

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT
NATIONALE, SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUES

REPUBLIQUE DU MALI
UN PEUPLE UN BUT UNE FOI

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES
TECHNIQUES DES TECHNOLOGIES DE
BAMAKO (USTTB)

FACULTE DE PHARMACIE
(FAPH)



ANNEE UNIVERSITAIRE 2020-2021

THESE N°....

**SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA DENGUE AU
CENTRE D'INFECTIOLOGIE CHARLES MERIEUX DE
JANVIER A DECEMBRE 2019**

Thèse présente a la faculté de Pharmacie

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

par

Mr Boubacar Sidiki TRAORE

née le 18 novembre 1993 à Bamako,

soutenue publiquement le 30-04-2021

Président : **Professeur Daouda K MINTA**

Membre : **Docteur Ibrehima GUINDO**

Membre : **Professeur Bourama KANE**

Co directeur : **Docteur Abdoul Karim SANGARE**

Directeur : **Professeur Agrégé Bourèma KOURIBA**

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUES

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES
TECHNIQUES DES TECHNOLOGIES DE
BAMAKO (USTTB)



REPUBLIQUE DU MALI
UN PEUPLE UN BUT UNE FOI

FACULTE DE PHARMACIE
(FAPH)



ANNEE UNIVERSITAIRE 2020-2021

THESE N°....

**SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA DENGUE AU
CENTRE D'INFECTIOLOGIE CHARLES MERIEUX DE
JANVIER A DECEMBRE 2019**

Thèse présente a la faculté de Pharmacie

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

par

Mr Boubacar Sidiki TRAORE
née le 18 novembre 1993 à Bamako,
soutenue publiquement le 30-04-2021

Président : **Professeur Daouda K MINTA**
Membre : **Docteur Ibrehima GUINDO**
Membre : **Professeur Bourama KANE**
Co directeur : **Docteur Abdoul Karim SANGARE**
Directeur : **Professeur Agrégé Bourèma KOURIBA**



DEDICACES ET REMERCIEMENTS

Je dédie ce travail à mes parents Mamadou TRAORE et Awa TRAORE.

Je remercie Allah, le tout miséricordieux le très miséricordieux, qui par sa grâce m'a permis de réaliser ce travail. Et par la même occasion, je Lui demande « de nous guider dans le droit chemin, de nous accorder bel pars ici-bas et aussi bel part dans l'au-delà et qu'Il nous protège du châtement du feu ». Amen ! Après notre Seigneur, comment pourrai-je dire merci à tout le monde quand il y a autant de gens à remercier ? Évidemment, par ce document, je veux dire merci à mes parents qui par leurs amours en ma faveur, présentent deux modèles à imiter.

À mes oncles *Bakore TRAORE*, *Boubacar TRAORE* et *Amadou DEMBELE*

Je vous remercie pour vos encouragements, vos conseils pour tous ce que vous faites et tous ce que vous allez faire pour moi. Chacun de vous a été pour moi plus qu'un oncle, mais un papa. Et sachez que ces mots ne seront jamais assez pour exprimer mon affection envers vous. Que Dieu vous donne longue vie !

À mon frère *Amadou DIALLO*

Tu as été un soutien inestimable durant toutes ces années d'études. Merci pour tout.

Mes tantes et oncles, cousines et cousins, nièces et neveux de la famille TRAORE

Votre affection, votre soutien et vos conseils ne m'ont jamais fait défaut. Soyez tous assurés de ma profonde reconnaissance et mon entière disponibilité.

A mes camarades de la dixième promotion du numerus clausus (Promotion Albert Y Dembélé) :

Nouhoum KONE, Karamoko DJIRE, Karamoko SANOGO, Idrissa CAMARA et j'en passe, vos soutiens en ma faveur ont été d'une valeur inestimable.

A tout le personnel du CICM,

Un grand merci, particulièrement à DR TIMBINE qui a su me faire avancer dans ce travail.

À la *Pharmacie Badiallo*

Merci à toute l'équipe de la pharmacie.

À Docteur *SANGARE Samba Adama* qui grâce à son expérience, m'a donné des informations décisives pour la réalisation de ce document. Egalement je remercie toute sa famille.

Je suis heureux d'avoir un patron « Trois en un ». Leader, Mentor, enseignant. Pour résumer, une personne qui comprend la meilleure façon de conduire ses employés.

Je remercie également toute la *Pharmacie Mamadou YATTASSAYE*, puis particulièrement Dr *SIDIBE Tiekoro* pour m'avoir bien formé en gestion d'officine.

Ne pouvant malheureusement citer toutes les personnes que j'ai rencontrées durant mon parcours et qui ont contribué d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin, à l'accomplissement de cette thèse. Je leur dis à tout merci d'avoir été là à cet instant précis où je les ai rencontrées et où ils m'ont apporté cette aide qui a sûrement contribué à aller au bout de ce travail :

Ma thèse !!

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et président de jury

Professeur Daouda Kassoum MINTA

- Professeur Titulaire de Maladies infectieuses et Tropicales ;
- Directeur du centre d'excellence de prise en charge VIH adulte du Mali ;
- Chercheur au département d'épidémiologie des affections parasitaires (DEAP/MRTC/FMOS) -Mali ;
- Vice-président de la société Africaine de Pathologie Infectieuses ;
- Président du comité Scientifique VIH du Mali ;
- Président de la Société Malienne de contrôle de Résistances aux Antimicrobiens (SONARAM).

Cher Maître,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail et merci pour l'honneur que vous me faites de présider mon jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A notre Maître et Juge

Docteur Ibrehima Guindo

- Pharmacien Microbiologiste ;
- Chef du département laboratoire et recherche biomédicale à l'Institut Nationale de Santé Publique (INSP) ;
- Point focal laboratoire COVID-19 ;
- Maître Assistant en Bactériologie virologie à la Faculté de Pharmacie.

Chers Maître,

Vous nous avez honorés en acceptant de prendre part à ce jury de thèse malgré toutes vos occupations. Merci pour le temps accordé. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de mon respect et de ma gratitude.

A notre Maître et Juge

Professeur Bourama KANE

- Chef du service de pédiatrie de l'hôpital du Mali ;
- Diplômé en pneumologie et allergologie pédiatrique ;
- Diplômé en Nutrition de l'Université de Boston ;
- Maître de recherche à la FMOS de Bamako ;
- Membre de la Société Pédiatrique de Pneumologie et d'Allergologie (SP2A) de France.

Cher maître,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Votre disponibilité et votre accueil nous ont permis d'apprécier vos qualités et humaines.

Veillez agréer le témoignage de notre profond respect et de notre sincère admiration.

A notre Maître et Co-directeur de thèse,

Docteur Abdoul Karim SANGARE

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

Cher Maître,

Nous vous remercions de nous avoir suivis et encadrés au cours de ce travail.

Recevez ici cher maître nos sincères remerciements.

A notre Maître et Directeur de thèse,

Professeur Agrégé Bourèma KOURIBA

- Maître de conférences Agrégé en Immunologie à la faculté de Pharmacie ;
- Chef du Département des Sciences biologiques et médicales de la FAPH ;
- Chef de l'Unité d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire du MRTC/DEAP ;
- Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles MERIEUX (CICM) ;
- Président de la société Malienne d'immunologie.

Cher Maître,

Merci d'avoir accepté de diriger ce travail et de m'avoir accordé de votre temps. Merci pour votre disponibilité, vos conseils et vos connaissances à ce sujet. Je vous adresse mes plus sincères remerciements.

LISTE DES ABREVIATIONS

ARN	Acide ribonucléique
AVE	Elution Buffer (tampon d'élution)
AVL	Viral Lysis Buffer and carrier RNA
AW1	Wash Buffer (1) (tampon de lavage 1)
AW2	Wash Buffer (2) (tampon de lavage 2)
BSL3	Bio Safety Levels 3
CHIKV	Chikungunia virus
CICM	Centre d'Infectiologie Charles Mérieux
CIVD	Coagulations intra vasculaires disséminées
CSCOM	Centre de Santé Communautaire
DEET	N,N-Diéthyl-3-méthylbenzamide
DENV1	Dengue virus 1
DENV2	Dengue virus 2
DENV3	Dengue virus 3
DENV4	Dengue virus 4
DENV5	Dengue virus 5
DSC	Dengue avec syndrome de chocs
ECDC	European Centre of Diseases Control
EDTA	Éthylène Diamine Tétra Acétique acide
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPA	Etablissement Public à caractère Administratif

FHD	Fièvre hémorragique la dengue
HDM	Hôpital du Mali
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
NS 1	Non Structural protéine 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PNS	Protéines non structurales
RT-qPCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne en Temps Réel (quantitative)
SPSS v21	Statistical Package For the Social Sciences version 21
TDR	Test de diagnostic Rapide
UCRC	University Clinical Research Center
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WNV	West Nile Virus
ZIKV	Zika virus

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Répartition des patients selon le sexe.	36
Tableau II : Répartition des patients suspects selon les classes d'âge.	36
Tableau III : Répartition de la population d'étude en fonction de la classe d'âge et du sexe. .	37
Tableau IV: Répartition des patients selon leurs provenances.	38
Tableau V : Fréquence de la dengue dans les l'échantillon par la RT-qPCR.	39
Tableau VI : Répartition des échantillons selon les sérotypes de la dengue.	39
Tableau VII : Répartition des cas de dengue diagnostiquée par la RT-qPCR selon les classes d'âge.	41
Tableau VIII : Répartition des cas de dengue diagnostiquée par la RT-qPCR selon la provenance des échantillons.	42
Tableau IX : Fréquence de détection de l'antigène NS1 dans les échantillons testés.	43
Tableau X : Répartition des échantillons positifs à l'antigène NS1 selon le sexe.	43
Tableau XI : Répartition des échantillons positifs à l'antigène NS1 selon les classes d'âge...	44
Tableau XII : Fréquence de détection de l'antigène NS1 dans les échantillons testés selon les communes.	45
Tableau XIII : Répartition des résultats du TDR Dengue NS1 selon la RT-qPCR.	46
Tableau XIV : Répartition des concordances selon le sexe.	47
Tableau XV : : Répartition des concordances selon les classes d'âge.	47
Tableau XVI : Répartition des concordances selon les provenances.	48

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Pays ou régions du monde où la dengue a été signalée en 2011, selon les données recueillies par l'Organisation mondiale de la santé(16).	9
Figure 2 : <i>Aedes aegypti</i> (25)	11
Figure 3 : <i>Aedes albopictus</i> (moustique tigre) (25).....	11
Figure 4 :L'ARN viral avec à gauche les protéines structurales et les protéines non structurales à droite(26).....	12
Figure 5 : Pétéchies sur l'avant-bras d'un patient atteint de dengue(39).	15
Figure 6 : Variation de la température, du taux de plaquettes, hémocrites et de la virémie pendant une infection à DENV(39).....	17
Figure 7 : Cinétique du virus et des anticorps de type IgM et IgG au cours d'une infection par DENV : cas d'une infection primaire(46)	18
Figure 8 : Cinétique du virus et des anticorps de type IgM et IgG au cours d'une infection par DENV : cas d'une infection secondaire par un sérotype viral hétérologue(46).....	18
Figure 9 : Boîte à gant pour inactivation des échantillons (49).	26
Figure 10 : Dispositif complet utilisé pour l'amplification de ARN/ADN : Therrmocycleur = SmartCycler® (Stratagème) ; Ordinateur portable ; mini centrifugeuse pour tube RT-qPCR ; portoir de tube RT-qPCR(49).....	72
Figure 11 : Etapes de détermination d'un nouveau programme de RT-qPCR (nombre de cycles, température, temps) (49).	74
Figure 12 : Etapes de lancement d'une RT-qPCR (49).....	75
Figure 13 : Fenêtre pour la vérification du nombre d'échantillon par rapport au site ID (49). 76	
Figure 14 : Courbes d'amplification des matériels génétiques éventuellement présents dans les échantillons (49).....	77

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ENSEIGNANTES.....	III
DEDICACE ET REMERCIEMENTS.....	X III
LISTE DES ABREVIATIONS.....	X IX
LISTE DES TABLEAUX.....	X X
LISTE DES FIGURES.....	X X I
1. INTRODUCTION	1
2. OBJECTIFS.....	3
2.1 Objectif général	4
2.2 Objectifs spécifiques	4
3. GENERALITES	5
3.1 La dengue.....	6
4. METHODOLOGIE.....	21
4.1 Cadre et lieu d'étude.....	22
4.2 Type et période d'étude.....	24
4.3 Population	24
4.4 Critères d'inclusion	24
4.5 Critères de non-inclusion	24
4.6 Echantillonnage	24
4.7 Variables mesurées.....	24
4.8 Saisie et analyse des données	24
4.9 Méthode d'étude	25
4.10 Considération éthiques.....	34

5. RESULTATS	35
5.1 Sociodémographiques :.....	36
5.2 Résultats biologiques :	39
5.3 Concordance des résultats du TDR Dengue NS1 selon la RT-qPCR.....	46
6. DISCUSSION	49
6.1 Données sociodémographiques	50
6.2 Données biologiques.....	52
7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	54
7.1 CONCLUSION.....	55
7.2 RECOMMANDATIONS :	55
8. REFERENCES	60
9. ANNEXES	65

INTRODUCTION

La dengue anciennement appelée grippe tropicale ou « petit paludisme » est une infection virale endémique due à un arbovirus (*Flavivirus*), transmis à l'homme par un moustique diurne du genre *Aedes*. C'est l'une des maladies les plus dynamiques en matière de propagation et constitue un problème majeur de santé publique malgré des efforts de lutte antivectorielle. Elle est inscrite aujourd'hui au rang des maladies dites « ré-émergentes » et compte parmi les principales maladies tropicales négligées [1]. Il n'y a actuellement ni traitement ni vaccin connus, son incidence annuelle selon l'OMS est estimée à 50 millions de cas entraînant plusieurs dizaines de milliers de morts. Plus de 2,5 milliards de personnes sont à risque. La dengue peut évoluer vers des formes sévères comme la dengue hémorragique (FHD) qui peut évoluer en dengue avec syndrome de choc (DSC) dont l'issue peut être mortelle. Depuis les années 1950, l'incidence des formes graves (FHD/DSC) a été multipliée. L'infection est souvent asymptomatique ce qui conduit à de mauvaises diagnostics et une sous-estimation du nombre de cas[2]. Mais aussi elle est sérotype dépendants.

La répartition mondiale du risque d'infection par le virus de la dengue et son impact sur la santé publique est mal connue. La mondialisation du commerce, en particulier le commerce des pneus de véhicules d'occasion, expliquerait la dispersion des œufs et des formes immatures de ces vecteurs arboviraux dans de nouveaux territoires. Ainsi, la propagation de la dengue illustre comment le commerce mondial (et le transport des moustiques vecteurs), l'augmentation des déplacements à l'intérieur et entre les pays (et le mouvement des personnes virémiques), la surpopulation urbaine (qui est propice à de multiples infections par un moustique infecté), et des stratégies de lutte antivectorielle inefficaces ont soutenu une pandémie à l'ère moderne [3]. En 2006, la dengue a été désignée maladie à déclaration obligatoire en France, et en 2 ans, 19 cas de FHD importés ont été signalés chez les voyageurs revenants d'Afrique de l'Ouest. [4].

En Afrique les infections par le virus de la dengue restent largement non quantifiées, mais des flambées récentes suggèrent que des parties substantielles du continent pourraient être exposées à un risque de transmission croissante de la dengue [3]. Elle a été isolé pour la première fois en Afrique de l'Ouest en 1964 au Nigeria avec l'isolement du DENV1 et 2 [5]. Depuis lors, des cas de transmissions de DENV urbain et sylvatique ont eu lieu dans plusieurs pays [6]. Plus récemment, DENV3 a émergé et provoqué des épidémies au Sénégal, au Cap-Vert, et Côte d'Ivoire. Cependant peu de données sur l'épidémiologie de la dengue en Afrique sont disponibles. Au fur et à mesure que des sérotypes du DENV continuent d'émerger dans les pays africains, les épisodes de (FHD) pourraient devenir plus fréquents. Les informations

concernant la transmission du DENV sont très limitées en Afrique de l'Ouest, avec les enquêtes les plus approfondies en tant que résultat des cas liés aux voyages [7].

Le Mali est parmi les pays confrontés à de nombreux problèmes de santé liés à la pauvreté, la malnutrition, le manque d'hygiène, d'assainissement et surtout par des moyens limités d'outils de diagnostics. En octobre et novembre 2008, le Mali a connu une flambée de plus de 70 cas de FHD avec à la fois au moins 2 morts suspectées de FHD. D'après les informations sur les voyageurs, le foyer aurait été causé par le DENV2. L'urbanisation anarchique au Mali créant les conditions d'une émergence et d'une propagation de la dengue, la fréquence des cas de dengue dans les pays voisins, incite à mettre en place une surveillance de cette maladie. C'est pourquoi nous avons conduit cette étude dans le but d'évaluer la prévalence de la dengue dans le district sanitaire de Bamako.

OBJECTIFS

2.1 Objectif général

Evaluer la prévalence de la dengue dans le district sanitaire de Bamako et environs.

2.2 Objectifs spécifiques

- Déterminer la fréquence de détection moléculaire antigénique, et sérologique ;
- Identifier les sérotypes de la dengue ;
- Comparer le résultat du diagnostic moléculaire (RT-qPCR) de la dengue à celui du test de diagnostic rapide (TDR).

GENERALITES

3.1 La dengue

3.1.1 Définition

La dengue anciennement appelée grippe tropicale fièvre rouge ou petit paludisme est une infection virale endémique due à un arbovirus, transmise à l'être humain par l'intermédiaire de moustiques diurne (actif jour et nuit) du genre *Aedes*, lui-même infecté par le virus de la dengue du genre des *Flavivirus*.

Il en existe une forme hémorragique (FHD) qui peut évoluer vers une forme avec syndromes de chocs (DSC) rares sévères pouvant entraîner la mort.

Jusqu'à présent, on croyait que la dengue était causée par quatre sérotypes différents. La cinquième variante du DENV5 a été isolée en octobre 2013. Ce sérotype suit le cycle sylvatique contrairement aux quatre autres sérotypes qui suivent le cycle humain [8].

3.1.2 Historique

Le premier signalement d'une maladie similaire à la maladie dengue FHD a eu lieu à la fin du dix-huitième siècle, et c'était une épidémie temporaire. Il est supposé que la FHD a été initialement transmise par des voyages et des expéditions commerciales entre l'Asie et Amérique du Sud. La pandémie de FHD qui s'est produite après la deuxième guerre mondiale était due aux dommages causés à l'environnement, aux personnes déplacées et aux déchets des équipements militaires qui sont devenus les hôtes de vecteurs. Au vingtième siècle, FHD / DSC a été identifié comme un signe de diagnostic pour l'infection de la dengue. Par la suite le nombre de cas a augmenté à l'échelle internationale, et la dengue a été transmise à d'autres régions du monde [9]. L'infection mortelle par la dengue a été documentée pour la première fois lors d'une flambée en Manille, Philippines, en 1953-54. Pendant 10 à 15 ans, il s'est développé pour devenir endémique dans toute l'Asie du Sud-Est. La première épidémie à Singapour était en 1960 et infectée des enfants et des adultes plus âgés, avec un faible taux de mortalité. En 1996, une grave épidémie de FHD s'est déclarée à Delhi, et environ 10 252 cas ont été signalés ; il y a eu 423 décès [10]. Des travaux ont commencé en 1949 pour réduire au minimum la reproduction des moustiques, ce qui a permis de réduire le nombre de cas de FHD. Bien que les données de l'OMS entre 1992 et 1998 montrent que l'Asie du Sud-Est a connu un nombre stable de cas de FHD, le taux de cas dans le Pacifique occidental a quadruplé. Les chiffres dans les Amériques ont été multipliés par huit au cours de la même période. L'OMS en 1980 a déclaré que 1 033 417 est le nombre de FHD dans la région

américaine. En 2002, ce nombre était passé à 8 491 416. À l'heure actuelle, environ 100 pays ont une FHD endémique, avec 100 millions de cas prévu annuellement [11].

3.1.3 Epidémiologie

L'incidence de la dengue a progressé de manière spectaculaire dans le monde entier au cours des dernières décennies. Le nombre réel de cas est sous-notifié et de nombreux cas ne sont pas correctement classés. Selon une estimation récente, on compterait 390 millions de cas de dengue par an, dont 96 millions présentent des manifestations cliniques [12]. Une autre étude de la prévalence de la dengue estime que 3,9 milliards de personnes dans 128 pays sont exposées à l'infection par les virus de la dengue [13]. La dengue est aujourd'hui considérée comme une maladie ré-émergente. Avec la globalisation de l'économie et l'augmentation des échanges des biens et des personnes, elle tend à gagner de nouvelles zones géographiques, se développe de plus en plus dans des environnements urbains, et provoque des épidémies de plus grandes importances. Les formes graves de dengue sont de plus en plus fréquemment observées lors des épidémies récentes [14].

Epidémiologie dans le monde [15]

Avant 1970, seuls 9 pays avaient connu des épidémies de dengue sévère. Désormais, la maladie est endémique dans plus de 100 pays en Afrique, dans les Amériques, en Méditerranée orientale, en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique occidental, ces 2 dernières régions étant les plus touchées. Le nombre des cas dans les Amériques, en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique occidental a dépassé 1,2 million en 2008 et 3,2 millions en 2015 (sur la base des données officielles transmises par les États membres à l'OMS). Récemment, le nombre des cas notifiés a continué de progresser. En 2015, la région des Amériques a signalé à elle seule 2,35 millions de cas, dont 10 200 cas de dengue sévère qui ont provoqué 1181 décès.

Non seulement le nombre de cas augmente à mesure que la maladie se propage à de nouvelles zones, mais l'on assiste également à des flambées explosives. La menace d'une flambée de dengue existe désormais en Europe et une transmission locale a été rapportée pour la première fois en France et en Croatie en 2010, et des cas importés ont été détectés dans 3 autres pays européens. En 2012, une flambée sur l'archipel de Madère (Portugal) a provoqué plus de 2000 cas et des cas importés ont été détectés sur Portugal continental et dans 10 autres pays européens. Chez les voyageurs de retour de pays à revenu faible ou intermédiaire, la dengue est la 2^e cause de fièvre la plus diagnostiquée après le paludisme.

En 2013, des cas se sont produits en Floride (États-Unis d'Amérique) et dans la province du Yunnan (Chine). La dengue a continué de sévir dans plusieurs pays d'Amérique latine, notamment au Costa Rica, au Honduras et au Mexique. En Asie, Singapour a notifié une augmentation du nombre des cas après une absence de cas de plusieurs années et des flambées ont également été signalées au Laos.

En 2014, les tendances indiquent une augmentation du nombre de cas en Chine, dans les Îles Cook, à Fidji, en Malaisie et à Vanuatu, le virus de type 3 (DENV3) touchant les pays insulaires du Pacifique après une absence de 10 ans. La dengue a également été signalée au Japon après une absence de plus de 70 ans.

En 2015, New Delhi (Inde) a connu la pire flambée de son histoire depuis 2006 avec plus de 15 000 cas signalés. L'île d'Hawaï (États-Unis d'Amérique) a été touchée par une flambée, avec 181 cas signalés, et la transmission se poursuit en 2016. Dans le Pacifique, les Îles Fidji, Tonga et la Polynésie française ont continués d'enregistrer des cas.

L'année 2016 a été marquée par d'importantes flambées de dengue dans le monde entier. La Région des Amériques a notifié plus 2,38 millions de cas en 2016, dont un peu moins de 1,5 million de cas au Brésil uniquement, soit environ 3 fois plus de cas qu'en 2014. On a également signalé 1032 décès dus à la dengue dans la Région.

La Région du Pacifique occidental a signalé plus de 375 000 cas suspects de dengue en 2016, dont 176 411 notifiés aux Philippines et 100 028 en Malaisie, soit une charge identique à l'année précédente pour les 2 pays. Les îles Salomon ont déclaré qu'il y avait une flambée de dengue dans le pays, avec plus de 7000 cas suspects.



Figure 1 : Pays ou régions du monde où la dengue a été signalée en 2011, selon les données recueillies par l'Organisation mondiale de la santé[16].

Epidémiologie en Afrique

En Afrique, l'incidence de la dengue est largement inconnue en raison de la rareté des données de surveillance, les cas et les foyers n'ayant pas été déclarés à l'OMS. Cependant, une épidémie de dengue causée par les quatre sérotypes a été documentée en Afrique depuis 1980, avec 22 pays signalant des cas sporadiques. La forte prévalence des anticorps dirigés contre le virus de la dengue dans les enquêtes sérologiques limitées, suggère une infection endémique par le virus de la dengue dans de nombreuses régions d'Afrique [17].

L'émergence et la propagation du virus de la dengue (DENV) dans les pays de l'Afrique de l'Ouest sont devenues de plus en plus apparentes au cours de ces dernières années. La DENV a été isolée pour la première fois en Afrique de l'Ouest en 1964 au Nigeria avec l'isolement du DENV1 et du DENV2 [5]. Depuis lors, des cas de transmissions de DENV urbain et sylvaïque ont eu lieu dans plusieurs pays [6]. Plus récemment, DENV3 a émergé et provoqué des épidémies au Sénégal, au Cap-Vert, et en Côte d'Ivoire. De plus, en octobre et novembre 2008, le Mali a connu une flambée de plus de 70 cas de FHD avec à la fois au moins 2 morts

suspectées de FHD. D'après les informations sur les voyageurs, le foyer aurait été causé par le DENV2. Au fur et à mesure que des sérotypes du DENV continuent d'émerger dans les pays africains, les épisodes de FHD pourraient devenir plus fréquents. Les informations concernant la transmission du DENV sont très limitées en Afrique de l'Ouest, avec les enquêtes les plus approfondies en tant que résultat des cas liés aux voyages importés en Europe. En 2006, la dengue a été désignée maladie à déclaration obligatoire en France, et en 2 ans, 19 cas de FHD importés ont été signalés chez les voyageurs revenants d'Afrique de l'Ouest. Bien que les cas importés soient d'une source d'information non pertinente, ces cas sporadiques ne peuvent pas être utilisés pour estimer la transmission du DENV dans la région [4]. Une épidémie s'est déclarée en mai 2019 dans un pays d'Afrique de l'Ouest (Côte d'Ivoire), où 130 cas et deux décès ont été recensés [18].

3.1.4 Vecteur

La dengue est transmise à l'homme par la pique de moustiques infecté Aèdes. Le vecteur principal de DENV est l'*Ae. aegypti*, un anthropophile qui s'est extrêmement bien adapté à l'environnement urbain et qui se trouve à la fois à l'intérieur, à l'extérieur et à proximité des zones urbaines et peut y compléter son cycle de vie, il préfère se nourrir pendant la journée [19]. *Ae. aegypti* est un vecteur puissant du DENV en raison de sa préférence pour la ponte en milieu artificiel, piquant l'homme, et restant à l'intérieur des habitats, où il a accès à son hôte favori [20]. Le moustique semble suivre une adaptation à une vie urbaine croissante. Comme tous les diptères, les moustiques possèdent la particularité de vivre en milieu aquatique aux stades immature (larves puis nymphes), et aérien au stade adulte. Les larves se développent dans des habitats remplis d'eau, principalement dans des récipients artificiels étroitement associés à des habitations humaines [21]. D'après une étude menée dans des grandes villes de six pays d'Asie du sud-est en 2009, les sites de reproduction les plus productifs sont des conteneurs d'eau aux caractéristiques suivantes : localisés en plein air et non protégés, sous les arbustes et dans des récipients inutilisés pendant au moins une semaine. La production de nymphe se concentre majoritairement dans les zones péri- ou intra domestiques plutôt que dans les espaces publics et commerciaux [22]. Par rapport à *Ae. aegypti*, qui est le vecteur le plus important de la dengue, *Ae. albopictus* est un vecteur de second ordre des arbovirus et les épidémies qu'il cause sont plus légères. Cependant, *Ae. albopictus* devient un vecteur de plus en plus important en raison de sa distribution mondiale en rapide évolution [23]. Avant 1979, *Ae. albopictus* était trouvé que dans l'Asie et dans le Pacifique occidental, mais il s'est beaucoup répandu dans le reste du monde au cours des dernières décennies [24]. D'autres

espèces de moustiques sont aussi des vecteurs du virus de la dengue. Il s'agit par exemple d'*Ae.polynesiensis* et plusieurs espèces complexes d'*Ae.scutellaris*. Chaque espèce possède ses particularités en termes d'écologie, de mode de vie et de répartition géographique [21]. Ces moustiques piquent surtout le jour avec une activité maximale à l'aube.



Figure 2 : *Aedes aegypti*[25]



Figure 3 : *Aedes albopictus* (moustique tigre) [25]

3.1.5 Réservoir[26]

Les principaux réservoirs sont les moustiques (comme vecteurs, *Aedes spp.*), l'humain et certains primates. Les virus sont maintenus dans un cycle humain-moustique-humain (chez les moustiques : transmission trans-ovarienne et concentrations extrêmement élevées de particules infectieuses dans les glandes salivaires) dans les centres urbains tropicaux. Des cycles singe-moustique sont fréquemment observés dans les forêts de l'Ouest de l'Afrique et dans le Sud-Est de l'Asie

3.1.6 Agent pathogène[26]

Le virus de la dengue appartient au genre *Flavivirus*, de la famille des *Flaviviridae*. Il est étroitement lié phylogénétiquement à d'autres *Flavivirus* : le virus *Zika*, le virus de la fièvre jaune, le virus du Nil occidental et le virus de l'encéphalite japonaise. C'est un petit virus à ARN simple brin positif d'environ 11kb qui possède une coiffe en 5' mais pas de queue polyadénylée en 3'. Il possède également deux régions non-traduites en 3' et 5' ayant un rôle

clé dans la régulation de la traduction et la réplication. La traduction de l'ARN viral produit un polypeptide unique qui est co-traduit par des protéases virales et cellulaires, générant trois protéines de structure de la capsidie et sept protéines non structurales (PNS). Les protéines de structure sont la capsidie, la protéine associée à la membrane et la glycoprotéine de l'enveloppe [27].

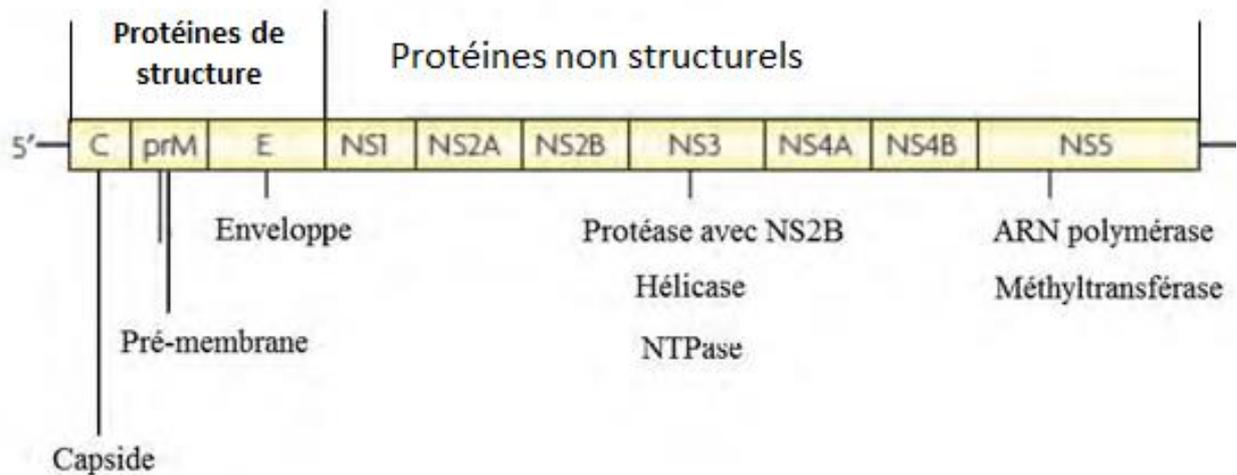


Figure 4 : L'ARN viral avec à gauche les protéines structurales et les protéines non structurales à droite [27]

Le virion de la dengue se compose d'un génome d'ARN monocaténaire entouré d'une nucléocapsidie icosaédrique ou isométrique d'environ 30nm de diamètre couvert par une enveloppe lipidique. Le virion complet mesure environ 50 nm de diamètre [28]. Comme les autres virus à ARN, le génome du virus de la dengue est en constante variation à cause de l'ARN polymérase qui n'a pas de mécanisme de vérification des erreurs lors de la réplication de l'ARN. Les nombreuses variations génétiques sont aussi causées par la réplication rapide du virus et la grande quantité de virus retrouvée dans le monde [29]. Il existe 4 sérotypes distincts du virus de la dengue (DEN1 à DENV4) impliqués dans le cycle humain. Ils diffèrent au niveau des acides aminés des protéines d'enveloppe virale de 25 à 40%. De plus, il existe une complexité supplémentaire car au sein d'un même sérotype on retrouve plusieurs génotypes qui varient jusqu'à 6% au niveau des nucléotides et 3% au niveau des acides aminés [27].

3.1.7 Transmission

La principale voie de transmission est celle par piqûre de moustiques porteurs du virus, principalement de l'espèce *Ae.aegypti*. La majorité des piqûres surviennent 2 heures après le lever du soleil et plusieurs heures avant le coucher du soleil.

A l'occasion d'un repas sanguin, le vecteur injecte la salive contenant des anticoagulants qui lui facilite l'alimentation. Les moustiques ont l'habitude de perturber le processus d'alimentation au moindre mouvement et ont tendance à se nourrir plusieurs fois par jour. Ils peuvent se nourrir sur plusieurs personnes au cours d'un seul repas de sang et peuvent transmettre la DENV à plusieurs personnes en peu de temps [30]. Après qu'une personne ait été piquée par un moustique infecté, le virus subit une période d'incubation de 3 à 5 jours environ, après quoi la personne piquée commence à faire de la fièvre accompagnée de divers signes et symptômes non spécifiques à la FHD et le DENV peut circuler dans le sang aussi longtemps que possible. Si d'autre *Ae.aegypti* piquent le patient pendant ce stade virémie fébrile, ils peuvent s'infecter et transmettre ensuite le virus à d'autres personnes non infectées[31], [32]. Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la dynamique de la transmission du virus, notamment : facteurs environnementaux et climatiques, interaction hôte pathogène et les facteurs immunologiques de la population. Dans la plupart des pays, la dengue présente un schéma saisonnier lié à la température et aux précipitations [33]. Le climat influence directement la biologie des vecteurs, leur abondance et leur distribution, ce qui a soulevé la question de savoir comment le virus hiverne ou persiste pendant les saisons sèches et froides. Une possibilité est qu'une population de moustiques infectés pourrait survivre pendant toute la période et introduire le virus au cours de la prochaine saison. Les moustiques Aedes restent infectés par le DENV et la plus longue durée de vie enregistrée à ce jour est de 174 jours, bien qu'un taux de survie plus typique soit de 1 à 2 semaines [34][35]. Une deuxième possibilité est de transmettre le virus à la prochaine génération de moustiques. La transmission verticale (transmission trans-ovarienne ou à l'œuf lors de la ponte) a été démontrée en laboratoire et dans la nature mais reste mal comprise pour le moment [36]. Certaines preuves montrent qu'*Ae. albopictus* est plus efficace à la transmission verticale qu'*Ae. aegypti*, ce qui en ferait un candidat pour le maintien du DENV au cours des périodes inter épidémique [37]. Ainsi, la transmission verticale du DENV chez les moustiques est possible, que le mécanisme soit véritablement trans-ovarienne ou qu'il s'agisse d'une infection de l'œuf mature au moment de la ponte (5)[35].

Toutefois, d'autres rares modalités de transmission ont été identifiées :

Transmission materno-foetale : passage transplacentaire lorsque l'infection survient au voisinage du terme de la grossesse, se traduisant par une infection congénitale. Ce moyen de transmission est relativement rare ;

Transfusion de sang ;

Greffe d'organes : 2 cas rapportés, une greffe rénale et une greffe de moelle osseuse.

3.1.8 Manifestation clinique[38]

La période d'incubation suite à une piqûre de moustique varie de 3 à 5 jours environ. En cas de DENV cliniquement apparent, l'infection est associée à une grande variété de symptômes. Des symptômes de dengue habituelle sont observés plus fréquemment chez l'adulte. Les signes cliniques commencent soudainement et s'accompagnent de trois phases différentes : une phase fébrile ; une phase critique durant laquelle survient une défervescence (moment où la fièvre est résolue) ; et une phase de rétablissement.

3.1.8.1 Phase fébrile

La phase fébrile est généralement caractérisée par de la fièvre ($\geq 38.5^{\circ}\text{C}$) accompagnée de maux de tête, de fatigue, myalgie, arthralgie, douleur rétro-orbitaire, nausées, vomissements, douleurs abdominales et parfois éruptions cutanées transitoires. Les manifestations hémorragiques légères telles que les pétéchies (taches cutanées de couleur rouge à violacées), les saignements gingivaux, et des ecchymoses spontanées peuvent également être observées à ce stade de la maladie. L'augmentation de la taille du foie (hépatomégalie) est parfois trouvée par l'examen physique ou par un outil de diagnostic tel que l'échographie [39]. Des pétéchies induites peuvent être observées pendant l'infection à DENV si on fait un test garrot positif. Cependant, un test de garrot positif n'est pas spécifique à l'infection par le DENV, car elle peut aussi être trouvée dans d'autres maladies comme l'infection à CHIKV. Les résultats de laboratoire comprennent une thrombocytopénie, leucopénie, qui peut s'accompagner d'un taux élevé d'enzymes hépatiques. Cette phase dure habituellement jusqu'à 7 jours et la majorité des patients se rétablissent sans d'autres complications. Pendant l'infection primaire, la durée de la fièvre se chevauche habituellement avec l'intervalle de virémie, alors qu'en cas d'infection secondaire, la virémie persiste habituellement pendant une période plus courte, 2-3 jours [40].



Figure 5 : Pétéchies sur l'avant-bras d'un patient atteint de dengue[41].

3.1.8.2 Phase critique

Dans une petite proportion de patients, principalement chez les enfants et les jeunes adultes, un syndrome de fuite vasculaire peut se développer au moment de la défervescence. Les résultats de laboratoire peu de temps avant ou pendant la fenêtre d'hyperperméabilité montrent habituellement une augmentation de l'hématocrite et un faible taux d'albumine sérique, qui confirment l'extravasation du plasma des vaisseaux sanguins dans les tissus [42]. Un choc se développe à la suite d'une fuite importante de plasma. Cette condition est caractérisée par une pression pulsatoire étroite (≤ 20 mmHg), ou une hypotension corrigée en fonction de l'âge (pression artérielle systolique ≤ 90 mmHg), plus un pouls rapide et faible avec une peau froide et moite. Sans traitement approprié, un état de choc profond peut s'installer, dans lequel la tension artérielle et le pouls deviennent indétectables, ce qui pourrait éventuellement conduire à la mort [43]. L'état de choc prolongé conduit généralement à une hypo-perfusion des organes, entraînant des déséquilibres hémostatiques, parfois un développement de coagulations intravasculaires disséminées (CIVD) et il en résulte une défaillance multi-viscérale [44]. Les manifestations hémorragiques majeures telles que des saignements des muqueuses gastro-intestinales sont couramment observés pendant le choc [45]. La thrombocytopénie modérée à grave est fréquente, avec un taux de plaquettes de nadir inférieur à $20,000/\mu\text{l}$ [46]. Dans une minorité de cas, d'autres manifestations graves peuvent être

observées, y compris une insuffisance hépatique, myocardite, pancréatite, rétinite, encéphalopathie, et syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Il est important de se rendre compte que certains patients passent à la phase critique sans éprouver de défervescence. Chez ces patients, les résultats de laboratoire doivent être utilisés pour définir la phase critique et guider le diagnostic des fuites plasmatiques et des fuites de plasma graves. L'examen radiologique donne une valeur significative pour établir les fuites plasmatiques [39].

3.1.8.3 Phase de rétablissement

Si un traitement de soutien est amorcé rapidement, l'augmentation de la perméabilité vasculaire dure généralement de 48 heures à 72 heures et une amélioration rapide de l'état du patient serait visible. Une réabsorption progressive du compartiment extravasculaire se poursuit habituellement pendant 48 à 72 heures. Si le traitement par les liquides est intensif, les patients peuvent développer des troubles cardiaques défailances ou détresse respiratoire due à une surcharge liquidienne. Une éruption convalescente peut également se développer à ce stade allant d'une éruption légère à une éruption cutanée plus sévère et démangeant, suggérant une leucocytose [3]. Certains patients peuvent développer de la fatigue pendant plusieurs semaines après la convalescence. Les résultats de laboratoire montrent habituellement des résultats faibles ou stables de taux d'hématocrite, probablement dus à l'effet dilutif du fluide réabsorbé. La concentration en globule blanc et celles des plaquettes commencent généralement à augmenter peu après la défervescence.

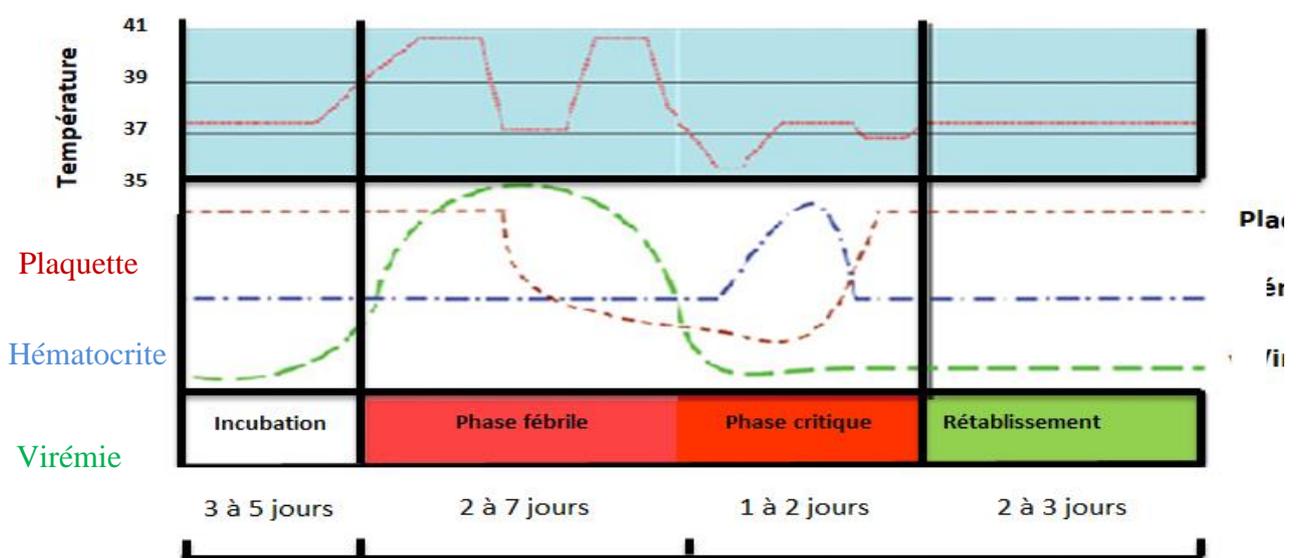


Figure 6 : Variation de la température, du taux de plaquettes, hémocrites et de la virémie pendant une infection à DENV[41]

3.1.8.4 Dengue primaire dengue secondaire

Le virus de la dengue appartient au genre *Flavivirus* de la famille des *Flaviviridae*. L'immunité contre un sérotype donné est définitive avec une réponse anticorps neutralisante. L'infection due à un sérotype n'induit cependant qu'une protection immunitaire croisée transitoire contre les autres sérotypes. Au contraire, une nouvelle infection avec un autre sérotype (dengue secondaire) pourrait être la cause d'une pathologie plus grave en raison d'un détournement des réponses immunitaires. On évoque un mécanisme de facilitation immunologique lié aux anticorps mais également à des réponses inappropriées. Lors d'une infection secondaire caractérisée par un contact avec un virus hétérologue, les IgG apparaissent plus précocement et leur taux croît progressivement durant environ deux semaines. Les IgM sont détectées à des taux plus faibles et dans certains cas peuvent être fugaces voire même absentes. D'une manière générale, le titre global en anticorps augmente très rapidement dès la phase aiguë de l'infection et ces anticorps présentent une réactivité croisée significative vis-à-vis d'autres antigènes de *Flavivirus*. L'émergence ou la réémergence d'un sérotype n'ayant pas circulé depuis plusieurs années peut être à l'origine d'une épidémie. Un individu peut en théorie contracter quatre fois la dengue, avec chacun des quatre sérotypes identifiés [47].

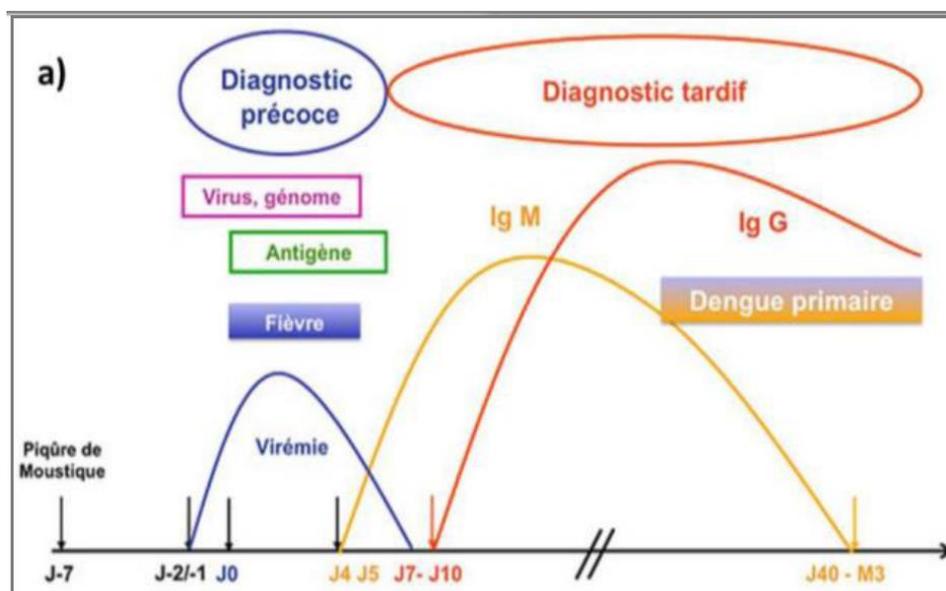


Figure 7 : Cinétique du virus et des anticorps de type IgM et IgG au cours d'une infection par DENV : cas d'une infection primaire[48]

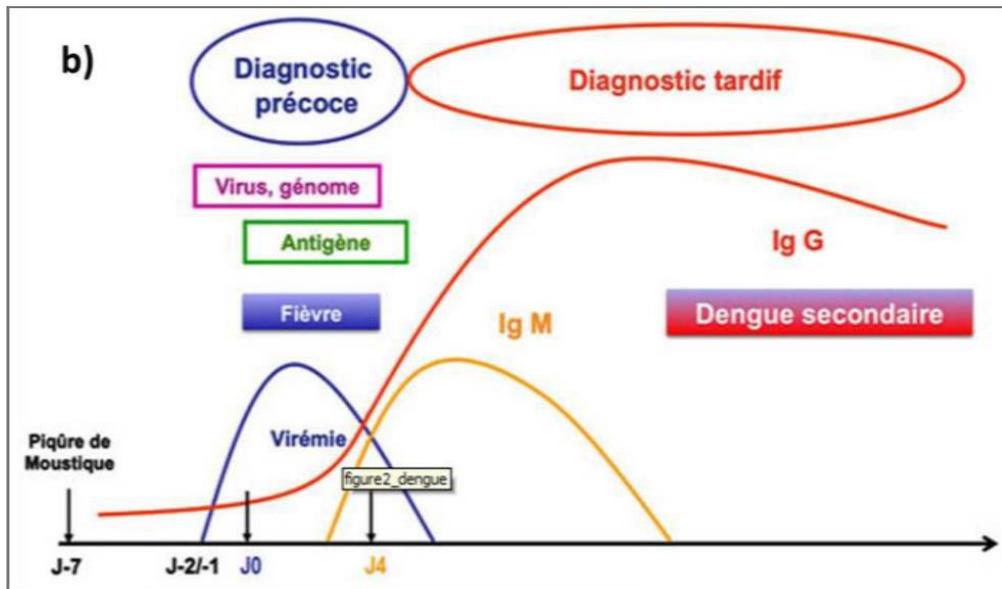


Figure 8 : Cinétique du virus et des anticorps de type IgM et IgG au cours d'une infection par DENV : cas d'une infection secondaire par un sérotype viral hétérologue[48]

3.1.9 Diagnostic biologique [49]

Le diagnostic biologique de la dengue fait appel à la détection du virus, de son génome ou d'antigènes viraux, constituant le diagnostic direct réservé au stade précoce de la maladie. La détection d'anticorps, ou diagnostic indirect, est quant à elle privilégiée à partir du 5e jour de la maladie

3.1.9.1 Diagnostic direct ou diagnostic précoce de la dengue

- Les méthodes moléculaires basées sur la RT-PCR ont contribué à améliorer le diagnostic de la dengue en phase symptomatique et ouvert la voie à la caractérisation des types de DENV, primordiale dans un but de surveillance épidémiologique plus qu'à des fins diagnostiques. L'isolement viral associé au séquençage permet de réaliser des études d'épidémiologie moléculaire utiles pour les autorités de santé et pour la compréhension de la circulation des souches de virus de la dengue.
- De récentes études sur la protéine non structurale 1 (NS1), spécifique de la dengue, ont mis en évidence de fortes concentrations sériques dans le sérum des patients infectés. En 2006, un premier test ELISA basé sur la détection de l'antigène NS1 par immuno-capture a été commercialisé. Ce test permet la mise en évidence de l'antigène

NS1 dans le sérum des patients dès l'apparition des premiers signes cliniques. Des tests rapides de type immuno-chromatographique (ICT) sous forme de bandelette rapide ou cassette ont récemment vu le jour, rendant encore plus accessible le diagnostic précoce de la dengue.

3.1.9.2 Diagnostic indirecte ou diagnostic sérologique

Le diagnostic sérologique de la dengue repose sur la détection d'IgM et d'IgG spécifiques en fonction de leur cinétique d'apparition au cours du temps. La détection des IgM met en oeuvre des techniques ELISA de type capture, celle des IgG utilise préférentiellement des techniques de type ELISA indirect.

3.1.10 Traitement

Officiellement il n'y a aucun vaccin ou traitement antiviral spécifique pour faire face à une menace croissante de la dengue. Seule une détection rapide et une gestion clinique appropriée peuvent réduire la mortalité due à la dengue sévère [50].

Néanmoins la guérison entraîne une immunité définitive contre le sérotype qui a provoqué l'infection mais ne confère qu'une immunité passagère et partielle contre les trois autres.

3.1.11 Prévention [51]

En tant que maladie causée par des moustiques, prévenir la dengue est aussi simple que de prévenir les piqûres de moustiques.

Plusieurs organisations de santé suggèrent ce qui suit pour vous protéger de la dengue :

- Porter des chandails (Vêtement à base de laine) à manches longues et des pantalons longs,
- Traiter les vêtements avec un répulsif comme le perméthrin,
- Utiliser un chasse-moustiques approuvé par l'EPA comme le DEET.
- Envisager l'utilisation de moustiquaire si vous prévoyez d'aller dans des régions qui ont beaucoup de moustiques.
- S'assurer que les moustiquaires et les fenêtres, les portes sont fermées pour éviter que les moustiques entrent dans des espaces confinés.
- Éviter les zones avec de l'eau stagnante. Spécialement dans les moments d'activité élevée des moustiques comme l'aube et le crépuscule.

D'autre part, un vaccin contre la dengue, Dengvaxia, a été approuvé pour utilisation dans certains pays. Ce vaccin contre la dengue a démontré son efficacité dans des tests menés en Asie et en Amérique Latine.

D'autres vaccins contre la dengue sont dans divers stades d'essais à travers le monde. Ceci inclut le DENVax (Phase II essais), TDENV PIV (Phase II étude) et V180 (Phase I stade).

METHODOLOGIE

4.1 Cadre et lieu d'étude

Le district de Bamako et le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux CICM ont constitués notre cadre d'étude. Le CICM est situé dans le quartier de l'ex- base aérienne de Bamako, rue du Docteur Charles Mérieux

Dans le cadre d'un projet de coopération, la Fondation Mérieux a choisi de créer à Bamako, un centre composé d'un laboratoire d'analyses médicales « le Laboratoire Rodolphe Mérieux » et d'un centre de formation. A la suite de la signature de l'Accord- cadre N° 0956/1899 du 18 février 2004 entre le Gouvernement de la République du Mali et la Fondation Mérieux ainsi que la Convention du 16 janvier 2005 et son Protocole annexe du 11 mai 2011 entre le Ministère de la Santé et la Fondation Mérieux

- 8 décembre 2003 : Création de la Fondation Mérieux Mali
- 15 janvier 2004 : Pose de la première pierre du CICM
- 17 janvier 2005 : Inauguration du CICM en présence de M. Alain Mérieux, Président de la Fondation Mérieux, de M. Amadou Toumani Touré, ancien Président de la république du Mali et de M. Pierre Messmer, ancien Premier ministre de la France.
- 2 mai 2005 : Démarrage des activités

Le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux est organisé en 5 unités disposées en 2 structures principales : le Laboratoire Rodolphe Mérieux et le Centre de formation.

Le laboratoire Rodolphe Mérieux

Le Laboratoire Rodolphe Mérieux est un laboratoire d'excellence nationale en biologie clinique.

Il est doté d'infrastructures et d'équipements lui permettant de réaliser des analyses biomédicales aux normes de qualité internationales et de faire de la recherche sur les maladies infectieuses à potentiel épidémique et les maladies émergentes.

Ces analyses comprennent :

- La microbiologie (avec tests d'identification et antibiogramme en bactériologie)
- La biochimie et l'immuno-analyse en mode automatisé
- Les examens en hémostase et en hémocytométrie
- Le contrôle de qualité et des évaluations externes de la qualité
- La biologie moléculaire (VIH, mycobactéries du complexe tuberculose et divers virus respiratoires, hémorragiques et hépatites).

Ces différentes activités sont réparties dans 3 espaces distincts : l'accueil du laboratoire, la salle de travail, et la salle de prélèvement.

Le laboratoire encadre également des étudiants de l'Université de Bamako et d'autres pays en stage et thèse.

Centre de formation

Le Centre de Formation du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux a pour objectif de renforcer les qualifications sur les techniques modernes de diagnostic biologique.

À vocation sous régionale, il permet aux scientifiques maliens et africains de disposer d'un centre de formation de proximité.

Le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux dispose d'infrastructures adaptées à différents types de formations :

- Une salle de conférence Youssouf Issabré de **50 places**
- Une salle de cours de **30 places**
- Une salle de cours paillote **25 places**
- Une salle de travaux pratiques microscopie de **20 places**
- Une grande salle multimédia

Le CICM dispose aussi d'un laboratoire BSL3 qui a été donné au Ministère Mali de la Santé et de l'Hygiène Publique par la Fondation Christophe et Rodolphe Mérieux et établi au CICM du Mali.

4.2 Type et période d'étude

Il s'agissait d'une étude de surveillance épidémiologique, transversale prospective qui s'est déroulée de Janvier 2019 à Décembre 2019, soit une année.

4.3 Population

Il s'agit de patients de tous les âges dont les prélèvements sanguins ont été envoyés au CICM par diverses structures sanitaires (Publique et Privés) et de patients adressés directement au CICM avec des symptômes évocateurs de la dengue.

4.4 Critères d'inclusion

- Donner son consentement écrit.
- Patients de tous les âges adressés au CICM avec des symptômes évocateurs de la dengue.
- Patients avec symptômes évocateurs de la dengue, envoyés par une structure sanitaire.

4.5 Critères de non-inclusion

- N'avoir pas donné son consentement écrit.
- Patients adressés au CICM pour autres diagnostics.

4.6 Echantillonnage

Les prélèvements sanguins ont été faits sur des tubes EDTA et gardés à +4⁰ C avant utilisation. Les patients de tout l'âge, provenant de différentes structures sanitaires Publics et privés du district de Bamako pour suspicion de Dengue étaient inclus dans cette étude.

4.7 Variables mesurées

Seulement les variables d'intérêts ont été mesurées dans cette étude :

- Les variables se rapportant au virus (CT= cycle threshold).
- Les variables sociodémographiques notamment l'Age, le sexe, la provenance.

4.8 Saisie et analyse des données

La saisie et l'analyse des données ont été faite sur le logiciel "IBM SPSS V 21.0", ensuite les tableaux ont été édités sur le logiciel "Microsoft Excel 2016". Pour la comparaison des

données, le test de khi2 et test exact de Fischer ont été utilisés et le seuil de signification fixé à p inférieur à 0,05.

4.9 Méthode d'étude

- Prélèvement des échantillons

Les prélèvements sanguins ont été faits sur des tubes EDTA (au moins 1.5ml) afin d'obtenir le plasma qui était ensuite gardés à 4⁰ C avant utilisation.

- Inactivation

Après le prélèvement, les échantillons de sang étaient reçus et immédiatement placés dans une boîte à gant. Cette inactivation était effectuée pour les échantillons à forte suspicion de fièvre hémorragique

1. Disposer le tube Eppendorff de 1,5ml contenant 560µl d'AVL + 5,6 µl de ARN carrier dilué.
2. Ajouter délicatement 50 µl de sang prélevé au tube contenant le mélange AVL+ ARN Carrier dilué.
3. Mélanger au vortex et centrifuger 30s avec la micro-centrifugeuse placée dans la boîte à gant. 4. Laisser incuber pendant 10mn à la température de la boîte à gants.
5. Ajouter 560 µl d'éthanol.

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

Aussi le test de diagnostic rapide a été réalisé dans la boîte à gant.



Figure 9 : Boite à gant pour inactivation des échantillons [52].

- **Extraction des acides nucléiques**

Après inactivation, le contenu du tube Eppendorff est totalement extrait. Pour les échantillons de plasma non inactivés, la procédure est la suivante :

Ce protocole est pour la purification de l'ARN viral à partir de 140 μ l de plasma à l'aide d'une micro-centrifugeuse

1. Pipeter 560 μ l de tampon AVL préparé contenant l'ARN porteur dans une micro centrifugeuse de 1,5 ml. Tube.

Remarque : si le volume d'échantillon est supérieur à 140 μ l, augmentez la quantité de tampon AVL – porteur ARN proportionnellement (par exemple, un échantillon de 280 μ l nécessitera 1 120 μ l d'ARN tampon AVL-porteur) et utilisez un tube plus grand

2. Ajouter 140 μ l de plasma au tampon ARN carrier-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 soigneusement mélangé avec le tampon AVL pour obtenir une solution homogène. Les

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 terminée après la lyse pendant 10 min à température ambiante. De long temps d'incubation n'ont aucun effet sur le rendement ou la qualité de l'ARN purifié.

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

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

Remarque : N'utilisez que 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 μ l, augmentez la quantité de l'éthanol proportionnellement (par exemple, un échantillon de 280 μ l nécessitera 1 120 μ l d'éthanol). Il est essentiel que l'échantillon soit bien mélangé avec l'éthanol pour donner une solution homogène.

6. Appliquez soigneusement 630 μ l de la solution de l'étape 5 sur la colonne (dans un tube de prélèvement) sans mouiller la jante. Fermer le capuchon et centrifuger à 6000 x g (8000 tr / min) pendant 1 min. Placez la colonne dans un tube de prélèvement propre de 2 ml, et jetez le tube contenant le filtrat.

Remarque : Fermez chaque colonne de centrifugation pour éviter toute contamination croisée pendant la centrifugation. Celle-ci est effectuée à 6000 x g (8000 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, centrifuger à nouveau à une vitesse jusqu'à ce que toute la solution soit passée.

7. Ouvrez soigneusement la colonne et répétez l'étape 6. Si le volume d'échantillon était supérieur à 140 μ l, répétez cette étape jusqu'à ce que tout le lysat ait été chargé sur le spin colonne.

8. Ouvrez soigneusement la colonne et ajoutez 500 µl de tampon AW1. Fermez le bouchon, et centrifuger à 6000 x g (8000 tr / min) pendant 1 min. Placez la colonne dans un 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 140 µl.

9. Ouvrez soigneusement la colonne et ajoutez 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 l'étape 11 ; ou pour éliminer le report éventuel du tampon AW2, effectuez l'étape 10 puis passez à l'étape 11.

Remarque : le tampon résiduel AW2 dans l'éluant peut causer des problèmes en aval. Certains rotors de centrifugeuse peuvent vibrer lors de la décélération, entraînant un écoulement à travers, contenant le tampon AW2, en contactant la colonne. Le retrait de la colonne et du tube de prélèvement du rotor peut également traverser pour entrer en contact avec la colonne. Dans ces cas, l'étape facultative 10 doit être effectuée.

10. Recommandé : Placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement de 2 ml (non fourni) et jetez l'ancien tube de prélèvement avec le filtrat. Centrifuger à pleine vitesse pour 1 minute.

11. Placer la colonne dans un tube de micro centrifugeuse propre de 1,5 ml (non fourni). Jeter l'ancien tube de prélèvement contenant le filtrat. Ouvrez soigneusement la colonne et ajouter 60 µl de tampon AVE équilibré à température ambiante. Fermez le capuchon et incubé à température ambiante pendant 1 min.

12. Centrifuger à 6000 x g (8000 tr / min) pendant 1 min.

Une seule élution avec 60 µl de tampon AVE suffit pour éluer au moins 90% de l'ARN viral de la colonne. La réalisation d'une double élution en utilisant 2 x 40 µl de tampon AVE augmentera le rendement jusqu'à 10%. L'élution avec des volumes inférieurs à 30 µl conduira à des rendements réduits et n'augmentera pas la concentration finale d'ARN dans l'éluant. L'ARN viral est stable jusqu'à 1 an lorsqu'il est conservé entre -30 et -15 ° C ou entre -90 et -65 ° C.

- **Amplification et RT-qPCR Dengue.**

Définition :

En 1983, Karry Mullis met au point la technique d'amplification des acides nucléiques :

la RT-qPCR (Polymérase Chain Réaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne). C'est une réaction enzymatique qui permet de sélectionner puis d'amplifier en une très grande quantité un fragment d'acide nucléique particulier, présent en très faible quantité au départ, parmi des millions d'autres fragments. Aujourd'hui c'est une technique incontournable et couramment utilisée en routine dans les laboratoires.

Principe

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

Réaction RT-qPCR

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

a. La dénaturation :

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

b. L'hybridation :

A cette phase, la température chute de 95°C pour atteindre la température dite d'hybridation. Cette dernière est généralement comprise entre 50°C et 60°C et est fonction de la composition en désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et Dctp) des amorces. Les amorces reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogène. On dit que les amorces s'hybrident au brin d'ADN.

c. L'élongation :

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

Cette étape permet à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. Au cycle suivant, les nouveaux fragments synthétisés servent à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux fragments d'ADN.

En théorie, à la fin de chaque cycle la quantité d'ADN cible est doublée. Cela pourrait se reproduire 30 fois (en fonction du protocole de RT-qPCR).

Sérotypage

Le sérotypage (anciennement, sérogroupage ou sérotypie) est une technique immunologique consistant à la mise en évidence d'antigènes structuraux bactériens ou viraux permettant le diagnostic de sérovars (ou sérogroupes, ou encore sérotypes).

Le sérotypage de notre étude a été faite par l'Institut de microbiologie de la Bundeswehr (l'armée nationale de la République fédérale d'Allemagne).

- **TDR Dengue**

Réalisé dans la boîte a gant.

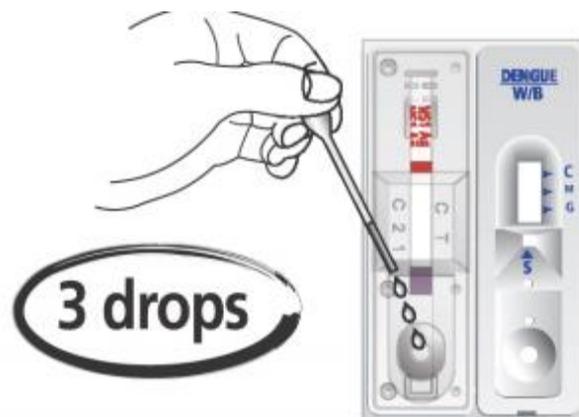
Procédure de test :

Laisser toutes les composants du kit et les échantillons atteindre la température ambiante (entre 15 et 30°C) avant d'ouvrir le kit et de procéder au test.

Retiré le dispositif de test de l'emballage en aluminium et les placer sur une surface plane et sèche. Étiqueter le dispositif de test avec un identifiant patient. Effectuer le test immédiatement pour éviter d'exposer le dispositif de test à l'humidité.

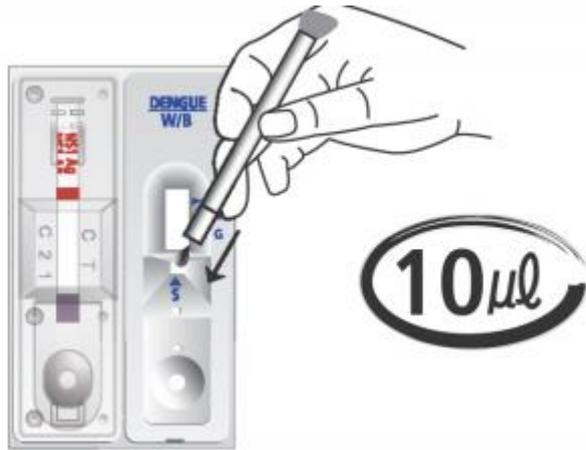
Test Dengue NS1

À l'aide du compte-goutte jetable fourni, déposez 3 gouttes (environ 100 µl) d'échantillon dans le puits d'échantillon S.



Test Dengue IgG/IgM

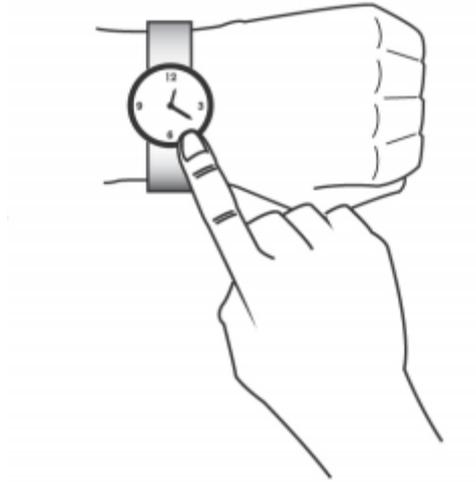
Avec la pipette de 10µl fournie, prélever l'échantillon jusqu'au trait noir puis déposer l'échantillon prélevé dans le puits d'échantillon carré S



Ensuite déposer 4 gouttes (environ 90-120µl) de diluant dans le puits de diluant rond.



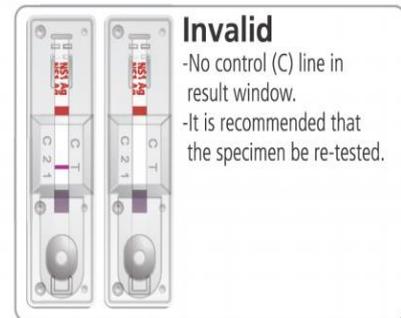
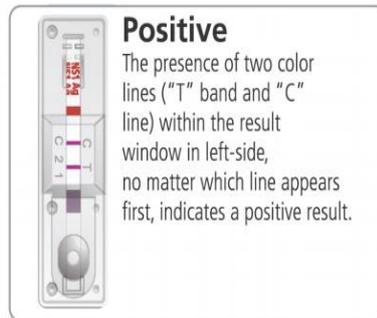
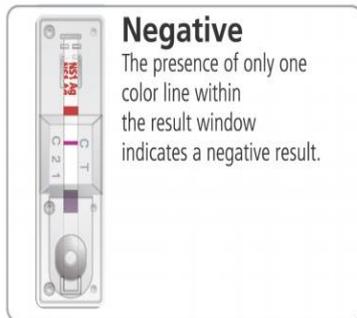
Interpréter les résultats du test au bout de 15 à 20 minutes.



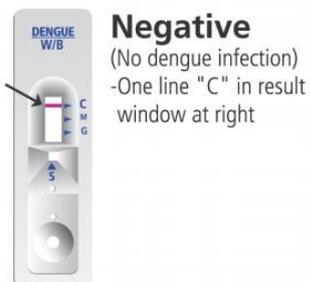
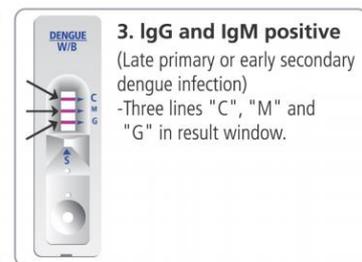
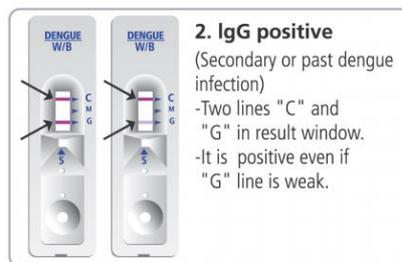
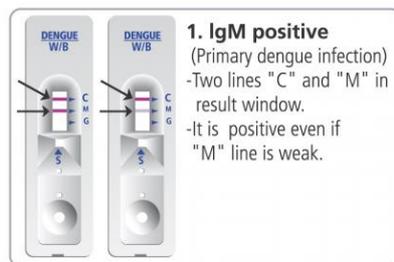
Mise en garde : Ne pas lire les résultats au-delà de 20 minutes ; une lecture après 20 minutes peut donner des résultats erronés.

Interprétation du test :

Dengue NS1 Ag



Dengue IgG/IgM



Pour plus de détails, voir annexe.

4.10 Considération éthiques

Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de la Faculté de Pharmacie de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako.

RESULTATS

La méthodologie nous a permis d'obtenir les résultats suivants

5.1 Sociodémographiques :

Tableau I : Répartition des patients selon le sexe.

Sexe	Effectifs	Pourcentage
Masculin	77	55,8
Féminin	61	44,2
Total	138	100

Le genre masculin était prédominant avec 55,8 % des cas.

Tableau II : Répartition des patients suspects selon les classes d'âge.

Classes d'âge (années)	Effectifs	Pourcentage
[0-5]	15	10,9
[6-10]	12	8,7
[11-18]	20	14,5
[19-30]	24	17,4
[31-40]	21	15,2
[41-60]	28	20,3
[61 et Plus[18	13
Total	138	100

La classe d'âge [41-60] était majoritaire avec 20,3% des cas, suivis de la classe [19-30] avec 17,4%. La classe d'âge [6-10] et celle de [0-5] étaient minoritaires avec respectivement 8,7% et 10,9%.

Tableau III : Répartition de la population d'étude en fonction de la classe d'âge et du sexe.

Classes d'âge (année)	Sexe		Total
	Masculin	Féminin	
[0-5]	9	6	15
[6-10]	5	7	12
[11-18]	16	4	20
[19-30]	13	11	24
[31-40]	11	10	21
[41-60]	15	13	28
[61 et Plus[8	10	18
Total	77	61	138

Chez le genre masculin, les classes d'âge [11-18] et [41-60] étaient les plus représentées. Alors que chez le genre féminin les classes d'âge [41-60] et [11-18] étaient les plus représentées.

Tableau IV: Répartition des patients selon leurs provenances.

Provenances des patients	Effectifs	Pourcentage
Commune I	2	1,4
Commune II	7	5,1
Commune III	7	5,1
Commune IV	42	30,4
Commune V	28	20,3
Commune VI	43	31,2
Autres localités	2	1,4
Non précise	7	5,1
Total	138	100

Les patients en provenance de la commune **VI** étaient prédominants avec 31,2 % suivis de ceux de la commune **IV** avec 30,4%.

NB : “Autres localités” regroupe les patients en provenance des villes périphériques de Bamako. Et “Non précise” regroupe les patients sur lesquelles on n’avait pas information sur leurs localités.

5.2 Résultats biologiques :

5.2.1 Résultats de la RT-qPCR

Tableau V : Fréquence de la dengue dans les échantillons par la RT-qPCR.

Résultat du RT-qPCR	Effectifs	Pourcentage
Positif	34	24,6
Négatif	104	75,4
Total	138	100

Sur les 138 cas diagnostiqués, 34 étaient positifs à la RT-qPCR soit 24,6% des échantillons.

Dans notre étude, on a puis faire le sérotypage 28 échantillons sur les 34 positifs à la RT-qPCR.

Tableau VI : Répartition des échantillons selon les sérotypes de la dengue.

Dengue				Total
Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	
12	12	4	0	28

Ainsi après le sérotypage, la dengue de type 1 et 2 étaient les plus représentées avec respectivement 12 cas chacun et 4 cas de dengue type 3.

Tableau VI : Répartition des cas de dengue diagnostiquée par la RT-qPCR selon le sexe.

Sexe	Dengue		Total
	Positif (%)	Négatif	
Masculin	19 (55,9)	58	77
Féminin	15 (44,1)	46	61
Total	34 (100,0)	104	138

(p=0,9)

Sur les 34 cas positifs à la RT-qPCR, 19 étaient du genre masculin soit 55,9%. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les genres et les résultats du RT-qPCR. (p>0,05).

Tableau VII : Répartition des cas de dengue diagnostiquée par la RT-qPCR selon les classes d'âge.

Classes d'âge (année)	Résultats du RT-qPCR		Total
	Positif (%)	Négatif	
[0-5]	5 (14,7)	10	15
[6-10]	5 (14,7)	7	12
[11-18]	2 (5,9)	18	20
[19-30]	10 (29,4)	14	24
[31-40]	6 (17,6)	15	21
[41-60]	3 (8,8)	25	28
[61 et Plus]	3 (8,8)	15	18
Total	34 (100)	104	138

(p=0,054)

Sur les cas positifs à la RT-qPCR, les classes d'âge [19-30] et [31-40] étaient les plus représentées avec respectivement 29,4% et 17,6% des cas. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les classes d'âge et les résultats du RT-qPCR. (p>0,05).

Tableau VIII : Répartition des cas de dengue diagnostiquée par la RT-qPCR selon la provenance des échantillons.

Provenances des patients	Résultat du RT-qPCR		Total
	Positif (%)	Négatif	
Commune I	1 (2,9)	1	2
Commune II	0 (0,0)	7	7
Commune III	0 (0,0)	7	7
Commune IV	8 (23,5)	34	42
Commune V	5 (14,7)	23	28
Commune VI	18 (52,9)	25	43
Autres localités	2 (5,9)	0	2
Non précise	0 (0,0)	7	7
Total	34 (100,0)	104	138

(p=0,003)

Les patients en provenance de la commune VI étaient les représentés avec 52,9% des cas, suivis de ceux de la commune IV avec 23,5% des échantillons positifs à la RT-qPCR. Il y'a une différence statistiquement significative entre les provenances des patientes les résultats du RT-qPCR. (p<0,05)

5.2.2 Résultats de la sérologie

5.2.2.1 TDR Dengue NS1_Ag :

Tableau IX : Fréquence de détection de l'antigène NS1 dans les échantillons testés.

	Effectifs	Pourcentage
Positif	27	71
Négatif	11	29
Total	38	100

L'antigène NS1 a été détecté dans 27 échantillons soit 71% des échantillons tester.

Tableau X : Répartition des échantillons positifs à l'antigène NS1 selon le sexe.

Sexe	Résultat TDR NS1_Ag		Total
	Positif (%)	Négatif	
Masculin	17 (63,0)	5	22
Féminin	10 (37,0)	6	16
Total	27 (100,0)	11	38

(p=0,32)

L'antigène NS1 a été détecté en majorité chez le genre masculin avec 17 cas soit 63% des échantillons positifs au TDR Dengue NS1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les genres et les résultats du TDR. ($p > 0,05$).

Tableau XI : Répartition des échantillons positifs à l'antigène NS1 selon les classes d'âge.

Classes d'âge (année)	Résultat TDR NS1_Ag		Total
	Positif (%)	Négatif	
[0-5]	2 (7,4)	3	5
[6-10]	5 (18,5)	1	6
[11-18]	1 (3,7)	1	2
[19-30]	8 (29,6)	1	9
[31-40]	6 (22,2)	1	7
[41-60]	2 (7,4)	2	4
[61 et Plus [3 (11,1)	2	5
Total	27 (100,0)	11	38

(p=0,33)

L'antigène NS1 a été détecté en majorité chez les patients des classes d'âge [19-30] et [31-40] avec respectivement 8 cas soit 29,6% et 6 cas 22,2%. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les classes d'âge et les résultats du TDR. (p>0,05).

Tableau XII : Fréquence de détection de l'antigène NS1 dans les échantillons testés selon les communes.

	Résultat TDR NS1_Ag		Total
	Positif (%)	Négatif	
Provenances des patients			
Commune I	1 (3,7)	0	1
Commune IV	7 (25,9)	4	11
Commune V	3 (11,1)	4	7
Commune VI	14 (51,9)	3	17
Autres localités	2 (7,4)	0	2
Total	27 (100,0)	11	38

(p=0,30)

L'antigène NS1 a été détecté en majorité chez les patients de la Commune VI avec 14 cas soit 51,9% suivis de ceux de la Commune IV avec 7 cas soit 25,9% des échantillons positifs au TDR Dengue NS1_Ag. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les provenances des patients et les résultats du TDR. (p>0,05).

5.2.2.2 TDR Dengue IgG/IgM

Selon le manuel du Kit "SD Dengue Duo" pour les périodes de stockage supérieur à 2 semaines, la congélation à une température inférieure à -20°C est obligatoire. Les échantillons doivent être ramenés à température ambiante entre 15 à 30°C avant utilisation.

Dans notre étude, les échantillons de plasma ont été conservé a environ -80°C. Pour faire le TDR, on les a ramenés à une température de 15 à 30°C. Mais tous les TDR Dengue IgG/IgM étaient négatifs.

5.3 Concordance des résultats du TDR Dengue NS1 selon la RT-qPCR

Tableau XIII : Répartition des résultats du TDR Dengue NS1 selon la RT-qPCR.

RT-qPCR	Résultat TDR NS1_Ag		Total
	Positif (%)	Négatif (%)	
RT-qPCR Positif	27 (100,0)	5 (45,5)	32
RT-qPCR Négatif	0	6 (54,5)	6
Total	27 (100,0)	11 (100,0)	38

(p=0,005)

Sur les 27 échantillons positifs au TDR Dengue NS1_Ag, tous étaient positifs à la RT-qPCR. Aussi 6 des 11 cas négatifs au TDR Dengue NS1_Ag étaient négatifs à la RT-qPCR.

Ainsi la RT-qPCR et le TDR Dengue NS1_Ag étaient concordants sur 33 échantillons dont 27 positifs et négatifs. Il existe une relation statistiquement significative entre les résultats du RT-qPCR et ceux du TDR. (p=0,05).

Tableau XIV : Répartition des concordances selon le sexe.

Sexe	Concordances aux tests		Total
	Positif (%)	Négatif	
Masculin	17 (63,0)	3	20
Féminin	10 (37,0)	3	13
Total	27 (100,0)	6	33

(p=0,56)

Sur les 27 positifs à la RT-qPCR et au TDR Dengue NS1_Ag, 17 étaient du genre masculin soit 63,0% (17/27). Il n'y a pas de différence statistiquement significative les concordances aux deux tests, quant à la distribution des patients selon le sexe. (p>0,05).

Tableau XV : Répartition des concordances selon les classes d'âge.

Classes d'âge (année)	Concordances aux tests		Total
	Positif (%)	Négatif	
[0-5]	2 (7,4)	1	1
[6-10]	5 (18,5)	1	1
[11-18]	1 (3,7)	0	1
[19-30]	8 (29,6)	0	7
[31-40]	6 (22,2)	1	7
[41-60]	2 (7,4)	1	3
[61 et Plus [3 (11,1)	2	4
Total	27 (100,0)	6	24

(p=0,47)

Sur les 27 positifs aux deux tests, les classes d'âge [19-30] et [31-40] étaient les plus représentées. Il n'y a pas de différence statistiquement significative des concordances aux deux tests, quant à la distribution des patients selon les classes d'âges. ($p > 0,05$).

Tableau XVI : Répartition des concordances selon les provenances.

Provenances des patients	Concordances aux tests		Total
	Positif (%)	Négatif	
Commune I	1 (3,7)	0	1
Commune IV	7 (25,9)	4	11
Commune V	3 (11,1)	2	5
Commune VI	14 (51,9)	0	14
Autres localités	2 (7,4)	0	2
Total	27 (100,0)	6	33

($p = 0,054$)

Sur les 27 positifs aux deux tests, la commune VI était la plus représentée. Il n'y a pas de différence statistiquement significative des concordances aux deux tests, quant à la distribution des patients selon leur provenance. ($p > 0,05$).

DISCUSSION

Les virus de la dengue (DENV) sont endémiques dans plus de 100 pays à travers le monde, et chaque année 50 à 100 millions de personnes sont infectées par l'un des quatre sérotypes de DENV, alors que plus de 2,5 milliards de personnes sont à risque d'infection. Les pays d'Afrique de l'Ouest ne disposent pas de la surveillance nécessaire pour déterminer l'incidence réelle de la dengue ; par conséquent, cette maladie est considérablement sous-estimée. Au Mali, plus de 14 millions de personnes sont potentiellement à risque de contracter une infection par la dengue.

La dengue est aujourd'hui considérée comme une maladie ré-émergente. Son incidence a progressé de manière spectaculaire dans le monde entier au cours des dernières décennies. Le nombre réel de cas est sous-notifié et de nombreux cas ne sont pas correctement classés surtout en Afrique et particulièrement au Mali où la population est confrontée à de nombreux problèmes de santé liés à la pauvreté, la malnutrition, le manque d'hygiène, d'assainissement et surtout par le manque de moyens limités d'outils de diagnostics. Ses indicateurs de santé et de développement sont parmi les plus bas au monde.

En octobre et novembre 2008, le Mali a connu une flambée de plus de 70 cas de FHD avec à la fois au moins 2 morts suspectées de (FHD). D'après les informations sur les voyageurs, le foyer aurait été causé par le DENV2. Au fur et à mesure que des sérotypes du DENV continuent d'émerger dans les pays africains, les épisodes de (FHD) pourraient devenir plus fréquents.

Ainsi ces observations nous amenés à entreprendre cette étude durant laquelle on a prélevé 138 échantillons de sang sur des hommes, des femmes et des enfants âgées de 6 mois à 86 ans en provenance de toutes les communes de Bamako et environ, de Janvier 2019 à Décembre 2019.

L'objectif général était de d'évaluer la prévalence de la dengue dans le district de Bamako.

6.1 Données sociodémographiques

Selon le sexe

Dans notre étude le genre masculin était majoritaire avec 77 individus sur les 138 soit 55,8%.

Par ailleurs une étude prospective transversale menée par Kodio PA au CICM de Bamako de mars 2016 à février 2017 sur des échantillons en provenance de deux hôpitaux de Bamako

chez les enfants de 1 à 14 ans, le genre féminin était le plus observé avec 273 individus soit 59,7%(273/457)[52].

Dans une étude descriptive de l'épidémie de la dengue dans la commune de Sadiola district sanitaire de Kayes (MALI) en 2010, menée par Mariko Y, le genre masculin était le plus représenté avec 75% de la population étudiée[53].

En 2016 dans une étude sur la prévalence de la dengue faite au Burkina Faso par Tarnagda Z et al, le genre masculin était majoritaire avec 24 individus soit 68,6%[54].

Dans une autre étude faite au Burkina par Lim JK entre décembre 2014 et février 2017, le genre féminin était majoritaire avec 2028 individus soit 69,2%.[55].

Selon l'âge

Dans notre étude la classe d'âge [41-60] était la plus représentées avec 28 individus soit 20,3%, suivie de la classe [19-30] avec 24 individus soit 17,4%.

Dans une étude descriptive de l'épidémie de la dengue dans la commune de Sadiola, la classe d'âge [26-35] était la plus représenté avec 48,6%[53].

Dans l'étude de Tarnagda Z et al, la classe d'âge [20-40[était majoritaire avec 17 individus soit 48,6%[54].

Celle de Lim JK et al, la classe d'âge [20-40[était majoritaire avec 1574 individus soit 53,7%[55].

Selon une revue publiée en 2014 par Verhaegen LM et al, la grande majorité des cas de dengue survient chez les enfants de moins de 15 ans [56]. Aussi selon une étude faite au Brésil, la survenue d'une dengue sévère est affiliée au fait d'avoir moins de 10 ans[57]. Une étude de trois ans menée auprès de patients hospitalisés DENV au Nicaragua a révélé que les nourrissons et les enfants âgés de 4 à 6 ans étaient plus susceptibles de développer une maladie grave que les adultes. De même, une étude cubaine a rapporté que les infections secondaires à DENV chez les enfants âgés de 3 à 15 ans étaient de 14,5 fois plus susceptibles d'être mortelles que les infections secondaires chez les adultes âgés de 16 à 39 ans[58]. Dans

les zones hyper-endémiques d'Asie, la dengue hémorragique (FHD) touchent principalement les enfants de moins de 15 ans [59].

Dans notre étude les enfants et les adolescents de moins de 19 ans constituaient une grande majorité des cas positifs.

6.2 Données biologiques

Selon la RT-qPCR

Notre étude a permis de diagnostiquer 34 cas de dengue sur 138 échantillons. Parmi ces cas de dengue le genre masculin et la classe d'âge [19-30] suivie de la classe [31-40ans] étaient les plus observés avec respectivement 55.9%, 29.4% et 17.6%.

L'étude de Kodio PA, *et al*, a révélé 1 cas de dengue sur 457 échantillons testés soit 0,21%[52]. Ceci s'explique peut-être par le nombre limité de lieux de provenances (2 hôpitaux) et aussi le nombre limité de la population étudiée (enfants de 1 à 14 ans).

L'étude de Mariko Y, *et al*, a révélé que sur 109 cas notifié, 6 cas furent confirmé par un laboratoire soit 5,50% (6/109)[53].

Celle de Lim JK, *et al*, a mis en évidence 740 cas de dengue par RT-qPCR sur 2929 échantillons soit 25,2%. Sur les 740 positifs, 62.8% étaient du genre féminin et 55.3% étaient de la classe d'âge [20-40] [55].

L'étude de Tarnagda Z, *et al*, a confirmé 19 cas de dengue par RT-qPCR sur 35 échantillons soit 54,3%[54].

Selon la TDR 'SD Dengue NS1'

Dans notre étude l'antigène NS1 a été détecté dans 27 échantillons sur 38 testés, dont le genre masculin et la classe d'âge [19-30] étaient les plus représentés.

L'étude de Lim JK, *et al*, a diagnostiqué 316 cas sur 2929 soit 11%[55].

Celle de Tarnagda Z *et al*, 31 cas dengue par TDR[54].

Selon les sérotypes

Les sérotypes DENV1 et DENV2 étaient les plus observés dans notre étude avec 12 cas chacun. DENV2 était majoritaire dans cas observés par Lim JK *et al* [55], alors celle de Tarnagda Z[54] comptait 11 cas de DENV2.

Les insuffisances de notre étude

- On a pu faire le TDR de seulement 38 échantillons sur les 138.
- On n'avait pas d'information sur les paramètres hématologiques.
- On n'avait pas d'information sur la provenance de certains patients, car une grande majorité de nos prélèvements dans d'autres structures.
- On n'avait pas d'information sur les paramètres hématologiques de nos patients.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1 CONCLUSION

Notre étude confirme que la dengue circule bien au Mali. Elle a permis diagnostiquer, 34 cas de dengue par RT-qPCR sur 138 échantillons soit 24,6% et 27 cas de dengue par TDR Dengue NS1_Ag sur 38 des échantillons soit 71%.

La RT-qPCR et le TDR Dengue NS1 avaient 27 cas positifs en commun dont le genre masculin, les patients en provenance de la commune VI et la classe d'âge 19-30 ans étaient les plus représentés. Aussi les sérotypes 1 et 2 ont été les plus diagnostiqués avec 12 cas chacun.

Ainsi, notre étude montre la nécessité de mettre en place une surveillance accrue de la dengue à Bamako en particulier et plus généralement au Mali.

7.2 RECOMMANDATIONS :

Aux autorités :

- Mettre en place un programme de surveillance de la dengue au Mali ;
- Faire des opérations de fumigations ;
- Faire des investigations et la prise en charge des cas ;
- Renforcé la surveillance épidémiologique sur toute l'étendue du territoire national ;
- Informé et sensibilisé la population sur les mesures de préventions de la maladie ;

A la population :

- Utiliser des moustiquaires imprégnées d'insecticides, les crèmes répulsives, le port d'habits amples et à manches longues pour éviter les piqûres de moustiques ;
- Assainissement de l'environnement (l'hygiène et la salubrité quotidienne, le désherbage, la destruction des sources d'eaux stagnantes, la pulvérisation domiciliaire, des espaces verts).

Aux personnels de santé et chercheurs

- Respecter les règles de biosécurité et de bio sûreté dans leurs pratiques quotidiennes car ils peuvent être confrontés à ces pathogènes. Adresser tous les prélèvements suspects aux laboratoires de référence de ces pathogènes ;
- Améliorer leur pratique de prise en charge des syndromes fébriles en intégrant les infections virales émergentes ;
- Déclarer rapidement tous les cas suspects de FHV à la division épidémiologique ;
- Lorsque quelqu'un manifeste les signes qui ressemblent à la dengue, il faut éviter l'automédication parce qu'il a été scientifiquement reconnu que certains médicaments contre la fièvre (Aspirine et AINS) peuvent précipiter le saignement dans le cas de la dengue. Ce qu'on peut conseiller aux malades de la dengue, c'est de boire beaucoup d'eau, de se reposer et de s'adresser à une structure sanitaire qui va prescrire des médicaments appropriés pour traiter les symptômes.

FICHE SIGNALITIQUE

Nom : TRAORE

Prénom : Boubacar Sidiki

Email : boubacarsidikitraore32@gmail.com

Contact : (+223) 72552507 / 89310919

Titre de la thèse : SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE DE LA DENGUE AU
CENTRE D'INFECTIOLOGIE CHARLES MERIEUX DE JANVIER A DENCEMBRE
2019

Nationalité : Malienne

Année **universitaire** : 2020-2021

Ville de soutenance : Bamako

Date de soutenance : ..-03-2021

Section : Pharmacie

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'odontostomatologie et de la
Faculté de Pharmacie du Mali.

RESUME

Introduction & Objectifs :

Les infections de la dengue en Afrique sont largement non quantifiées, aussi des flambées récentes suggèrent que la dengue pourrait devenir plus fréquent dans les parties subsahariennes du continent. Le Mali avec ces nombreux problèmes de santé liés à la pauvreté, la malnutrition, le manque d'hygiène, d'assainissement et surtout par des moyens limités d'outils de diagnostics a récemment eu des cas de dengue (UCRC). L'urbanisation anarchique créant les conditions d'une émergence et d'une propagation de la dengue, la fréquence des cas de dengue dans les pays voisins, incite à mettre en place une surveillance de cette maladie. C'est pourquoi nous avons conduit cette étude dans le but d'évaluer la prévalence de la dengue dans le district sanitaire de Bamako et environ.

Matériels et Méthode :

Nous avons effectué une étude transversale qui s'est déroulée durant 12 mois (de janvier à décembre 2019). Un total de 138 patients (hommes, femmes et enfants), âgés de 6mois à 86 ans en provenance des communes de Bamako et environs ont été inclus. La saisie et l'analyse des données ont été faite sur le logiciel "IBM SPSS Statistics 21.0", ensuite les tableaux ont été édités sur le logiciel "Microsoft Excel 2016". Pour la comparaison des données, le test de khi2 a été utilisé et le seuil de signification fixé à P inférieur à 0,05. Les échantillons étaient inactivés dans une boîte à gant, et l'extraction des acides nucléiques a été réalisée avec le Kit QIAGEN. La technique de la RT-qPCR utilisant l'automate SmartCycler®-Cepheid fut utilisée pour la détection du virus de la dengue. Le sérotypage de notre étude a été faite par l'Institut de microbiologie de la Bundeswehr (l'armée nationale de la République fédérale d'Allemagne). Aussi un TDR a été réaliser pour confirmer la présence de l'antigène NS1 (Protéine non structurel spécifique au virus de la dengue).

Résultats :

La RT-qPCR a permis de diagnostiquer 34 cas dengue sur les 138 soit 24,6%. Le genre masculin, la classe d'âge [19-30] et les patients en provenance de la commune VI étaient les plus représenter. Aussi les sérotype DENV-1 et DENV-2 étaient les plus observés avec 12 cas chacun, 4 cas de DENV-3 et zéro cas de DENV-4.

D'autre part la TDR a été faite sur 38 échantillons dont 27 étaient positifs à l'antigène NS1 soit 71%. Le genre masculin, la classe d'âge [19-30] et les patients en provenance de la commune VI étaient les plus représentés.

La RT-qPCR et la TDR NS1 étaient en concordance sur les 27 cas.

Conclusion :

Notre étude a montré que les sérotypes de la dengue circulent au Mali et manifeste ainsi la nécessité de mettre en place un programme de surveillance de la dengue.

Mots clés :

Dengue, Bamako, Mali, Prévalence, RT-qPCR, TDR NS1.

REFERENCES

- [1] « OMS | Maladies tropicales négligées: principaux repères », *WHO*. http://www.who.int/topics/tropical_diseases/factsheets/neglected/fr/ (consulté le janv. 21, 2021).
- [2] G. Liang, X. Gao, et E. A. Gould, « Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control », *Emerg Microbes Infect.*, vol. 4, n° 3, p. e18, mars 2015, doi: 10.1038/emi.2015.18.
- [3] C. P. Simmons, J. J. Farrar, van V. C. Nguyen, et B. Wills, « Dengue », *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, n° 15, p. 1423-1432, avr. 2012, doi: 10.1056/NEJMra1110265.
- [4] E. K. Phoutrides *et al.*, « Dengue virus seroprevalence among febrile patients in Bamako, Mali: results of a 2006 surveillance study », *Vector Borne Zoonotic Dis.*, vol. 11, n° 11, p. 1479-1485, nov. 2011, doi: 10.1089/vbz.2011.0622.
- [5] D. E. Carey, R. Reuben, K. N. Panicker, R. E. Shope, et R. M. Myers, « Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India », *Indian J. Med. Res.*, vol. 59, n° 11, p. 1758-1760, nov. 1971.
- [6] N. Vasilakis *et al.*, « Genetic and phenotypic characterization of sylvatic dengue virus type 2 strains », *Virology*, vol. 377, n° 2, p. 296-307, août 2008, doi: 10.1016/j.virol.2008.04.044.
- [7] E. K. Phoutrides *et al.*, « Dengue Virus Seroprevalence Among Febrile Patients in Bamako, Mali: Results of a 2006 Surveillance Study », *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 11, n° 11, p. 1479-1485, juill. 2011, doi: 10.1089/vbz.2011.0622.
- [8] M. S. Mustafa, V. Rasotgi, S. Jain, et V. Gupta, « Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control », *Med J Armed Forces India*, vol. 71, n° 1, p. 67-70, janv. 2015, doi: 10.1016/j.mjafi.2014.09.011.
- [9] M. G. Guzman et G. Kouri, « Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges », *J. Clin. Virol.*, vol. 27, n° 1, p. 1-13, mai 2003.
- [10] A. S. Bakshi, « Dengue Fever, DHF and DSS », *Apollo Medicine*, vol. 4, n° 2, p. 111-117, juin 2007, doi: 10.1016/S0976-0016(11)60117-8.
- [11] N. T. Darwish, Y. B. Alias, et S. M. Khor, « An introduction to dengue-disease diagnostics », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 67, p. 45-55, avr. 2015, doi: 10.1016/j.trac.2015.01.005.
- [12] S. Bhatt *et al.*, « The global distribution and burden of dengue », *Nature*, vol. 496, n° 7446, p. 504-507, avr. 2013, doi: 10.1038/nature12060.
- [13] O. J. Brady *et al.*, « Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus », *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 6, n° 8, p. e1760, 2012, doi: 10.1371/journal.pntd.0001760.
- [14] « Dengue », *Institut Pasteur*, mai 20, 2016. <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/dengue> (consulté le janv. 19, 2019).
- [15] « OMS | Dengue et dengue sévère », *WHO*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/fr/> (consulté le févr. 24, 2021).
- [16] A. ROY, « Coût d'une épidémie de dengue en Nouvelle-Calédonie », Nouvelle-Calédonie, 2013 2012.
- [17] A. Amarasinghe, J. N. Kuritsk, G. W. Letson, et H. S. Margolis, « Dengue virus infection in Africa », *Emerging Infect. Dis.*, vol. 17, n° 8, p. 1349-1354, août 2011, doi: 10.3201/eid1708.101515.
- [18] « Lutte contre le retour de la dengue », *VOA*. <https://www.voaafrique.com/a/lutte-contre-le-retour-de-la-dengue/4947912.html> (consulté le juin 25, 2019).
- [19] Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats, *Vector-Borne Diseases: Understanding the Environmental, Human Health, and Ecological Connections, Workshop Summary*. Washington (DC): National Academies Press (US), 2008.

- [20] D. J. Gubler, « Dengue and dengue hemorrhagic fever », *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 11, n° 3, p. 480-496, juill. 1998.
- [21] Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases et World Health Organization, Éd., *Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control*, New ed. Geneva: TDR : World Health Organization, 2009.
- [22] N. Arunachalam *et al.*, « Eco-bio-social determinants of dengue vector breeding: a multicountry study in urban and periurban Asia », *Bull World Health Organ*, vol. 88, n° 3, p. 173-184, mars 2010, doi: 10.2471/BLT.09.067892.
- [23] G. Rezza, « Aedes albopictus and the reemergence of Dengue », *BMC Public Health*, vol. 12, n° 1, p. 72, janv. 2012, doi: 10.1186/1471-2458-12-72.
- [24] N. G. Gratz, « Critical review of the vector status of Aedes albopictus », *Med. Vet. Entomol.*, vol. 18, n° 3, p. 215-227, sept. 2004, doi: 10.1111/j.0269-283X.2004.00513.x.
- [25] E. H. Sasan, « Emergence du virus du Zika en Polynésie française: aspect clinique et évolution », Université du droit et de la santé-Lille 2, 2015.
- [26] « Dengue - Sciensano ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.wiv-isp.be/matra/fiches/dengue.pdf>.
- [27] M. Védrunes, « Un nouveau vaccin contre la dengue », exercice, Université Toulouse III - Paul Sabatier, 2017.
- [28] P. Gurugama, P. Garg, J. Perera, A. Wijewickrama, et S. L. Seneviratne, « DENGUE VIRAL INFECTIONS », *Indian J Dermatol*, vol. 55, n° 1, p. 68-78, 2010, doi: 10.4103/0019-5154.60357.
- [29] « Virus de la dengue », *Wikipédia*. déc. 07, 2016, Consulté le: juin 08, 2017. [En ligne]. Disponible sur: https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Virus_de_la_dengue&oldid=132479177.
- [30] E. J. Platt, N. Madani, S. L. Kozak, et D. Kabat, « Infectious properties of human immunodeficiency virus type 1 mutants with distinct affinities for the CD4 receptor », *J. Virol.*, vol. 71, n° 2, p. 883-890, févr. 1997.
- [31] L. Rosen, L. E. Rozeboom, W. C. Reeves, J. Saugrain, et D. J. Gubler, « A field trial of competitive displacement of Aedes polynesiensis by Aedes albopictus on a Pacific atoll », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 25, n° 6, p. 906-913, nov. 1976, doi: 10.4269/ajtmh.1976.25.906.
- [32] D. J. Gubler et L. Rosen, « Variation among geographic strains of Aedes albopictus in susceptibility to infection with dengue viruses », *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 25, n° 2, p. 318-325, mars 1976, doi: 10.4269/ajtmh.1976.25.318.
- [33] S. B. Halstead, « Dengue virus-mosquito interactions », *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 53, p. 273-291, 2008, doi: 10.1146/annurev.ento.53.103106.093326.
- [34] D. J. Gubler, « Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever », *Clin Microbiol Rev*, vol. 11, n° 3, p. 480-496, juill. 1998.
- [35] Cucunawangsih et N. P. H. Lugito, « Trends of Dengue Disease Epidemiology », *Virology (Auckl)*, vol. 8, mars 2017, doi: 10.1177/1178122X17695836.
- [36] J. Günther, J. P. Martínez-Muñoz, D. G. Pérez-Ishiwara, et J. Salas-Benito, « Evidence of vertical transmission of dengue virus in two endemic localities in the state of Oaxaca, Mexico », *Intervirology*, vol. 50, n° 5, p. 347-352, 2007, doi: 10.1159/000107272.
- [37] S. Lequime et L. Lambrechts, « Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective », *Infect. Genet. Evol.*, vol. 28, p. 681-690, déc. 2014, doi: 10.1016/j.meegid.2014.07.025.
- [38] T. Monath et K. Maramorosch, *The Flaviviruses: Structure, Replication and Evolution*. Elsevier, 2003.
- [39] P. M. Venkata Sai, B. Dev, et R. Krishnan, « Role of ultrasound in dengue fever », *Br J Radiol*, vol. 78, n° 929, p. 416-418, mai 2005, doi: 10.1259/bjr/54704044.

- [40] D. W. Vaughn *et al.*, « Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses », *J. Infect. Dis.*, vol. 176, n° 2, p. 322-330, août 1997, doi: 10.1086/514048.
- [41] K. S. Sunit, *Human emerging and re-emerging infectious*. 2015.
- [42] S. B. Halstead, « Dengue », *Lancet*, vol. 370, n° 9599, p. 1644-1652, nov. 2007, doi: 10.1016/S0140-6736(07)61687-0.
- [43] S. Rajapakse, « Dengue shock », *Journal of Emergencies, Trauma, and Shock*, vol. 4, n° 1, p. 120, janv. 2011, doi: 10.4103/0974-2700.76835.
- [44] B. A. Wills *et al.*, « Coagulation Abnormalities in Dengue Hemorrhagic Fever: Serial Investigations in 167 Vietnamese Children with Dengue Shock Syndrome », *Clin Infect Dis*, vol. 35, n° 3, p. 277-285, août 2002, doi: 10.1086/341410.
- [45] T. Srichaikul et S. Nimmannitya, « Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever », *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.*, vol. 13, n° 2, p. 261-276, juin 2000, doi: 10.1053/beh.2000.0073.
- [46] S. Nimmannitya, « Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever », *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, vol. 18, n° 3, p. 392-397, sept. 1987.
- [47] « Diagnostic biologique direct précoce de la dengue par détection génomique du virus avec RT-PCR (transcription inverse et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne) », *Haute Autorité de Santé*. https://has-sante.fr/jcms/c_1253629/fr/diagnostic-biologique-direct-precoce-de-la-dengue-par-detection-genomique-du-virus-avec-rt-pcr-transcription-inverse-et-amplification-genique-par-reaction-de-polymerisation-en-chaîne (consulté le janv. 06, 2020).
- [48] « wallonie familles sante handicap dengue ».
- [49] D. Martin, T. Debord, A. Cabié, et P. Dussart, « Stratégie de diagnostic biologique de la dengue ». Haut Conseil de la Santé Publique, janv. 2011, [En ligne]. Disponible sur: https://www.hcsp.fr/explore.cgi/hcspr20110121_dengue.pdf.
- [50] N. E. A. Murray, M. B. Quam, et A. Wilder-Smith, « Epidemiology of dengue: past, present and future prospects », *Clin Epidemiol*, vol. 5, p. 299-309, août 2013, doi: 10.2147/CLEP.S34440.
- [51] « Prévention de la dengue | Passport Health Clinique santé-voyage ». <https://www.passporthealthglobal.com/fr-ca/services-sante-voyage/prevention-de-la-dengue/?cn-reloaded=1> (consulté le nov. 16, 2019).
- [52] P. A. Kodio, « Surveillance des émergences virales au Mali : étude pilote chez les enfants de 1 à 14 ans à Bamako. », USTTB/FAPH, Bamako, 2017.
- [53] Y. Mariko, « ETUDE DESCRIPTIVE DE L'EPIDEMIE DE LA DENGUE DANS LA COMMUNE DE SADIOLA, DISTRICT SANITAIRE DE KAYES », USTTB/FAPH, Bamako, 2009.
- [54] Z. Tarnagba et A. Cissé, « Dengue Fever in Burkina Faso, 2016 », Burkina Faso, 2016.
- [55] J. K. Lim *et al.*, « Clinical and epidemiologic characteristics associated with dengue during and outside the 2016 outbreak identified in health facility-based surveillance in Ouagadougou, Burkina Faso », *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 13, n° 12, déc. 2019, doi: 10.1371/journal.pntd.0007882.
- [56] L. M. Verhagen et R. de Groot, « Dengue in children », *J Infect*, vol. 69 Suppl 1, p. S77-86, nov. 2014, doi: 10.1016/j.jinf.2014.07.020.
- [57] M. N. Burattini *et al.*, « Age and regional differences in clinical presentation and risk of hospitalization for dengue in Brazil, 2000-2014 », *Clinics (Sao Paulo)*, vol. 71, n° 8, p. 455-463, 2016, doi: 10.6061/clinics/2016(08)08.
- [58] A. B. Byrne *et al.*, « Age-associated differences in clinical manifestations and laboratory parameters during a dengue virus type 4 outbreak in Argentina », *J Med Virol*, vol. 90, n° 2, p. 197-203, 2018, doi: 10.1002/jmv.24952.

- [59] T. Tantawichien, « Dengue fever and dengue haemorrhagic fever in adolescents and adults », *Paediatr Int Child Health*, vol. 32 Suppl 1, p. 22-27, mai 2012, doi: 10.1179/2046904712Z.00000000049.

ANNEXES

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

Préparation préalable des réactifs :

○ *Le mélange “RNA carrier” + Tampon AVE :*

310 µl de tampon AVE étaient ajoutés au tube contenant 310 µg du carrier ARN lyophilisé pour obtenir une solution de 1 µg/µl. Le « ARN carrier complètement dissout était partagé en aliquotes et conservez-le entre -30 et -15°C. Ne pas congeler et décongeler les aliquotes plus de 3 fois.

Le mélange “RNA carrier” + Tampon AVE+ Tampon AVL :

Calcule du volume de mélange tampon AVL-ARN carrier nécessaire par lot d'échantillons en sélectionnant le nombre d'échantillon à traiter simultanément.

No. samples	Buffer AVL (ml)	Carrier RNA-AVE (µl)	No. samples	Buffer AVL (ml)	Carrier RNA-AVE (µl)
1	0.56	5.6	13	7.28	72.8
2	1.12	11.2	14	7.84	78.4
3	1.68	16.8	15	8.4	84.0
4	2.24	22.4	16	8.96	89.6
5	2.80	28.0	17	9.52	95.2
6	3.36	33.6	18	10.08	100.8
7	3.92	39.2	19	10.64	106.4
8	4.48	44.8	20	11.20	112.0
9	5.04	50.4	21	11.76	117.6
10	5.60	56.0	22	12.32	123.2
11	6.16	61.6	23	12.88	128.8
12	6.72	67.2	24	13.44	134.4

Tableux

Pour un plus nombre d'échantillon, les volumes peuvent être calculés à l'aide de la formule suivante :

$$N \times 0,56 \text{ ml} = Y \text{ ml}$$

$$Y \text{ ml} \times 10 \mu\text{l/ml} = Z \mu\text{l}$$

Où N = Nombre d'échantillons à traiter simultanément

Y = Volume calculé de tampon AVL

Z = Volume d'ARN carrier + AVE à ajouter à l'AVL

Mélangez doucement en inversant le tube 10 fois. Pour éviter la formation de mousse, ne pas vortexer.

Remarque : La procédure de préparation des échantillons est optimisée pour 5,6 µg d'ARN porteur par échantillon. S'il s'avère que moins d'ARN porteur est meilleur pour votre système d'amplification, transférez uniquement la quantité requise d'ARN porteur dissous dans les tubes contenant le tampon AVL. (Utilisation de moins de 5,6 µg d'ARN porteur par échantillon doivent être validés pour chaque type d'échantillon particulier et analyser en aval.)

Le tampon ARN porteur AVL doit être préparé frais et est stable entre 2 et 8 ° C pendant 48 h maximum. Ce la solution développe un précipité lorsqu'elle est stockée à 2–8 ° C qui doit être re-dissoudre en chauffant à 80 ° C avant utilisation. Ne pas réchauffer la solution tampon d'ARN porteur d'AVL plus de 6 fois. Ne pas incuber à 80 ° C pendant plus de 5 min. Un réchauffement fréquent et une incubation prolongée entraîneront dégradation de l'ARN porteur, conduisant à une récupération réduite de l'ARN viral et éventuellement résultats de RT-PCR négatifs. C'est particulièrement le cas des échantillons à faible titre.

○ *Les tampons AW1 et AW2 :*

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

Ce protocole est pour la purification de l'ARN viral à partir de 140 µl de plasma à l'aide d'une micro-centrifugeuse

1. Pipeter 560 µl de tampon AVL préparé contenant l'ARN porteur dans une micro centrifugeuse de 1,5 ml. Tube.

Remarque : si le volume d'échantillon est supérieur à 140 µl, augmentez la quantité de tampon AVL – porteur ARN proportionnellement (par exemple, un échantillon de 280 µl nécessitera 1 120 µl d'ARN tampon AVL-porteur) et utilisez un tube plus grand

2. Ajouter 140 μ l de plasma au tampon ARN carrier-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 soigneusement mélangé avec le tampon AVL pour obtenir une solution homogène. Les 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 terminée après la lyse pendant 10 min à température ambiante. De long temps d'incubation n'ont aucun effet sur le rendement ou la qualité de l'ARN purifié.

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

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

Remarque : N'utilisez que 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 μ l, augmentez la quantité de l'éthanol proportionnellement (par exemple, un échantillon de 280 μ l nécessitera 1 120 μ l d'éthanol). Il est essentiel que l'échantillon soit bien mélangé avec l'éthanol pour donner une solution homogène.

6. Appliquez soigneusement 630 μ l de la solution de l'étape 5 sur la colonne (dans un tube de prélèvement) sans mouiller la jante. Fermer le capuchon et centrifuger à 6000 x g (8000 tr / min) pendant 1 min. Placez la colonne dans un tube de prélèvement propre de 2 ml, et jetez le tube contenant le filtrat.

Remarque : Fermez chaque colonne de centrifugation pour éviter toute contamination croisée pendant la centrifugation. Celle-ci est effectuée à 6000 x g (8000 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, centrifuger à nouveau à une vitesse jusqu'à ce que toute la solution soit passée.

7. Ouvrez soigneusement la colonne et répétez l'étape 6. Si le volume d'échantillon était supérieur à 140 µl, répétez cette étape jusqu'à ce que tout le lysat ait été chargé sur le spin colonne.

8. Ouvrez soigneusement la colonne et ajoutez 500 µl de tampon AW1. Fermez le bouchon, et centrifuger à 6000 x g (8000 tr / min) pendant 1 min. Placez la colonne dans un 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 140 µl.

9. Ouvrez soigneusement la colonne et ajoutez 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 l'étape 11 ; ou pour éliminer le report éventuel du tampon AW2, effectuez l'étape 10 puis passez à l'étape 11.

Remarque : le tampon résiduel AW2 dans l'éluant peut causer des problèmes en aval. Certains rotors de centrifugeuse peuvent vibrer lors de la décélération, entraînant un écoulement à travers, contenant le tampon AW2, en contactant la colonne. Le retrait de la colonne et du tube de prélèvement du rotor peut également traverser pour entrer en contact avec la colonne. Dans ces cas, l'étape facultative 10 doit être effectuée.

10. Recommandé : Placer la colonne dans un nouveau tube de prélèvement de 2 ml (non fourni) et jetez l'ancien tube de prélèvement avec le filtrat. Centrifuger à pleine vitesse pour 1 minute.

11. Placer la colonne dans un tube de micro centrifugeuse propre de 1,5 ml (non fourni). Jeter l'ancien tube de prélèvement contenant le filtrat. Ouvrez soigneusement la colonne et ajouter 60 µl de tampon AVE équilibré à température ambiante. Fermez le capuchon et incubé à température ambiante pendant 1 min.

12. Centrifuger à 6000 x g (8000 tr / min) pendant 1 min.

Une seule élution avec 60 µl de tampon AVE suffit pour éluer au moins 90% de l'ARN viral de la colonne. La réalisation d'une double élution en utilisant 2 x 40 µl de tampon AVE augmentera le rendement jusqu'à 10%. L'élution avec des volumes inférieurs à 30 µl conduira à des rendements réduits et n'augmentera pas la concentration finale d'ARN dans l'éluant.

L'ARN viral est stable jusqu'à 1 an lorsqu'il est conservé entre -30 et -15 ° C ou entre -90 et -65 ° C.

Annexe 2 : Préparation du mélange réactionnel (Master mix) pour RT-qPCR

Cette procédure était réalisée dans une salle exempte d'ADN/ARN le mélange réactionnel

Virus	Réactifs	Quantité pour une réaction (µl)
Dengue/Zika	2x Reaction mix	12,5
	SuperScript®III RT/ Platinum®TaqMix	0,40
	Zika Forw 3b (10µM) Primer sens	0,75
	Zika Rev 3(10µM) Primer anti sens	0,75
	Zika Plex p3 (10µM) sonde	0,75
	DEN13 forw (10µM) Primer sens	1
	DEN2f 177(10µM) Primer sens	1
	DEN24rev (10µM) Primer anti sens	1
	PanDen p1 LNA (10µM) sonde	0,75
	Eau sans RNASE	1,10
	Volume total du master mix (µl)	20
	Volume de l'échantillon (µl)	5
	Volume final de la réaction (µl)	25

était préparé dans un micro tube de 1.5ml selon le nombre d'échantillon à tester. La composition du mélange réactionnel et du programme RT-qPCR (tableau II et III) sont variables selon le virus à détecter.

Annexe 3 : Description (données techniques et utilisation) de l'automate d'amplification

- Description de l'appareil

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



Figure 10 : Dispositif complet utilisé pour l'amplification de ARN/ADN : Thermocycleur = SmartCycler® (Stratagème); Ordinateur portable; mini centrifugeuse pour tube RT-qPCR; portoir de tube RT-qPCR[52].

- Données techniques

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

Poids : 10 kg

Capacité d'échantillons : 16 cavités

Tubes réactionnels : tubes capillaires en plastique de 25 μ l

Volume réactionnel : 20 à 30 μ l

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

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

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

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

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

Température de fonctionnement : 15 °C à 35 °C

Humidité relative : 10 % à 80 %

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

- **Les différents canaux et fluorochromes :**

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

Utilisation de l'appareil

- **Connexion de l'appareil**

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

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

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

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

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

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

- **Création d'un nouveau protocole de RT-qPCR**

Cliquer sur l'icône *DefineProtocols*

Cliquer sur le bouton *New Protocol*

Saisir le nom du protocole

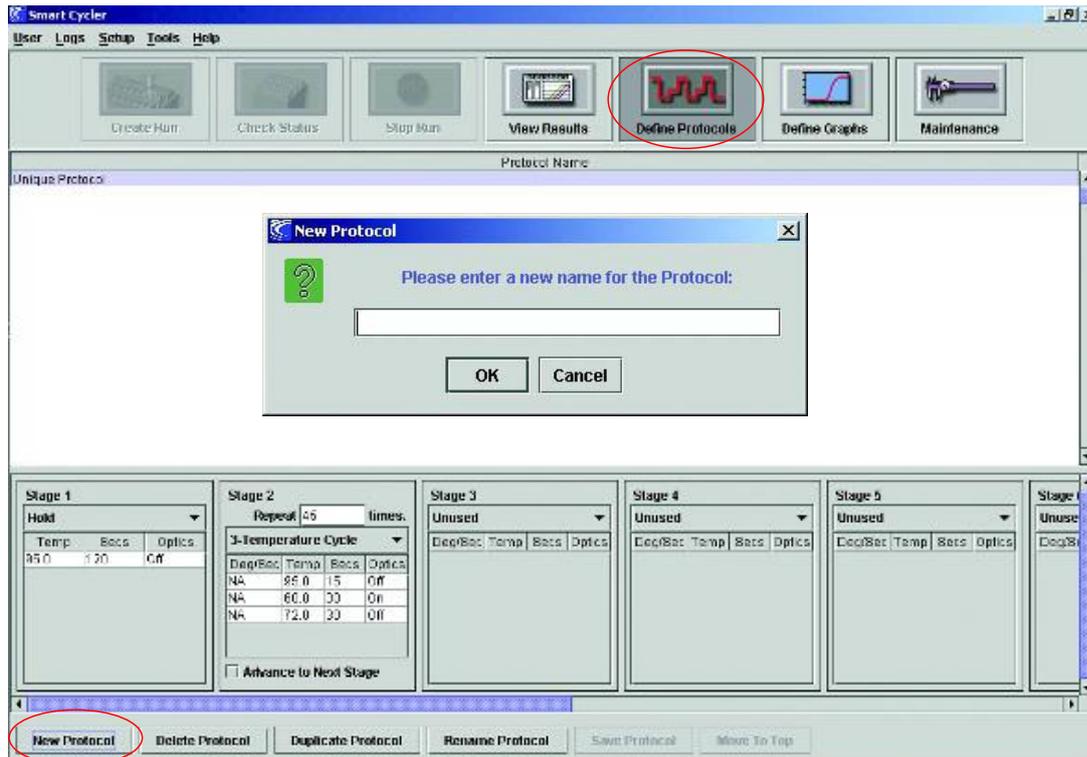


Figure 11 : Etapes de détermination d'un nouveau programme de RT-qPCR (nombre de cycles, température, temps) [52].

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

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

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

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

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

Enregistrer le profil thermique par le bouton *Save Protocol*

Exécution d'un protocole de RT-qPCR et saisie d'identifiants des échantillons

Cliquer sur l'icône *CreateRun*

Dénomination du passage sous *Run Name*

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

Cliquer sur le bouton *Add/Remove Sites*

Sélectionner un protocole enregistré et les blocs à occuper.

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

Appuyer sur *OK*

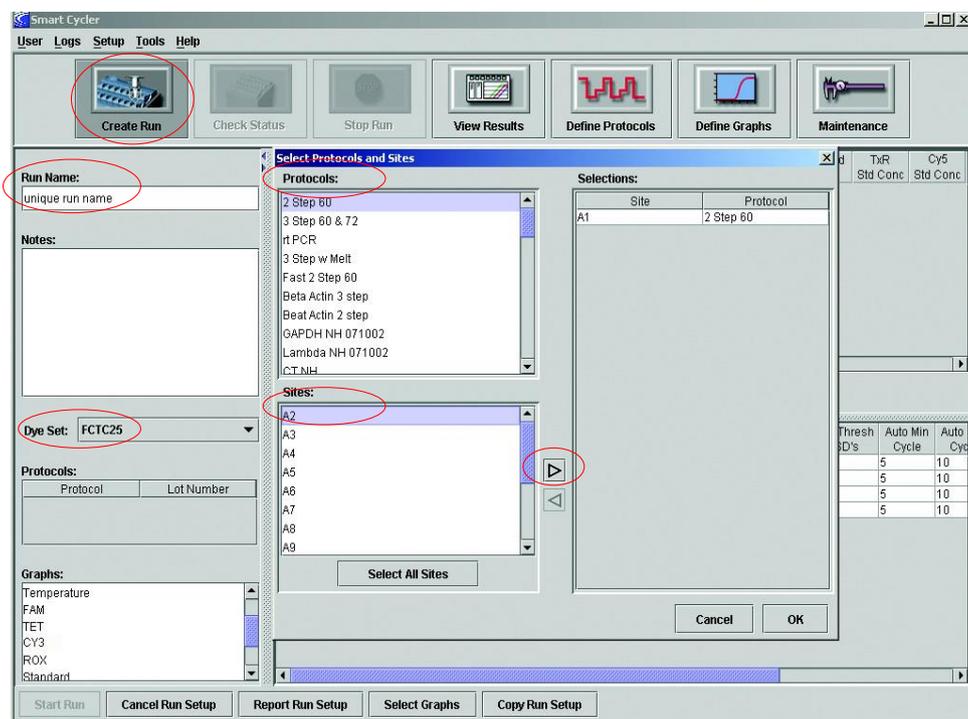


Figure 12 : Étapes de lancement d'une RT-qPCR [52].

La désignation de l'échantillon peut maintenant être saisie.

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

Figure 13 : Fenêtre pour la vérification du nombre d'échantillon par rapport au site ID [52].

Cliquer sur le bouton *Start Run*

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

Validation du test :

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

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

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

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



Figure 14 : Courbes d'amplification des matériels génétiques éventuellement présents dans les échantillons [52].

Annexe 4 : Principe du test rapide SD BIOLINE Dengue Duo

Le test rapide SD BIOLINE Dengue Duo contient deux dosages immuno-chromatographiques *in vitro* pour le dépistage de l'infection par le virus de la dengue dans le sérum, le plasma ou le sang total humains (côté gauche : test Dengue NS1 Ag et côté droit : test Dengue (IgG/IgM)). Le test rapide Dengue NS1 Ag est un test en une étape, hautement sensible et spécifique conçu pour la détection qualitative de l'antigène NS1 du virus de la dengue. Lorsqu'il est ajouté au puits d'échantillon, l'antigène NS1 présent dans l'échantillon réagit avec les conjugués d'anticorps de souris monoclonaux anti-virus de la dengue/or colloïdal pour former un complexe anticorps-antigène. Lorsque ce complexe migre dans le dispositif de test par chromatographie, il est capturé par des anticorps immobilisés et produit une ligne de test colorée à côté de la lettre « T » (ligne de test de l'antigène NS1). Une deuxième ligne sert au contrôle de la procédure. Elle apparaît systématiquement à côté de la lettre « C » (ligne de contrôle) lorsque la procédure de test a été réalisée correctement et lorsque les ingrédients actifs des principaux composants de la bandelette fonctionnent. Lorsque l'antigène NS1 du virus de la dengue est présent dans l'échantillon, la ligne de contrôle (« C ») et la ligne de test (« T ») apparaissent toutes deux dans la fenêtre de résultat pour indiquer que le résultat est positif. Seule la ligne de contrôle (« C ») apparaît lorsque l'échantillon ne contient pas l'antigène NS1 ou lorsqu'il contient une quantité de l'antigène NS1 inférieure aux niveaux détectables ; dans ce cas, le résultat est négatif. Le test rapide Dengue IgG/IgM est un dosage qualitatif pour la détection différentielle des anticorps IgG/IgM dirigés contre le virus de la dengue. Ce test détecte les anticorps dirigés contre les quatre sérotypes du virus de la dengue (Cycle humain) grâce à un mélange de protéines recombinantes de l'enveloppe du virus de la dengue. Lorsqu'ils sont ajoutés aux puits d'échantillon, les anticorps IgG et les IgM dirigés contre virus de la dengue présents dans l'échantillon réagissent avec les conjugués de protéines recombinantes d'enveloppe du virus de la dengue-or colloïdal pour former un complexe anticorps-antigène. Lorsque ce complexe migre dans le dispositif de test, par chromatographie, il est capturé par les anticorps IgG anti-humains et/ou IgM anti-humains et il produit deux lignes de test colorées à côté de la lettre « G » (ligne de test IgG anti dengue) et/ou « M » (ligne de test IgM anti-dengue). Une troisième sert au contrôle de la procédure et apparaît systématiquement à côté de la lettre « C » (ligne de contrôle) lorsque la procédure de test a été réalisée correctement et que les ingrédients actifs des principaux composants de la bandelette fonctionnent. Lorsque les anticorps dirigés contre le virus de la dengue sont

présents dans l'échantillon, la ligne de contrôle (« C ») et les lignes de test (« G » et/ou « M ») apparaissent dans la fenêtre de résultat pour indiquer que le résultat est positif. Seule la ligne de contrôle « C » apparaît lorsque l'échantillon ne contient pas d'anticorps IgG/IgM dirigés contre le virus de la dengue (« G/M ») ou lorsqu'il contient une quantité de ces anticorps inférieure à la limite de détection du test ; dans ce cas, le résultat est négatif.

Matériels fournis :

Le kit SD BIOLINE Dengue Duo contient les éléments suivants pour la réalisation du test :

Dispositif combinant les tests Dengue NS Ag et Dengue IgG/IgM	25
Diluant pour le test Dengue IgG/IgM	1x5ml
Pipettes capillaires pour le test Dengue IgG/IgM (10µl)	25
Compte-gouttes jetables pour le test Dengue NS1 Ag	25
Mode d'emploi	1

Stockage et stabilité du kit :

- Le dispositif de test est sensible à la chaleur et à l'humidité ; il doit être utilisé et stocker correctement.
- Conserver le kit de test entre 1°C et 30°C. Ne pas congeler le kit et ses composants, ni les exposer à des températures élevées.
- Avant d'utiliser le test vérifier que l'indicateur d'humidité présent sur les dessicants de l'emballage n'a pas changé de couleur. Jeter le dispositif si l'indicateur d'humidité est de couleur verte. N'utiliser le dispositif que si l'indicateur d'humidité est de couleur jaune.
- Procéder au test immédiatement après avoir retiré le dispositif de test de l'emballage en aluminium pour éviter de l'exposer à l'humidité.
- Ne pas utiliser le kit ou c'est composant au-delà de la date de péremption.
- Ne pas utiliser le dispositif si l'emballage est endommagé ou n'est plus étanche.

Collecte et stockage des échantillons :

- Sang total

Pratiquer une ponction veineuse pour recueillir le sang total dans le tube de prélèvement (contenant des anticoagulants tel que l'héparine l'EDTA et le citrate de sodium).

Mise en garde : Ne pas utiliser de sang capillaire.

Si les échantillons de sang ne sont pas testés immédiatement, ils doivent être réfrigérer entre 2 et 8°C.

Lorsqu'il est conservé entre 2 et 8°C, l'échantillon de sang doit être testé dans les 3 jours suivant le prélèvement.

Ne pas utiliser un échantillon de sang stocké depuis plus de 3 jours au risque de provoquer une réaction non spécifique.

Ramener les échantillons de sang à température ambiante (entre 15 et 30°C) avant l'utilisation.

Plasma ou sérum :

Pratiquer une ponction veineuse pour recueillir le sang total dans le tube de prélèvement (contenant des anticoagulants tel que l'héparine, l'EDTA ou le citrate de sodium), puis centrifuger le tube pour obtenir un échantillon de plasma.

Sérum Pratiquer une ponction veineuse pour recueillir le sang total dans le tube de prélèvement (sans anticoagulant). Laisser le sang coaguler pendant 30 minutes, puis centrifuger le sang pour obtenir un surnageant sérique.

Si les échantillons de plasma ou de sérum ne sont pas testés immédiatement, ils doivent être réfrigérés entre 2 et 8°C. Pour des périodes de stockage supérieure à 2 semaines la congélation à une température inférieure à -20°C est obligatoire. Les échantillons doivent être ramenés à température ambiante entre 15 et 30°C avant utilisation.

Les échantillons de plasma ou de sérum contenant un précipité peuvent générer des résultats de test incohérent. Appliquer des techniques de laboratoire standard pour clarifier ces échantillons avant de procéder au test.

Précautions :

Eviter de soumettre les échantillons à des cycles répéter de congélation-décongélation.

Les anticoagulants notamment l'héparine, l'EDTA et le citrate, n'influent pas sur le résultat du test. L'utilisation d'autres anticoagulants n'a pas été évaluée. Leur utilisation pourrait affecter les résultats du test.

Utiliser un nouveau compte-gouttes ou un nouvel embout de pipettes jetables pour chaque échantillon afin d'éviter toute contamination croisée entre les échantillons, qui pourrait entraîner des résultats erronés.

Les limites du test :

Le taux de l'antigène NS1 du virus de la dengue et des anticorps IgM et IgG varie selon le stade de la maladie.

Les taux détectables d'anticorps IgM peuvent être faibles au début de l'infection et dans certains cas d'infection secondaire. Certains patients ne peuvent pas produire des taux détectables d'anticorps au cours des 7 à 10 premiers jours de l'infection. Si le résultat du test est négatif mais que les symptômes persistent, prélever un deuxième échantillon 3 à 4 jours après le premier.

Certains patients produisent des anticorps anti-NS1. Dans ce cas, la détection de l'antigène NS1 est inhibée et il est possible d'obtenir un résultat négatif.

Il est possible d'obtenir un résultat négatif lorsque l'antigène NS1 du virus de la dengue ou les anticorps dirigés contre le virus de la dengue ne sont pas présents dans l'échantillon au moment où il est prélevé, ou s'ils sont présents en une quantité inférieure à la quantité détectable. Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité de l'infection par le virus de la dengue.

Comme avec tous les tests de diagnostic, les résultats doivent être étudiés conjointement aux autres informations cliniques à la disposition du médecin.

Une réactivité sérologique croisée entre le virus du genre *Flavivirus* est fréquente. Bien qu'aucune réactivité croisée n'ait été observée dans les études internes, une réactivité croisée avec le virus du genre *Flavivirus* doit être considéré comme possible.

Les résultats du test peuvent varier en fonction du moment où l'échantillon a été collecté après l'apparition des symptômes, du type d'échantillon, du sérotype présent dans la population testée, de la méthode de référence et d'autres facteurs. Ces variations doivent être prises en compte lors de la comparaison des études.

Valeurs attendu :

L'antigène NS1 doit pouvoir être détecté dès le premier jour après l'apparition de la fièvre et persiste jusqu'à 9 jours, qu'il s'agisse d'une primo-infection ou d'une infection secondaire. La primo-infection par le virus de la dengue se caractérise par la présence détectable anticorps IgM 3 à 5 jours après le début de l'infection. La dengue secondaire se caractérise par une augmentation des anticorps IgG un à 2 jours après le début de l'infection, hausse accompagner dans la majorité des cas d'une augmentation du taux de IgM 20 jours après l'apparition des symptômes.

Annexe 5 : Tableaux de la loi de KHI2 (X^2)

LOI DU KHI-DEUX AVEC k DEGRÉS DE LIBERTÉ
QUANTILES D'ORDRE $1 - \gamma$

k	γ										
	0.995	0.990	0.975	0.950	0.900	0.500	0.100	0.050	0.025	0.010	0.005
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.45	2.71	3.84	5.02	6.63	7.88
2	0.01	0.02	0.05	0.10	0.21	1.39	4.61	5.99	7.38	9.21	10.60
3	0.07	0.11	0.22	0.35	0.58	2.37	6.25	7.81	9.35	11.34	12.84
4	0.21	0.30	0.48	0.71	1.06	3.36	7.78	9.94	11.14	13.28	14.86
5	0.41	0.55	0.83	1.15	1.61	4.35	9.24	11.07	12.83	15.09	16.75
6	0.68	0.87	1.24	1.64	2.20	5.35	10.65	12.59	14.45	16.81	18.55
7	0.99	1.24	1.69	2.17	2.83	6.35	12.02	14.07	16.01	18.48	20.28
8	1.34	1.65	2.18	2.73	3.49	7.34	13.36	15.51	17.53	20.09	21.96
9	1.73	2.09	2.70	3.33	4.17	8.34	14.68	16.92	19.02	21.67	23.59
10	2.16	2.56	3.25	3.94	4.87	9.34	15.99	18.31	20.48	23.21	25.19
11	2.60	3.05	3.82	4.57	5.58	10.34	17.28	19.68	21.92	24.72	26.76
12	3.07	3.57	4.40	5.23	6.30	11.34	18.55	21.03	23.34	26.22	28.30
13	3.57	4.11	5.01	5.89	7.04	12.34	19.81	22.36	24.74	27.69	29.82
14	4.07	4.66	5.63	6.57	7.79	13.34	21.06	23.68	26.12	29.14	31.32
15	4.60	5.23	6.27	7.26	8.55	14.34	22.31	25.00	27.49	30.58	32.80
16	5.14	5.81	6.91	7.96	9.31	15.34	23.54	26.30	28.85	32.00	34.27
17	5.70	6.41	7.56	8.67	10.09	16.34	24.77	27.59	30.19	33.41	35.72
18	6.26	7.01	8.23	9.39	10.87	17.34	25.99	28.87	31.53	34.81	37.16
19	6.84	7.63	8.81	10.12	11.65	18.34	27.20	30.14	32.85	36.19	38.58
20	7.43	8.26	9.59	10.85	12.44	19.34	28.41	31.41	34.17	37.57	40.00
21	8.03	8.90	10.28	11.59	13.24	20.34	29.62	32.67	35.48	38.93	41.40
22	8.64	9.54	10.98	12.34	14.04	21.34	30.81	33.92	36.78	40.29	42.80
23	9.26	10.20	11.69	13.09	14.85	22.34	32.01	35.17	38.08	41.64	44.18
24	9.89	10.86	12.40	13.85	15.66	23.34	33.20	36.42	39.36	42.98	45.56
25	10.52	11.52	13.12	14.61	16.47	24.34	34.28	37.65	40.65	44.31	46.93
26	11.16	12.20	13.84	15.38	17.29	25.34	35.56	38.89	41.92	45.64	48.29
27	11.81	12.88	14.57	16.15	18.11	26.34	36.74	40.11	43.19	46.96	49.65
28	12.46	13.57	15.31	16.93	18.94	27.34	37.92	41.34	44.46	48.28	50.99
29	13.12	14.26	16.05	17.71	19.77	28.34	39.09	42.56	45.72	49.59	52.34
30	13.79	14.95	16.79	18.49	20.60	29.34	40.26	43.77	46.98	50.89	53.67
40	20.71	22.16	24.43	26.51	29.05	39.34	51.81	55.76	59.34	63.69	66.77
50	27.99	29.71	32.36	34.76	37.69	49.33	63.17	67.50	71.42	76.15	79.49
60	35.53	37.48	40.48	43.19	46.46	59.33	74.40	79.08	83.30	88.38	91.95
70	43.28	45.44	48.76	51.74	55.33	69.33	85.53	90.53	95.02	100.42	104.22
80	51.17	53.54	57.15	60.39	64.28	79.33	96.58	101.88	106.63	112.33	116.32
90	59.20	61.75	65.65	69.13	73.29	89.33	107.57	113.14	118.14	124.12	128.30
100	67.33	70.06	74.22	77.93	82.36	99.33	118.50	124.34	129.56	135.81	140.17

Si k est entre 30 et 100 mais n'est pas un multiple de 10, on utilise la table ci-haut et on fait une interpolation linéaire. Si $k > 100$ on peut, grâce au théorème limite central, approximer la loi $\chi^2(k)$ par la loi $N(k, 2k)$.

LE SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

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

Je le jure !