

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI



**UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES  
TECHNOLOGIES DE BAMAKO**



**FACULTE DE PHARMACIE**

ANNEE UNIVERSITAIRE 2023-2024

**Thèse de Pharmacie**

N°.....

**Distribution des variants du SARS-COV 2  
pendant les deux premières vagues de la  
pandémie de Covid-19 au Mali.**

Présentée et soutenue publiquement le 09/12/2024 devant le jury de la faculté de Pharmacie (FAPH) par

**Mme. ZEINABA M DICKO**

Pour l'obtention du grade de docteur en pharmacie (diplôme d'état)

**Président du Jury : M. Ibréhima GUINDO**, Maître de conférences agrégé (FAPH)

**Directeur de thèse : M. Antoine DARA**, Maître de conférences agrégé (FAPH)

**Membres du Jury : Mme. Aminatou KONE**, Maître de conférences (FAPH)

**M. Sédina A.S DIAKITE**, Maître de conférences (FAPH)

## **Hommages aux membres du jury**

- ❖ Au **Professeur Ibréhima Guindo**, Pharmacien biologiste ; Directeur général de l'Institut National de Santé Publique ; Point focal RAM ; Maître de conférences agrégé (FAPH) en Bactériologie-Virologie à la faculté de Pharmacie de Bamako.

**Cher maître,**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury. Homme de rigueur, vos grandes qualités humaines et scientifiques, votre disponibilité, font de vous un maître très apprécié.

Trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude.

- ❖ Au **Professeur Aminatou Koné**, Biologiste, PhD en sciences Médicale biologie moléculaire, Maître de conférences en Biologie moléculaire à la faculté de Pharmacie.

**Cher maître,**

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites, en acceptant de siéger dans ce jury. Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

- ❖ Au **Professeur Seidina A. S. Diakit** ; Pharmacien ; PhD en Immunologie ; Maître de conférences en Immunologie à la faculté de Pharmacie.

**Cher maître,**

Nous sommes très touchés par l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Votre disponibilité et votre sens des responsabilités nous ont marqué dès notre première rencontre. Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

- ❖ Au **Professeur Antoine Dara**, Pharmacien ; PhD en microbiologie moléculaire et immunologie ; Responsable de l'unité génomique au MRTC ; Maître de conférences agrégé à la faculté de Pharmacie.

**Cher maître,**

Ce fut un grand honneur pour nous d'avoir bénéficié de vos qualités pédagogiques et humaines. Vos remarques et suggestions ont sans doute contribué à l'amélioration de la qualité de ce travail.

Permettez-nous cher maître, de vous exprimer à travers ce travail tout notre respect et profonde gratitude.

## **Dédicaces**

Je dédie cette thèse...

✓ **A mon très cher et adorable père : Mohamed Sidida DICKO**

Père attentionné, aimable, depuis toute petite vous n'avez cessé de croire en moi. Vos encouragements, votre soutien moral et financier, et vos sages conseils m'ont toujours accompagné. Que Dieu vous accorde une longue vie, pour goûter aux fruits de l'arbre que vous avez semé et entretenue depuis toujours, Amine.

✓ **A ma tendre et douce mère : Fatoumata DICKO**

Femme battante et affective, ton dévouement, tes sacrifices, ton amour pour tes enfants font de toi une maman exemplaire. Puisse Allah te garder longtemps à nos côtés avec une santé de fer pour que tu puisses continuer à nous guider sur le droit chemin et bénéficier du fruit de ce travail.

✓ **A mon adorable grand-père : Wahari DIALLO**

Ton amour, ton soutien et tes prières m'ont toujours accompagné durant toutes ces années. Que Dieu te garde en vie aussi longtemps que possible.

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont à l'endroit de tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de mes études jusqu'à ce travail.

✓ **A mon très cher et tendre mari : Issouf Mahamoud**

Ton amour, ton soutien, ton encouragement et tes prières, m'ont toujours accompagné durant ces longues années d'étude. Ta patience sans égale m'a donné la force et le courage de venir à bout de ce travail. Je prie Dieu, qu'il accorde une longue vie remplie de bonheur à notre foyer, qu'il y mette sa barakat, et qu'il nous éloigne de tout mal, Amine !

✓ **A mes deux petits amours : Fadila Dicko et Ahmed Salim**

Mes enfants vous êtes ma joie, ma force, mon courage, mon espoir, ma fierté. Qu'Allah vous accorde une longue vie pieuse et pleine de bonheur. Que Dieu vous bénisse mes bébés, maman vous aime très fort...

✓ **A mes frères et sœurs, cousins et cousines : Amadou, Elmeymoune, Maïssa, Zaliha, Dijo, Zeyde, Hamidou, Mariama, Sakinah, Hadiza, Ibrahim, Abdoul Aziz, Ahmed, Soumaila, Boubou, Abdoulaye, Oumar, Nana Baby, Dila, Fatoumata.**

Les mots me manquent pour vous exprimer mon amour. Je prie Dieu qu'il accorde à chacun son vœu le plus cher, et qu'il unisse d'avantage notre famille. Longue vie à nous.

✓ **A mes amies et sœurs de cœur : Fatoumata Keita (Mamy), Adja Mayaka Raïssa Cissé, Fatoumata Keita (Tata), Faouziya Djibril, Sanata Keita et Rabiou Sanogo**

Pour l'estime, l'amour et la considération que vous m'avez témoignés ; que cette thèse soit pour vous l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon attachement. Le souvenir des moments passés avec vous, restera pour toujours graver dans ma mémoire. Que Dieu vous prête succès et longue vie.

Je remercie également :

✓ **Dr Mahamadou Abdou, Noumou Yakhoubou KEITA, Dr Fatoumata Issa DIALLO, Dr Alhadji Alassane DICKO, Dr Teninba SOUNTOURA, Dr**

**Mamadou SAMAKE, Fankele Mamadou DIARRA, Amidou DIARRA, Seni BENGALY et Moussa COULIBALY**

Merci pour vos conseils, vos encouragements, la disponibilité, et vos aides dans la rédaction de ce document. J'espère que vous trouverez dans ce travail l'expression de ma profonde reconnaissance.

## Listes des abréviations

Ac	Anticorps
ACE2	Angiotensin Converting Enzyme 2 (Enzyme de conversion de l'angiotensine 2)
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ALAT	Alanine aminotransférase
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATB	Antibiotique
AVE	Aliquot Volume Elution (Tampon d'éluion)
AVL	Viral lysis buffer (Tampon de lyse)
AW Buffer	Wash Buffer (Tampon de lavage)
BPCO	Bronchopathie chronique obstructive
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CoV	Coronavirus
COVID-19	Coronavirus Disease 2019 (maladie à Coronavirus 2019)
Ct	Cycle de Treshold
d-NTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
Del	Délétion
DILI	Drug-induced liver injury (lésion hépatique d'origine médicamenteuse)
E	Enveloppe
FAM	6-carboxyfluorescéine

FFP	Filtering Facepiece particle (Pièce Faciale Filtrante)
GI	Tractus gastro-intestinal
GISAID	Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data
GM-CSF	Facteur de stimulation des colonies de granulocytes-Macrophages
HCOV	Coronavirus Humain
HCoV-229 E	Human Coronavirus-229 E
HCoV-OC43	Human Coronavirus Organ Culture 43
HCoV-NL63	Human Coronavirus Netherland 63
HCoV-HKU1	Human Coronavirus Hong Kong University 1
HE	hémagglutinine estérase
IBV	Infectious Bronchitis Virus
IC	Contrôle Interne
Ig	Immunoglobulines
IgA	Immunoglobulin A
IgM	Immunoglobulin M
IL	Interleukine
INF	Interféron
INSP	Institut National de santé publique
IV	Intra-veineuse
MERS-COV	Middle-East respiratory syndrome coronavirus
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
MHV	Murine hepatitis virus
NAC	Negative Amplification Control

NFS	Numération Formule Sanguine
Nsp	Protéines non structurales
Nt	Nucléotides
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Open Reading frame (cadre de lecture ouvert)
PANGO	Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak Lineages
PCR	Polymerase Chain Reaction
PP	Polyprotéines
RdRp	ARN polymérase ARN-dépendante
RT-PCR	Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction
SRAA	Système rénine angiotensine-aldostérone
SRAS-CoV	Syndrome Respiratoire Aigu Sévère à Coronavirus
TCA	Temps de céphaline activée
TDM	Tomodensitométrie
TGEV	Transmissible gastro-enteritis virus
TMPRSS2	Protéase transmembranaire à serine 2
UTM	Universal transport medium
UTR	Région Non Traduite
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VOC	Variant of Concern (Variant de préoccupation)
VOI	Variant of Interest (Variant d'intérêt)
VTM	Viral transport medium

## Table des matières

Liste des figures.....	14
Liste des tableaux.....	15
I. Introduction.....	17
II. Objectifs.....	20
1. Objectif général.....	20
2. Objectifs spécifiques.....	20
2.1. Décrire les caractéristiques socio-démographiques des patients.....	20
2.2. Identifier les variants du SARS-COV-2 circulant au Mali pendant les deux premières vagues de la pandémie de Covid-19.....	20
2.3. Déterminer la distribution géographique des variants circulant au Mali pendant les deux premières vagues de la pandémie de Covid-19. ....	20
III. Généralités .....	22
1. Historique des coronavirus.....	22
2. Classification et taxonomie des coronavirus.....	23
3. Structure et organisation du génome des coronavirus.....	23
3.1. Structure.....	23
3.2. Génome des coronavirus.....	25
4. Mécanisme de réplication du SARS-COV-2 .....	26
5. Epidémiologie.....	27
6. Mode de transmission du SARS COV2 :.....	27
7. Présentation de la maladie.....	28
8. Pathogenèse du SARS-CoV-2 .....	29
8.1. Effet du SARS-CoV-2 sur le système nerveux central (SNC) .....	30
8.2. Effet du SARS-CoV-2 sur le système cardiovasculaire .....	30
8.3. Effet du SARS-CoV-2 sur le tractus gastro-intestinal (GI) .....	31
8.4. Effet du SARS-CoV-2 sur le système hépatobiliaire.....	31
8.5. Effet du SARS-CoV-2 sur le système rénal.....	31

9.	Les variants du SARS-COV 2.....	32
9.1.	Les variants préoccupants (VOC).....	32
9.2.	Variants d'intérêt du SRAS-CoV-2 (VOI).....	34
10.	Diagnostic de l'infection par le SARS-COV2.....	34
10.1.	Etape pré-analytique .....	34
10.2.	Étape analytique, immunologique et moléculaire.....	35
10.2.1.	RT-PCR .....	35
10.2.2.	RT-LAMP .....	35
10.2.3.	Tests antigéniques .....	36
10.2.4.	Tests sérologiques.....	36
11.	Séquençage .....	36
11.1.	Séquençeurs de première génération.....	37
11.2.	Séquençeurs de deuxième génération.....	37
11.3.	Séquençeurs de troisième génération .....	38
11.3.1.	Méthode du nanopore .....	38
12.	Prévention et Prise en charge de la Covid 19.....	40
12.1.	Prévention .....	40
12.1.1.	Mesures barrières .....	40
12.1.2.	Les équipements de protection individuelle pour les agents de santé.....	40
12.1.3.	Vaccins contre la Covid-19 .....	41
12.2.	Prise en charge de la Covid-19 .....	42
IV.	Méthodologie .....	46
1.	Cadre d'étude .....	46
2.	Type et période d'étude.....	46
3.	Population d'étude.....	47
4.	Echantillonnage .....	47
5.	Critères d'inclusion.....	47
6.	Critères de non-inclusion .....	47

7.	Variables de l'étude.....	47
8.	Matériels et réactifs de laboratoire .....	47
8.1.	Outils de collecte des données.....	47
8.2.	Matériel biologique .....	47
8.3.	Séquençage du génome entier.....	48
8.3.1.	Extraction de l'ARN génomique .....	48
8.3.2.	Amplification et détermination des échantillons éligibles au séquençage.....	48
8.3.3.	Préparation de la librairie.....	49
8.4.	Equipements.....	50
9.	Analyse des séquences et identification des variants.....	51
10.	Aspects éthiques .....	51
V.	Résultats.....	53
1.	Caractéristiques socio-démographiques de la population d'étude et cliniques.....	54
1.1.	Répartition des échantillons en fonction du sexe .....	54
1.2.	Répartition des échantillons en fonction de l'âge .....	54
1.3.	Répartition des échantillons en fonction de la profession.....	55
1.4.	Répartition des échantillons en fonction de la résidence .....	55
1.5.	Symptomatologie .....	56
2.	Identification par génomique des variants circulants au Mali pendant les vagues 1 et 2.....	56
2.1.	Les variants détectés .....	56
2.2.	Répartition des variants en fonction des vagues.....	57
2.3.	Arbre phylogénétique des variants détectés .....	58
3.	Répartition géographique des variants circulant au Mali pendant les vagues 1 et 2 .....	59
VI.	Commentaires et Discussion .....	61
1.	Caractéristiques socio-démographiques et cliniques de la population étudiée.....	61
2.	Identification par génomique des variants circulant au Mali pendant les vagues 1 et 2 .....	62
3.	Répartition géographique des variants circulant au Mali pendant les vagues 1 et 2 .....	63
4.	Limites de l'étude.....	63

VII.	Conclusion .....	65
VIII.	Recommandations.....	67
IX.	Références.....	69
X.	Annexes .....	76
	Fiche signalétique.....	95
	Résumé.....	95
	Abstract .....	96
	Serment de Galien.....	97

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Arbre phylogénétique des Coronavirinae, construit par la méthode du Neighbor-joining (MEGA6). .....	23
<b>Figure 2</b> : Structure virale du SARS-COV-2.....	25
<b>Figure 3</b> : Organisation génomique du Sars-CoV-2. ORF : open reading frame ; RdRp : gène codant l'ARN polymérase ARN-dépendante ; S, E, M, N : gènes qui codent pour les protéines structurales .	26
<b>Figure 4</b> : Etapes du cycle viral du SARS-CoV-2.....	26
<b>Figure 5</b> : Symptômes cliniques de la maladie infectieuse à coronavirus 2019 (COVID-19). .....	29
<b>Figure 6</b> : Illustration du principe de séquençage par nanopore.....	39
<b>Figure 7</b> : Programme d'amplification .....	49
<b>Figure 8</b> : LightCycler® 480 (INSP Mali) .....	50
<b>Figure 9</b> : MinION™ Mk1C d'Oxford Nanopore Technologies® (INSP Mali).....	51
<b>Figure 10</b> : Sélection des échantillons éligibles pour le séquençage .....	53
<b>Figure 11</b> : Répartition des échantillons en fonction du sexe .....	54
<b>Figure 12</b> : Répartition des échantillons en fonction de l'âge .....	54
<b>Figure 13</b> : Répartition des échantillons en fonction de la résidence .....	56
<b>Figure 14</b> : Fréquence des différents variants détectés pendant l'étude .....	57
<b>Figure 15</b> : Répartition des variants en fonction des vagues .....	57
<b>Figure 16</b> : Arbre phylogénétique représentatif des échantillons séquencés.....	58

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Programme d'amplification des RT-PCR de diagnostic du kit ARGENE.....	48
<b>Tableau 2</b> : Préparation du mix .....	49
<b>Tableau 3</b> : Répartition des échantillons en fonction de la profession.....	55
<b>Tableau 4</b> : Répartition des échantillons en fonction des symptômes.....	56
<b>Tableau 6</b> : Répartition géographique des variants circulants au Mali.....	59
<b>Tableau 7</b> : Composition des kits d'extraction d'acide nucléique .....	76
<b>Tableau 8</b> : Composition des kits de détection moléculaire SRAS-CoV-2.....	76
<b>Tableau 9</b> : Rapid barcoding 96 V14 (EXP-MRT001 et SQK-RBK114.96).....	77
<b>Tableau 10</b> : Midnight RT PCR Expansion .....	77
<b>Tableau 11</b> : Pool A .....	78
<b>Tableau 12</b> : Pool B.....	79
<b>Tableau 13</b> : Programme d'amplification du LightCycler .....	84

# **INTRODUCTION**

## I. Introduction

Le SARS-CoV-2, agent responsable de la maladie à coronavirus 2019 (COVID-19), a émergé initialement à Wuhan, dans la province de Hubei, en Chine. Il s'est ensuite rapidement propagé à l'échelle mondiale, affectant des millions de personnes et entraînant un nombre considérable de décès. En raison de cette crise sanitaire majeure et de son potentiel de diffusion internationale, l'OMS a déclaré une urgence sanitaire mondiale le 31 janvier 2020, suivie le 11 mars 2020 par la reconnaissance de la pandémie [1].

A l'échelle mondiale, le nombre de cas de covid-19 signalé à l'OMS à la date du 02 Décembre 2024 était de 776 897 200 avec plus de 7 millions de décès. Le continent africain qui est resté le moins touché par cette pandémie dénombrait à la même date 9 584 113 cas positifs avec 175 531 décès [2].

Au Mali, les premiers cas de COVID-19 ont été détectés en mars 2020, marquant le début de cinq vagues distinctes de la pandémie. Cette situation a conduit à la mise en place de mesures de contrôle et de prévention par le gouvernement. À la date du 02 Décembre 2024, l'OMS a confirmé 33 177 cas et 743 décès au Mali [2].

Le SARS-CoV-2 est un virus à ARN monocaténaire de sens positif d'environ 30 kb. Il est issu des *Coronaviridae*, sous-famille *Orthocoronavirinae*, genre *Betacoronavirus* assez proche du SARS-CoV-1 avec lequel il partage 79% de l'identité de séquence génomique [3].

Les efforts mondiaux pour contrôler la maladie ont inclus la surveillance génomique comme élément clé des stratégies de contrôle. Cette surveillance consiste à suivre l'évolution du génome du virus afin d'identifier les variations significatives pouvant influencer les méthodes de lutte telles que la vaccination et le traitement. Les séquences génomiques sont généralement mises à la disposition du public dans la base de données GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data), facilitant ainsi une surveillance en temps réel de la propagation et de l'évolution de la pandémie par la santé publique grâce à des outils interactifs tels que NextStrain [4].

Nous avons ainsi assisté à l'émergence de plusieurs lignées virales porteuses de mutations qui confèrent des avantages adaptatifs au virus, que ce soit par une augmentation de la transmission et l'infectiosité, ou par une résistance aux anticorps neutralisants issus de la vaccination ou d'infections antérieures. Ces lignées sont désignées sous le nom de variants. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a identifié certaines de ces lignées virales comme variants préoccupants (VOC) ou variants d'intérêt (VOI) en fonction de l'impact potentiel

qu'elles peuvent avoir sur la pandémie. À ce jour, cinq VOC ont été déclarés par l'OMS [5]; que sont :

- **Alpha (B.1.1.7)** : premier variant préoccupant décrit au Royaume-Uni en fin décembre 2020
- **Beta (B.1.351)** : signalé pour la première fois en Afrique du Sud en décembre 2020
- **Gamma (P.1)** : signalé pour la première fois au Brésil en début janvier 2021
- **Delta (B.1.617.2)** : signalé pour la première fois en Inde en décembre 2020
- **Omicron (B.1.1.529)** : signalé pour la première fois en Afrique du Sud en novembre 2021.

L'ampleur de circulation des variants du SARS-COV-2 n'est pas bien connue et étudiée au Mali, bien que quelques études préliminaires rapportent la circulation de ces variants lors de certaines vagues. C'est dans cette optique que nous nous sommes engagés à réaliser cette étude afin d'évaluer la distribution des variants circulant au Mali entre Mars 2020 et Février 2021 correspondant aux deux premières vagues de la pandémie.

# **OBJECTIFS**

## **II. Objectifs**

### **1. Objectif général**

Evaluer la distribution des variants du SARS-COV-2 pendant les deux premières vagues de la pandémie de Covid-19 au Mali.

### **2. Objectifs spécifiques**

**2.1.**Décrire les caractéristiques socio-démographiques des patients.

**2.2.**Identifier les variants du SARS-COV-2 circulant au Mali pendant les deux premières vagues de la pandémie de Covid-19.

**2.3.**Déterminer la distribution géographique des variants circulant au Mali pendant les deux premières vagues de la pandémie de Covid-19.

# **GENERALITES**

### III. Généralités

#### 1. Historique des coronavirus

Le genre « coronavirus » a été créé en 1967 sur la base de critères essentiellement morphologiques. Il regroupe des virus animaux connus depuis les années 1930, tels que le virus de la bronchite infectieuse ou IBV, le virus de l'hépatite murine ou MHV, et le virus de la gastroentérite porcine (TGEV), ainsi que des virus récemment identifiés chez l'homme (souches B814, 229E, OC43, OC48, 692). [6-8]

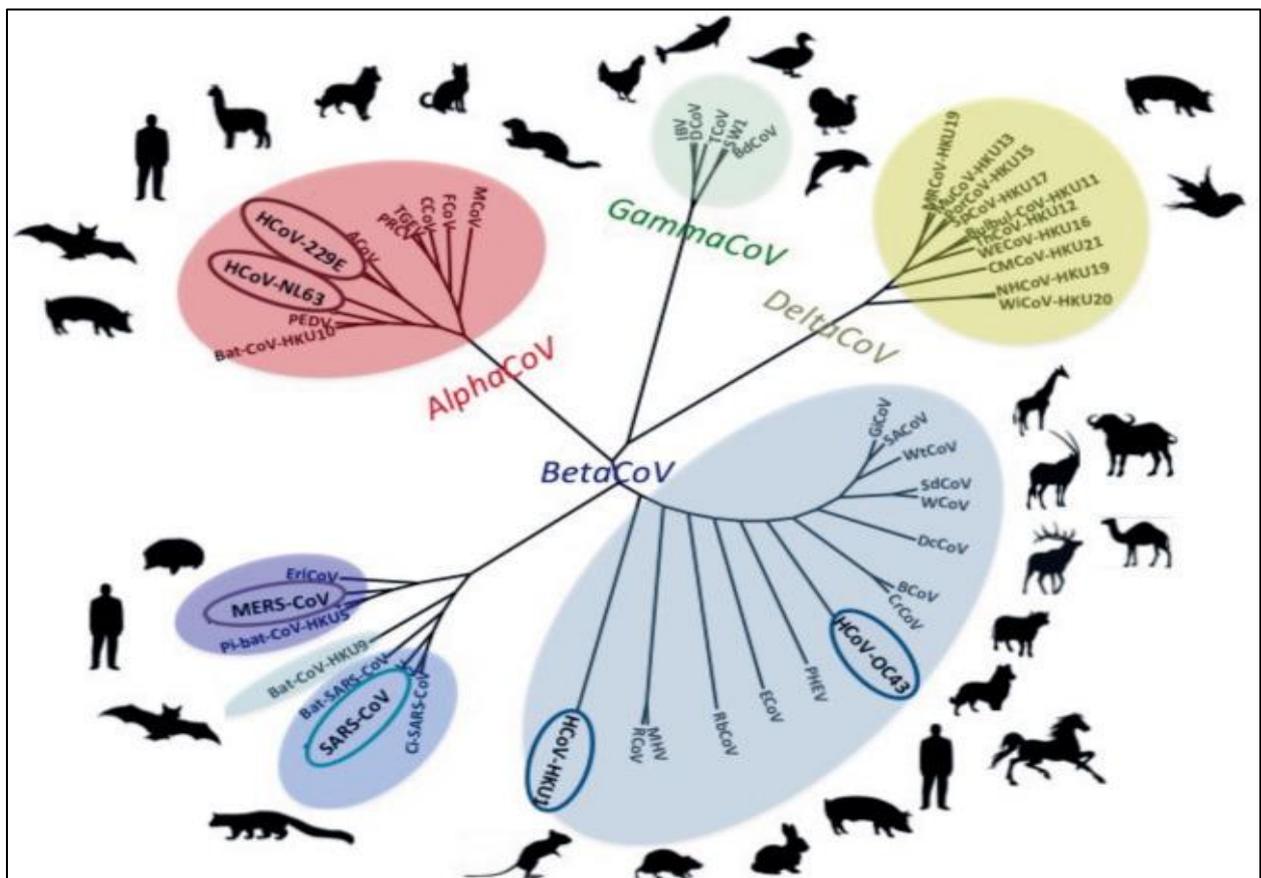
Le terme « coronavirus » fait référence à l'aspect en couronne des virions observé en microscopie électronique. La taxinomie virale a ensuite été régulièrement revue : l'ordre des Nidovirales, créé en 1996, regroupe actuellement trois familles, les Coronaviridae, les Arteriviridae, et les Roniviridae. Ces virus ont en commun l'organisation du génome ARN et la stratégie de réplication, mais se distinguent par leur morphologie, la structure de leur capsid, et la taille de leur génome, qui varie de 13 000 nucléotides pour les *Arteriviridae* à 31 000 nucléotides pour les *Coronaviridae*. La famille des *Coronaviridae* est constituée de deux genres, les coronavirus et les torovirus. Parmi les Nidovirales, seul le genre coronavirus inclut des virus capables d'infecter l'homme [9].

Lors de l'identification des premiers coronavirus humains HCoV-OC43 et HCoV-229E dans les années 1960, les pathologies respiratoires associées étaient jugées trop bénignes pour susciter un réel intérêt au sein de la communauté médicale. Cependant, en 2003, l'identification d'un coronavirus comme agent étiologique du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS), circulant de manière pandémique depuis novembre 2002, a ravivé l'attention portée à ce groupe viral jusqu'alors peu étudié en médecine humaine [10]. Depuis l'identification du SARS-CoV, plusieurs coronavirus ont été décrits, dont deux infectant l'Homme, HCoV-NL63 et HCoV-HKU1, découverts en 2004 [11-13]. En 2012, un nouveau coronavirus humain, le MERS-CoV, est apparu au Moyen-Orient, provoquant une pathologie similaire au SRAS [14].

La dernière émergence en fin 2019 s'est développée sous forme pandémique (Covid-19), créant au niveau mondial une crise sanitaire et économique sans précédent et faisant des coronavirus un sujet d'actualité particulièrement inquiétant [15].

## 2. Classification et taxonomie des coronavirus

Le terme coronavirus fait référence à la sous-famille des Coronavirinae, appartenant à la famille des Coronaviridae, elle-même faisant partie de l'ordre des Nidovirales. Les coronavirus infectent de nombreuses espèces mammifères et aviaires. Selon la taxonomie actuelle, les Coronavirinae sont subdivisés en quatre genres nommés Alpha-, Beta-, Gamma- et Deltacoronavirus. Les HCoV-229E et -NL63 appartiennent au genre Alphacoronavirus. Les quatre autres coronavirus humains appartiennent au genre Betacoronavirus qui est lui-même subdivisé en quatre clades nommés A, B, C et D [16]. Les HCoV-HKU1 et -OC43 sont inclus dans le clade A, le SARS-CoV et le MERS-CoV appartiennent aux clades B et C respectivement (figure 1).



**Figure 1 :** Arbre phylogénétique des Coronavirinae, construit par la méthode du Neighbor-joining (MEGA6).[17]

Les figures animales représentent le spectre d'hôte. La sous-famille des Coronavirinae est divisée en quatre genres nommés Alpha-, Beta-, Gamma- et Deltacoronavirus.

## 3. Structure et organisation du génome des coronavirus

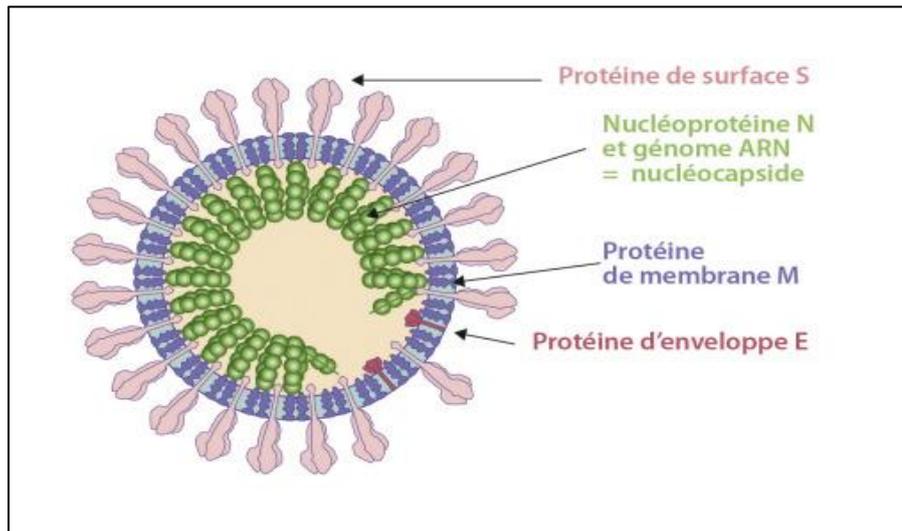
### 3.1. Structure

Les CoV, y compris le SARS-CoV-2 récemment découvert, sont des virus à ARN simple brin positif sphériques caractérisés par des protéines de pointe projetées à partir de la surface du virion [18, 19]. La morphologie sphérique de la particule virale ainsi que les projections de pointes ont conduit au nom coronavirus du mot latin « corona » signifiant couronne, en raison de l'apparition du virus comme une couronne royale au microscope électronique [18, 19]. Les CoV sont des virus enveloppés (l'enveloppe est une bicouche lipidique dérivée de la membrane de la cellule hôte) dont la structure virale est principalement formée de protéines structurales telles que les protéines de pointe (S), de membrane (M), d'enveloppe (E), de nucléocapside (N) et l'hémagglutinine-estérase (HE) chez certains betacoronavirus [20]. Les protéines S, M et E sont toutes intégrées dans l'enveloppe virale; cependant, la protéine N interagit avec l'ARN viral et est située au cœur de la particule virale, formant la nucléocapside [20].

La protéine S est une glycoprotéine majeure qui forme des pointes homotrimériques à la surface de la particule virale et médie l'entrée du virus dans les cellules hôtes [21]. Chez certains CoV, chaque monomère de cette protéine est divisé en deux sous-unités (S1 et S2), en raison d'un clivage effectué par des protéases de type furine de l'hôte pendant la réplication virale [21, 22].

La protéine M est une composante structurale majeure du virion, présente en plus grande quantité que toute autre protéine dans la particule virale, contrairement à la protéine E qui se trouve en petites quantités dans le virion [23]. La différence d'abondance peut être due au fait que la protéine M donne au virus sa forme et est essentielle avec la protéine E pour orchestrer l'assemblage du virus et former des enveloppes virales matures [24]. La protéine E fonctionne également dans la libération de particules virales des cellules hôtes, en plus d'autres fonctions [24].

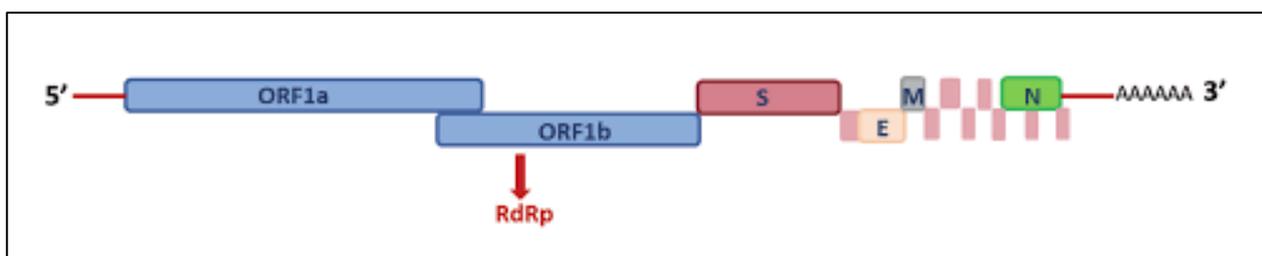
La protéine N se lie à l'ARN viral et joue un rôle essentiel dans son encapsidation au sein de la particule virale lors de l'assemblage du virus [25, 26]. Comme mentionné précédemment, l'HE est présente chez certains betacoronavirus. Cette hémagglutinine, similaire à celle du virus de la grippe, se lie à l'acide sialique des glycoprotéines de surface des cellules hôtes et possède une activité acétyl-estérase [27]. Les caractéristiques de l'HE peuvent améliorer l'entrée et la pathogénèse des coronavirus qui contiennent une telle protéine dans leur structure virale. La structure virale du SARS-COV-2 est représentée par la figure 2.



**Figure 2 :** Structure virale du SARS-COV-2 [28].

### 3.2.Génome des coronavirus

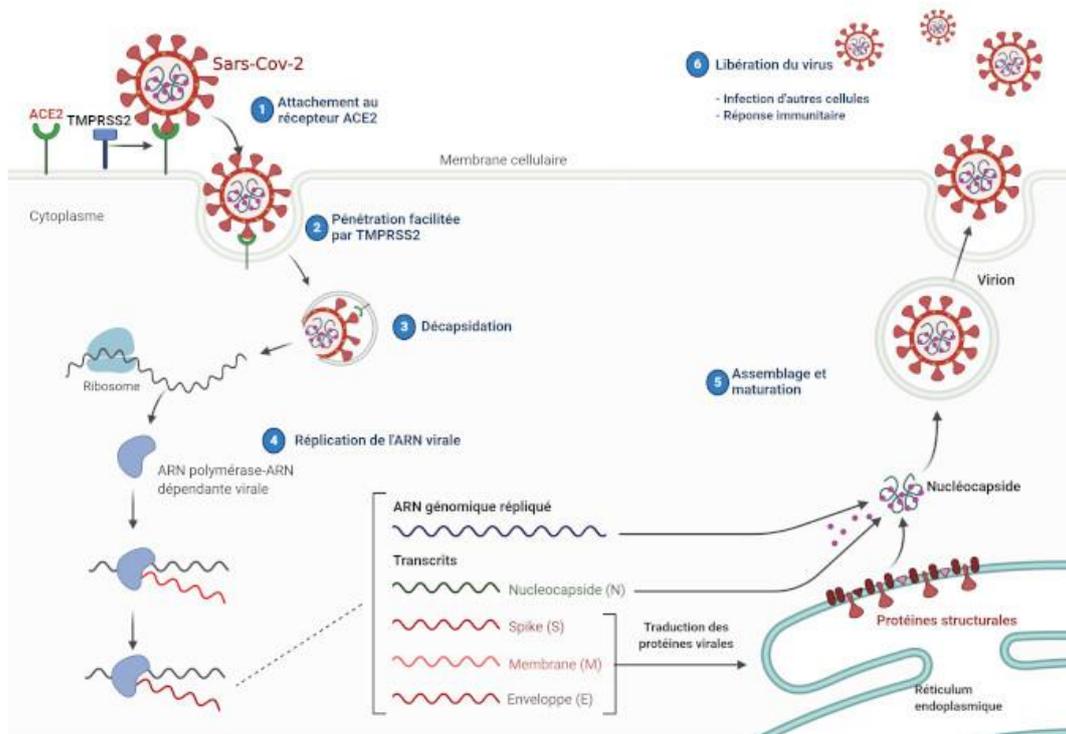
Le génome du SARS-CoV-2 est composé d'un ARN monocaténaire de sens positif [29]. La constitution génétique du SARS-CoV-2 est composée de 13 à 15 (12 fonctionnels) cadres de lecture ouverts (ORF) contenant ~30 000 nucléotides. L'arrangement génétique des ORF ressemble beaucoup au SARS-CoV et au MERS-CoV [30, 31]. Les ORF sont disposés en répliques et protéases (1a–1b) et en protéines majeures S, E, M et N, qui suivent un ordre d'apparence typique de 5'-3' et sont considérées comme des cibles médicamenteuses / vaccins majeures. Ces produits géniques jouent un rôle important dans l'entrée, la fusion et la survie virales dans les cellules hôtes [32].



**Figure 3 :** Organisation génomique du Sars-CoV-2. ORF : open reading frame ; RdRp : gène codant l'ARN polymérase ARN-dépendante ; S, E, M, N : gènes qui codent pour les protéines structurales [28].

#### 4. Mécanisme de réplication du SARS-COV-2

Le cycle de réplication des coronavirus a été largement étudié. Après la fusion du virus avec la cellule hôte et la libération de la nucléocapside dans le cytosol, la machinerie cellulaire traduit le gène de la réplicase en deux polyprotéines (pp1a et pp1ab). Ces polyprotéines sont ensuite clivées en plusieurs protéines essentielles au cycle viral, notamment deux protéases virales et une ARN-polymérase ARN-dépendante, qui s'assemblent pour former un complexe de transcription et de réplication [33, 34]. Ce complexe assure à la fois la réplication de l'ARN viral et, grâce à la synthèse d'ARN sous-génomiques sous forme de petits brins d'ARN anti-sens, la production des protéines structurales nécessaires aux nouveaux virions. Enfin, les brins d'ARN néosynthétisés s'associent à la protéine N pour former la nucléocapside et l'assemblage avec les glycoprotéines d'enveloppe permet le bourgeonnement de nouvelles particules virales [34].



**Figure 4 :** Etapes du cycle viral du SARS-CoV-2 [34].

## **5. Epidémiologie**

### **➤ Dans le monde :**

De Décembre 2019 jusqu'au 02 Décembre 2024, 776 897 200 de cas positifs (conformément aux définitions de cas et aux stratégies de dépistage appliquées dans les pays touchés) ont été signalés, avec plus de 7 millions de décès.

Devant l'explosion du nombre de cas et la saturation des systèmes de santé dans certaines régions, des mesures de confinement ont progressivement été instituées dans le monde entier, permettant le contrôle de la pandémie [2].

### **➤ En Afrique**

Depuis le 25 février 2020 l'Afrique a enregistré son premier cas en Égypte puis la maladie s'est propagée dans les 54 pays. Selon l'OMS, le nombre de cas en Afrique est d'environ 9 584 113, avec 175 531 décès à la date du 02 Décembre 2024 [2].

### **➤ Au Mali**

Du 25 mars 2020 à la date du 02 Décembre 2024, Selon l'OMS, le nombre de cas confirmés de COVID-19 était 33 177 cas avec 743 décès [2].

## **6. Mode de transmission du SARS COV2 :**

Le SARS-CoV-2 se transmet essentiellement par l'émission de gouttelettes respiratoires contenant des particules virales. Ces gouttelettes peuvent infecter un individu soit par contact direct avec une muqueuse (transmission directe), soit par contact avec une surface contaminée, suivi d'un transfert vers les muqueuses nasales, buccales ou conjonctivales (transmission indirecte). Bien qu'elles puissent être projetées à plusieurs mètres, elles ne restent pas en suspension dans l'air. Si le virus peut survivre au moins trois heures après aérosolisation expérimentale, aucune donnée n'a, à ce jour, confirmé sa transmission par aérosols. En revanche, il peut survivre plusieurs jours sur des surfaces inertes [35].

En dehors des prélèvements respiratoires, l'ARN viral a également été détecté dans les selles et le sang des patients infectés. Bien que des virus vivants aient été isolés à partir de selles et que le SARS-CoV-2 puisse infecter les entérocytes humains, aucune preuve définitive n'atteste d'une transmission féco-orale significative. De même, malgré l'existence possible d'une virémie, la transmission intra-utérine du virus reste à démontrer à ce jour, bien que quelques cas suspects aient été rapportés [36]. Enfin l'isolement de l'ARN viral dans les urines reste un phénomène rarement documenté [37].

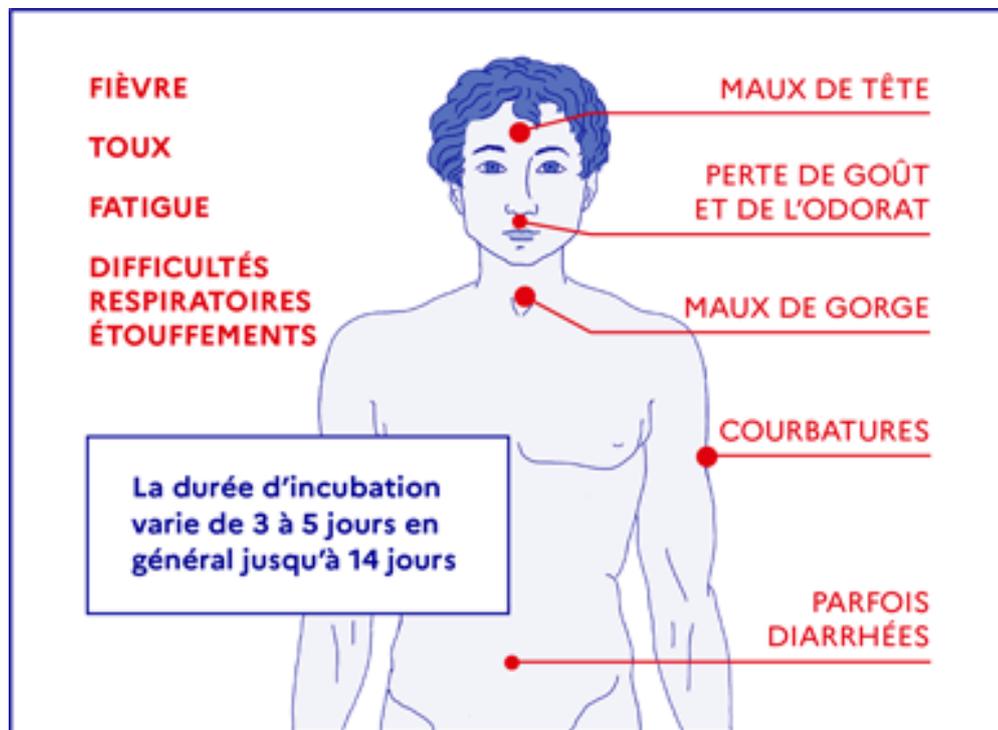
## 7. Présentation de la maladie

Les coronavirus responsables du rhume provoquent généralement des symptômes bénins, tels que l'urticaire et, plus rarement des troubles gastro-intestinaux. En revanche, les infections par des coronavirus hautement pathogènes, notamment le SRAS-CoV-2, entraînent de graves symptômes similaires à ceux de la grippe, pouvant évoluer vers un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), une pneumonie, une insuffisance rénale et, dans certains cas causer la mort. Selon une étude épidémiologique menée sur 99 patients atteints de la COVID-19, les symptômes les plus fréquents étaient la fièvre (83%), la toux (82%) et la dyspnée (31%).[38]

La période d'incubation de la COVID-19 est rapide : ~5 à 6 jours contre 2 à 11 jours pour les infections dues au SARS-CoV. Avec la progression de la pandémie, il est devenu de plus en plus évident que la COVID-19 englobe non seulement les maladies respiratoires et gastro-intestinales rapides, mais peut également avoir des ramifications à long terme, telles que l'inflammation du myocarde [39].

En outre, la COVID-19 grave ne se limite pas à la population âgée telle qu'elle a été initialement signalée ; Les enfants et les jeunes adultes sont également à risque.[38]

Du point de vue du diagnostic, la COVID-19 présente certains indices de laboratoire et radiologiques « caractéristiques », qui peuvent être utiles pour évaluer la progression de la maladie. Ensemble, les COVID-19 présentent initialement des symptômes semblables à ceux de la grippe et peuvent ensuite évoluer vers une inflammation systémique potentiellement mortelle et un dysfonctionnement multiviscéral [38].



**Figure 5 :** Symptômes cliniques de la maladie infectieuse à coronavirus 2019 (COVID-19) [2].

### 8. Pathogenèse du SARS-CoV-2

Le SARS-CoV-2 pénètre dans les cellules des hôtes en liant abondamment le pic du SARS-CoV-2 ou la protéine S (S1) aux récepteurs ACE2 sur l'épithélium respiratoire tel que les cellules épithéliales alvéolaires de type II. Outre l'épithélium respiratoire, les récepteurs ACE2 sont également exprimés par les cellules d'autres organes tels que l'œsophage supérieur, les entérocytes de l'iléon, les cellules myocardiques, les cellules tubulaires proximales du rein et les cellules urothéliales de la vessie. [40]

Le processus d'attachement viral est suivi par l'amorçage de la sous-unité de la protéine de pointe S2 par la sérine protéase transmembranaire 2 de l'hôte (TMPRSS2) qui facilite l'entrée cellulaire et l'endocytose de réplication virale subséquente avec l'assemblage des virions. [41] Deux phases expliquent la pathogenèse, une phase précoce caractérisée par une réplication virale suivie d'une phase tardive où les cellules hôtes infectées déclenchent une réponse immunitaire avec le recrutement de lymphocytes T, de monocytes et de recrutement de neutrophiles qui libèrent des cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), le facteur de stimulation

des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF), l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6) et l'interféron (IFN)- $\gamma$ . Comme on l'a vu dans les cas graves de COVID-19, la suractivation du système immunitaire entraîne une surexpression de cytokines caractérisée par la libération de niveaux élevés de cytokines, en particulier d'IL-6 et de TNF- $\alpha$ , dans la circulation, provoquant une réponse inflammatoire locale et systémique [42, 43].

La variation génétique des gènes viraux du SARS-CoV-2 peut avoir des implications pour sa pathogenèse, surtout si elle implique le RBD, qui intervient dans l'entrée virale dans les cellules hôtes et est une cible essentielle des anticorps monoclonaux des sérums vaccinaux. Comme il a été mentionné précédemment, les trois COV signalés (B.1.1.7; B.1.351; et P.1) ont des mutations dans le RBD et le NTD, dont la mutation N501Y située sur le RBD est commune à toutes les variantes et entraîne une affinité accrue de la protéine de pointe pour les récepteurs ACE 2 améliorant l'attachement viral et son entrée ultérieure dans les cellules hôtes. Bien que le système respiratoire soit la cible prédominante du SARS-CoV-2, tel que décrit ci-dessus, il peut affecter d'autres systèmes organiques majeurs tels que le tractus gastro-intestinal (GI), les systèmes hépatobiliaire, cardiovasculaire, rénal et nerveux central. Le dysfonctionnement d'organes induit par le SARS-CoV-2, en général, est peut-être expliqué par l'un ou l'autre ou une combinaison des mécanismes proposés, tels que la toxicité virale directe, les lésions ischémiques causées par une vascularite, une thrombose ou une thrombo-inflammation, une dysrégulation immunitaire et une dysrégulation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA).[44]

### **8.1.Effet du SARS-CoV-2 sur le système nerveux central (SNC)**

Il existe de nouvelles preuves de la présence de récepteurs ACE2 dans le cerveau humain et de souris, indiquant une infection cérébrale potentielle par le SARS-CoV-2. Zubair et al. ont souligné que la neuroinvasion par le SARS-CoV-2 peut se produire avec diverses voies possibles, telles que le transfert trans synaptique à travers les neurones infectés via le nerf olfactif, l'infection des cellules endothéliales vasculaires ou la migration des leucocytes à travers la barrière hémato-encéphalique.[45]

### **8.2.Effet du SARS-CoV-2 sur le système cardiovasculaire**

La pathogenèse de l'implication du SVC dans la COVID-19 est inconnue et est probablement multifactorielle, et plusieurs théories ont été postulées. Les récepteurs ACE2 sont également

exposés par les cellules myocardiques impliquant une cytotoxicité directe par le SARS-CoV-2 sur le myocarde conduisant à une myocardite. Inversement, la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 peut entraîner une inflammation vasculaire, une myocardite et des arythmies cardiaques.[46]

Le syndrome coronarien aigu (SCA) est également une manifestation cardiaque bien connue de la COVID-19. Il est probablement multifactoriel en raison de la thrombogénicité associée à ce virus et peut-être en raison de la libération de cytokines inflammatoires, ce qui peut réduire le flux sanguin coronaire, réduire l'apport en oxygène, entraînant la déstabilisation de la micro-thrombogénèse de la plaque coronaire [47, 48].

### **8.3.Effet du SARS-CoV-2 sur le tractus gastro-intestinal (GI)**

La pathogénèse des manifestations gastro-intestinales de la COVID-19 est inconnue et est probablement multifactorielle. Plusieurs mécanismes ont été proposés, y compris la cytotoxicité virale directe médiée par l'ACE 2 de la muqueuse intestinale, l'inflammation induite par les cytokines, la dysbiose intestinale et les anomalies vasculaires.[49]

### **8.4.Effet du SARS-CoV-2 sur le système hépatobiliaire**

La pathogénèse des lésions hépatiques chez les patients atteints de COVID-19 est inconnue. Les lésions hépatiques sont probablement multifactorielles et s'expliquent par diverses hypothèses, y compris la réplication virale médiée par l'ACE-2 dans le foie et la cytotoxicité qui en résulte, les dommages hypoxiques ou ischémiques, la réponse inflammatoire à médiation immunitaire et les lésions hépatiques induites par les médicaments (DILI), ou l'aggravation d'une maladie hépatique préexistante.[49]

### **8.5. Effet du SARS-CoV-2 sur le système rénal**

La pathogénèse des lésions rénales associées à la COVID-19 est inconnue. Il est probablement multifactoriel, expliqué par un seul ou une combinaison de nombreux facteurs tels que les lésions cytotoxiques directes causées par le virus, le déséquilibre du SRAA, l'état hyperinflammatoire associé induit par les cytokines, les lésions microvasculaires et l'état prothrombotique associé à la COVID-19. D'autres facteurs peuvent contribuer aux lésions rénales, tels que l'hypovolémie associée, les agents néphrotoxiques potentiels et la septicémie nosocomiale.[50]

## 9. Les variants du SARS-COV 2

Le SARS-CoV-2 est sujet à une évolution génétique entraînant de multiples variants qui peuvent avoir des caractéristiques différentes de celles de ses souches ancestrales. Le séquençage génomique périodique des échantillons viraux est d'une importance fondamentale, en particulier dans un contexte de pandémie mondiale, car il aide à détecter tout nouveau variant génétique du SARS-CoV-2.

De multiples variants du SARS-CoV-2 ont été décrits, dont quelques-uns sont considérés comme des **variants préoccupants (VOC)** en raison de leur potentiel de provoquer une transmissibilité ou une virulence accrue, une réduction de la neutralisation par des anticorps obtenus par infection naturelle ou vaccination, la capacité d'échapper à la détection ou une diminution de l'efficacité thérapeutique ou de la vaccination.

Avec l'émergence continue de multiples variants, les CDC et l'OMS ont établi indépendamment un système de classification pour distinguer les variants émergents du SARS-CoV-2 en variants préoccupants (VOC) et **variants d'intérêt (VOI)**.

### 9.1. Les variants préoccupants (VOC)

#### ➤ **Alpha (lignée B.1.1.7)**

Fin décembre 2020, un nouveau variant préoccupant du SARS-CoV-2, la **lignée B.1.1.7**, également appelé **variant Alpha** ou **GRY** (anciennement GR/501Y. V1), a été signalé au Royaume-Uni sur la base du séquençage du génome entier d'échantillons de patients testés positifs pour le SARS-CoV-2.[51, 52]

Le variant B.1.1.7 comprend 17 mutations dans le génome viral. Parmi celles-ci, huit mutations (délétion  $\Delta 69-70$ , délétion  $\Delta 144$ , N501Y, A570D, P681H, T716I, S982A, D1118H) sont dans la protéine S. N501Y montre une affinité accrue de la protéine de pointe pour les récepteurs ACE 2, améliorant la fixation virale et l'entrée ultérieure dans les cellules hôtes [53-55].

Ce variant préoccupant circulait au Royaume-Uni dès septembre 2020 et était basé sur diverses projections de modèles. Il a été signalé comme étant 43% à 82% plus transmissible, dépassant les variants préexistants du SARS-CoV-2 pour émerger comme le variant dominant du SARS-CoV-2 au Royaume-Uni.[53]

#### ➤ **Beta (lignée B.1.351)**

Un autre variant du SARS-CoV-2, **B.1.351**, également appelé **variant bêta** ou **GH501Y**. Le **V2** avec de multiples mutations de pointe, a entraîné la deuxième vague d'infections COVID-19, a été détecté pour la première fois en Afrique du Sud en octobre 2020. [56]

Le variant B.1.351 comprend neuf mutations (L18F, D80A, D215G, R246I, K417N, E484K, N501Y, D614G et A701V) dans la protéine de pointe, dont trois mutations (K417N, E484K et N501Y) sont localisées dans le RBD et augmentent l'affinité de liaison pour les récepteurs ACE.SARS-CoV-2 501Y. V2 (lignée B.1.351) a été signalé aux États-Unis à la fin de janvier 2021.[57]

Ce variant aurait un risque accru de transmission et une neutralisation réduite par le traitement par anticorps monoclonaux, les sérums de convalescents et les sérums post-vaccination.[58]

➤ **Gamma (lignée P.1)**

Le troisième variant préoccupant, le **variant P.1** également connu sous le nom de **variant Gamma** ou **GR/501Y. V3**, a été identifié en décembre 2020 au Brésil et a été détecté pour la première fois aux États-Unis en janvier 2021. [59]

Le variant B.1.1.28 héberge dix mutations dans la protéine de pointe (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, H655Y, T1027I V1176, K417T, E484K et N501Y). Trois mutations (L18F, K417N, E484K) sont localisées dans le RBD, similaires au variant B.1.351. [59]

Notamment, ce variant peut avoir réduit la neutralisation par les thérapies par anticorps monoclonaux, les sérums de convalescents et les sérums post-vaccination. [58]

➤ **Delta (lignée B.1.617.2)**

Le quatrième variant préoccupant, B.1.617.2, également appelé **variant Delta**, a été initialement identifié en décembre 2020 en Inde et a été responsable de la deuxième vague mortelle d'infections à la COVID-19 en avril 2021 en Inde. Aux États-Unis, ce variant a été détecté pour la première fois en mars 2021

Le variant Delta a d'abord été considéré comme un variant d'intérêt. Cependant, il s'est rapidement répandu dans le monde entier, ce qui a incité l'OMS à le classer comme VOC en mai 2021.

Le variant B.1.617.2 héberge dix mutations (T19R, (G142D\*), 156del, 157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N) dans la protéine de pointe.

➤ **Omicron (lignée B.1.1.529)**

Le cinquième variante préoccupant **B.1.1.529**, également désigné comme variant **Omicron** par l’OMS, a été identifié pour la première fois en Afrique du Sud le 23 novembre 2021 après une légère augmentation du nombre de cas de COVID-19. [60]

La mutation Spike K417N (également observée dans la variante bêta) ainsi que E484A devraient avoir un effet perturbateur écrasant, rendant Omicron plus susceptible d’avoir des percées vaccinales.

L’**Omicron (B.1.1.529)** est devenu le VOC dominant dans de nombreux pays et de nombreux sous-variants tels que **BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5** ont été identifiés.

## **9.2. Variants d’intérêt du SRAS-CoV-2 (VOI)**

Les VOI sont définis comme des variants avec des marqueurs génétiques spécifiques qui ont été associés à des changements pouvant entraîner une transmissibilité ou une virulence accrue, une réduction de la neutralisation par des anticorps obtenus par infection naturelle ou vaccination, la capacité d’échapper à la détection ou une diminution de l’efficacité des traitements ou de la vaccination. Depuis le début de la pandémie, l’OMS a décrit huit variants d’intérêt (VOI), à **savoir Epsilon (B.1.427 et B.1.429); zêta (p.2); Eta ( B.1.525); thêta (p.3); Iota (B.1.526); Kappa (B.1.617.1); Lambda (C.37) et Mu (B.1.621); et le CDC a désigné l’Epsilon (B.1.427 et B.1.429), Eta (B.1.525); Iota (B.1.526); Kappa(B.1.617.1); zêta (p.2); Mu(B.1.621, B.1.621.1) et B.1.617.3 en tant que VOI.[61]**

## **10. Diagnostic de l’infection par le SARS-COV2**

### **10.1. Etape pré-analytique**

D’après les recommandations de l’OMS, les prélèvements microbiologiques d’un patient suspecté d’être atteint de la Covid-19 peuvent être manipulés dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 2, à condition de respecter rigoureusement les bonnes pratiques de travail. Une attention particulière doit être portée aux procédures susceptibles d’entraîner des aérosols, avec des mesures de prévention et un protocole à suivre en cas d’incident. En

revanche, toute manipulation directe du virus doit être effectuée dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3. [62]

### ➤ **Prélèvements**

Les prélèvements nécessaires pour le diagnostic initial de la Covid-19 comprennent un prélèvement nasopharyngé, un prélèvement des voies respiratoires inférieures (crachats, LBA) en cas d'atteinte parenchymateuse, ainsi qu'un prélèvement sanguin [62].

## **10.2. Étape analytique, immunologique et moléculaire**

### **10.2.1. RT-PCR**

Les tests de diagnostic actuels pour la pandémie de SARS-CoV-2 utilisent des détections basées sur les acides nucléiques, les anticorps et les protéines, mais la détection des acides nucléiques viraux par RT-PCR reste l'étalon-or.[63] Ces tests sont utilisés pour prévenir la propagation infectieuse entre les personnes et les communautés qui comprennent les personnes infectées asymptomatiques, dont l'excrétion virale peut propager par inadvertance l'infection aux personnes âgées et aux personnes présentant des comorbidités de la maladie.[64]

La procédure commence par l'isolement et la conversion de l'ARN viral en ADN complémentaire (ADNc). Ensuite, l'ADNc est amplifié à l'aide de l'ADN polymérase Taq. Le flux de travail global final du test RT-PCR, qui quantifie la charge virale, est illustré à la figure 6. Les tests sont généralement effectués dans les laboratoires hospitaliers.[63]

### **10.2.2. RT-LAMP**

L'amplification isotherme médiée par boucle (LAMP) est une technique développée par Notomi et al. en 2000 [65]. Il s'agit d'une méthode rapide, sensible et efficace permettant l'amplification visuelle des acides nucléiques. Plus récemment, cette technique a été largement utilisée pour l'isolement de divers virus, notamment le virus de la grippe, le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient, le virus du Nil occidental, le virus Ebola, le virus Zika, le virus de la fièvre jaune et plusieurs autres agents pathogènes [66],[67]. Yan et al. ont mis au point un test LAMP à transcription inverse (RT-LAMP) pour détecter le SARS-CoV-2 chez les individus atteints de la Covid-19 [68].

Une étude comparative entre la RT-PCR et RT-LAMP a montré que la sensibilité des deux tests est identique, mais que la spécificité de la technique LAMP est supérieure à celle de la sérologie [69].

### **10.2.3. Tests antigéniques**

Les tests antigéniques détectent les protéines spécifiques du SARS-CoV-2 et permettent un diagnostic précoce de la maladie, notamment durant la phase aigüe. Comme les tests RT-PCR, le prélèvement est réalisé au niveau des narines (nasopharyngé), puis placé dans une encoche d'une carte où un liquide réactif est ajouté. Le résultat est obtenu en quelques minutes. cependant, en raison de leur sensibilité réduite, notamment en cas de charge virale est faible, ces tests antigéniques ne sont pas recommandés en usage clinique pour le diagnostic de la Covid-19, comme l'a souligné l'OMS dans sa parution du 8 avril 2020 [62].

### **10.2.4. Tests sérologiques**

Les tests sérologiques permettent de détecter les anticorps (Ac) spécifiques, notamment les immunoglobulines (Ig), produits par l'organisme en réponse au SARS-CoV-2. Réalisés sur des prélèvements sanguins, ces tests servent à identifier les individus ayant développé une immunité contre le virus, qu'ils aient présenté des symptômes ou non. Les tests sérologiques utilisent la méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay) fondée sur la reconnaissance antigène-anticorps. Les protéines (les antigènes) du virus sont mises en contact avec deux gouttes de sang de la personne testée. Si des anticorps (IgG ou IgM) sont présents dans le sang, ils se lient aux protéines et la réaction est visualisée par une coloration. Toutefois, l'utilisation de ces test en pratique clinique reste dépendante de la disponibilité préalable de connaissances physiopathologiques, techniques et cliniques permettant leur évaluation et validation [62].

## **11. Séquençage**

Le séquençage de l'ADN est une méthode visant à déterminer l'ordre linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information génétique contenue dans celle-ci [70]. La séquence d'ADN contient l'information nécessaire aux êtres vivants pour survivre et se reproduire.

### **11.1. Séquenceurs de première génération**

Ces outils de séquençage reposent sur deux principes distincts développés au cours du vingtième siècle : Il s'agit de celui de Frederick Sanger, basé sur la synthèse enzymatique et de celui de Maxam et Gilbert, fondé sur la dégradation chimique. La méthode de Sanger a connu le plus grand succès, en raison des progrès dans les techniques chimiques enzymatiques (tels que l'invention de la PCR par Kary Mulis en 1985, la découverte de la Taq polymérase, l'emploi industriel possible et l'automatisation facile). En revanche, celle de Maxam et Gilbert requiert des réactions chimiques toxiques, présente des limitations en termes de résolution d'analyse et est de plus en plus difficile à automatiser. Parmi les premières générations, le pyroséquençage, introduit en 1988 par Ronaghi, Uhlen et al. 1998, se distingue. Il repose principalement sur l'addition d'un seul nucléotide à la fois, dont l'incorporation est détectée en temps réel par la luminescence [71],[72].

Les séquenceurs de première génération ont été les piliers de la génomique moderne, mais leur faible rendement et leur coût élevé les ont rendus obsolètes en faveur des technologies NGS et de troisième génération pour les études à grande échelle.

### **11.2. Séquenceurs de deuxième génération**

Les techniques de séquençage de première génération ont été optimisées afin d'améliorer leur résolution et le temps nécessaire au séquençage. Depuis 2005, de nouvelles machines, appelées nouvelle ou seconde génération de séquençage ou séquençage à haut débit (NGS : next generation sequencing), ont été développés pour pallier les limitations des séquenceurs de première génération, notamment leur faible débit et leur coût élevé. Actuellement, quatre principales plateformes de séquençage de seconde génération sont disponibles sur le marché, avec différentes versions de machines : Roche 454 (2005), Illumina/Solexa (2006), SOLiD (life technologies Applied Biosystems 2007), Ion Torrent (life technologies Ion Torrent 2010). Elles sont composées cependant toutes de 4 grandes étapes principales : la préparation des bibliothèques qui contient une étape d'amplification par PCR, les cycles de réactions de séquençage, la prise d'image après chacun de ces cycles pour déterminer le nucléotide correspondant, puis l'analyse des données.

Ces nouvelles générations de séquenceurs offrent l'avantage de pouvoir analyser des génomes de grande taille avec une haute résolution, grâce à la parallélisation des réactions [73].

### **11.3. Séquenceurs de troisième génération**

La principale distinction entre les séquenceurs de deuxième et de troisième génération réside dans leur capacité à analyser directement des molécules d'ADN individuelles sans amplification préalable. Cela permet également le séquençage de l'ARN sans avoir à convertir en ADNc au préalable.

Pacific Biosciences et Oxford Nanopore Technologies sont les deux acteurs majeurs des technologies de troisième génération. D'autres technologies, comme le 10x Genomics peut être considéré comme une technologie de troisième génération [74].

#### **11.3.1. Méthode du nanopore [74]**

##### **Principe**

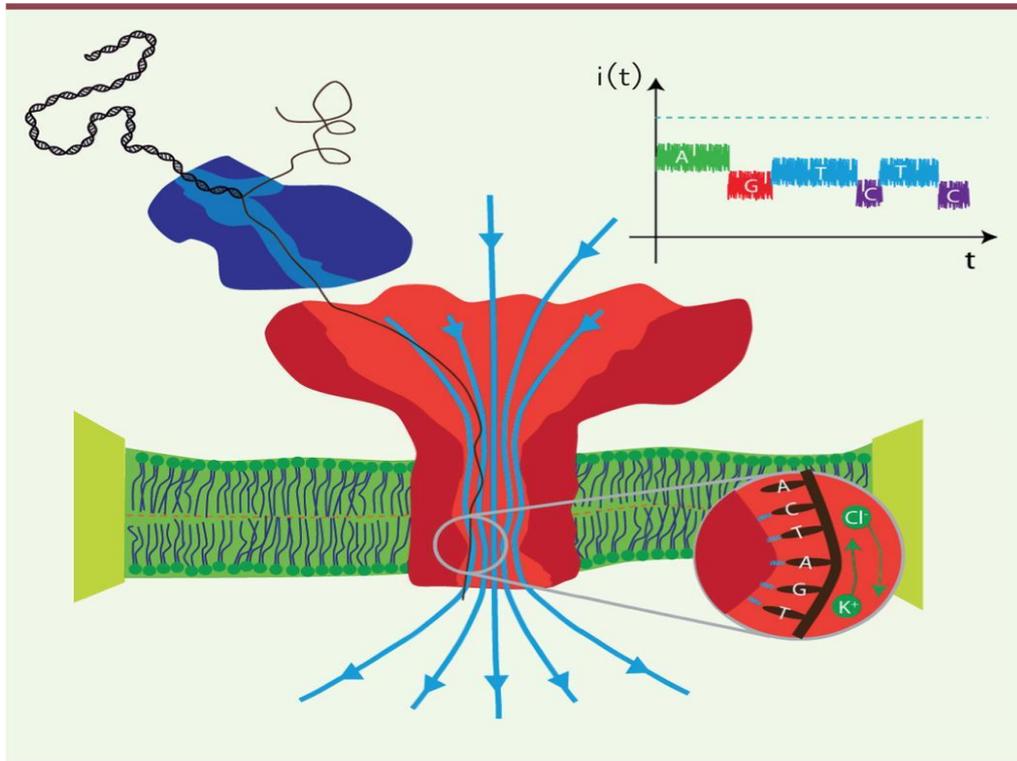
Le principe de la méthode de séquençage par le nanopore repose sur la détermination de la séquence de la molécule d'ADN ou d'ADNc par l'utilisation de nanopores (pores avec un diamètre de l'ordre du nanomètre).

Ces nanopores peuvent être :

- D'origine biologique en utilisant des protéines transmembranaires telles que les porines ;
- D'origine synthétique construits à partir de résidus de silicium ou de graphène.

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 non seulement de la taille et de la forme du nanopore mais également de la nature et concentration des particules traversant le nanopore. Le courant est ainsi modifié de manière caractéristique lorsque le pore est traversé par un nucléotide contenant les bases A, C, T ou G.

L'ADN étant double brin, il ne peut passer à travers le pore que si l'hélice est ouverte. Pour cela, des enzymes comme l'hélicase ou l'ADN polymérase sont utilisés pour se lier au pore et ouvrir l'hélice d'ADN directement en direction du nanopore (figure 7).



**Figure 6 :** Illustration du principe de séquençage par nanopore [74]

L'hélice d'ADN est ouverte par une enzyme (en bleu), et le brin simple d'ADN peut ainsi passer à travers du nanopore (en rouge) qui se trouve au sein d'une membrane (en vert). Le courant ionique (flèches bleues) favorise le passage de l'ADN à travers le pore, entraînant ainsi un changement de vitesse de passage des ions, selon le nucléotide qui se trouve dans le pore (encerclé en bas à droite). Le graphique en haut représente l'identification des nucléotides, par rapport au courant mesuré, le pointillé bleu représentant le courant à vide.

### Avantages et Limites

La technique de séquençage par nanopore présente de plusieurs avantages :

- Elle ne nécessite pas d'amplification préalable de l'ADN et permet ainsi d'éliminer toute erreur introduite au cours de l'amplification

- Elle permet de séquencer des échantillons avec des longueurs d'ondes allant jusqu'à 1Mb.
- Elle fait partie des méthodes de séquençage les plus rapides.
- Les séquenceurs ONT sont moins chers, portables et de taille nettement plus réduite par rapport aux plateformes de séquençage de deuxième génération, ce qui permet un séquençage directement sur le terrain.

Une des principales limites de cette méthode est un taux d'erreur relativement élevé par rapport à celui observé avec les technologies à lecture courte. Afin de minimiser les erreurs, les nanopores sont constamment améliorés pour favoriser, par exemple, un passage plus lent des nucléotides à travers le pore. Une autre limite est la nécessité de disposer de quantités relativement importantes de matériel génétique.

## **12. Prévention et Prise en charge de la Covid 19**

### **12.1. Prévention**

#### **12.1.1. Mesures barrières [75]**

Il existe un certain nombre de mesures pour prévenir l'infection et ralentir la transmission de la COVID-19 :

- Se laver les mains régulièrement (eau + savon) ou utilisez une solution hydro alcoolique ;
- Respecter une distanciation d'au moins 1 mètre avec tout interlocuteur ;
- Tousser ou éternuer dans votre coude, ou dans un mouchoir ;
- Eviter de se toucher le visage ;
- Porter des masques correctement ;
- Utiliser des mouchoirs à usage unique (et les jeter à la poubelle après le premier usage) ;
- Saluer sans serrer la main, sans accolades ;
- Choisir l'isolement quand vous présentez des symptômes jusqu'à ce que vous soyez rétabli ;
- Choisir des espaces ouverts et bien ventilés ;
- Se faire vacciner lorsqu'un vaccin est disponible.

#### **12.1.2. Les équipements de protection individuelle pour les agents de santé [76]**

Le personnel soignant fait face à de nombreuses difficultés, notamment l'exposition directe aux patients et au risque de contamination. Cependant la prise en charge des patients infectés par le coronavirus nécessite les éléments de protection suivants :

Protection de la tête : Les bouchons d'oreilles et les casques de protection ;

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.

### **12.1.3. Vaccins contre la Covid-19**

Depuis le début de l'année 2021, plusieurs vaccins contre la COVID-19 sont disponibles [77]:

- **Les vaccins dits « à ARN messenger » sans adjuvant** : COMIRNATY (laboratoires Pfizer/BioNTech), SPIKEVAX (laboratoires Moderna)

Ces vaccins contiennent une portion de l'ARN du virus pour fabriquer des protéines. L'ARN messenger est entouré de lipides pour empêcher sa dégradation trop rapide et lui permettre ainsi de pénétrer dans les cellules. Une fois à l'intérieur des cellules, l'ARN messenger trouve, dans le cytoplasme, les ribosomes qui fabriquent toutes les protéines du corps. Les ribosomes décodent le mode d'emploi fourni par l'ARN messenger et fabriquent une protéine de spicule (protéine S) identique à celle qui se trouve à la surface du SARS-CoV-2. La protéine S est un bon antigène et sa présence va stimuler le système immunitaire à produire des anticorps de défense.

- **Les vaccins à ADN recombinant sans adjuvant (vaccin à vecteur viral)** : VAXZEVRIA (laboratoires Astra Zeneca), COVID-19 VACCINE JANSSEN (laboratoires Janssen), Covishield (SII)

Les vaccins Vaxzevria et Covishield utilisent un adénovirus simien non pathogène et non répliquatif, modifié pour exprimer la protéine S du SARS-CoV-2, responsable de la COVID-19. Cet adénovirus a été cultivé à partir de cellules rénales humaines. De son côté, le vaccin

Janssen utilise un adénovirus humain non réplicatif, également modifié pour coder la protéine S du SARS-CoV-2, et cultivé sur des cellules rétiniennes humaines.

- **Les vaccins protéique recombinant avec adjuvant : COVIFENZ (Medicago), NUVAXOVID (laboratoires Novavax)**

Le Covifenz est conçu à partir de la protéine S du SRASCoV-2, associé à l'adjuvant AS03. Cette protéine S est produite par recombinaison génétique avec des feuilles de tabac (*Nicotiana benthamiana*, variété différente du tabac commercial) et une bactérie (*Agrobacterium tumefaciens*). Les protéines S s'auto-assemblent pour former des particules pseudo-virales.

Le Nuvaxovid, quant à lui, est préparé avec la protéine S du virus SARS CoV-2, également combinée à l'adjuvant Matrix-M. La protéine S obtenue 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*.

## 12.2. Prise en charge de la Covid-19 [78]

La majorité des personnes atteintes de la COVID-19 ne ressentiront que des symptômes bénins ou modérés et guériront sans traitement particulier. Cependant, certaines tomberont gravement malades et auront besoin de soins médicaux.

### ➤ **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 1<sup>er</sup> jour

- 250 mg par jour du 2<sup>ème</sup> au 4<sup>ème</sup> jour

➤ **Cas sévères chez les adultes :**

- Polypnée (fréquence respiratoire > 30/min),
- Saturation en oxygène (SpO<sub>2</sub>) < 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.

• **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 1<sup>er</sup> jour
  - 250mg par jour du 2<sup>ème</sup> au 4<sup>ème</sup> jour
- Thromboprophylaxie :
  - Enoxaparine 0,4 UI/24h,
- Repos au lit,
- Apport hydro-électrolytique et Nutritionnel,
- Monitoring clinique (Cardioscope, SPO<sub>2</sub>, TA, Diurèse, Température),
- Examens complémentaires : Biologie (NFS, Urée, créatinine, ASAT, ALAT, Bilirubine, TPTCA, Troponine, Gazométrie Artérielle, lactatémie),
- Radiologique (Rx thorax, échographie pulmonaire, TDM thoracique C+).

➤ **Cas sévères chez les enfants**

- Saturation en oxygène (< 92%),
- Détresse respiratoire sévère (battement des ailes du nez, tirage intercostal, Entonnoir xiphoidien, 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**
- 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,
- 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.
- **Le nirmatrelvir-ritonavir (Paxlovid®), un traitement du Covid-19**

Le médicament Paxlovid®, commercialisé par Pfizer, se présente sous forme de comprimés pelliculés de couleurs distinctes :

- Le comprimé rose contient 150 mg de nirmatrelvir ;
- Le comprimé blanc contient 100 mg de ritonavir.

- **Protocole pour les adultes**

- 300 mg de nirmatrelvir (deux comprimés de 150 mg) et 100 mg de ritonavir (un comprimé de 100 mg) ;
- A prendre ensemble par voie orale, toutes les douze heures, pendant cinq jours ;
- Doit être administré dans les plus brefs délais après l'obtention d'un résultat positif et au plus tard dans les cinq jours suivants l'apparition des symptômes de la Covid-19 ;
- Ils sont avalés entiers sans être ni mâchés, ni cassés, ni écrasés.

- **Contre-indications :**

- Hypersensibilité aux principes actifs ou à l'un des excipients,
- Insuffisance hépatique sévère,
- Insuffisance rénale sévère.

# **METHODOLOGIE**

## **IV. Méthodologie**

### **1. Cadre d'étude**

L'étude s'est déroulée dans le laboratoire de virologie de l'Institut National de santé publique (INSP) à BAMAKO.

#### **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. L'Institut est constitué du Directeur, le comité scientifique-technique, le Comité de Gestion et le Comité d'Ethique.

### **2. Type et période d'étude**

Il s'est agi d'une étude rétrospective transversale à visée descriptive chez des cas confirmés de Covid-19 provenant des districts sanitaires dans la période de Mars 2020 à Février 2021 correspondant aux deux premières vagues de la pandémie de Covid-19.

### **3. Population d'étude**

L'étude a concerné les individus de tout âge et des deux sexes testés positifs par RT-qPCR au SARS-COV-2 pendant la période concernée.

### **4. Echantillonnage**

L'échantillonnage a porté sur 400 échantillons testés par la méthode RT-qPCR au SARS-COV-2 collectés entre Mars 2020 et Février 2021.

### **5. Critères d'inclusion**

Ont été inclus dans l'étude les échantillons positifs au SARS-COV-2 des vagues 1 et 2 confirmés par la PCR quantitative (qPCR) et qui ont un Ct inférieur à 35 cycles.

### **6. Critères de non-inclusion**

N'ont pas été inclus dans l'étude les échantillons testés négatifs au SARS-CoV 2 et ceux ayant un Ct supérieur à 35 cycles.

### **7. Variables de l'étude**

Les variables étaient les suivantes :

- Les variables socio-démographiques incluant l'âge, le sexe, la profession, la résidence ainsi que les signes cliniques en faveur de la maladie ;
- Les séquences obtenues.

### **8. Matériels et réactifs de laboratoire**

#### **8.1.Outils de collecte des données**

Un registre portant des renseignements sur l'identité du patient, ses données sociodémographiques, les signes cliniques en faveur de la maladie, la date et le type de prélèvement, a été utilisé pour collecter les données de nos sujets.

#### **8.2.Matériel biologique**

Les prélèvements nasopharyngés et/ou oro-pharyngés réalisés à l'aide d'écouvillon en dacron et plongé dans un liquide de transport de virus dit viral transport medium (VTM) ou Universal transport medium (UTM) ont constitué notre matériel biologique.

### 8.3.Séquençage du génome entier

Pour séquencer le génome entier, l'ARN génomique a été extrait et amplifié avec deux pools d'amorces. Les amplicons ont été étiquetés avec le Rapid Barcoding kit (Oxford Nanopore technology) et purifiés sur bille SPRI. La librairie a été quantifiée et chargée sur la Flowcell et séquencée sur MinIon MK1C.

#### 8.3.1. Extraction de l'ARN génomique

Le kit QIAamp viral RNA Qiagen (Qiagen, Allemagne) a été utilisé pour l'extraction de l'acide nucléique. 200 µl d'échantillons sur VTM/UTM ont été lysés avec le tampon de lyse tampon AVL (560 µl) suivi du traitement avec l'éthanol absolu. Le lysat transféré sur colonne de silice est purifié avec les tampons de lavage (AW1 et AW2). L'ARN fixé sur colonne de silice est élué dans 60 µl de tampon d'éluion (AE). Les extraits sont gardés à -20°C.

#### 8.3.2. Amplification et détermination des échantillons éligibles au séquençage

Le kit ARGÈNE® COVID-19 R- GENE ® (biomerieux) a été utilisé pour amplifier les extraits. C'est un kit de détection moléculaire utilisant la RT-PCR qui est une technique de laboratoire combinant la transcription inverse de l'ARN en ADN et l'amplification de cibles spécifiques de l'ADN par réaction en chaîne par polymérase en temps réel après l'extraction virale d'acides nucléiques. Il est composé de master-mix prêt à l'emploi (y compris Taq polymérase), de reverse Transcriptase, d'un contrôle positif et négatif, et d'un contrôle interne (IC1) qui vérifie le processus d'extraction et la présence d'inhibiteurs d'amplification dans l'échantillon.

ARGÈNE® COVID-19 R- GENE ® permet de cibler les gènes N, RdRp, et E. La plateforme d'amplification est le LightCycler 480 (System II).

**Tableau 1 :** Programme d'amplification des RT-PCR de diagnostic du kit ARGÈNE

Étape	Température	Temps	Nombre de cycles
ARGÈNE			
Transcription inverse	50°C	5 min	1
Taq polymerase activation	95°C	15 min	1
Dénaturation	95°C	10 sec	45
Hybridation	60°C	40 sec	
Elongation	72°C	26 sec	

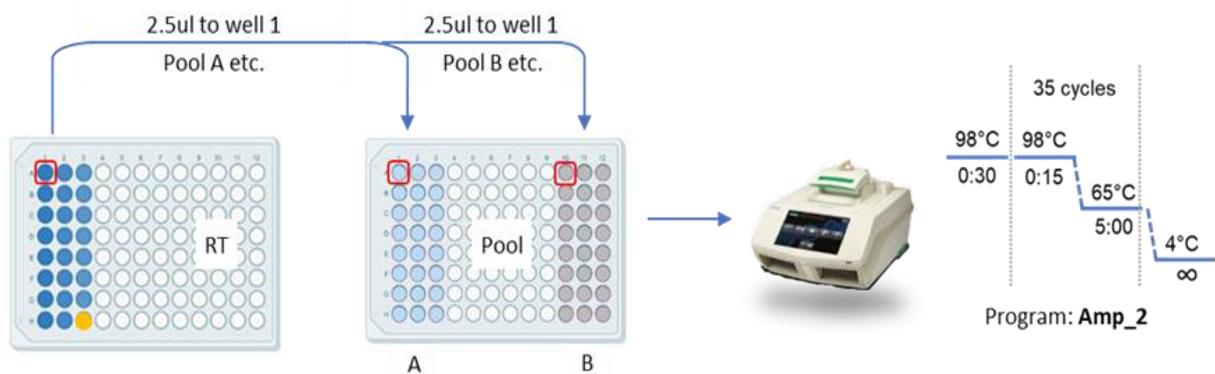
### 8.3.3. Préparation de la librairie

La librairie a été préparé avec le Midnight RT expansion kit et le Rapid Barcoding kit 96 V14 (EXP-MRT001 et SQK-RBK114.96) en quatre étapes. L'ARN est retro transcrit en mélangeant 2µl de Lunascript RT et 8µLd'ARN. Le mélange réactionnel a été incubé (25°C 2 min, 55°C 10 min et 95°C 1min). Suivant la rétrotranscription, deux pools d'amorces sont utilisés pour générer des amplicons de 1200 paires de base (bp) le long du génome conformément au tableau 2 ci-dessous.

**Tableau 2 :** Préparation du mix

Réactifs	Pool A tube	Pool B tube
Nucléase free water	102	102
Midnight primer Pool A	2	
Midnight primer Pool B		2
Q5 HS Master Mix	172	172
Total	234	234

- Ajouter 10 µL du Mix Pool A aux trois premières colonnes d'une nouvelle plaque « Pool »
- Ajouter 10 µL du Mix Pool B aux trois dernières colonnes de la plaque « pool »



**Figure 7 :** Illustration de la procédure d'amplification

Les amplicons ont été étiquetés avec 1µL de « Rapid Barcod incubé pendant 2 minutes à 30°C et 2 minutes à 80°C. Suivant l'étiquetage, les amplicons sont poolés, purifiés et quantifiés sur Qubit avec le kit HS ds DNA. Les adaptateurs de séquençage et le mix de séquençage sont

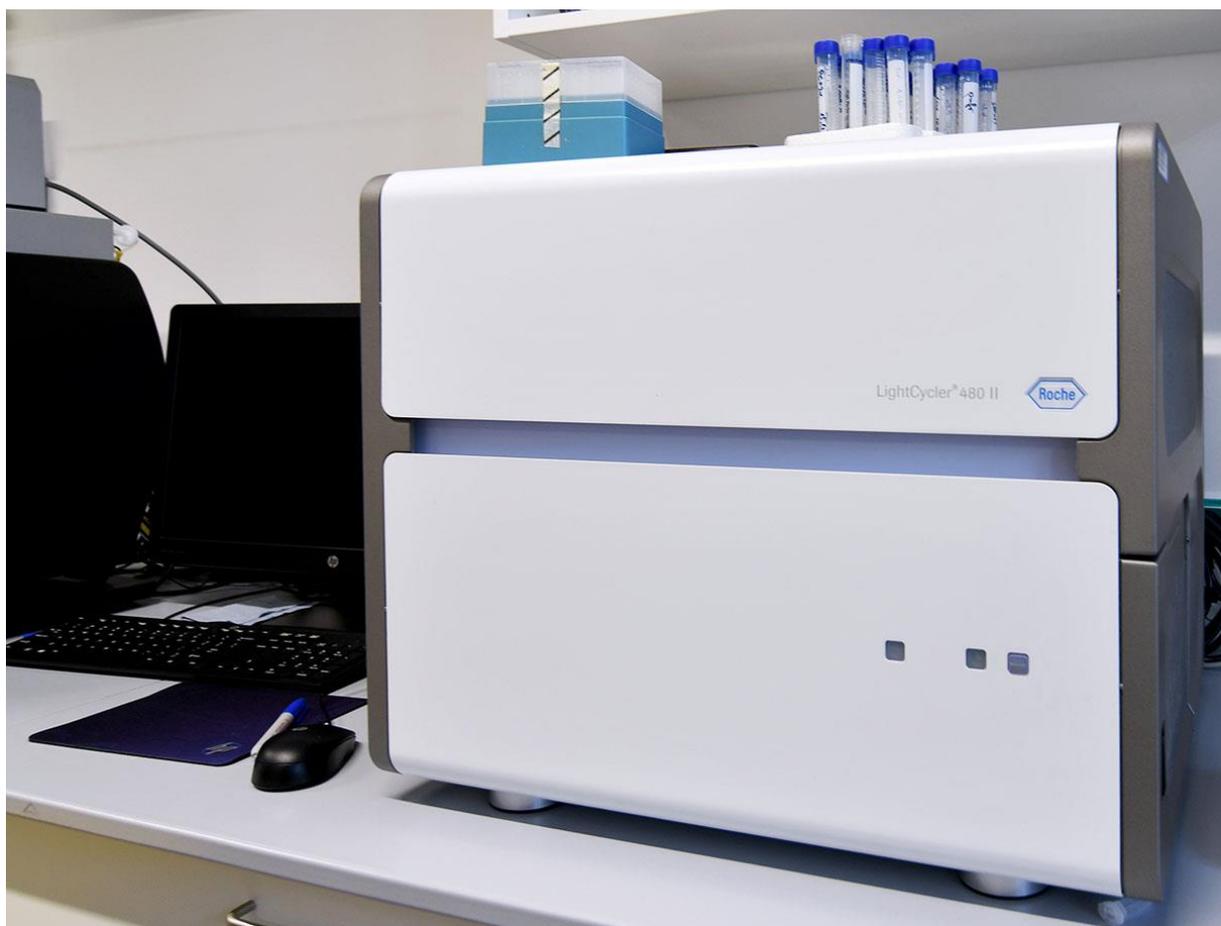
ajoutés à 800 ng de librairie. La librairie est chargée sur la Flowcell Minion106 version 9 et séquencée sur MinionMK1C pendant 12 heures.

Ce kit fournit tous les réactifs et amorces nécessaires pour générer du matériel transcrit et amplifié par PCR ainsi qu'un kit de codage à barres rapide 96 pour séquencer les échantillons d'ARN du SARS-Cov-2.

## 8.4.Equipements

### ➤ Description des automates de détection moléculaire de SARS-CoV-2

Nous avons utilisé l'instrument Light Cycler®480 (Roche, Germany). Ce système LightCycler® 480 est une plateforme de PCR haute performance, conçue pour un débit moyen à élevé. Il offre différentes méthodes pour la détection des gènes, l'analyse de l'expression génique, l'étude des variations génétiques et la validation des données. Il est équipé d'un bloc de variation de température adapté aux plaques de 96 puits de 0,2m.



**Figure 8 :** LightCycler® 480 (INSP Mali)

### ➤ Description du MinION™ Mk1C

Le MinION™ Mk1C d'Oxford Nanopore Technologies® est un appareil compact et portable, combinant le matériel nécessaire à l'exécution d'expériences de séquençage de nanopores avec un calcul entièrement intégré utilisé pour l'appel de base et l'analyse ultérieure. L'appareil est entièrement autonome et ne nécessite aucune autre ressource informatique.



**Figure 9:** MinION™ Mk1C d'Oxford Nanopore Technologies® (INSP Mali)

### 9. Analyse des séquences et identification des variants

Les fichiers des séquences générées sous forme de fichiers FASTQ ont été analysés sur Epi2me et Nextclade pour la détermination des variants. L'alignement multiple des séquences a été fait avec le logiciel MAFFT et la visualisation de l'arbre avec iTOL.

### 10. Aspects éthiques

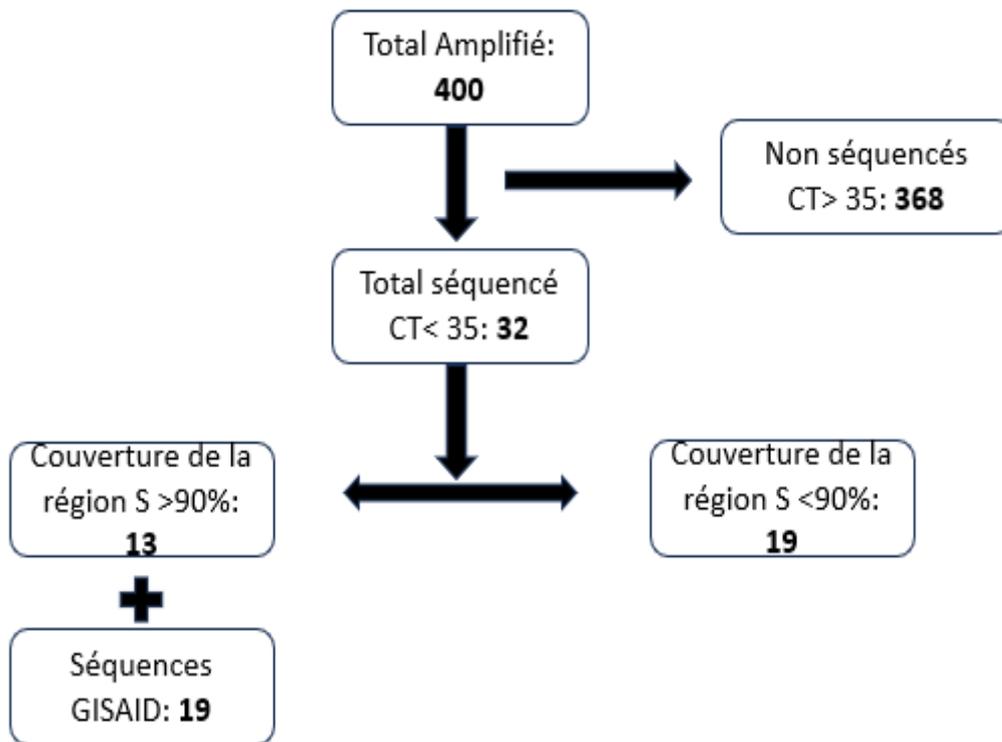
Notre étude a été réalisée à l'Institut National de Santé Publique (INSP) dans le cadre de la surveillance épidémiologique de la maladie à coronavirus, et a reçu l'approbation du Directeur général de l'Institut.

# **RESULTATS**

## V. Résultats

Notre étude englobe des échantillons des deux premières vagues de la pandémie de COVID-19.

Au total 32 librairies ont été préparées, et nous avons obtenu 13 séquences de bonne qualité. Ensuite nous avons téléchargé dix-neuf séquences (19) provenant d'autres pays d'Afrique déposées sur la base de données de GISAID (Figure 1).



**Figure 10 :** Sélection des échantillons éligibles pour le séquençage

# 1. Caractéristiques socio-démographiques de la population d'étude et cliniques

## 1.1. Répartition des échantillons en fonction du sexe

Le sexe masculin était majoritaire dans notre étude avec 75% et le sexe ratio (H/F) était de 3.

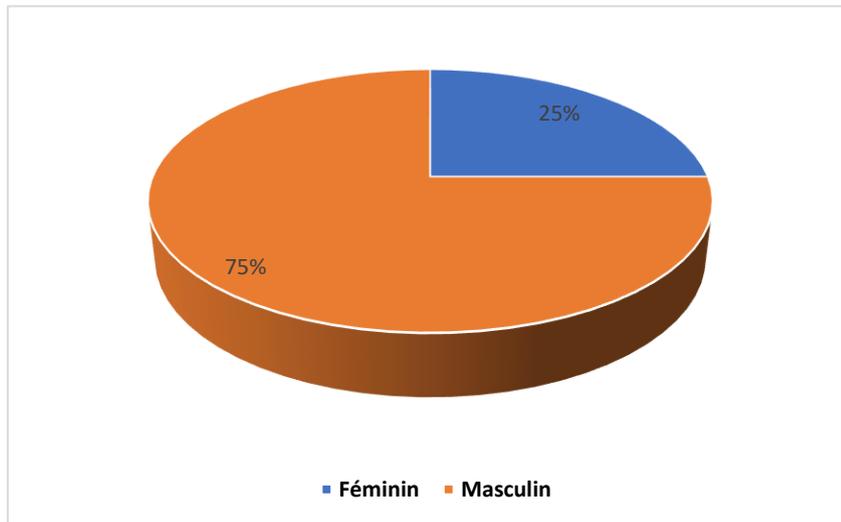


Figure 11 : Répartition des échantillons en fonction du sexe

## 1.2. Répartition des échantillons en fonction de l'âge

Cette figure montre que la tranche d'âge 41-50 ans était la plus représentée avec 28,10%, suivie de celle comprise entre 61 ans et plus.

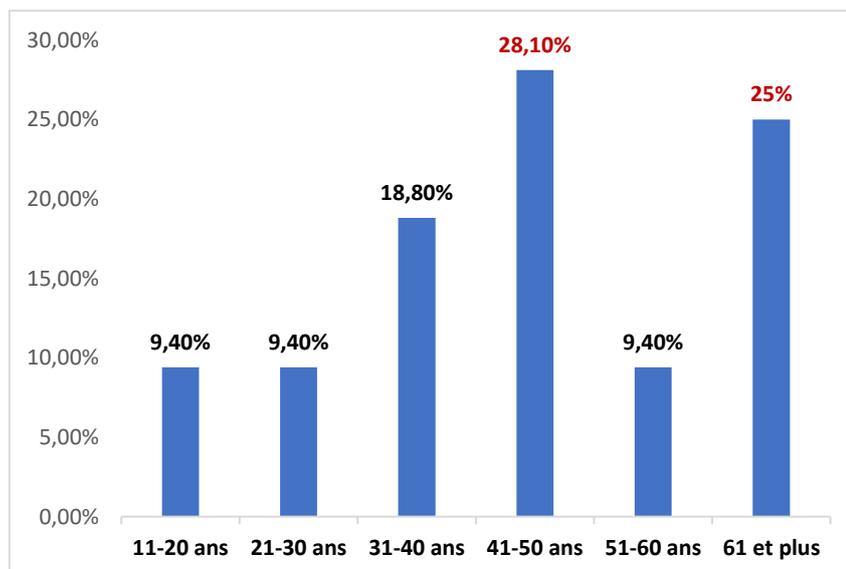


Figure 12 : Répartition des échantillons en fonction de l'âge

### 1.3.Répartition des échantillons en fonction de la profession

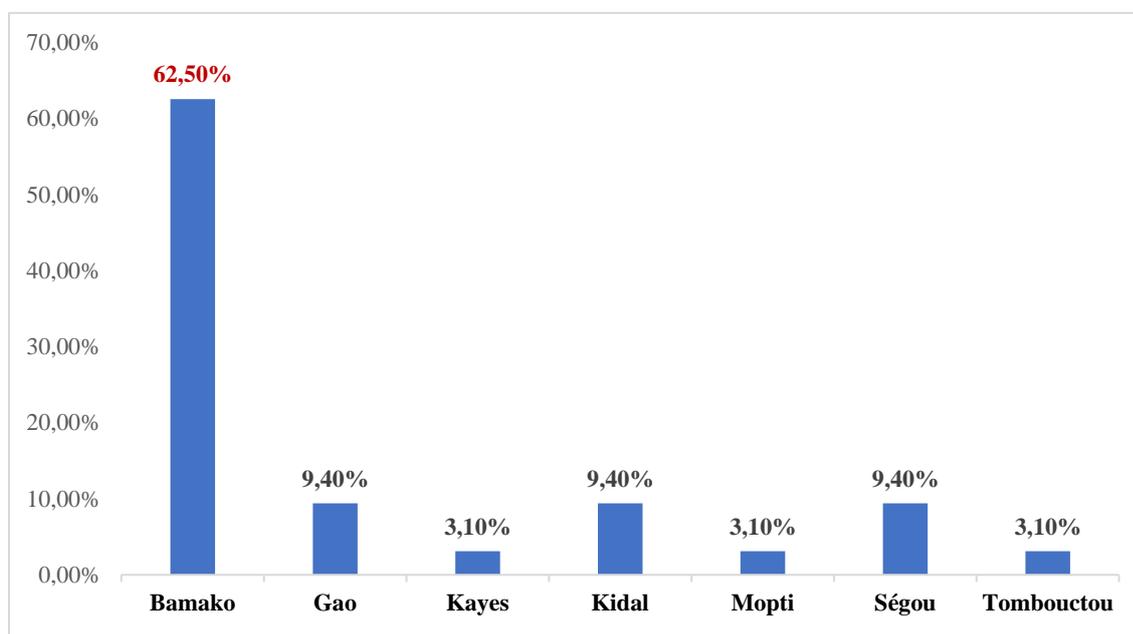
**Tableau 3** : Répartition des échantillons en fonction de la profession

Profession	Effectifs	Pourcentages (%)
Agent à la retraite	4	12,5
Agent de sécurité/Militaire	2	6,3
Cadres	<b>9</b>	<b>28,1</b>
Commerçants	<b>5</b>	<b>15,6</b>
Elève/Étudiant	3	9,4
Ingénieur	1	3,1
Ménagère	2	6,3
Métiers informels	2	6,3
Professionnel de santé	<b>4</b>	<b>12,5</b>
Total	<b>32</b>	<b>100</b>

L'analyse des données socioprofessionnelles montre que les cadres étaient les plus représentés dans notre étude avec 28,1%, suivis des commerçants et des professionnels de santé avec respectivement 15,6% et 12,5%.

### 1.4.Répartition des échantillons en fonction de la résidence

La répartition géographique des patients a montré que les échantillons provenaient majoritairement du district de Bamako avec 62,5% des cas durant l'étude.



**Figure 13** : Répartition des échantillons en fonction de la résidence

## 1.5.Symptomatologie

**Tableau 4** : Répartition des échantillons en fonction des symptômes

	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Symptômes</b>		
Asymptomatiques	11	34,40
Symptomatiques	<b>21</b>	<b>65,60</b>
<b>Symptômes</b>		
Non-graves	<b>13</b>	<b>61,90</b>
Graves	8	38,10

Les cas symptomatiques représentaient 65,60% de l'ensemble. Parmi eux, la majorité étaient considérée comme non-graves.

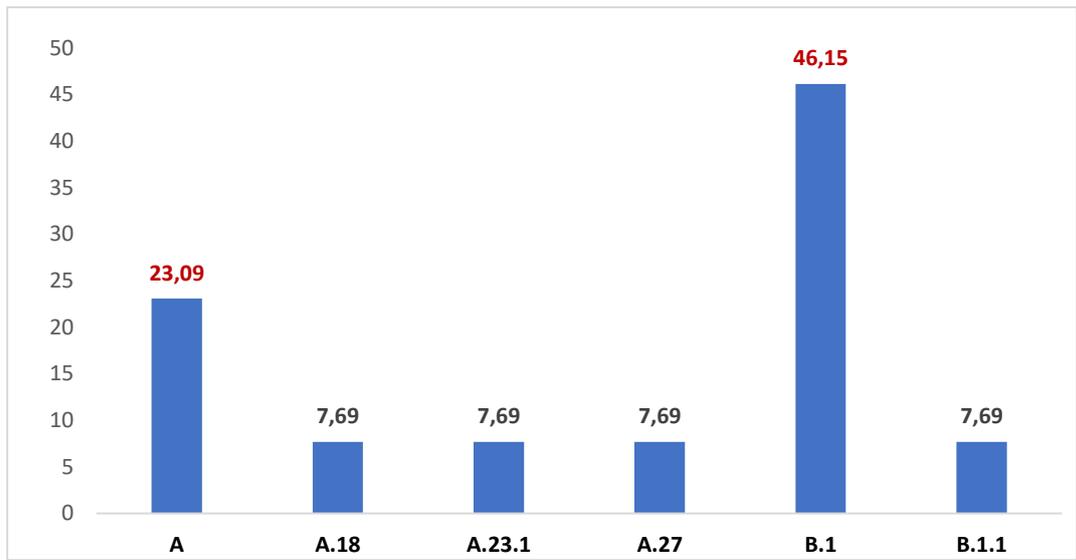
La symptomatologie était aussi déterminée par les symptômes régulièrement rencontrés dans notre étude qui sont : fièvre, toux, courbatures, maux de gorge, diarrhée, écoulement nasal.

## 2. Identification par génomique des variants circulants au Mali pendant les vagues 1 et 2

### 2.1.Les variants détectés

Dans notre étude, nous avons détecté six (6) variants du SARS-cov2 circulant au Mali qui sont : A, A.18, A.23.1, A.27, B.1 et B.1.1.

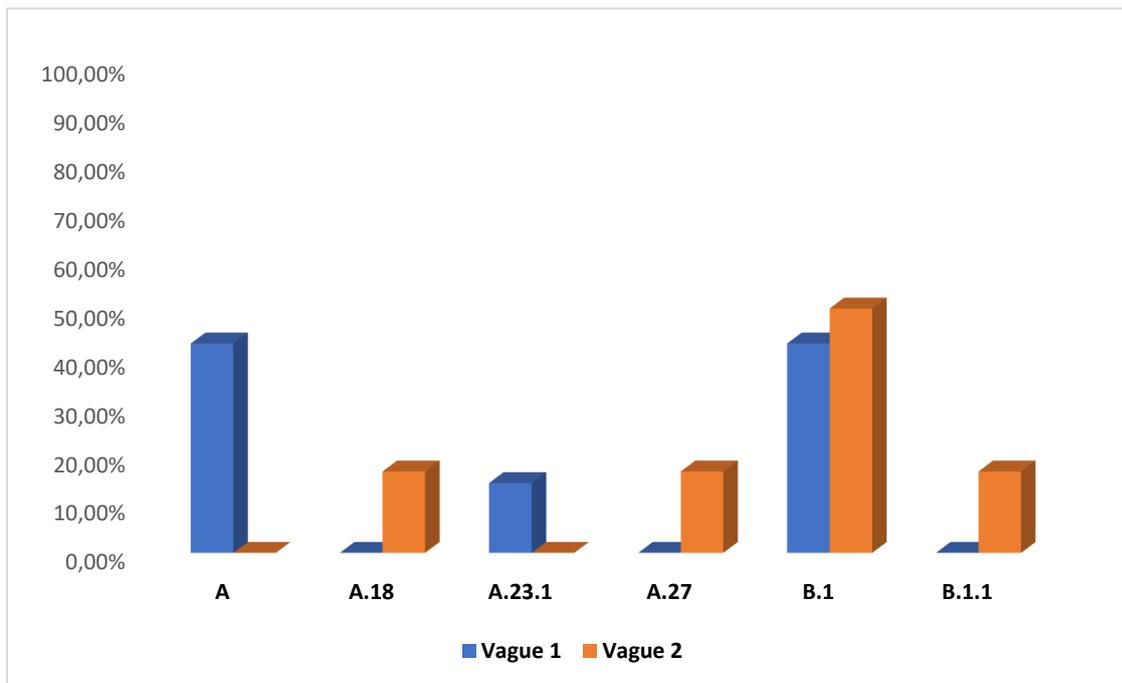
La figure 14 illustre les variants circulant chez les cas séquencés localement au moment de la rédaction de cette thèse. Le variant B.1 dominait suivie du variant A avec respectivement 46,15% et 23,09%.



**Figure 14 :** Fréquence des différents variants détectés pendant l'étude

## 2.2. Répartition des variants en fonction des vagues

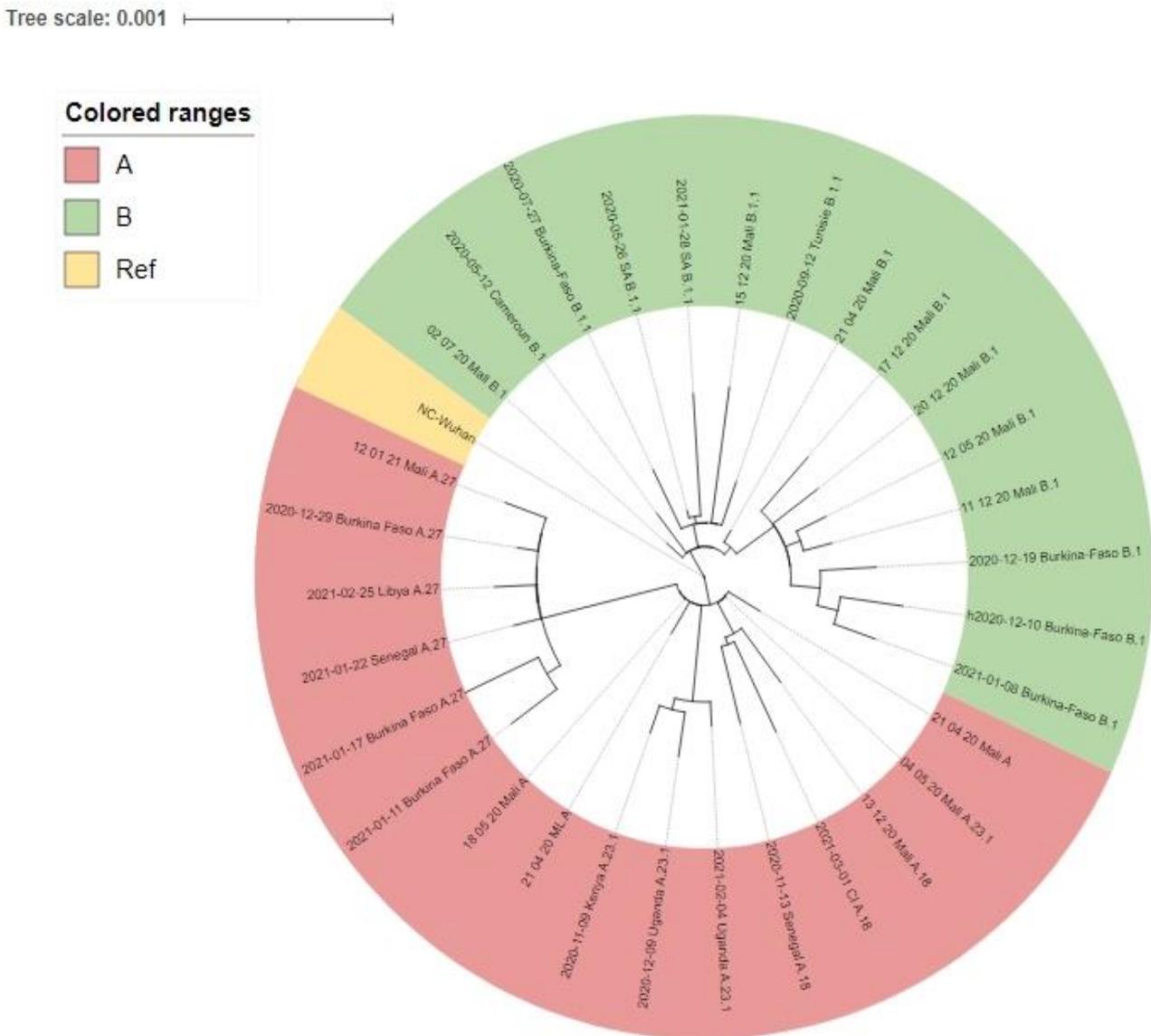
Durant la vague 1, le variant A et son sous-variant A.23.1 représentaient 57,14% contre 42,85% du variant B.1. Dans la deuxième vague, c'est le variant B.1 qui dominait avec 50%.



**Figure 15 :** Répartition des variants en fonction des vagues

### 2.3. Arbre phylogénétique des variants détectés

A partir des séquences déterminées dans nos échantillons, nous avons établi un arbre phylogénétique par la méthode de Neighbor-joining des variants du SARS-COV-2 détectés dans notre étude. Nos échantillons se groupent avec des échantillons séquencés dans d'autres pays d'Afrique que nous avons téléchargé sur GISAID.



**Figure 16:** Arbre phylogénétique représentatif des échantillons séquencés.

### 3. Répartition géographique des variants circulant au Mali pendant les vagues 1 et 2

**Tableau 5** : Répartition géographique des variants circulants au Mali

Résidence	A	A.18	A.23.1	A.27	B.1	B.1.1
Bamako	1(33,33%)	1(100%)	1(100%)	1(100%)	4(66,66%)	1(100%)
Gao	1(33,33%)	-	-	-	-	-
Kayes	1(33,33%)	-	-	-	-	-
Kidal	-	-	-	-	1(16,66%)	-
Tombouctou	-	-	-	-	1(16,66%)	-

Le district de Bamako est la seule localité où tous les variants détectés ont été retrouvés, le variant B.1 y domine avec 66,66%. Les autres localités n'ont qu'un seul cas.

# **COMMENTAIRES ET DISCUSSION**

## **VI. Commentaires et Discussion**

Dans cette étude, nous avons séquencé et caractérisé des échantillons de SARS-CoV-2 reçus entre Mars 2020 et février 2021 à l'Institut National de Santé Publique (INSP), à l'aide du séquençage MinION Nanopore. Dans l'ensemble, le protocole Midnight utilisé a permis de générer les bibliothèques nécessaires à un séquençage réussi sur le séquenceur. La technologie MinION Oxford Nanopore a permis d'identifier les variants circulant.

### **1. Caractéristiques socio-démographiques et cliniques de la population étudiée**

Le sexe masculin était le plus représenté avec 75% et le sexe ratio (H/F) était de 3. Cette prévalence rencontre des similitudes avec certaines études, notamment celles de Meredith et al., qui ont trouvé dans leur étude (Mise en œuvre rapide du séquençage du SRAS-CoV-2 pour étudier les cas de COVID-19 associés aux soins de santé : une étude prospective de surveillance génomique) 62% (n=374) de sexe masculin [79], ainsi que A. Koné et al., qui ont également rapporté dans leur étude portant sur la dynamique des variants du SARS-CoV-2 caractérisés lors des différentes vagues de COVID-19 au Mali, une prédominance du sexe masculin de 51,25% (n=80) [80]. Cette prédominance élevée du sexe masculin pourrait s'expliquer par le fait que les hommes sont plus actifs que les femmes au Mali et ils interagissent avec bon nombre de personnes donc ils sont exposés à un risque de contamination plus élevé que les femmes.

La majorité de nos patients étudiés avait un âge supérieur à quarante-ans avec un intervalle d'âge compris entre 41- 50 ans. Ces résultats sont comparables à ceux observés par D. Samaké et al. au Mali [81] qui ont rapporté dans leur étude que les tranches d'âge de 31-40 ans et 41-50 ans (19,6%) étaient les plus affectées.

La plupart des cas étaient symptomatiques (65,6 %) avec des symptômes classés légers/modérés et graves/critiques. Ceux classés légers/modérés (61,9%) présentaient de la fièvre/des frissons, de la toux, des douleurs, des maux de gorge, de la diarrhée, un écoulement nasal, une perte d'odorat, une perte de goût ou des maux de tête. Ces résultats présentent une similarité avec le pourcentage de cas légers/modérés (69,4%) rapporté par Collins M. Morang'a et al., dans leur étude faite sur la diversité génétique des infections par le SRAS-CoV-2 au Ghana [82].

## **2. Identification par génomique des variants circulant au Mali pendant les vagues 1 et 2**

Dans notre étude nous avons identifié six (6) variants du SARS-CoV-2 qui étaient en circulation au Mali lors des deux premières vagues de la pandémie qui sont : A, A.18, A.23.1, A.27, B.1 et B.1.1.

Durant la première vague, les variants suivants étaient présents à savoir : A (42,85%), A.23.1(14,29%) et B.1(42,85%). Le variant A considéré comme la souche étant à l'origine de l'infection de Wuhan [83], et son sous-variant A.23.1 détecté pour la première fois en Ouganda [84] dominaient avec 57,14% par rapport au variant B.1 (42,85%). Ces résultats concordent avec la première étude au Mali sur les variants circulant menée par Kouriba et al., qui a également montré une prédominance du variant A (66,66%) par rapport au variant B.1 pendant la première vague de la pandémie [85]. En revanche, notre étude présente une différence avec l'étude de Madlen Stange et al., (L'épidémie de SRAS-CoV-2 dans une zone urbaine tri nationale est dominée par un variant de la lignée B.1 lié à un événement de rassemblement de masse) qui a montré que le variant B.1 (83,6%) était prédominant durant la première vague de la pandémie en Suisse [86].

Durant la deuxième vague, le variant B, l'un des deux haplotypes originaux de SARS-CoV-2 et le premier à être découvert en Hubei (Chine) [83], avec ses sous-variants B.1 et B.1.1 découverts en janvier 2020 et originaires d'Europe [87] occupaient la plus forte prévalence (66,66%). Cette observation est cohérente avec l'étude de Charles N Agoti et al., (Réseaux de transmission du SARS-CoV-2 sur la côte du Kenya au cours des deux premières vagues : une étude génomique rétrospective) qui a trouvé une prévalence élevée du variant B.1 (56%) au cours de la seconde vague [88]. Par ailleurs, durant la deuxième vague, circulaient également des sous-variants du variant A notamment : A.18 (16,66%) détecté pour la première fois au Mali, A.27 (16,66%) détecté pour la première fois au Danemark/Mayotte décembre 2020 [89] à faible pourcentage.

Ces résultats indiquent que les deux premières vagues de la pandémie de covid-19 au Mali étaient causées par un ensemble hétérogène de génotypes de virus provenant de plusieurs variants différents. La plupart des cas de la première vague ainsi que de la deuxième vague étaient liés à des souches qui ont causé une maladie généralisée dans les pays européens et asiatiques, ainsi que dans d'autres localités. Nous pouvons en conclure que le virus SARS-CoV-2 a été introduit au Mali à plusieurs reprises indépendamment, probablement par des individus voyageant depuis différentes parties du monde.

### **3. Répartition géographique des variants circulant au Mali pendant les vagues 1 et 2**

Le Mali a signalé son premier cas de Covid-19 le 25 mars 2020 [90], ce qui a marqué le début d'une série de vagues épidémiques dans le pays. Le virus a d'abord été signalé à Bamako, en provenance d'un pays étranger avant de s'étendre vers les autres villes.

Une analyse de 21 séquences collectées au cours du mois d'avril 2020 a permis de repérer et d'identifier rapidement l'introduction des différents variants du SARS COV-2 circulant au Mali dès les premiers instants de la pandémie [85]. Tous les variants détectés dans notre étude ont été retrouvés dans le District de Bamako, cependant le variant B.1 y était prédominant et a été également retrouvé dans les régions de Kidal (16,66%) et Tombouctou (16,66%). Le variant A avec un taux de détection de 23,9% circulait à Bamako, Gao et Kayes.

La fréquence élevée de détection des variants dans le district de Bamako par rapport aux régions pourrait s'expliquer par la densité et la mobilité de la population ainsi que par la disponibilité d'une offre de santé plus importante dans le District de Bamako par rapport aux régions.

### **4. Limites de l'étude**

- Pendant notre étude, il n'y avait pas assez d'échantillons positifs archivés provenant de la première et deuxième vague.
- En raison de la durée de conservation des échantillons connaissant la labilité de l'ARN, nous avons dû prendre des valeurs de CT trop élevés (CT>35).

# **CONCLUSION**

## **VII. Conclusion**

Notre étude portant sur la distribution des variants du SARS-CoV-2 au Mali pendant les deux premières vagues de la pandémie de Covid-19 a inclus des échantillons positifs provenant de cette période, avec des individus âgés de 11 à 61 ans et plus, majoritairement de sexe masculin (75%). Le séquençage nous a permis d'identifier six lignées Pango du SARS-CoV-2 : A (23,09%), A.18 (7,69%), A.23.1 (7,69%), A.27 (7,69%), B.1 (46,15%) et B.1.1 (7,69%). Ces variants étaient principalement présents à Bamako, bien que les variants A et B.1 aient été également détectés de manière sporadique dans d'autres régions telles que Kayes, Tombouctou, Gao et Kidal. Nos résultats indiquent une propagation rapide des variants depuis l'épicentre vers d'autres régions du pays dès les premières phases de la pandémie.

# **RECOMMENDATIONS**

## VIII. Recommandations

Nous formulons les recommandations suivantes :

- Pour l'Institut National de Santé Publique (INSP)

Prendre des mesures spécifiques pour assurer la collecte et la conservation adéquates des échantillons destinés au séquençage.

- Concernant le Ministère de la Santé

Soutenir les laboratoires universitaires qualifiés en leur fournissant des réactifs, des équipements et des consommables afin qu'ils puissent contribuer à l'évaluation épidémiologique.

- A l'attention des centres de soins

De renseigner correctement les fiches de notifications accompagnants les échantillons.

- Pour les chercheurs

Poursuivre les recherches et le suivi épidémiologique sur le SARS-CoV-2 afin de mieux comprendre la maladie.

- Envers la population

- Continuer à respecter les mesures de prévention établies par les autorités sanitaires,

- Continuer à se faire vacciner contre la maladie à coronavirus.

## **Références bibliographiques**

## IX. Références

1. Dhama, K., et al., *Coronavirus disease 2019–COVID-19*. 2020. **33**(4): p. 10.1128/cmr. 00028-20.
2. (OMS), O.m.d.l.s., *Tableau de bord COVID-19 de l'OMS*  
<https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?m49=953&n=c>. 2024.
3. Berno, G., et al., *SARS-CoV-2 variants identification: overview of molecular existing methods*. 2022. **11**(9): p. 1058.
4. Baker, D.J., et al., *CoronaHiT: high-throughput sequencing of SARS-CoV-2 genomes*. 2021. **13**(1): p. 1-11.
5. Tegally, H., et al., *The evolving SARS-CoV-2 epidemic in Africa: Insights from rapidly expanding genomic surveillance*. 2022. **378**(6615): p. eabq5358.
6. Almeida, J.D. and D.A.J.J.o.G.V. Tyrrell, *The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture*. 1967. **1**(2): p. 175-178.
7. McIntosh, K., et al., *Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease*. 1967. **57**(4): p. 933-940.
8. Hamre, D., J.J.J.P.o.t.s.f.e.b. Procknow, and medicine, *A new virus isolated from the human respiratory tract*. 1966. **121**(1): p. 190-193.
9. Cavanagh, D.J.A.V., *Nidovirales; a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae*. 1997. **142**: p. 629-633.
10. Christian, D.J.N.E.J.M., van der Werf Sylvie, Brodt Hans-Reinhard, Becker Stephan, Rabenau Holger, Panning Marcus, Kolesnikova Larissa, Fouchier Ron AM, et al. *Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome*. 2003. **348**(20): p. 1967-1976.
11. Fouchier, R.A., et al., *A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans*. 2004. **101**(16): p. 6212-6216.
12. Van Der Hoek, L., et al., *Identification of a new human coronavirus*. 2004. **10**(4): p. 368-373.
13. Woo, P.C., et al., *Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia*. 2005. **79**(2): p. 884-895.
14. Zaki, A.M., et al., *Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia*. 2012. **367**(19): p. 1814-1820.
15. Segondy, M.J.R.F.d.L., *Les coronavirus humains*. 2020. **2020**(526): p. 32-39.
16. Woo, P.C., et al., *Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus*. 2012. **86**(7): p. 3995-4008.

17. Walsh, E.E., J.H. Shin, and A.R.J.T.J.o.i.d. Falsey, *Clinical impact of human coronaviruses 229E and OC43 infection in diverse adult populations*. 2013. **208**(10): p. 1634-1642.
18. Bárcena, M., et al., *Cryo-electron tomography of mouse hepatitis virus: Insights into the structure of the coronavirus*. 2009. **106**(2): p. 582-587.
19. Neuman, B.W., et al., *Supramolecular architecture of severe acute respiratory syndrome coronavirus revealed by electron cryomicroscopy*. 2006. **80**(16): p. 7918-7928.
20. Fehr, A.R., S.J.C.m. Perlman, and protocols, *Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis*. 2015: p. 1-23.
21. Bosch, B.J., et al., *The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex*. 2003. **77**(16): p. 8801-8811.
22. Izaguirre, G.J.V., *The proteolytic regulation of virus cell entry by furin and other proprotein convertases*. 2019. **11**(9): p. 837.
23. Nal, B., et al., *Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E*. 2005. **86**(5): p. 1423-1434.
24. Siu, Y., et al., *The M, E, and N structural proteins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus are required for efficient assembly, trafficking, and release of virus-like particles*. 2008. **82**(22): p. 11318-11330.
25. Chang, C.-k., et al., *Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein*. 2006. **13**: p. 59-72.
26. Hurst, K.R., C.A. Koetzner, and P.S.J.J.o.v. Masters, *Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein*. 2009. **83**(14): p. 7221-7234.
27. Klausegger, A., et al., *Identification of a coronavirus hemagglutinin-esterase with a substrate specificity different from those of influenza C virus and bovine coronavirus*. 1999. **73**(5): p. 3737-3743.
28. Wang, M.-Y., et al., *SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development*. 2020. **10**: p. 587269.
29. Wu, F., et al., *A new coronavirus associated with human respiratory disease in China*. 2020. **579**(7798): p. 265-269.
30. Lu, R., et al., *Complete genome sequence of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) from the first imported MERS-CoV case in China*. 2015. **3**(4): p. 10.1128/genomea.00818-15.
31. Rota, P.A., et al., *Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome*. 2003. **300**(5624): p. 1394-1399.
32. Tong, T.R.J.I.D.-D.T., *Drug targets in severe acute respiratory syndrome (SARS) virus and other coronavirus infections*. 2009. **9**(2): p. 223-245.

33. De Wilde, A.H., et al., *Host factors in coronavirus replication*. 2018: p. 1-42.
34. De Wit, E., et al., *SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses*. 2016. **14**(8): p. 523-534.
35. Van Doremalen, N., et al., *Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1*. 2020. **382**(16): p. 1564-1567.
36. Dong, L., et al., *Possible vertical transmission of SARS-CoV-2 from an infected mother to her newborn*. 2020. **323**(18): p. 1846-1848.
37. Zheng, S., et al., *Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study*. 2020. **369**.
38. Harrison, A.G., T. Lin, and P.J.T.i.i. Wang, *Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis*. 2020. **41**(12): p. 1100-1115.
39. Puntmann, V.O., et al., *Outcomes of cardiovascular magnetic resonance imaging in patients recently recovered from coronavirus disease 2019 (COVID-19)*. 2020. **5**(11): p. 1265-1273.
40. Xu H, Z.L., Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, Li T, Chen Q, *High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa*. *Int J Oral Sci*, 2020 Feb 24.
41. Hoffmann, M., et al., *SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor*. 2020. **181**(2): p. 271-280. e8.
42. Azkur, A.K., et al., *Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19*. 2020. **75**(7): p. 1564-1581.
43. Wang, J., et al., *Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts*. 2020. **108**(1): p. 17-41.
44. Coopersmith, C.M., et al., *The surviving sepsis campaign: research priorities for coronavirus disease 2019 in critical illness*. 2021. **49**(4): p. 598-622.
45. Zubair, A.S., et al., *Neuropathogenesis and neurologic manifestations of the coronaviruses in the age of coronavirus disease 2019: a review*. 2020. **77**(8): p. 1018-1027.
46. Huang, C., et al., *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China*. 2020. **395**(10223): p. 497-506.
47. Guo, T., et al., *Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19)*. 2020. **5**(7): p. 811-818.
48. Hua A, O.G.K., Sado D, Byrne J, *Life-threatening cardiac tamponade complicating myopericarditis in COVID-19*. *Eur Heart J*, 2020 Jun 07. **41**(22):2130.
49. Patel, K.P., et al., *Gastrointestinal, hepatobiliary, and pancreatic manifestations of COVID-19*. 2020. **128**: p. 104386.

50. Gabarre, P., et al., *Acute kidney injury in critically ill patients with COVID-19*. 2020. **46**: p. 1339-1348.
51. Galloway SE, et al., *Emergence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Lineage - United States, December 29, 2020-January 12, 2021*. 2021. **70(3):95-99**.
52. Volz, E., et al., *Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B. 1.1. 7 in England*. 2021. **593(7858)**: p. 266-269.
53. Davies, N.G., et al., *Estimated transmissibility and impact of SARS-CoV-2 lineage B. 1.1. 7 in England*. 2021. **372(6538)**: p. eabg3055.
54. Walensky, R.P., H.T. Walke, and A.S.J.J. Fauci, *SARS-CoV-2 variants of concern in the United States—challenges and opportunities*. 2021. **325(11)**: p. 1037-1038.
55. Wu K, et al., *mRNA-1273 vaccine induces neutralizing antibodies against spike mutants from global SARS-CoV-2 variants*. bioRxiv : the preprint server for biology, 2021
56. Tegally, H., et al., *Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa*. 2021. **592(7854)**: p. 438-443.
57. Wibmer, C.K., et al., *SARS-CoV-2 501Y. V2 escapes neutralization by South African COVID-19 donor plasma*. 2021. **27(4)**: p. 622-625.
58. Wang, P., et al., *Increased resistance of SARS-CoV-2 variant P. 1 to antibody neutralization*. 2021. **29(5)**: p. 747-751. e4.
59. Faria, N.R., et al., *Genomics and epidemiology of the P. 1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil*. 2021. **372(6544)**: p. 815-821.
60. A, V., *Omicron emerges*. New scientist (1971), 2021 Déc 4.
61. Aleem, A., A.S. Ab, and A.K. Slenker, *Emerging variants of SARS-CoV-2 and novel therapeutics against coronavirus (COVID-19)*. 2021.
62. Amir, I.J., Z. Lebar, and M.J.O.B. Mahmoud, *Covid-19: virologie, épidémiologie et diagnostic biologique*. 2020. **31(619)**: p. 15.
63. Liu, R., et al., *Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020*. 2020. **505**: p. 172-175.
64. Wang, B., et al., *Does comorbidity increase the risk of patients with COVID-19: evidence from meta-analysis*. 2020. **12(7)**: p. 6049.
65. Notomi, T., et al., *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. 2000. **28(12)**: p. e63-e63.
66. Huang, P., et al., *A rapid and specific assay for the detection of MERS-CoV*. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1101. 2018, Epub 2018/06/14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01101> PMID: 29896174.
67. Cao, Z., et al., *Visual detection of West Nile virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a vertical flow visualization strip*. 2016. **7**: p. 554.

68. Chotiwan, N., et al., *Rapid and specific detection of Asian-and African-lineage Zika viruses*. 2017. **9**(388): p. eaag0538.
69. Li, H., et al., *Survey and visual detection of Zaire ebolavirus in clinical samples targeting the nucleoprotein gene in Sierra Leone*. 2015. **6**: p. 1332.
70. Lamoril, J., et al., *Les techniques de séquençage de l'ADN: une révolution en marche. Première partie*. 2008. **23**(5): p. 260-279.
71. Ahakoud, M.J.U.S.M.B.A., 159p, *Le séquençage d'acide désoxyribonucléique: principe technique, indications médicales et expérience du CHU Hassane II de Fés*. 2015.
72. EL FAHIME, E. and M.M.J.L.t.d.l. ENNAJI, *Évolution des techniques de séquençage*. 2007. **2**(5).
73. Stéphane Le Crom. "Le séquençage à haut débit, 2011.
74. Morisse, P., *Correction de données de séquençage de troisième génération*. 2019, Normandie Université.
75. déc, O.N.c.-n.c.a.g.p.l.c. and D.s. <https://www.who.int/fr/emergencies/diseases/novel-coronavirus2019/advice-for-public>.
76. <https://fipcenter.com/guide/les-epiindispensables-pour-se-proteger-contre-le-coronavirus/> , L.E.i.p.s.p.c.l.c.F.C.l.b.l.F.c.j.D.s.
77. Lachâtre, M. and O.J.M.e.M.I.F. Launay, *Vaccination COVID-19: technologies vaccinales, efficacité en vie réelle et spécificités*. 2022. **1**(3): p. 129-135.
78. Ouédraogo, S.A., *Etude de la séroprévalence du SARS-CoV-2 chez les enfants de 18 mois-15 ans des consultations pédiatriques au CHU Gabriel TOURE à Bamako, Mali*. 2023, Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako.
79. Meredith, L.W., et al., *Rapid implementation of SARS-CoV-2 sequencing to investigate cases of health-care associated COVID-19: a prospective genomic surveillance study*. 2020. **20**(11): p. 1263-1271.
80. Koné, A., et al., *Dynamics of SARS-CoV-2 variants characterized during different COVID-19 waves in Mali*. 2023. **6**: p. 24-28.
81. Samaké, D., et al., *La COVID-19 à Mopti: Aspects épidémiologique, clinique, thérapeutique et évolutif*. 2021. **16**(1): p. 47-51.
82. Morang'a, C.M., et al., *Genetic diversity of SARS-CoV-2 infections in Ghana from 2020-2021*. Nature Communications, 2022. **13**(1): p. 2494.
83. Rambaut, A., et al., *A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology*. 2020. **5**(11): p. 1403-1407.
84. Bugembe, D.L., et al., *Emergence and spread of a SARS-CoV-2 lineage A variant (A. 23.1) with altered spike protein in Uganda*. 2021. **6**(8): p. 1094-1101.

85. Kouriba, B., et al., *First phylogenetic analysis of Malian SARS-CoV-2 sequences provides molecular insights into the genomic diversity of the Sahel Region*. 2020. **12**(11): p. 1251.
86. Stange, M., et al., *SARS-CoV-2 outbreak in a tri-national urban area is dominated by a B. 1 lineage variant linked to a mass gathering event*. 2021. **17**(3): p. e1009374.
87. Ali, S., et al. *A k-mer based approach for sars-cov-2 variant identification*. in *Bioinformatics Research and Applications: 17th International Symposium, ISBRA 2021, Shenzhen, China, November 26–28, 2021, Proceedings 17*. 2021. Springer.
88. Agoti, C.N., et al., *Transmission networks of SARS-CoV-2 in Coastal Kenya during the first two waves: A retrospective genomic study*. 2022. **11**: p. e71703.
89. Daou, A., *Epidémiologie génomique de SARS-CoV-2 au Mali*. 2022, USTTB.
90. HB, D., et al., *CONTRIBUTION DU LABORATOIRE DU CENTRE UNIVERSITAIRE DE RECHERCHE CLINIQUE (UCRC) AU DIAGNOSTIC DE SRAS-COV-2 AU MALI*. 2021. **36**(2).

# ANNEXES

## X. Annexes

### Annexes 1 : Constitution des kits d'extractions d'ARN et des kits d'amplification

**Tableau 6 :** Composition des kits d'extraction d'acide nucléique

#### QIAamp Viral RNA Kits REF. HB-0354-007©2020 QIAGEN

Désignation	Nombre	Composantes
Numéro de catalogue 52906		
Nombre de préparation	250	
Mini colonnes de centrifugation QIAmp	250	
Tubes collecteurs (2ml)	750	
Tampon AVL (155 ml)	1	Sel chaotropique
Tampon AW1 concentré (98 ml)	1	Sel chaotropique
Tampon AW2 concentré (66 ml)	1	Azoture de sodium
Tampon AVE (20 ml)	1	Azoture de sodium
ARN carrier (1550ug)	1	Poly A

**Tableau 7:** Composition des kits de détection moléculaire SRAS-CoV-2

#### ARGENE REF ARGENE®SRAS-COV-2 R- GENE ®

Désignation	Nombre	Composantes
Eau grade moléculaire W0 (1,8ml)	2	
Contrôle interne 1, IC1 (vert) (1,1ml)	2	ARN prêt à l'emploi Contrôle interne
SRAS-COV-2 prémix d'amplification R01 (rouge)(900µl)	2	dNTP, MgCl <sub>2</sub> , tampon amplifié, amorce et sonde, Taq Polymérase
SARBECOVIRUS prémix	1	dNTP, MgCl <sub>2</sub> , tampon amplifié, amorce et sonde, Taq polymérase

d'amplification R02 (bleu) (450µl)		
SRAS-COV-2 Positif contrôle PC1 (mauve) (110µl)	1	2 transcriptions pour SRAS-COV2
SARBECOVIRUS et Cc Contrôle positif, PC2 (rose) (110µl)	1	1 transcription pour Sarbecovirus et 1 plasmide de la cellule contrôlé
Transcriptase inverse concentré, RT (orange) (15µl)	1	

#### Composition des kits de séquençage

**Tableau 8** : Rapid barcoding 96 V14 (EXP-MRT001 et SQK-RBK114.96)

Désignation	Couleur	Nombre	Volume (µl)
Adaptateur rapide (RA)	Vert	2	15
Tampon de l'adaptateur (BASD)	Clair	1	100
Perles AMPure XP (L'AXP)	Ambre	3	1,200
Tampon d'éluion (EB)	Noir	1	1,500
Tampon de séquençage (SB)	Rouge	1	1,700
Perles de bibliothèque (LIB)	Rose	1	1,800
Solution de bibliothèque LIS (en anglais seulement)	Bouchon blanc, étiquette rose	1	1,800
Rinçage de la cellule d'écoulement (Le FCF)	Clair	1	15,500
Attache de cellule d'écoulement FCT (en anglais seulement)	Pourpre	2	200
Codes-barres rapides (RB01-96)	-	3 assiettes	8 µl par puits

Ce produit contient le réactif AMPure XP fabriqué par Beckman Coulter, Inc. et peut être stocké à -20°C avec le kit sans nuire à la stabilité du réactif.

**Tableau 9** : Midnight RT PCR Expansion

Désignation	Couleur	Nombre	Volume (µl)
Luna script RT SuperMix (LS RT)	Bleue	3	500
Q5 HS Master Mix (Q5)	Orange	6	1500
Midnight Primer Pool A (MP A)	Blanche	3	15
Midnight Primer Pool B (MP B)	Claire	3	15

➤ Séquences d'amorce

Tableau 10 : Pool A

Nom de l'amorce	Séquence des amorces
SARSCoV_1200_1_LEFT	ACCAACCAACTTTCGATCTCTTGT
SARSCoV_1200_1_RIGHT	GGTTGCATTCATTTGGTGACGC
SARSCoV_1200_3_LEFT	GGCTTGAAGAGAAGTTTAAGGAAGGT
SARSCoV_1200_3_RIGHT	GATTGTCCTCACTGCCGTCTTG
SARSCoV_1200_5_LEFT	ACCTACTAAAAAGGCTGGTGGC
SARSCoV_1200_5_RIGHT	AGCATCTTGTAGAGCAGGTGGA
SARSCoV_1200_7_LEFT	ACCTGGTGTATACGTTGTCTTTGG
SARSCoV_1200_7_RIGHT	GCTGAAATCGGGGCCATTTGTA
SARSCoV_1200_9_LEFT	AGAAGTTACTGGCGATAGTTGTAATAACT
SARSCoV_1200_9_RIGHT	TGCTGATATGTCCAAAGCACCA
SARSCoV_1200_11_LEFT	AGACACCTAAGTATAAGTTTTTTCGCA
SARSCoV_1200_11_RIGHT	GCCACATGGAAATGGCTTGAT
SARSCoV_1200_13_LEFT	ACCTCTTACAACAGCAGCCAAAC
SARSCoV_1200_13_RIGHT	CGTCCTTTTCTTGGAAGCGACA
SARSCoV_1200_15_LEFT	TTTTAAGGAATTACTTGTATGCTGCT
SARSCoV_1200_15_RIGHT	ACACACAACAGCATCGTCAGAG
SARSCoV_1200_17_LEFT	TCAAGCTTTTTGCAGCAGAAACG
SARSCoV_1200_17_RIGHT	CCAAGCAGGGTTACGTGTAAGG

SARSCoV_1200_19_LEFT	GGCACATGGCTTTGAGTTGACA
SARSCoV_1200_19_RIGHT	CCTGTTGTCCATCAAAGTCCC
SARSCoV_1200_21_LEFT	TCTGTAGTTTCTAAGGTTGTCAAAGTGA
SARSCoV_1200_21_RIGHT	GCAGGGGGTAATTGAGTTCTGG
21_right_spike	GTGTATGATTGAGTTCTGGTTGTAAG
SARSCoV_1200_23_LEFT	ACTTTAGAGTCCAACCAACAGAATCT
23_left_spike	ACTTTAGAGTTCAACCAACAGAATCT
SARSCoV_1200_23_RIGHT	TGACTAGCTACACTACGTGCC
SARSCoV_1200_25_LEFT	TGCTGCTACTAAAATGTCAGAGTGT
SARSCoV_1200_25_RIGHT	CATTTCCAGCAAAAAAAGCC
SARSCoV_1200_27_LEFT	TGGATCACCGGTGGAATTGCTA
SARSCoV_1200_27_RIGHT	TGTTTCGTTTAGGCGTGACAAGT
SARSCoV_1200_29_LEFT	TGAGGGAGCCTTGAATACACCA
SARSCoV_1200_29_RIGHT	TAGGCAGCTCTCCCTAGCATTG

**Tableau 11 : Pool B**

<b>Nom de l'amorce</b>	<b>Séquence des amorces</b>
SARSCoV_1200_2_LEFT	CCATAATCAAGACTATTCAACCAAGGGT
SARSCoV_1200_2_RIGHT	ACAGGTGACAATTTGTCCACCG
SARSCoV_1200_4_LEFT	GGAATTTGGTGCCACTTCTGCT
SARSCoV_1200_4_RIGHT	CCTGACCCGGGTAAGTGGTTAT
SARSCoV_1200_6_LEFT	ACTTCTATTAATGGGCAGATAACAACCTG
SARSCoV_1200_6_RIGHT	GATTATCCATTCCCTGCGCGTC
SARSCoV_1200_8_LEFT	CAATCATGCAATTGTTTTTTCAGCTATTTTG
SARSCoV_1200_8_RIGHT	TGACTTTTTGCTACCTGCGCAT
SARSCoV_1200_10_LEFT	TTTACCAGGAGTTTTCTGTGGTGTGT
SARSCoV_1200_10_RIGHT	TGGCCTCATAGCACATTGGTA
SARSCoV_1200_12_LEFT	ATGGTGCTAGGAGAGTGTGGAC
SARSCoV_1200_12_RIGHT	GGATTTCCACAATGCTGATGC
SARSCoV_1200_14_LEFT	ACAGGCACTAGTACTGATGTCGT
SARSCoV_1200_14_RIGHT	GTGCAGCTACTGAAAAGCACGT

SARSCoV_1200_16_LEFT	ACAACACAGACTTTATGAGTGTCTCT
SARSCoV_1200_16_RIGHT	CTCTGTCAGACAGCACTTCACG
SARSCoV_1200_18_LEFT	GCACATAAAGACAAATCAGCTCAATGC
SARSCoV_1200_18_RIGHT	TGTCTGAAGCAGTGGAAAAGCA
SARSCoV_1200_20_LEFT	ACAATTTGATACTTATAACCTCTGGAACAC
SARSCoV_1200_20_RIGHT	GATTAGGCATAGCAACACCCGG
SARSCoV_1200_22_LEFT	GTGATGTTCTTGTTAACAACCTAAACGAACA
SARSCoV_1200_22_RIGHT	AACAGATGCAAATCTGGTGGCG
22_right_spike	AACAGATGCAAATTTGGTGGCG
SARSCoV_1200_24_LEFT	GCTGAACATGTCAACAACCTCATATGA
24_left_spike	GCTGAATATGTCAACAACCTCATATGA
SARSCoV_1200_24_RIGHT	ATGAGGTGCTGACTGAGGGAAG
SARSCoV_1200_26_LEFT	GCCTTGAAGCCCCTTTTCTCTA
SARSCoV_1200_26_RIGHT	AATGACCACATGGAACGCGTAC
SARSCoV_1200_28_LEFT	TTTGTGCTTTTTAGCCTTTCTGCT
SARSCoV_1200_28_RIGHT	GTTTGGCCTTGTTGTTGTTGGC
SARSCoV_1200_28_LEFT_27837T	TTTGTGCTTTTTAGCCTTTCTGTT

## Annexes 2 : Modes opératoires

### Procédures techniques du kit QIAamp Viral RNA

#### Avant de commencer

- Équilibrer les échantillons à température ambiante.
- Équilibrer le tampon AVE à température ambiante pour l'élution 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'éluat 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 incubé 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 réduit 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.

## **Mode opératoire des kits de détection moléculaire**

### **➤ Procédure du kit ARGENE**

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.

**Les augmentations et les diminutions de température sont réglées par défaut jusqu'à 20°C/sec, soit 100%.**

Acquisition de fluorescence							
Etapes	Heure	T°	Cycles	LC480 (Système II)	Validé Appliqué Biosystèmes	RotorGene Q	CF X96
Transcription inverse	5mn	50°	1	-	-	-	-
TaqPolymerase							
Activation	15min	95°	1	-	-	-	-
Dénaturation	10s	95°	-	-	-	-	-
Amplification	40s	60°	45	<b>FAM (465-510)</b>  <b>« Cy5'''/''Cy 5. 5 »</b>  <b>(618-660)</b>	FAM « CY 5 » VIC	<b>Vert</b>  <b>Ro</b>  <b>u</b>  <b>ge</b>  <b>Jaune</b>	FAM « Cy5 » SOR TILÈ GE
Elongation	25s	72°	-	<b>VIC/HEX/</b>	-		-

				<b>Jaune555</b> <b>(533-580)</b> À la fin du recuit -			
--	--	--	--	---	--	--	--

**Tableau 12 :** Programme d'amplification du LightCycler

**Séquençage**

➤ **Mode opératoire**

**Jour 1**

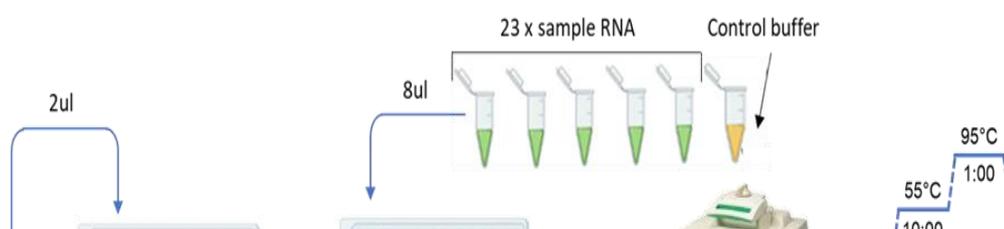
Équipement	Consommables
<ul style="list-style-type: none"> <li>Thermocycler programs (pre-PCR area)</li> </ul> <p><b>RT_1 and Amp_2</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifuge for 96-well plates</li> <li>Vortex mixer</li> <li>Ice bucket</li> <li>Pipette set</li> </ul>	<ul style="list-style-type: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

**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

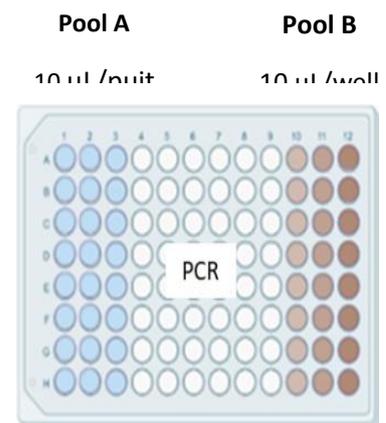
### Bonnes pratiques

- 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

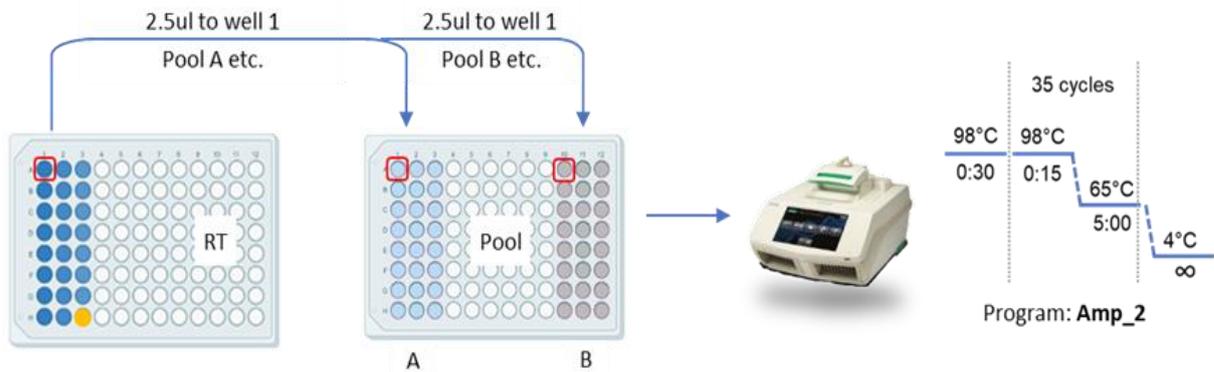
Reagent	Pool A Tube (ul)	Pool B Tube (ul)
Nuclease-free water	102	102
Midnight Primer Pool A	2	
Midnight Primer Pool B		2
Q5 HS Master Mix (Q5)	172	172
Total	234	234



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

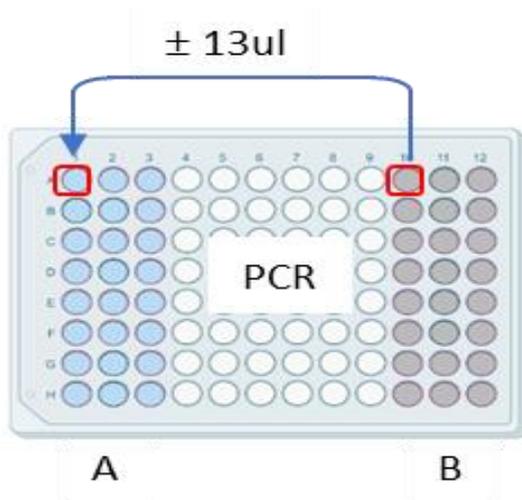
--	--

### Bonnes pratiques

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

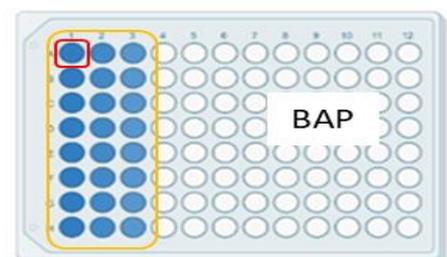
### Procédures

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

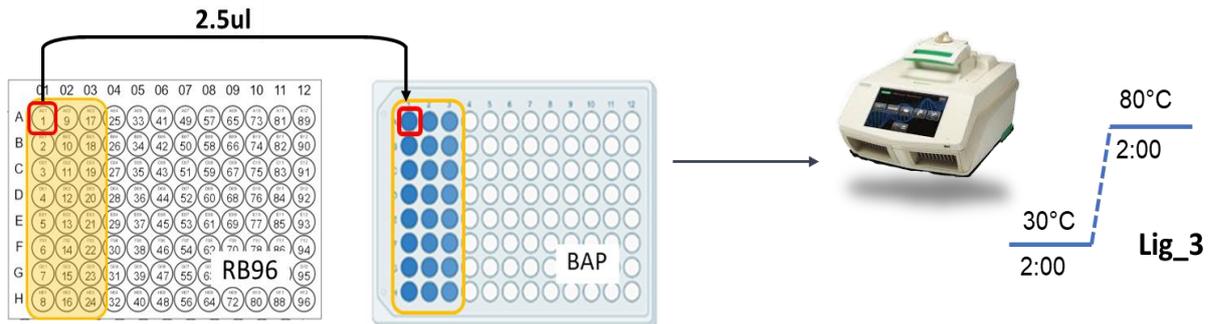


3. Étiqueter une nouvelle plaque « BAP »
4. Ajouter 2.5 µL nuclease-free water
5. Ajouter 5 µL des PCR poolés

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 »



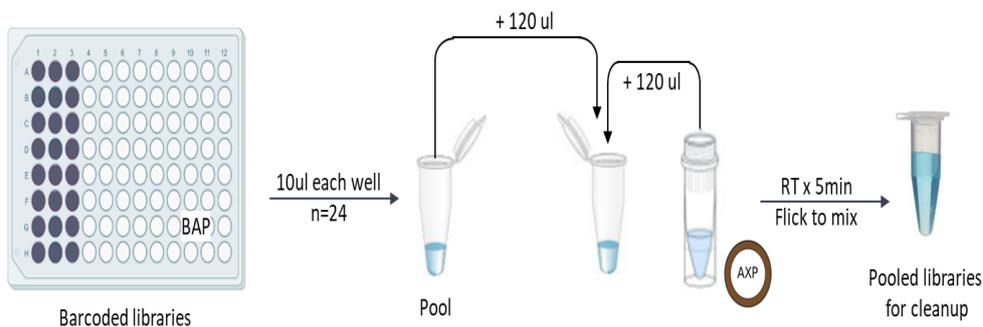
### III. Pooling de la librairie et purification

#### 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
- Suspendre les billes avant d'ajouter

#### Procédure

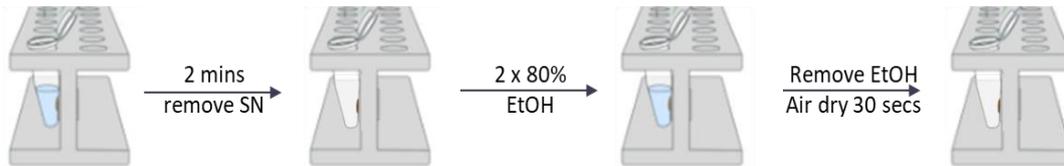
1. Poolez 10 µl de chaque échantillon (n=24) dans un seul tube
2. Transférez 120ul dans un nouveau tube
3. Ajouter 120 ul AMPure XP beads
4. Incubez à la température ambiante pendant 5 minutes,
5. Tapotez 3-4 X fois toutes les 45 secondes



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  $\mu$ l Elution Buffer (EB)

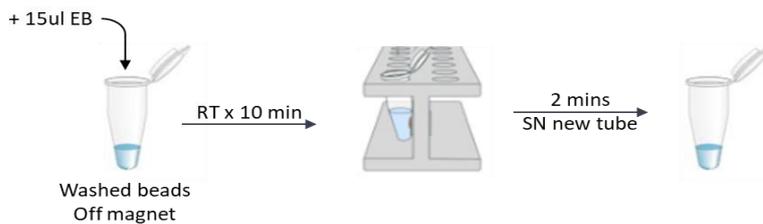
13. Suspendre en pipetant

14. Incuber à la température ambiante pendant 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

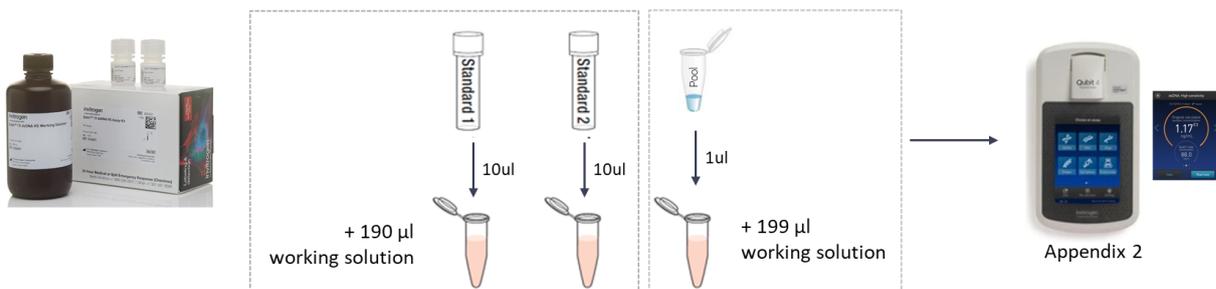
- Vérifier la solution de travail du Qubit dsDNA HS kit
- Utiliser les tubes spécifique du Qubit
- Vérifier sur le Qubit si le standard est déjà enregistré (etape 3-5 ci-dessous), si oui ce n'est pas nécessaire de préparer les standard

#### Procédure

1. Préparer la solution de travail en mélangeant dans un tube 597  $\mu$ l HS buffer (flacon) et 3  $\mu$ l 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)	Librairie Poolée (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 « read sample »
- 9.



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

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 « calculacion » 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

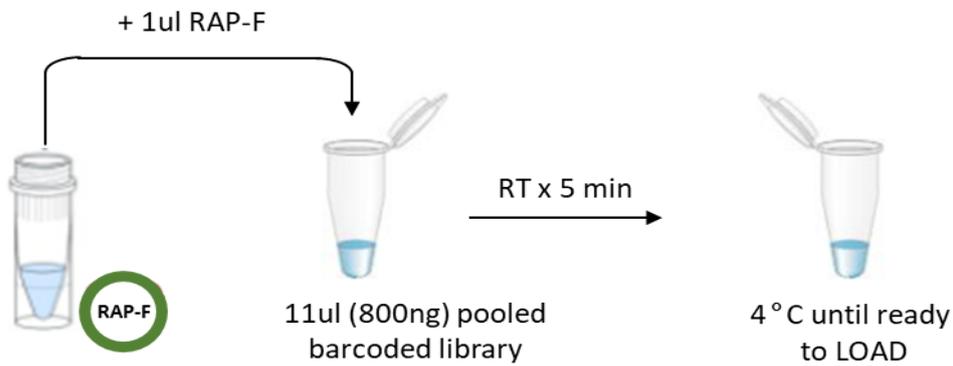
## V. Addition des adaptateurs

### 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



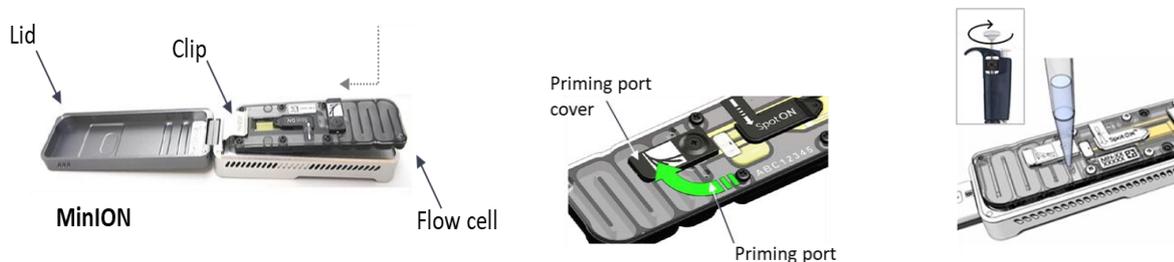
## VI. Séquençage

### 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)
- Suspendre 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 » image 1 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 µl 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 (µl)
Flush Buffer (FB)	1170
Flush Tether (FLT)	30

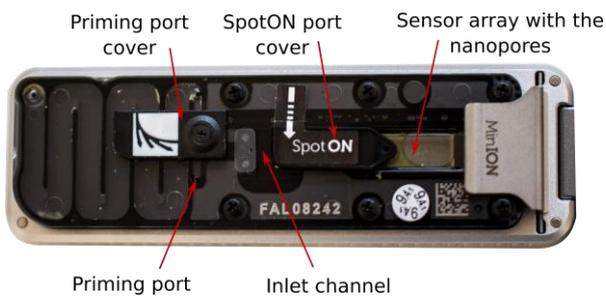
6. Ajouter 800 µl du « flow cell priming mix » au « Priming port »
7. Attendre 5 minutes

8. Préparer « library mix » comme indiqué dans le Tableau ci-dessous

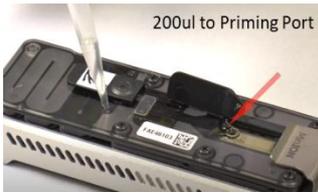
Reagent	Volume (ul)
Sequencing Buffer II (SBII)	37.5
Loading Beads II (LBII)*	25.5
Prepared Library	12

**NB : Melanger immédiatement LB avant l'utilisation**

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



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



## **Fiche signalétique**

**Nom :** DICKO

**Prénoms :** Zeinaba Mohamed

**Titre de la thèse :** Distribution des variants de SARS-COV 2 pendant les deux premières vagues de la pandémie de Covid-19 au Mali.

**Téléphone :** (+223) 72890005

**Nationalité :** Malienne

**Année de soutenance :**

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la FMOS/ FAPH

**Secteur d'intérêt :** Virologie, Bio-informatique

## **Résumé**

**Introduction :** Le nouveau coronavirus, SARS-COV 2, découvert en Chine fin Décembre 2019 a causé une pandémie qui a déclenché une urgence de santé publique de portée internationale. Le but de cette étude était de décrire la distribution des variants de SARS-COV 2 pendant les deux premières vagues de la pandémie au Mali.

**Méthodologie :** Nous avons mené une étude descriptive chez des cas de Covid-19 positifs par RT-PCR et provenant des districts sanitaires des deux premières vagues de la pandémie (Mars 2020-Février 2021). Les échantillons éligibles ont été soumis à un séquençage du génome entier avec le Midnight RT expansion kit utilisant le MinIon. Les séquences générées ont été analysées sur Epi2me et Next clade pour la détermination des variants.

**Résultats :** Sur 32 échantillons éligibles séquencés, le sexe masculin était le plus représenté avec 75% et la tranche d'âge 41-50ans était la plus retrouvée. Parmi les 32 échantillons, 19 ont été partiellement séquencés et 13 avaient une couverture supérieure à 90%. Six 6 variants de SARS-COV 2 ont été détectés notamment A, A.18, A.23.1, A.27, B.1 et B.1.1. Le variant B.1 était prédominant et circulait essentiellement dans les régions de Bamako (66,6%), Kidal (16,7%), Tombouctou (16,7%). Le variant A avec un taux de détection de 23,9% circulait dans les régions de Bamako, Gao et Kayes.

**Conclusion :** Ces résultats montrent que dès les premiers instants de la pandémie on a assisté à une dissémination des variants de l'épicentre vers les autres régions du pays.

**Mots-clés :** SARS-COV 2, Séquençage, Variants, Mali.

## **Abstract**

**Introduction :** The novel coronavirus, SARS-COV 2, discovered in China in late December 2019 has caused a pandemic that has triggered a public health emergency of international concern. The aim of this study was to describe the distribution of SARS-COV 2 variants during the first two waves of the pandemic in Mali.

**Methodology :** We conducted a descriptive study among cases of Covid-19 positive by RT-PCR and coming from health districts of the first two waves of the pandemic (March 2020-February 2021). Eligible samples were subjected to whole genome sequencing with the Midnight RT expansion kit using the MinIon. The generated sequences were analyzed on Epi2me and Next clade for the determination of variants.

**Results :** Out of 32 eligible samples sequenced, the male gender was the most represented with 75% and the 41-50 year old age group was the most found. Of the 32 samples, 19 were partially sequenced and 13 had coverage greater than 90%. Six 6 variants of SARS-COV 2 were detected in particular A, A.18, A.23.1, A.27, B.1 and B.1.1. The B.1 variant predominated with 46.16% and circulated mainly in the regions of Bamako (66.6%), Kidal (16.7%), Timbuktu (16.7%). Variant A with a detection rate of 23.9% was circulating in the regions of Bamako, Gao and Kayes.

**Conclusion :** These results show that from the first moments of the pandemic we witnessed a dissemination of variants from the epicenter to other regions of the country.

**Keywords :** SARS-COV 2, Sequencing, Variants, Mali.

## **Serment de Galien**

- ✓ Je jure en présence des maîtres de cette Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes chers condisciples.
- ✓ D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- ✓ D'exercer dans l'intérêt de la santé publique ma profession, avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement
- ✓ De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.
- ✓ En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.
- ✓ Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

**Je le jure !!!!!**