-19 Dans La Région De Cheria-Tébessa. 2021, Universite laarbi tebessi tebessa.
21. de Santé, H.A., Aspects immunologiques et virologiques de l'infection par le SARS-CoV-2. Variabilité génétique, réponses immunitaires, plateformes vaccinales et modèles animaux. Rapport. HAS, novembre, 2020: 2020-11.

22. Organization, W.H., Weekly Epidemiological Record, 2006, vol. 81, 41 [full issue]. Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire, 2006. 81(41): 385-396.
23. VDI, C., Coronavirus disease 2019 (COVID-19). 2020.
24. Covid, M., 19 (nouveau coronavirus)[Internet]. Institut Pasteur, 2020.
25. Birgand, G., S. Kerneis, and J.-C. Lucet, Modes de transmission du SARS-CoV-2: que sait-on actuellement? Médecine et Maladies Infectieuses Formation, 2022. **1**(1): 2-12.
26. Sow, M., Temps moyen de clairance virale chez les patients infectés par SARS-CoV-2 sous traitement à Bamako/Mali. 2023, USTTB.
27. Soriano-Arandes, A., et al., Household severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 transmission and children: a network prospective study. Clinical Infectious Diseases, 2021. **73**(6): e1261-e1269.
28. Hantz, S., Diagnostic biologique de l'infection à Sars-CoV-2: stratégies et interprétation des résultats. Revue Francophone des Laboratoires, 2020. **2020**(526): 48-56.
29. Coulibaly, Y., Caractéristiques virologiques et cliniques du SARS-CoV-2 dans les centres de prise en charge de la COVID-19 au Mali et en Guinée. 2022, USTTB.
30. Guen, A.-L., et al., Fiche de gestion des prélèvements biologiques d'un patient suspect ou confirmé de la COVID-19. 2020.
31. Artika, I.M., et al., Real-time polymerase chain reaction: Current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis. Genes, 2022. **13**(12): 2387.
32. Tra, N.O.M.E., Etude moléculaire et sérologique de l'infection à sars-cov-2 chez le personnel soignant dans les Hôpitaux de Bamako au Mali. 2022, USTTB.
33. Martin, A., Détection et quantification d'acides nucléiques par l'intercalation de sondes électro-actives appliquée à l'intégration d'approches d'amplifications isothermes in vitro. 2016, Université Sorbonne Paris Cité.
34. mondiale de la Santé, O., Tests diagnostiques pour le dépistage du SARS-CoV-2: orientations provisoires, 11 septembre 2020. 2020, Organisation mondiale de la Santé.
35. Taleghani, N. and F. Taghipour, Diagnosis of COVID-19 for controlling the pandemic: A review of the state-of-the-art. Biosensors and Bioelectronics, 2021. **174**: 112830.
36. BOUZID, A. and A.N. BEKIRI, Profil biologique des patients atteints de COVID 19: Examens biochimiques et sérologiques. 2023.
37. EL FAHIME, E. and M.M. ENNAJI, Évolution des techniques de séquençage. Les technologies de laboratoire, 2007. **2**(5).
38. Adem, K., Temel Moleküler Biyoloji. 2023: Akademisyen Kitabevi.
39. Simonetti, M., et al., COVseq is a cost-effective workflow for mass-scale SARS-CoV-2 genomic surveillance. Nature Communications, 2021. **12**(1): 3903.
40. Lamoril, J., et al., Les techniques de séquençage de l'ADN: une révolution en marche. Première partie. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 2008. **23**(5): 260-279.
41. Smati, M. and M. Kitouni, Etude de la biodiversité des bactéries actinomycétales dans les zones humides d'Ezzemoul, Djendli et Tinsilt par des approches culturelles et moléculaires. 2020, Université Frères Mentouri-Constantine 1.
42. Passamonti, F., et al., Management of patients with lymphoma and COVID- 19: Narrative review and evidence- based practical recommendations. Hematological Oncology, 2023. **41**(1): 3-15.
43. Boly, A., et al., ETUDE SUR LES CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES DES 1030 PREMIERS CAS DE COVID-19 AU MALI. Mali Médical, 2021. **36** (2).

44. DU QUÉBEC, C.S.L.I., Avis intérimaire sur l'utilisation des vaccins contre la COVID-19.
45. Nekmi, N. and K. Ouali, La contribution des établissements privés de santé dans le dépistage de la covid-19: Cas de la clinique ABERSI ALI (AZAZGA). 2022, Université Mouloud Mammeri.
46. Bustos-Paz, M., et al., Perfil epidemiológico de la infección por SARS-COV-2 en pediatría. *Infectio*, 2023: 7-14.
47. Guan, W.-j., et al., Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England journal of medicine*, 2020. **382**(18): 1708-1720.
48. Zhou, F., et al., Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The lancet*, 2020. **395**(10229): 1054-1062.
49. Wu, C., et al., Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA internal medicine*, 2020. **180**(7): 934-943.
50. Sanogo, R., Etude de la diversité des variants SRAS-CoV-2 par la RT-PCR de criblage au Mali de Novembre 2021 à Janvier 2022. 2022. 103.
51. Oumar, S., et al., Connaissances, attitudes et pratiques de la COVID-19 dans la Région de Tombouctou au Mali Knowledge, attitudes and practices of COVID-19 in the Timbuktu region of Mali 2021.
52. Gisaid.org, S.W.h., Relative Variant Genome Frequency per Region Articles, 2024.
53. Merzougui, i. And a. Sehailia, coronavirus émergent sars-cov-2 et syndrome respiratoire aigüe severe: stratégies de diagnostic biologique et prévention. 2022, Université Larbi Tébessi-Tébessa.
54. Cao, Y., et al., Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature*, 2022. **602**(7898): 657-663.
55. Planas, D., et al., Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. *Nature*, 2022. **602**(7898): 671-675.
56. Dolgin, E., Omicron thwarts some of the world's most-used COVID vaccines. *Nature*, 2022. **601**(7893): 311.
57. Pulliam, J.R., et al., Increased risk of SARS-CoV-2 reinfection associated with emergence of Omicron in South Africa. *Science*, 2022. **376**(6593): p. eabn4947.
58. Weng, S., et al., Genetic differentiation and diversity of SARS-CoV-2 Omicron variant in its early outbreak. *Biosafety and Health*, 2022. **4** (03): p. 171-178.
59. Qu, P., et al., Enhanced evasion of neutralizing antibody response by Omicron XBB. 1.5, CH. 1.1, and CA. 3.1 variants. *Cell reports*, 2023. **42**(5).
60. Pascarella, S., et al., The biological properties of the SARS-CoV-2 cameroon variant spike: an intermediate between the alpha and Delta variants. *Pathogens*, 2022. **11**(7): 814.
61. Fibke, C.D., et al., Spike mutation profiles associated With SARS-CoV-2 breakthrough infections in delta emerging and predominant time periods in British Columbia, Canada. *Frontiers in public health*, 2022. **10**: 915363.

VIII. Annexes

Procédures techniques du kit QIAamp Viral RNA

Principe du kit d'extraction Qiagen

Le kit Qiagen consiste à extraire l'ARN du virus SRAS-CoV-2 à partir d'une lyse de l'échantillon avec le tampon AVL, suivi d'une capture des ARN sur colonne à résine. Les ARN capturés sont lavés avec deux tampons AW1, AW2 de concentration différent et élué sur 60 µl avec le tampon AVE. Puis garder les extraits à -20°C.

Mode opératoire kit d'extraction Qiagen

Avant de commencer

- **Équilibrer les échantillons à température ambiante.**
 - Équilibrer le tampon AVE à température ambiante pour l'éluion à l'étape 11.
 - Vérifiez que Buffer AW1 et Buffer AW2 ont été préparés conformément aux instructions (Avant la première utilisation, ajoutez le produit approprié quantité d'éthanol (96–100 %) comme indiqué sur les flacons).
 - Ajouter l'ARN porteur reconstitué dans le tampon AVE au tampon AVL conformément aux instructions (Ajouter le tampon AVE au tube contenant l'ARN porteur lyophilisé pour obtenir une solution de 1 µg/µl (c'est-à-dire ajouter 1 550 µl de tampon AVE à 1550 µg d'ARN porteur lyophilisé), puis ajouter au Tampon AVL mélanger délicatement en retournant le tube 10 fois. Pour éviter la formation de mousse, ne pas vortexer).
1. Pipeter 560 µl de tampon AVL préparé contenant l'ARN porteur dans une micro centrifugeuse de 1,5 ml tube.
 2. Ajouter 200 µl de l'échantillon à la Tamponnez l'ARN porteur AVL dans le tube de micro centrifugeuse. Mélanger par impulsion-vortex pendant 15 s.

Remarque : Pour assurer une lyse efficace, il est essentiel que l'échantillon soit bien mélangé avec Tampon AVL pour obtenir une solution homogène. Échantillons congelés qui ont seulement été décongelés une fois peut également être utilisé.

3. Incuber à température ambiante pendant 10 min.

Remarque : La lyse des particules virales est complète après lyse pendant 10 min à température ambiante. Plus long les temps d'incubation n'ont aucun effet sur le rendement ou la qualité de l'ARN purifié.

4. Centrifuger brièvement le tube pour retirer les gouttes de l'intérieur du couvercle.

5. Ajouter 560 µl d'éthanol (96–100 %) à l'échantillon et mélanger au vortex puisé pendant 15 s. Après mélange, centrifuger brièvement le tube pour retirer les gouttes de l'intérieur du couvercle.

Remarque : Utilisez uniquement de l'éthanol, car d'autres alcools peuvent entraîner une réduction du rendement et de la pureté de l'ARN. N'utilisez pas d'alcool dénaturé, qui contient d'autres substances, telles que le méthanol ou méthyle éthyle cétone. Si le volume d'échantillon est supérieur à 140 µl, augmentez la quantité de l'éthanol proportionnellement (par exemple, un échantillon de 280 µl nécessitera 1120 µl d'éthanol). S'assurer liaison efficace, il est essentiel que l'échantillon soit soigneusement mélangé à l'éthanol pour donner une solution homogène.

6. Appliquez soigneusement 630 µl de la solution de l'étape 5 sur la colonne QIAamp (dans un tube collecteur) sans mouiller le rebord. Fermer le bouchon et centrifuger à 6000 x g (8000 tr/min) pendant 1 min. Placer la colonne QIAamp dans un tube de prélèvement propre de 2 ml, et jeter le tube contenant le filtrat.

Remarque : Fermez chaque colonne de centrifugation pour éviter toute contamination croisée pendant la centrifugation.

Remarque : La centrifugation est effectuée à 6 000 x g (8 000 tr/min) pour limiter le bruit de la micro centrifugeuse. La centrifugation à pleine vitesse n'affectera pas le rendement ou la pureté de l'ARN viral. Si la solution n'a pas complètement traversé la membrane, centrifugé à nouveau à une température plus élevée. Vitesse jusqu'à ce que toute la solution soit passée.

7. Ouvrez avec précaution la colonne QIAamp et répétez l'étape 6. Si le volume d'échantillon a été supérieur à 200 µl, répétez cette étape jusqu'à ce que tout le lysat ait été chargé sur le spin colonne.

8. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp et ajouter 500 µl de tampon AW1. Fermez le bouchon, et centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 min. Placez la colonne QIAamp Mini dans un nettoyer le tube de prélèvement de 2 ml (fourni) et jeter le tube contenant le filtrat.

Remarque : Il n'est pas nécessaire d'augmenter le volume du tampon AW1 même si l'échantillon d'origine le volume était supérieur à 200 µl.

9. Ouvrir avec précaution la colonne QIAamp et ajouter 500 µl de tampon AW2. Fermer le bouchon et centrifuger à pleine vitesse (20 000 x g ; 14 000 tr/min) pendant 3 min. Continuez directement avec étape 11 ; ou pour éliminer le report possible du tampon AW2, effectuez l'étape 10, puis passez à l'étape 11. Remarque : Le tampon résiduel AW2 dans l'éluât peut causer des problèmes en aval.

10. Recommandé : Placer la colonne QIAamp dans un nouveau tube de prélèvement de 2 ml, et jetez l'ancien tube de collecte avec le filtrat. Centrifuger à pleine vitesse pendant 1 minute.

11. Placer la colonne QIAamp dans un tube de micro centrifugeuse propre de 1,5 ml. Jeter l'ancien tube collecteur contenant le filtrat. Ouvrez soigneusement le QIAamp colonne et ajouter 60 µl de tampon AVE équilibré à température ambiante. Fermez le bouchon et incubez à température ambiante pendant 1 min.

12. Centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 min. Une seule élution avec 60 µl de tampon AVE est suffisante pour éluer au moins 90 % de l'ARN viral de la colonne QIAamp. L'élution avec des volumes inférieurs à 30 µl conduira à réduire les rendements et n'augmentera pas la concentration finale d'ARN dans l'éluat. L'ARN viral est stable jusqu'à 1 an lorsqu'il est conservé entre -30 et -15 °C ou entre -90 et -65 °C.



Figure 26: Kit d'extraction QIAGEN

Procédure du Magmax™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit

Principe du kit d'extraction Maxmag

L'extraction par Magmax consiste à extraire les acides nucléiques en plusieurs étapes. Les acides nucléiques libérés par lyse se lient aux particules magnétiques de silice. Non liées, les substances et les impuretés, telles que les débris cellulaires, les protéines dénaturées et les inhibiteurs potentiels de la PCR sont éliminées pendant les étapes de lavage. Enfin, les acides

nucléiques sont élués des particules de silice magnétiques à température élevée et récupérés dans une petite quantité de tampon d'éluion.

Mode opératoire :

Consultez la documentation de votre kit d'amplification pour déterminer si un contrôle d'extraction est recommandé pour vérifier l'efficacité de la procédure d'extraction d'acide nucléique. Suivez les consignes en matière de contrôle d'extraction fournies dans la documentation de l'analyse.

1. Déterminez le nombre de réactions requises en fonction du nombre d'échantillons patient à traiter, plus un contrôle négatif par plaque.

2. Préparez de l'éthanol frais à 80 % à l'aide de d'Ethanol absolu pour biologie moléculaire et de l'eau PCR sans nucléase en fonction du nombre requis de réactions, en quantité suffisante pour 1 ml par réaction, plus 10 % d'excédent.

3. Étiquetez le côté court de quatre plaques KingFisher™ Deep-Well 96 Plate comme indiqué ci-dessous : a. Plaque d'échantillon

b. Lavage 1

c. Lavage 2

d. Plaque d'éluion

4. Étiquetez le côté cour de la KingFisher™ 96 KF microplate : Peigne

Configuration de la machine

1. Vérifiez que le KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor with 96 Deep-Well Head est configuré avec le KingFisher™ Flex 96 Deep-Well Heating Block

IMPORTANT ! Ne pas utiliser la tête magnétique et le bloc chauffant appropriés entraîne une baisse des rendements et peut endommager l'instrument.

2. Assurez-vous que le programme MVP_2Wash_200_Flex a été téléchargé depuis la page du produit MagMAX™ Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit sur www.thermofisher.com et chargé dans l'instrument.

Remarque : Pendant les étapes de lavage, la Wash Solution peut développer des résidus particuliers inertes blancs ou bruns qui flottent dans la solution. Cela ne constitue pas une source d'inquiétude et n'affecte pas négativement les performances.

➤ **Préparation des plaques (volume 200 µl d'échantillon).**

Couvrez les plaques (par exemple le MicroAmp™ ClearAdhesive Film), puis conservez-les à température ambiante jusqu'à 1 heure tandis que vous préparez la plaque d'échantillons.

Tableau VII : Préparez les plaques pour le traitement conformément au tableau suivant.

ID de la plaque	Position de la plaque	Type de Plaque	Réactif	Volume par Puits
Plaque de Lavage 1	2		Solution de lavage	500 µl
Plaque de Lavage 2	3	KingFisher™	Ethanol 80%	500 µl
Plaque d'éluion	4	Deep-Well 96 Plate	Tampon d'éluion	50 µl
Plaque Peigne	5	Placez un « KingFisher™ 96 tip comb for DW magnets » dans une plaque « KingFisher™ 96 KF microplate » ou une plaque équivalente		

Préparation du mélange Binding Bead (volume 200 µl d'échantillon)

Important : préparez la quantité requise de mélange Binding Bead pour un jour.

1. Vortexer les Binding beads pour vous assurer que le mélange de billes est homogène.

2. Pour le nombre de réactions requises, préparez le mélange Binding Bead selon le tableau suivant :

Tableau VIII : Préparation de Binding Bead

Composant	Volume par puits
Solution de binding	265µl
Binding beads	10 µl
Volume total par puits	275 µl

Incluez un excédent de 10 % lorsque vous faites le mélange Binding Bead à utiliser pour plusieurs réactions.

3. Remuez le mélange en le retournant, puis conservez-le à température ambiante.

5. Préparation le plaque d'échantillon (volume 200 µl d'échantillon)

1. Retournez doucement le mélange Binding Bead cinq fois pour l'homogénéiser, puis ajoutez 275µl à chaque puits d'échantillon et au puits de contrôle négatif dans la plaque d'échantillon (KingFisher™ Deep-Well 96 Plate).

Remarque : Agitez fréquemment le mélange Binding Bead en le retournant pendant le pipetage pour assurer une distribution uniforme des billes dans tous les échantillons ou puits. Le mélange Binding Bead étant visqueux, il convient de le pipeter lentement pour s'assurer que la bonne quantité est ajoutée.

NE RÉUTILISEZ PAS les embouts de pipettes pour ajouter le mélange Binding Bead aux échantillons, car la viscosité élevée entraînerait des variations dans les volumes ajoutés.

2. Ajoutez 200 µl d'échantillon à chaque puits.

3. Ajoutez 200 µl de Nuclease-free Water (not DEPC-Treated) au puits de contrôle négatif.

4. Ajoutez 5 µl de Proteinase K dans chaque puits, y compris dans le puits de contrôle négatif.

5. (Facultatif) Si vous utilisez un contrôle d'extraction, ajoutez le volume requis dans chaque puits, y compris dans le puits de contrôle négatif. Pour plus d'informations sur l'utilisation d'un contrôle d'extraction, voir la documentation du kit d'amplification.

Remarque : La Proteinase K (voir étape 4) et le contrôle d'extraction peuvent être prémixés chaque jour d'utilisation, puis conservés sur de la glace. Ajoutez le volume requis combiné de Proteinase K et de contrôle d'extraction à chaque puits de la plaque d'échantillon. Par exemple, si votre analyse recommande 5 µl du contrôle d'extraction par réaction, ajoutez 10 µl de Proteinase K et de contrôle d'extraction prémixés à chaque puits à l'étape 4.

➤ Lancement de l'extraction (volume 200 µl d'échantillon)

1. Sélectionnez le MVP_2Wash_200_Flex sur le KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor with 96 Deep-Well Head.

2. Démarrez le test, puis chargez les plaques préparées dans leur emplacement lorsque l'instrument vous invite à le faire.

3. Après l'exécution du test (environ 22 minutes après le démarrage), retirez immédiatement la plaque Éluion de l'instrument, puis couvrez la plaque avec le MicroAmp™ ClearAdhesive Film.

IMPORTANT ! Pour éviter toute évaporation, scellez immédiatement la plaque contenant l'éluât.

Les échantillons sont élués dans 50 µL de Tampon d'éluion (voir "Préparer les plaques pour le traitement (volume de prélèvement d'échantillon de 200 µl)")

Remarque :

- **Un transfert important de billes peut avoir un impact négatif sur les performances de la RT-PCR. Si vous observez un transfert de billes, placez la plaque d'éluotion sur un support magnétique pour accumuler les billes, puis pipetez l'éluât sur une nouvelle plaque de 96 puits pour l'utiliser dans la PCR temps réel. Examinez les résultats de la PCR temps réel pour déterminer si une nouvelle extraction est nécessaire.**

- **Pour assurer la fiabilité des performances du « KingFisher™ Flex MagneticParticle Processor », effectuez une maintenance préventive conformément aux instructions du fabricant.**

Placez la plaque d'éluotion sur de la glace pour une utilisation immédiate à la RT- PCR temps réel.



Figure 27 : Kit d'extraction Magmax™

Mode opératoire des kits de détection moléculaire

Procédure du kit ARGENE

Les principes sont basés sur la détection par RT-PCR de la sonde fluorogène TaqMan (FAM, VIC, Cy5, HEX, JUN). L'acide nucléique de l'échantillon et le contrôle interne (IC1) sont extraits simultanément. L'amplification est basée sur la technologie 5' nucléase' qui utilise l'activité exo nucléase 5'-3' de la Taq polymérase. Les kits ARGENE et TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR sont amplifiés par cycle thermique.

Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali

L'ordre de distribution suivant doit être suivi pour les procédures manuelles :

1. Ajouter 10 µL d'extrait IC1 + W0 dans le tube correspondant. Ce tube est le contrôle IC1W0.
2. Ajouter 10 µL d'échantillon extrait dans chaque tube correspondant.
3. Ajouter 10 µL de Contrôle Positif dans le tube correspondant. Ce tube est le contrôle positif d'amplification.
4. Centrifuger les tubes avec le dispositif approprié, le cas échéant, puis les transférer dans le thermocycleur.
5. Lancez le programme d'amplification.

				Acquisition de fluorescence			
Escalier	Heur e	Températur e	Cycl es	LC480 (Système II)	Validé Appliqué Biosystèm es	Rotor- Gène Q	CFX96
Les augmentations et les diminutions de température sont réglées par défaut jusqu'à 20°C/sec, soit 100%.							
Transcription inverse	5 min.	50°C	1	-	-	-	-
Taq Polymerase Activation	15 min.	95°C	1	-	-	-	-
Dénatu ration	10 sec.	95°C		-	-	-	-
Amplification	Recuit 40 sec.	60°C	45	FAM (465- 510) « Cy5''/'Cy5. 5 » (618-660) VIC/HEX/ Jaune555 (533-580) À la fin du recuit	FAM « CY 5 » VIC	Vert Rou ge Jaune	FAM « Cy5 » SORTILÈ GE
	Élonga tion	25 sec.		-	-	-	-



Figure 28 : Kit d'amplification ARGENE

Procédure du TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit

1. *Ajouter 10 µL MS2 Phage Contrôle au Contrôle négatif pendant extraction et effectuer extraction d'ARN en utilisant ton protocole de laboratoire. ARN Extrait sera être le point de départ pour la réaction.
2. Préparer feuilles de paillasse du PCR en temps réel (KGMU- VIRO-RTM-MPX-PCR-PP-6.7-copie attaché à la fin)
3. Effectuer le réel temps multiplex PCR réaction comme pour couronne ORF1ab gène, N gène, S gène et MS2 (Interne traité contrôler pour nucléique acide extraction) dans un tube vide (comme indiqué par fabricants).
4. Déterminer le numéro de réactions (N) à ensemble en haut par essai. Dans une addition, inclure le contrôle Négatif et le contrôle Positif dans le test.
5. Préparer excès réaction cocktail à Compte pour erreur de pipetage.
Si nombre d'échantillons (n) y compris contrôles = 1 à 10, puis $N = n + 2$
6. Préparer la Master Mix : Calculer la quantité de chacun réactif à être ajoutée pour chaque ensemble réaction mélange maître.

Tableau IX : Calculs sont comme suit

N°	Component	Volume pour une réaction (N=1)
1.	TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (N° ROX™)	6,25µl
2.	COVID-19 [Réel Temps PCR Essai Multiplex	1,25µl
3.	L'eau Sans nucléase	12,5µl
	Total Réaction Mix volume	20,0 µl

7. Mélanger réaction mélange par pipetage en haut et en bas.
8. Centrifugeuse pour 5-10 secondes pour collecter Contenu à fond du tube, puis placez le tube dans le col du drack. Mettre en place la plaque de 96 puits dans la glacière étagère.
9. Distribuer 20µl de chaque mélange Master Mix dans chaque bien comme par la configuration de la plaque.
10. Pipette 5ul de la nucléase dans Puits.
11. Dans la chambre d'extraction d'acide nucléique, ajouter 5 ul de chaque goûter et 5 ul d'extraction contrôlé dans respectif puits comme par le mettre en place.
12. Cap la colonne ou couverture la plaque avec du tissu papier auquel l'échantillon et contrôle a été ajouté.
13. Enfin, pipette 5 µl de positif viral modèle contrôler (Positif Contrôler) dans puits dans positif contrôler une addition région. Casquette VTC puits/ ou scelle avec optique scellant. Centrifuger la plaque pour dix secondes. Faire sûr que bulles sont éliminé en bas du tube de réaction.
14. Pour réel temps PCR ensemble en haut suivre l'instruction donnée par la Temps réel PCR système Manuel pour assiette ensemble en haut. Sauvegarder ta configuration de la plaque !
15. La réaction le volume est 25µl.

Tableau X: Programme la Cours méthode comme suit

Etape	Température	Temps	Nombre de cycles
UNG incubation	25°C	2 minutes	1
Sens inverse transcription	53°C	10 minutes	1
Activation	95°C	2 minutes	1
Dénaturation	95°C	3 secondes	45
Recuit/extension*	60°C	30 secondes	

*Fluorescence les données devraient être collectées pendant la 60°C incubation étape



Figure 19: Kit d'amplification TaqPath

Feuille de travail simplifié Protocole Midnight Oxford Nanopore

Jour 1 Date : _____ Tech : _____

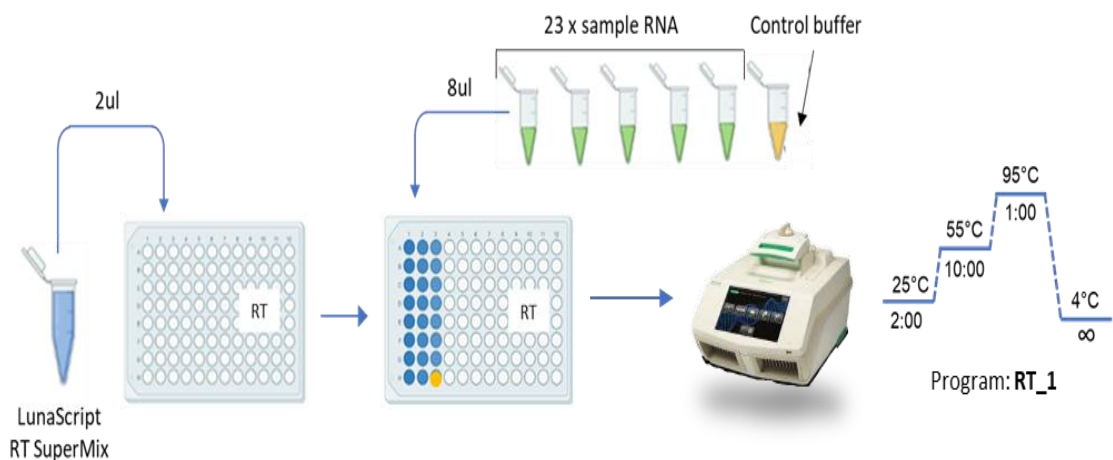
Équipement	Consommables
<ul style="list-style-type: none"> Thermocycler programs (pre-PCR area) <p style="text-align: center;">RT_1 and Amp_2</p> <ul style="list-style-type: none"> Centrifuge for 96-well plates Vortex mixer Ice bucket Pipette set 	<ul style="list-style-type: none"> 96 LoBind PCR plate Microseal “B” or foil seal Nuclease-free water

Bonnes pratiques

- Maintenir ARN sur glace
- Préchauffer le thermocycleur à 25°C
- Utilisé un contrôle négatif

I. Rétrotranscription

1. Ajouter 2 µl LS-RT sur une nouvelle plaque denommée « RT_date »
2. Ajouter + 8 µl ARN
3. Melanger doucement en pipetant
4. Sceller et centrifuger la plaque
5. Lancer le programme **RT_1** (pre-heated to 25°C)



II. Amplification

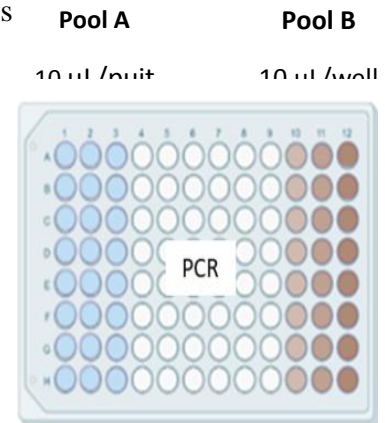
Bonnes pratiques

- Prépare le mix pendant que la RT est en cours
- Manipuler les amorces sous une hotte propre exempte de matériel génétique

Procédures

Préparer le mix comme indiqué dans le Tableau ci-dessous

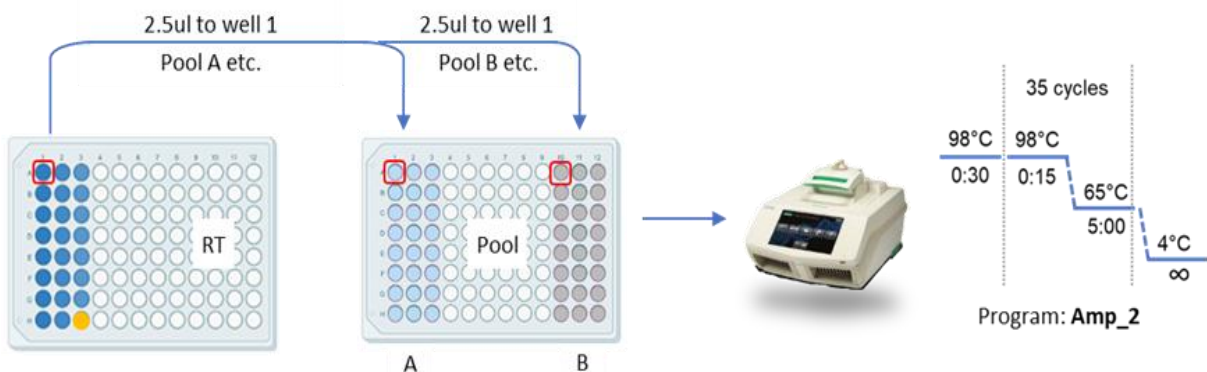
Reagent	Pool A Tube (ul)	Pool B Tube (ul)
Nuclease-free water	102	102
Midnight Primer Pool A	2	
Midnight Primer Pool B		2
Q5 HS Master Mix (Q5)	172	172
Total	234	234



1. Ajouter 10 ul du Mix Pool A aux trois premières colonnes d'une nouvelle plaque « Pool »
2. Ajouter 10 ul du Mix Pool B aux trois dernières colonnes de la plaque « pool »

Sous la hotte de dépôt

1. Ajouter 2,5 ul de chaque échantillon de la plaque RT aux puits Pool A et Pool B
2. Mélanger en pipetant
3. Sceller et centrifuger la plaque
4. Lancer le programme **Amp**



Les amplicons peuvent être conservés la nuit à +4°C ou -20°C pour une durée plus longue.

Jour 2

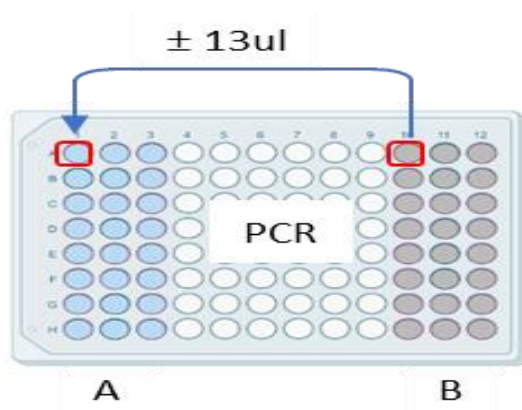
<u>Equipements</u>	<u>Consommables</u>
<ul style="list-style-type: none">• <u>Thermocycler program (post-PCR area)</u>• <u>Lig_3</u>• <u>Qubit</u>• <u>Centrifuge for 96-well plates</u>• <u>Microcentrifuge</u>• <u>Vortex mixer</u>• <u>Magnetic tube rack</u>• <u>Ice bucket</u>• <u>Pipette set</u>	<ul style="list-style-type: none">• <u>96 LoBind PCR plate</u>• <u>Microseal “B” or foil seal</u>• <u>100% ethanol (molecular grade)</u>• <u>1.5 ml Eppendorf DNA LoBind tubes</u>• <u>5- or 15- ml conical tubes</u>• <u>Qubit 1X dsDNA HS Kit</u>• <u>Qubit assay tubes</u>• <u>MinION R9 Flow Cell</u>• <u>Nuclease-free water</u>

Bonnespratiques

- Mélanger les échantillons avant d’ajouter le code barre
- Centrifuger le code plate avant de percer l’aluminium

Procédures

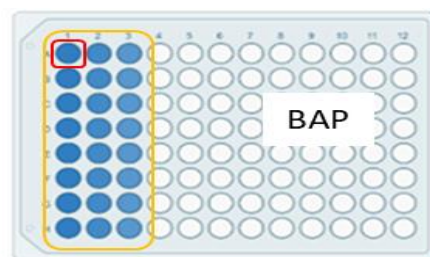
1. Transférer le contenu du Pool B dans les puits correspondants du Pool A
2. Mélanger en pipetant



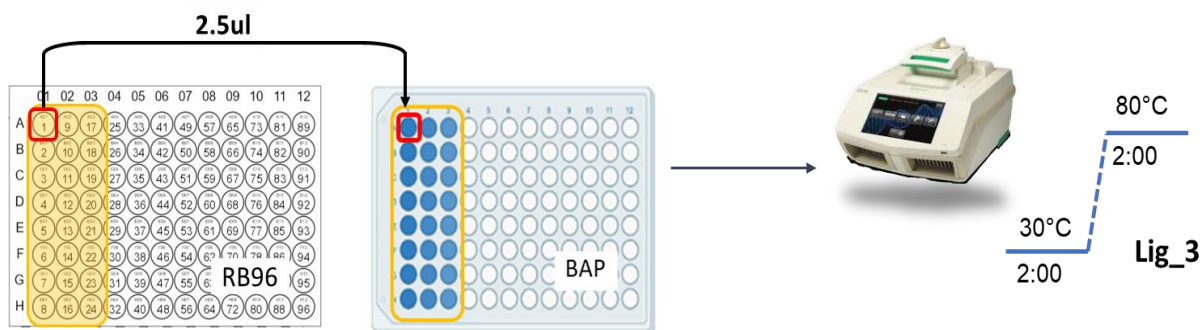
3. Étiqueter une nouvelle plaque « BAP »
4. Ajouter 2.5 µL nuclease-free water
5. Ajouter 5 µL des PCR poolés

4. + 2.5 ul water

5. + 5 ul pooled PCR product from relevant well



4. Centrifuge la plaque “ Rapid Barcode plate (RB96) “
5. ajouter 2.5 µl de RB96 aux puits correspondants de la plate (BAP).
6. Mélanger en pipetant
7. Lancer le programme “Run Lig_3 »



III. Pooling de la librairie et purification

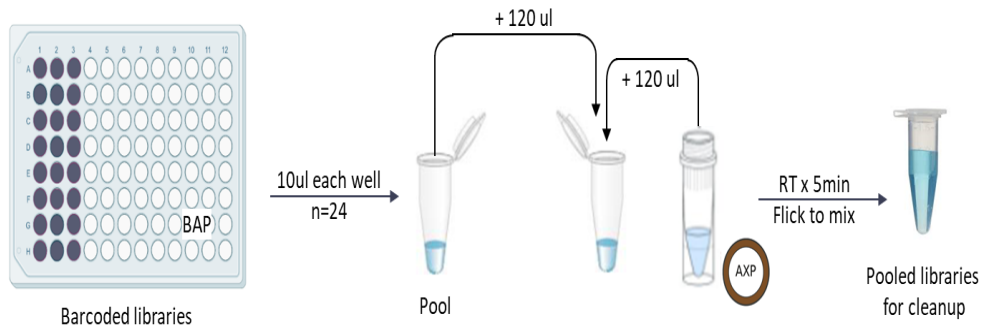
Bonnes pratiques

- Ramener AMPure XP beads à la température ambiante
- Utilisé ethanol 80% fraîchement préparé
- Assurer vous que l'éthanol ait été enlevé avant d'ajouter le tampon d'élution « EB »
- Ne laisser pas les billes séchées
- Suspender les billes avant d'ajouter

Procédure

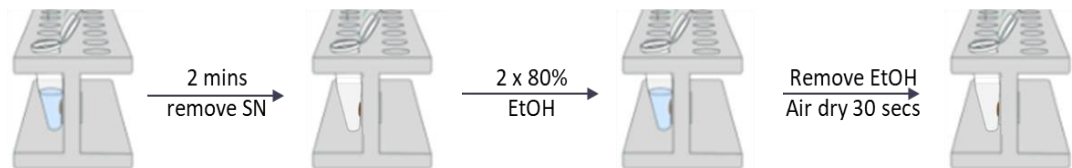
1. Poolez 10 µl de chaque échantillon (n=24) dans un seul tube
2. Transférez 120ul dans un nouveau tube
3. Ajouter 120 ul AMPure XP beads
4. Incubez à la température ambiante pendant 5 minutes,
5. Tapotez 3-4 X fois toutes les 45 secondes

Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali

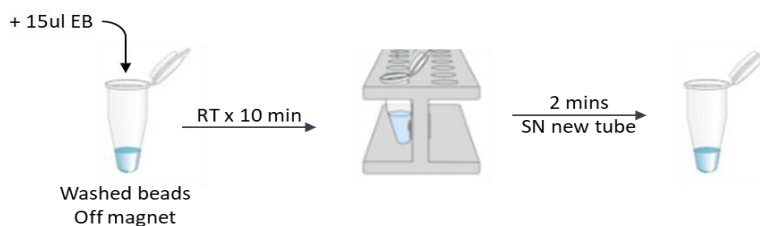


6. Placer le tube sur le portoire magnétique
7. Attendre 2 minutes
8. Enlever le surnageant une fois que les billes sont collées au portoire
9. Nettoyer 2 fois avec de l'éthanol 80% fraîchement préparé
10. Enlever toutes les traces d'éthanol
11. Laisser le tube ouvert 30 secondes pour

ALL steps performed on magnet



12. Ajouter 15 μ l Elution Buffer (EB)
13. Suspendre en pipetant
14. Incuber à la température ambiante pendant x 10 mins (en dehors du portoir magnétique)
15. Placer le tube sur le portoir magnétique
16. Attendre 2 minutes
17. Transférer le surnageant dans un nouveau tube



!!! VOUS AVEZ VOTRE LIBRAIRIE PURIFIEE POUR LE SEQUENCAGE !!!

IV. Quantification de la librairie

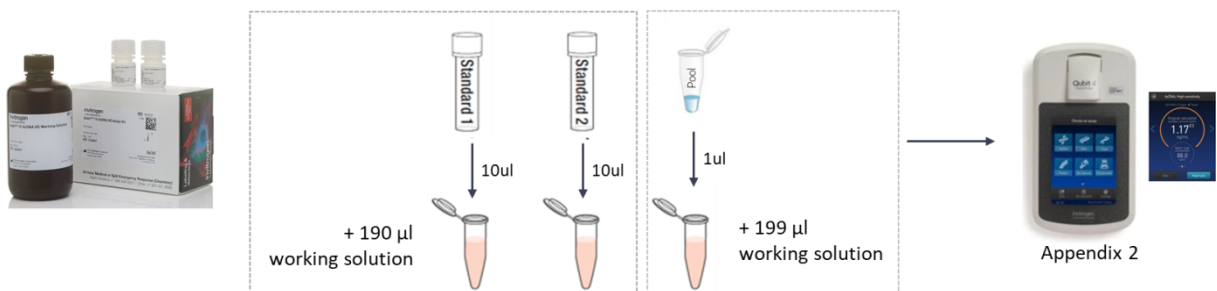
- Vérifier la solution de travail du QubitdsDNA HS kit
- Utiliser les tubes spécifiques du Qubit
- Vérifier sur le Qubit si le standard est déjà enregistré (étape 3-5 ci-dessous), si oui ce n'est pas nécessaire de préparer les standard

Procédure

1. Préparer la solution de travail en mélangeant dans un tube 597 ul HS buffer (flacon) et 3 ul HS reagent (bouchon bleu)
2. Préparer les deux standard et l'échantillon comme indiqué dans le tableau ci-dessous dans les tubes Qubit distincts

Réactifs	Standards S1 & S2 (ul)	LibrairiePoolée(ul)
Sample	10	1
Solution de travail	190	199

3. Allumer le Qubit
4. Cliquer sur DsDNA
5. Cliquer sur 1x DsDNA High Sensitivity
6. Placer le Standard 1 préparé dans la cuve et cliquer « read standard »
7. Placer le standard 2 préparé dans la cuve et cliquer « read standards »
8. Placer l'échantillon préparé (1ul de la librairie et 199 ul de la solution de travail) et cliquer « readsample »
- 9.



NB : si le standard a déjà été lu, mettez l'échantillon et cliquer « readsample »

10. Ajuster la concentration de la librairie à 800 ng/ul, en utilisant la feuille Excel « MidnightProtocol_MinION_Workbook.xlsx ».
11. Sur ce fichier Excel sur la feuille « calculation » entrer la valeur donnée par Qubit en ng/ul

Run ID: 210909_MidnightTraining	
Total number of pooled libraries:	24
Volume of SPRI Bead to add to pool for cleanup:	120
Library pool concentration (Qubit value, ng/ul):	80.8
Target loading amount (600-800 ng):	800
Volume of pool needed (ul) for loading:	9.90
Volume of RSB needed (ul) to bring total volume to 11 ul = 11 - volume of pool needed:	1.10
Combine the volume of pool need (ul) and volume of elution buffer (uL) needed in an Eppendorf tube	
Add 1 ul RAP-F, incubate for 5 min at room temperature Proceed to Library Loading Procedure once flow cell has been primed	

(Image d'illustration)

La feuille Excel vous donne le volume du tampon d'éluion à mélanger à la librairie pour obtenir un volume final de 11 ul.

L'ajustement peut se faire manuellement en utilisant la formule suivante :

Volume Librairie Poolée = Quantité cible (ng) / Concentration du Pool (ng/ul)

Quantité cible = 800 ng

Concentration Pool = donnée par qubit

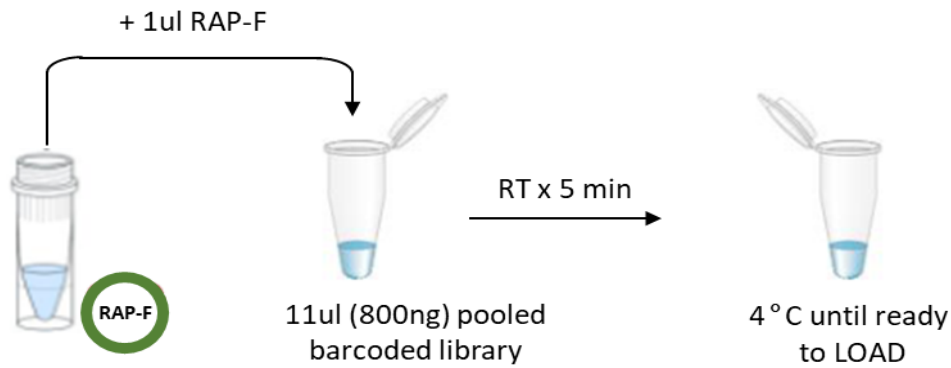
V. Addition des adaptateurs

Bonne pratique

- Conserver la librairie sur glace jusqu'au lancement

Procédure

1. Ajouter 1 µl of Rapid Adapter F (RAP F) aux 11ul de la librairie poolée (= 800ng)
2. Incuber à la température ambiante 5 minutes
3. Conserver sur glace jusqu'au lancement



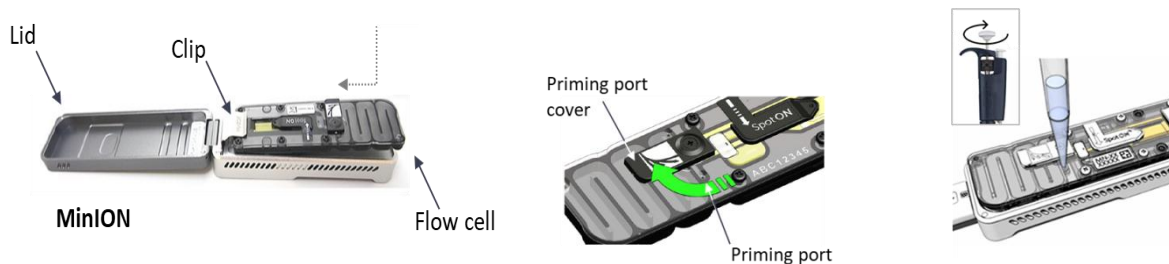
VI. Séquençage

Bonnes pratiques

- Eviter d'introduire des bulles d'air lors de l'amorçage de la flow cell
- Mélanger LBII avant d'utiliser (les billes sédimentent rapidement)
- Suspending les billes LBII dans « library mix » en pipetant avant de charger

Procédure

1. Ouvrir le Mk1B/1C lid
2. Insérer la flow cell dans son compartiment (sous « clip » image1 ci-dessous)
3. Ouvrir le priming port (rotation de 90° image 2 ci-dessous)
4. Enlever les bulles d'air: réglée la pipette de P1000 à 200 ul et introduire le bout de l'embout dans le priming port, tourner le dispenser de la pipette jusqu'à 220-230 µl



5. Préparer le “ flow cell priming mix “ en mélangeant les réactifs indiqués dans le Tableau ci-dessous

Reagent	Volume (ul)
Flush Buffer (FB)	1170
Flush Tether (FLT)	30

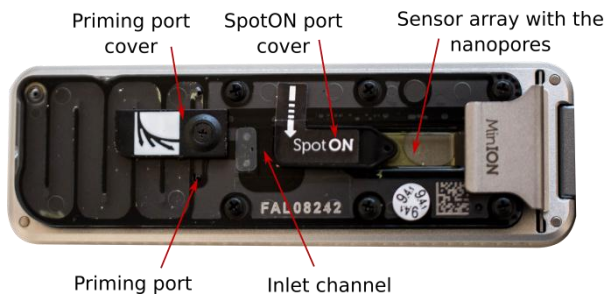
6. Ajouter 800 ul du “ flow cell priming mix “ au « Priming port »

- Attendre 5 minutes
- Préparer « library mix » comme indiqué dans le Tableau ci-dessous

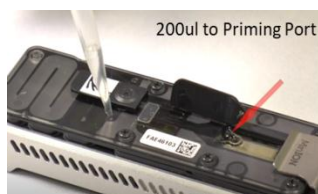
Reagent	Volume (ul)
Sequencing Buffer II (SBII)	37.5
Loading Beads II (LBII)*	25.5
Prepared Library	12

NB : Mélanger immédiatement LB avant l'utilisation

- Ouvrir SpotONsample port (port pour échantillon)
- Finaliser l'amorçage "priming" en ajoutant 200 µl du "priming mix" au PRIMING PORT
- Ajouter par gouttelette la "library mix" via le port d'échantillon « SpotONsample port »
- Fermer les deux ports " SpotON and priming ports "
- Configure le Minion pour commencer le séquençage



<https://www.youtube.com/watch?v=Pt-iaemrM88>



Protocole Illumina

I-Synthétiser l'ADNc du premier brin

Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali

Cette étape transcrit de manière inverse les fragments d'ARN amorcés avec des hexamères aléatoires en ADNc premier brin en utilisant transcriptase inverse.

Consommables

- FSM HT (Premier Brin Mix HT)
- RVT HT (Transcriptase inverse HT)
- Tubes de 1,7 ml (1 par plaque à échantillon de 96 puits)
- Joint adhésif Microseal 'B'

Préparation

1-Préparez les consommables suivants :

Instructions de stockage des réactifs

FSM HT -25°C à -15°C Décongeler et ramener à température ambiante.

Retourner pour mélanger, puis conserver sur la glace.

RVT HT -25°C à -15°C Inverser pour mélanger avant utilisation. Gardez sur la glace.

2-Enregistrez le programme COVIDSeq FSS suivant sur le thermocycleur :

Choisissez l'option de préchauffage du couvercle

Régler le volume réactionnel à 25 µl

- 25°C pendant 5 minutes
- 50°C pendant 10 minutes
- 80°C pendant 5 minutes
- Maintenir à 4°C

Procédure

1-Dans un tube de 1,7 ml, combinez les volumes suivants pour préparer le Master Mix d'ADNc First Strand.

Multipliez chaque volume par le nombre d'échantillons.

FSM HT (9 µl)

RVT HT (1 µl)

Pour usage de recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

L'excédent de réactifs est inclus pour tenir compte des petites erreurs de pipetage.

2-Ajoutez 8 µl de master mix dans chaque puits de la plaque CDNA1.

3-Scellez et agitez à 1 600 tr/min pendant 1 minute.

4-Centrifuger à 1 000 × g pendant 1 minute.

5-Placez-le sur le thermocycleur préprogrammé et exécutez le programme COVIDSeq FSS.

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, scellez la plaque et conservez-la entre -25 °C et -15 °C pendant 7 jours maximum.

II-Amplification de l'ADNc

Cette étape utilise deux réactions PCR distinctes pour amplifier l'ADNc.

Consommables

- IPM HT (Illumina PCR Mix HT)
- CPP1 HT (COVIDSeq Primer Pool 1 HT)
- CPP2 HT (COVIDSeq Primer Pool 2 HT)
- Eau sans nucléases
- Tube de 15 ml (2 pour quatre plaques à échantillons de 96 puits)
- Plaques PCR 96 puits (3)
- Joint adhésif Microseal 'B'

Préparation

1-Préparez les consommables suivants :

Instructions de stockage des réactifs

CPP1 HT -25°C à -15°C Décongeler à température ambiante. Conserver sur la glace jusqu'à utilisation.

CPP2 HT -25°C à -15°C Décongeler à température ambiante. Conserver sur la glace jusqu'à utilisation.

IPM HT -25°C à -15°C Décongeler à température ambiante, puis retourné pour mélanger. Conserver sur la glace jusqu'à utilisation.

2-Enregistrez le programme PCR COVIDSeq suivant sur le thermocycleur :

- Choisissez l'option de préchauffage du couvercle
- Régler le volume réactionnel à 25 µl
- 98°C pendant 3 minutes
- 35 cycles de :
- 98°C pendant 15 secondes
- 63°C pendant 5 minutes
- Maintenir à 4°C

Procédure

1-Étiquetez deux nouvelles plaques PCR COV1 et COV2.

Les plaques représentent deux réactions PCR distinctes sur chaque échantillon et contrôle dans la plaque CNDA1.

Pour usage de recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

2-Dans un tube de 15 ml, combiner les volumes suivants pour préparer COVIDSeq PCR 1 Master Mix et COVIDSeq Master Mix PCR 2.

Multipliez chaque volume par le nombre d'échantillons.

Réactif

- Mélange principal COVIDSeq PCR 1 (µl)
- Mélange principal COVIDSeq PCR 2 (µl)
- IPM HT 15 15
- CPP1 HT 4,3 S.O.
- CPP2 HT S.O. 4,3
- Eau sans nucléases 4,7 4,7

L'excédent de réactifs est inclus pour tenir compte des petites erreurs de pipetage.

3-Ajouter 20 µl de COVIDSeq PCR 1 Master Mix dans chaque puits de la plaque COV1 correspondant à chaque puits de la Plaque cDNA1.

4-Ajouter 5 µl de synthèse d'ADNc premier brin de chaque puits de la plaque cDNA1 au puits correspondant de la Plaque COV1.

5-Ajouter 20 µl de COVIDSeq PCR 2 Master Mix dans chaque puits de la plaque COV2 correspondant à chaque puits de la Plaque cDNA2.

6-Ajouter 5 µl de synthèse d'ADNc premier brin de chaque puits de la plaque cDNA1 au puits correspondant de la Plaque COV2.

7-Scellez et agitez à 1 600 tr/min pendant 1 minute.

8-Centrifuger à 1 000 x g pendant 1 minute.

9-Placez-le dans le thermocycleur préprogrammé et exécutez le programme COVIDSeq PCR.

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, scellez la plaque et conservez-la entre -25 °C et -15 °C jusqu'à 3 jours.

III-Marquage PCR des Amplicons

Cette étape utilise EBLTS HT pour marquer les amplicons PCR, qui est un processus qui fragmente et marque la PCR amplicons avec des séquences adaptatrices.

Consommables

- EBLTS HT (Enrichissement BLT HT)
- TB1 HT (Tampon de Tagmentation 1 HT)
- Eau sans nucléases
- Tube de 1,7 ml
- Tube de 15 ml (1 pour quatre plaques à échantillons de 96 puits)
- Joint adhésif Microseal 'B'

À propos des réactifs

Conserver EBLTS HT debout à des températures supérieures à 2°C. Assurez-vous que les billes sont toujours immergées dans le tampon.

Pour usage de recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

Si les billes adhèrent au côté ou au-dessus de la plaque à 96 puits, centrifuger à 500 × g pendant 1 minute, puis pipeter pour remettre en suspension.

Préparation

1-Préparez les consommables suivants :

Instructions de stockage des réactifs

EBLTS HT 2°C à 8°C Ramener à température ambiante. Vortexer soigneusement avant utilisation.

TB1 HT -25°C à -15°C Ramener à température ambiante. Vortexer soigneusement avant utilisation.

2-Si les plaques COV1 et COV2 ont été conservées congelées, préparez-vous comme suit.

- Décongeler à température ambiante.
- Vérifiez les joints, puis agitez à 1 600 tr/min pendant 1 minute.
- Centrifuger à 1 000 x g pendant 1 minute.

3-Enregistrez le programme COVIDSeq TAG suivant sur le thermocycleur :

- Choisissez l'option de préchauffage du couvercle
- Régler le volume réactionnel à 50 µl
- 55°C pendant 5 minutes
- Maintenir à 10°C

Procédure

1-Étiquetez une nouvelle plaque PCR TAG1.

2-Combinez COV1 et COV2 comme suit.

- Transférer 10 µl de chaque puits de la plaque COV1 vers le puits correspondant de la plaque TAG1.
- Transférer 10 µl de chaque puits de la plaque COV2 vers chaque puits de la plaque TAG1 contenant COV1.

3-Dans un tube de 15 ml, combiner les volumes suivants pour préparer le Tagmentation Master Mix. Multipliez chacun volume par le nombre d'échantillons.

- TB1 HT (12 µl)
- EBLTS HT (4 µl)
- Eau sans nucléases (20 µl)

4-Ajoutez 30 µl de master mix dans chaque puits de la plaque TAG1.

5-Scellez et agitez à 1 600 tr/min pendant 1 minute.

6-Placez-le sur le thermocycleur préprogrammé et exécutez le programme COVIDSeq TAG.

IV-Nettoyage post-tagmentation

Cette étape lave les amplicons marqués par l'adaptateur avant l'amplification PCR.

Consommables

- ST2 HT (Stop Tagment Buffer 2 HT)
- TWB HT (Tagmentation Wash Buffer HT)
- Joint adhésif Microseal 'B'

Pour usage de recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

À propos des réactifs

- Distribuez ST2 HT et TWB HT lentement pour minimiser la formation de mousse.
- Répartir le TWB HT directement sur les billes.

Préparation

1-Préparez les consommables suivants :

Instructions de stockage des réactifs

ST2 HT Température ambiante Vortexer avant utilisation.

TWB HT 2°C à 8°C Vortexer avant utilisation.

Procédure

1-Centrifugez la plaque TAG1 à 500 x g pendant 1 minute.

2-Ajouter 10 µl de ST2 HT dans chaque puits de la plaque TAG1.

3-Scellez et agitez à 1 600 tr/min pendant 1 minute.

4-Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.

5-Centrifuger à 500 × g pendant 1 minute.

6-Placez-le sur le support magnétique et attendez que le liquide soit clair (~3 minutes).

7-Inspectez la présence de bulles sur le joint. Le cas échéant, centrifuger à 500 x g pendant 1 minute, puis placer sur le support magnétique (~3 minutes).

8-Retirez et jetez tout le surnageant.

9-Lavez les perles comme suit.

- Retirez-le du support magnétique.
- Ajouter 100 µl de TWB HT dans chaque puits.
- Scellez et agitez à 1600 tr/min pendant 1 minute.
- Centrifuger 500 × g pendant 1 minute.
- Placez-le sur le support magnétique et attendez que le liquide soit clair (~3 minutes).

- Pour le premier lavage uniquement, retirez et jetez tout le surnageant de chaque puits.

10-Lavez les perles une seconde fois.

Laisser le surnageant dans la plaque pour le deuxième lavage afin d'éviter que les perles ne sèchent trop.

Amplification des amplicons marqués

Cette étape amplifie les amplicons marqués à l'aide d'un programme PCR. L'étape PCR ajoute de la base 10 préparée associez les adaptateurs Index 1 (i7), les adaptateurs Index 2 (i5) et les séquences requises pour la génération de clusters de séquençage.

Consommables

- EPM HT (Enhanced PCR Mix HT)
- Adaptateurs d'index (IDT pour les index Illumina-PCR Set 1, 2, 3, 4)
- Eau sans nucléases

Pour usage de recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

- Tubes de 15 ml (1 pour deux plaques à échantillons de 96 puits)
- Plaque PCR 96 puits

À propos des réactifs

- Plaques d'adaptation d'index
- N'ajoutez pas d'échantillons dans les puits de la plaque d'indexation.
- Les puits de la plaque d'indexation ne peuvent pas être réutilisés.

Préparation

1-Préparez les consommables suivants :

Instructions de stockage des réactifs

EPM HT -25°C à -15°C Inverser pour mélanger. Conserver sur la glace jusqu'à utilisation.

Indices adaptateurs -25°C à -15°C Décongeler à température ambiante. Vortexer pour mélanger, puis centrifuger à $1\ 000 \times g$ pendant 1 minute.

2-Ouvrez chaque joint de plaque d'adaptation d'index préparé comme suit. Utilisez une nouvelle plaque PCR pour chaque index différent ensemble.

- Alignez une nouvelle plaque PCR à 96 puits au-dessus de la plaque adaptatrice d'indexation, puis appuyez pour percer le joint en aluminium.
- Jetez la plaque PCR.

3-Enregistrez le programme COVIDSeq TAG PCR suivant sur le thermocycleur :

- Choisissez l'option préchauffer le couvercle et réglez-le sur 100°C
- Régler le volume réactionnel à 50 μ l
- 72°C pendant 3 minutes

- 98°C pendant 3 minutes
- 7 cycles de :
 - 98°C pendant 20 secondes
 - 60°C pendant 30 secondes
 - 72°C pendant 1 minute
 - 72°C pendant 3 minutes
- Maintenir à 10°C

Procédure

1-Dans un tube de 15 ml, combiner les volumes suivants pour préparer le PCR Master Mix.

Multipliez chaque volume par le nombre d'échantillons.

- EPM HT (24 µl)
- Eau sans nucléases (24 µl)

2-Vortex PCR Master Mix pour mélanger.

3-Gardez la plaque TAG1 sur le support magnétique et retirez le TWB HT.

4-Utilisez une pipette de 20 µl pour éliminer tout TWB HT restant.

5-Retirez la plaque TAG1 du support magnétique.

6-Ajoutez 40 µl de PCR Master Mix dans chaque puits.

7-Ajoutez 10 µl d'adaptateurs d'index dans chaque puits de la plaque PCR.

Pour usage de recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

8-Scellez et agitez à 1 600 tr/min pendant 1 minute.

9-Si du liquide est visible sur le sceau, centrifuger à 500 x g pendant 1 minute.

Inspectez pour vous assurer que les billes sont remises en suspension. Pour remettre en suspension, réglez votre pipette à 35 µl avec le piston vers le bas, puis pipeter lentement pour mélanger.

11-Placez-le sur le thermocycleur préprogrammé et exécutez le programme COVIDSeq TAG PCR.

V- Pooling et lavage de la librairie

Cette étape combine les bibliothèques de chaque plaque d'échantillon de 96 puits dans un tube de 1,7 ml. Les bibliothèques de taille optimale sont retenues puis liés à des billes magnétiques, et les fragments trop petits ou trop gros sont éliminés dans la solution de lavage.

Consommables

- ITB (perles Illumina Tune)
- RSB HT (tampon de remise en suspension HT)
- Éthanol à 80 % (EtOH) fraîchement préparé

- Tube de 1,7 ml (2 par plaque à échantillon de 96 puits)
- Barrette de 8 tubes PCR

À propos des réactifs et ITB

- Vortexer avant chaque utilisation.
- Vortexez fréquemment pour vous assurer que les perles sont uniformément réparties.
- Aspirer et distribuer lentement en raison de la viscosité de la solution.

Préparation

1-Préparez les consommables suivants :

Instructions de stockage des réactifs

ITB Température ambiante Vortexer soigneusement pour mélanger.

RSB HT 2°C à 8°C Laisser reposer 30 minutes pour ramener à température ambiante. Vortexer et inverser pour mélanger.

2-Préparez 80 % d'EtOH à partir d'EtOH absolu.

Procédure

1-Centrifugez la plaque TAG1 à 500 × g pendant 1 minute.

2-Placez-le sur le support magnétique et attendez que le liquide soit clair (~3 minutes).

3-Pour regrouper les bibliothèques, procédez comme suit. Répétez les étapes pour chaque plaque d'échantillon supplémentaire.

- Utilisez une pipette à huit canaux de 20 µl pour transférer 5 µl de bibliothèque de chaque puits de la plaque PCR vers un PCR 8-barrette de tubes.
- Changez les conseils après chaque colonne.
- Ces volumes donnent lieu à une bibliothèque regroupée de 60 µl par ligne.
- Étiquetez un nouveau tube de 1,7 ml Pooled ITB.
- Transférez 55 µl de la bibliothèque poolée de chaque puits de la barrette de 8 tubes PCR dans le tube Pooled ITB.

Pour usage de recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

Pour chaque plaque d'échantillon, ces volumes donnent des pools de 440 µl de bibliothèques regroupées.

Si vous traitez 3 072 échantillons, ces étapes génèrent 32 tubes ITB regroupés.

4-Vortexez les tubes ITB regroupés pour les mélanger, puis centrifugez brièvement.

5-Vortexer l'ITB pour remettre en suspension.

6-Ajoutez l'ITB en utilisant le volume résultant du volume du tube ITB groupé multiplié par 0,9. Par exemple, pour 96 échantillons, ajoutez 396 µl d'ITB dans chaque tube.

7-Vortexer pour mélanger.

8-Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.

9-Centrifugez brièvement.

10-Placez-le sur le support magnétique et attendez que le liquide soit clair (~5 minutes).

11-Retirez et jetez tout le surnageant.

12-Lavez les perles comme suit.

- Maintenir le support magnétique et ajouter 1 000 µl d'EtOH frais à 80 % dans chaque tube.
- Attendez 30 secondes.
- Retirez et jetez tout le surnageant.

13-Lavez les perles une seconde fois.

14-Utilisez une pipette de 20 µl pour éliminer tout EtOH résiduel.

15-Ajouter 55 µl de RSB HT.

16-Vortexer pour mélanger, puis centrifuger brièvement.

17-Incuber à température ambiante pendant 2 minutes.

18-Placez-le sur le support magnétique et attendez que le liquide soit clair (~2 minutes).

19-Transférer 50 µl de surnageant de chaque tube Pooled ITB vers un nouveau tube de microcentrifugeuse.

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, bouchez le tube et conservez-le entre -25°C et -15°C pendant 30 jours maximum.

VI-Quantification et normalisation de la librairie

1-Analysez un pool de bibliothèques de 2 µl à l'aide d'un kit QubitdsDNA HS Assay.

Si les bibliothèques se situent en dehors de la plage standard, diluez à une concentration de 1:10 et analysez à nouveau.

2-Calculez la valeur de molarité à l'aide de la formule suivante.

- Utilisez 400 pb comme taille moyenne de bibliothèque.

3-Diluer chaque pool de bibliothèques à un minimum de 30 µl à une concentration normalisée de 4 nM en utilisant RSB HT.

Pour usage de recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

VII-Dilution de la librairie

Cette étape regroupe et dilue les bibliothèques jusqu'à la concentration de départ de votre système de séquençage. Après avoir dilué à la concentration de départ, les librairies sont prêtes à être dénaturées et diluées jusqu'à la concentration de charge finale.

Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali

1-Pour chaque ensemble de 384 échantillons, combinez 25 µl de chaque pool normalisé contenant l'ensemble d'adaptateurs d'index 1, 2, 3, 4 dans un nouveau tube de microcentrifugeuse. Ne combinez pas de pools avec le même jeu d'adaptateurs d'index.

Cette étape produit un pool final de 384 échantillons dilués à une concentration initiale de 4 nM. Pour chaque système de séquençage, voici le nombre d'échantillons requis par Flow Cell.

- Flow Cell NextSeq 500/550 HO, Flow Cell NextSeq 550Dx HO ou Flow Cell NextSeq 1000/2000 P2: 384 échantillons par Flow Cell.
- Flow Cell du système NovaSeq 6000 SP : 384 échantillons par voie et 768 échantillons au total par Flow Cell.
- Flow Cell du système S4 NovaSeq 6000 : 384 échantillons par voie et 1 536 échantillons au total par Flow Cell.

2-Suivez les instructions de dénaturation et de dilution de votre système pour diluer jusqu'à la concentration de charge finale.

- Pour le système de séquençage NextSeq 500/550 et le système de séquençage NextSeq 550Dx, voir le Guide de dénaturation et de dilution des bibliothèques du système NextSeq (document n° 15048776).
- Pour le système de séquençage NovaSeq 6000, voir les bibliothèques de dénaturation et de dilution NovaSeq 6000
- Pour le système de séquençage NextSeq 2000, voir le Guide du système de séquençage NextSeq 1000/2000.

3-Utilisez les concentrations de charge suivantes pour votre système.

Concentration initiale du système de séquençage (nM) Concentration de charge finale (pM)

Flow Cell NextSeq 500/550 ou 550Dx HO 4 1,4

Cellule à circulation NovaSeq 6000 SP 4 100

Cellule à circulation NovaSeq 6000 S4 4 100

Cellule à circulation NextSeq 1000/2000 P2 4 1000

Les ajustements à la concentration de charge finale doivent suivre les instructions de dénaturation et de dilution de votre système de séquençage.

VIII-Préparation pour le séquençage

Le test Illumina COVIDSeq est compatible avec les Flow Cells du système de séquençage NovaSeq 6000 SP et S4, le système de séquençage NextSeq 2000, les systèmes de séquençage NextSeq 500/550 et le NextSeq 550DX instrument.

Consommables

Si vous utilisez la Flow Cell S4 du système de séquençage NovaSeq 6000 :

Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali

- 2 Kit de réactifs S4 du système de séquençage NovaSeq 6000 v1.5 (35 cycles), Illumina, n° 20044417
- 2 Kit NovaSeqXp 4 voies v1.5, Illumina, # 20043131
- Si vous utilisez la Flow CellNovaSeq 6000 Sequencing System SP :
- 4 Kit de réactifs SP du système de séquençage NovaSeq 6000 v1.5 (100 cycles), Illumina, n° 20028401
- 4 Kit NovaSeqXp 2 voies v1.5, Illumina, # 20043130
- Si vous utilisez le système NextSeq 500/550 ou l'instrument NextSeq 550Dx :
- 8 Kit NextSeq 500/550 haut rendement v2.5 (75 cycles), Illumina, # 20024906
- Si vous utilisez le système de séquençage NextSeq 2000
- 8 réactifs NextSeq 1000/2000 P2 (100 cycles), Illumina, # 2004681

Fiche signalétique :

Auteur : Amidou DIARRA

Téléphone : +223 74 66 02 01

Adresse email : amidoudiarra428@gmail.com

TITRE : Distribution des variants de la vague 5 du SARS-CoV-2 au Mali.

Année de soutenance : 2023-2024

Ville de soutenance : Bamako

Pays d'origine : Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et la Faculté de pharmacie (FAPH).

Secteur d'intérêt : Virologie, Biologie moléculaire

Résumé :

Introduction

La maladie à coronavirus de 2019 (en anglais coronavirus disease 2019) ou COVID-19 est une affection des voies respiratoires supérieures et inférieures causée par un virus de la famille Coronaviridae. A cause de la rapidité de la transmission interhumaine, cette maladie a causé une pandémie dans le monde. L'OMS a nommé, le 11 février, la maladie respiratoire provoquée par le SARS-CoV-2 : le COVID-19.

A l'échelle mondiale 775 552 191 cas ont été confirmés par l'OMS le 12 juin 2024 avec 7 050 201 décès en cette même date l'Afrique avait détecté 12 553 199 cas cumulés et un total de 259 265 décès. Selon le ministère de la santé le Mali comptait au total 33 164 cas positifs de COVID-19 avec 743 décès en juin 2024.

La surveillance génomique a permis de détecter plusieurs variants durant les vagues précédentes. Selon les séquences déposées dans la base de données GISAID il y'a eu des études sur les quatre premières vagues (vague 1, vague2, vague 3 et vague 4) qui ont fourni comme résultat les variants Alpha, Beta, Gamma et Delta. Mais il n'y a pas eu d'étude sur la vague 5 on se référant sur les séquences déposées dans la base de données GISAID d'où la nécessité de réaliser cette étude.

Méthodologie

Au cours de cette période en utilisant le système de sélection de l'OMS, nous avons pu séquencer 72 échantillons positifs avec un CT < 30. Les échantillons ont été extraits de façon automatique avec l'appareil KingFisher utilisant le KIT QIAGEN. Le KIT ARGENE COVID-19 a servi pour l'amplification sur le LIGTH CYCLER 480. Le séquençage a été réalisé sur

Illumina Nextseq 2000 et le MinION MKC1 en utilisant respectivement le kit COVIDseq et Midnigh RT expansion Kit utilisant le protocole ARTIC.

Résultats

Sur 72 échantillons préparés pour séquençage, 60 échantillons avaient une couverture > 90 donc séquencés avec succès. Le sexe masculin était dominant avec 57%. La tranche d'âge la plus représentée était de 31-45 ans avec 35%. Les entrepreneurs et les commerçants étaient les plus touchés par cette maladie de coronavirus avec une fréquence de 60%. Le mois de février a été le plus représenté avec 40 cas. La ville de Bamako était la plus touchée par le coronavirus durant notre étude. Le variant détecté était Omicron avec ses sous-variants (B.1.1.529 ; BA.2 ; GA.10 ; GA.5 ; GA.8 ; XBB.1 ; XBB.1.17.1 ; XBB.1.22.1.1 ; XBB.1.5 ; XBB.2) dont le plus représenté était XBB.1.17.1 avec une fréquence de 63,3%. Nous avons détecté plusieurs mutations notamment sur la protéine Spike (protéine S) dont la plus fréquente était la mutation G252V impliquée dans la résistance de XBB.1.5 contre les anticorps monoclonaux neutralisants et une augmentation du pouvoir infectieux.

Conclusion

Cette étude sur la distribution des variants pendant la vague 5 nous a permis de détecter plusieurs mutations notamment sur la région Spike (S) d'où la nécessité de mettre en place une surveillance génomique de routine pour suivre régulièrement l'évolution des variants de SARS CoV-2 afin de mettre en place des mesures de prévention et de contrôle efficaces contre la COVID-19 et des maladies infectieuses émergentes en général.

MOTS CLES : Distribution, vague 5, SARS-CoV-2, variant, Omicron, Mali.

Data sheet: Author: Amidou DIARRA

Phone: +223 74 66 02 01

Email address: amidoudiarra428@gmail.

TITLE: Distribution of variants of wave 5 of SARS-CoV-2 in Mali.

Year of defense: 2023-2024

City of defense: Bamako

Country of origin: Mali

Place of submission: Library of the Faculty of Medicine and Odontostomatology (FMOS) and the Faculty of Pharmacy (FAPH).

Sector of interest: Virology, Molecular biology

Abstract:

Introduction

Coronavirus disease 2019 or COVID-19 is an upper and lower respiratory tract disease caused by a virus of the Coronaviridae family. Due to the rapidity of human-to-human transmission, this disease has caused a pandemic worldwide. On February 11, WHO named the respiratory disease caused by SARS-CoV-2: COVID-19.

Globally, 775,552,191 cases have been confirmed by WHO on June 12, 2024, with 7,050,201 deaths. On the same date, Africa had detected 12,553,199 cumulative cases and a total of 259,265 deaths. According to the Ministry of Health, Mali had a total of 33,164 positive cases of COVID-19 with 743 deaths in June 2024.

Genomic surveillance has made it possible to detect several variants during previous waves. According to the sequences deposited in the GISAID database, there were studies on the first four waves (wave 1, wave 2, wave 3 and wave 4) which provided the Alpha, Beta, Gamma and Delta variants as results. But there has been no study on wave 5 referring to the sequences deposited in the GISAID database, hence the need to carry out this study.

Methodology

During this period using the WHO selection system, we were able to sequence 72 positive samples with a CT < 30. The samples were extracted automatically with the KingFisher

device using the QIAGEN KIT. The ARGENE COVID-19 KIT was used for amplification on the LIGTH CYCLER 480. Sequencing was performed on Illumina Nextseq 2000 and the MinION MKC1 using the COVIDseq kit and Midnigh RT expansion Kit respectively using the ARTIC protocol.

Results

Out of 72 samples prepared for sequencing, 60 samples had a coverage > 90 therefore capable of being sequenced. The male gender was dominant with 57%. The most represented age group was 31-45 years with 35%. Entrepreneurs and traders were the most affected by this coronavirus disease with a frequency of 60%. 43. The month of February was the most represented with 29 cases. The city of Bamako was the most affected by the coronavirus during our study. The variant detected was Omicron with its subvariants, the most represented of which was XBB.1.17.1 with a frequency of 63.3%. We detected several mutations, particularly on the Spike protein (S protein), the most frequent of which was the G252V mutation involved in the resistance of XBB.1.5 against neutralizing monoclonal antibodies and an increase in infectious power.

Conclusion

This study on the distribution of variants during wave 5 allowed us to detect several mutations, particularly in the Spike (S) region, hence the need to set up routine genomic surveillance to regularly monitor the evolution of SARS CoV-2 variants in order to implement effective prevention and control measures against COVID-19 and emerging infectious diseases in general.

KEYWORDS: Distribution, wave 5, SARS-CoV-2, variant, Omicron, Mali.

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
moeurs et favoriser les actes criminels ;*

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

*Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes
confrères si j'y manque !*

Je le jure !