



UNIVERSITE DES SCIENCES, DES
TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES DE
BAMAKO



Faculté de Pharmacie

Année Universitaire
2018-2019

FAPH

N°...../P

THESE

**Méningites à entérovirus dans le cadre de
la surveillance épidémiologique au Mali**

**Présentée et soutenue publiquement le 23/02/2019
Devant le jury de la faculté de pharmacie**

Par

Mme Aicha DIALLO

**Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie
(DIPLOME D'ETAT)**

JURY

Président : Professeur Daouda Kassoum Minta
Membre : Docteur Karamoko Sacko
Membre : Docteur Jean Paul Dembélé
Co-directeur : Docteur Ibréhima Guindo
Directeur : Professeur Flabou Bougoudogo

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE**FACULTE DE PHARMACIE****ANNEE UNIVERSITAIRE 2018-2019****ADMINISTRATION****DOYEN : M. Boubacar TRAORE - Professeur****VICE-DOYEN : M. Ababacar I. MAIGA - Professeur****SECRETAIRE PRINCIPAL : M. Seydou COULIBALY Administrateur civil****AGENT COMPTABLE : M. Famalé DIONSAN, inspecteur des finances****PROFESSEURS HONORAIRES**

M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Mahamadou	CISSE	Biologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie générale & minérale
M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie- Virologie
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
M. Boulkassoum	HADARA	Législation
M. Moussa	HARAMA	Chimie organique (décédé)
M. Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
M. Alou A	KEITA	Galénique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
M. Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

DER DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

M. Mounirou	BABY	Hématologie
M. Bakary M.	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biologie/parasitologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
M. Alassane	DICKO	Santé Publique
M. Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
M. Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
M. Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
M. Boubacar	TRAORE	Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

M. Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
M. Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie Chef de DER
M. Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé environnement

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE

M. Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-virologie
M. Charles	ARAMA	Immunologie
M. Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
M. Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie clinique
M. Antoine	DARA	Biologie Moléculaire
M. Souleymane	DAMA	Parasitologie-Mycologie
Mme Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire

M. Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
M. Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
M. Seydina S. A.	DIAKITE	Immunologie
M.Yaya	GOITA	Biochimie clinique
M. Ibrehima	GUINDO	Bactériologie virologie
Mme Aminatou	KONE	Biologie moléculaire
M. Kassoum	KAENTAO	Santé Publique/Bio statistiques
M. Birama Apho	LY	Santé publique
Mme. Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
M. Issaka	SAGARA	Santé Publique/Bio statistiques
M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
Mme Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé communautaire
M. Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique/Bio statistiques
4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE		
Mme Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
M. Issa	DIARRA	Immunologie
M. Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale
Mme Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
Mme Merepen dit Agnes	GUINDO	Immunologie
M. Oumar	GUINDO	Epidémiologie
M. Falaye	KEITA	Santé publique/Santé environnement
Mme.N'Deye Lallah Nina	KOITA	Nutrition
M. yacouba	MAIGA	Bio statistique
M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
M. Oumar	SANGHO	Epidémiologie
M. Djakaridia	TRAORE	Hématologie

DER DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS/ DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
M. Saibou	MAIGA	Législation
Mme Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRE DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

Néant - -

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
M. Bakary Moussa	CISSE	Galénique
M. Yaya	COULIBALY	Législation
M. Issa	COULIBALY	Gestion
M. Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
M. Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
M. Moussa	SANOGO	Gestion
Mme Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

4. ASSISTANTS/ ATTACHE DE RECHERCHE

M. Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
M. Antoine	DARA	Sciences pharmaceutiques
M. Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
M. Adama	DENOU	Pharmacognosie
M. Sekou	DOUMBIA	Pharmacognosie
M. Mahamane	HAIDARA	Pharmacognosie
Mme. Assitan	KALOGA	Législation

M. Ahmed	MAIGA	Législation
Mme. Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
M. Aboubacar	SANGHO	Législation
M. Bourama	TRAORE	Législation
M. Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutiques
M. Sylvestre	TRAORE	Gestion pharmaceutique
Mme. Aminata Tiéba	TRAORE	Pharmacie hospitalière
M. Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière

DER DES SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

M. Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
M. Ababacar I.	MAIGA	Toxicologie

2. MAITRES DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

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

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
M. Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie
M. Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

4. ASSISTANTS/ ATTACHE DE RECHERCHE

M. Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
M. Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie analytique
M. Blaise	DACKOOU	Chimie Analytique
Mme. Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
M. Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
M. Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
M. Madani	MARIKO	Chimie Analytique
M. Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
M. Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

DER SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

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

2. MAITRES DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

M. Lassana	DOUMBIA	Chimie appliquée
------------	---------	------------------

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGE DE RECHERCHE

M. Abdoulaye	KANTE	Anatomie
M. Boureima	KELLY	Physiologie médicale

4. ASSISTANTS/ ATTACHE DE RECHERCHE

M. Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie organique
M. Modibo	DIALLO	Génétique
M. Moussa	KONE	Chimie Organique
M. Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

M. Cheik Oumar	BAGAYOKO	Informatique
M. Babou	BAH	Anatomie

M. Abdourahamane	COULIBALY	Anthropologie médicale
M. Souleymane	COULIBALY	Psychologie
M. Bouba	DIARRA	Bactériologie
M. Modibo	DIARRA	Nutrition
M. Moussa I	DIARRA	Biophysique
M. Babacar	DIOP	Chimie
M. Atimé	DJIMDE	Bromatologie
M. Yaya	KANE	Galénique
M. Boubacar	KANTE	Galénique
M. Aboubacary	MAIGA	Chimie organique
M. Massambou	SACKO	SCMP/SIM
M. Modibo	SANGARE	Anglais
M. Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
Mme. Fatoumata	SOKONA	Hygiène du milieu
M. Fana	TANGARA	Maths
M. Abdel Kader	TRAORE	Pathologie médicales
Mme. Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
M. Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

Louange à Allah, le tout puissant, l'omnipotent, le miséricordieux, de m'avoir donné la force et la détermination pour la réalisation de ce travail. Paix et salut sur son prophète Mohamed.!

DEDICACES

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect et la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que je dis cette thèse à :

La mémoire de mon père Drissa DIALLO

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ton absence a laissé un grand vide dans ma vie, mais grâce aux valeurs (le sens de la responsabilité, l'optimisme et la confiance en soi face aux difficultés de la vie) que tu m'as inculqué j'ai pu résister pour finir et te rendre heureux. Je sais que tu es proche de moi et que tu m'observe, j'ai bien aimé que tu sois présent ce jour-là mais le bon Dieu en a décidé autrement.

Puisse Allah t'accorde le repos éternel dans son immense paradis !

Je t'aime papa, tu resteras gravé dans mon cœur pour toujours.

Ma très chère maman Salimata DIALLO

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient prouver le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et ton affection tout au long de mon parcours. Tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il le fallait. En ce jour mémorable pour moi ainsi que pour toi, reçois ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime.

Puisse le tout puissant te donne une longue vie en santé afin que je puisse te combler à mon tour !

Ma sœur ainée Fatoumata DIALLO

Je suis très honorée d'avoir une sœur comme toi, tu m'as épaulé aux moments les plus durs, je te dédie ce travail avec l'expression de mon amour et de ma gratitude.

Que dieu te bénisse et t'offre un avenir prospère.

Toute ma famille paternelle et maternelle

Cette modeste dédicace ne saurait exprimer mon respect, ma profonde estime et mon amour pour vous !

Cette dédicace ne serait pas complète sans une pensée spéciale pour :

- **Mes tontons : Pr Adama MARIKO, Dr Mohamed Lamine DIALLO, Dr Mamadou Otto DIALLO ;**
- **Mon cousin : Moctar DIALLO ;**
- **Mes tantes : Adiara, Tata, Nabou, Ouda et Fatoumata Sidibé ;**
- **Mon beau-frère : Aly Diakité ;**
- **Ma belle-sœur : Kadidia Diallo.**

Merci pour vos soutiens et encouragement. Que Dieu vous bénisse !

Mes ami(e)s

Particulièrement **Mamadou Lassine KEITA, Halidou Moussa KONE, Mohamed Kéou COULIBALY, Youssouf Fadiga SAMOUNOU, Sylvie BERTHE, Maimouna Katty NIAMBELE, Aminata Yiriba TRAORE, Massetou TRAORE**, à toute la 9^{ème} promotion du Numerus Clausus « **Promotion N’Golo DIARRA** ».

Qui, avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu soutiens ? », bien qu’angoissante en période fréquente de doutes, m’ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final.

Merci pour votre amour, soutiens et encouragements.

Que Dieu vous comble de bonheur !

Remerciements

Hommages aux membres du jury

- **A notre maitre et président du jury : Professeur Daouda Kassoum MINTA,**
 - o Professeur titulaire des universités ;
 - o Agrégé de maladies infectieuses et tropicales ;
 - o Directeur du centre d'excellence de lutte contre le VIH ;
 - o Chargé de cours de parasitologies et de thérapeutiques à la FMOS ;
 - o Chercheur au DEAP/MRTC/FMOS-Mali ;
 - o Vice-président de la société africaine de pathologies infectieuses ;
 - o Président du comité scientifique VIH du Mali ;
 - o Président de la SOMARAM.

Cher Maître

Permettez-nous de vous exprimer nos sincères remerciements. C'est un grand honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de cette thèse avec plaisir et sans conditions.

Nous gardons un vif souvenir de la simplicité et l'amabilité de votre abord.

Vos qualités humaines et scientifiques seront pour nous un exemple à suivre dans l'exercice de notre métier.

Veillez trouver ici, l'expression de notre profonde gratitude et notre grande estime.

- **A notre maitre et juge : Docteur Karamoko SACKO,**
 - o Maître-assistant à la FMOS ;
 - o Diplômé interuniversitaire en pathologie fonctionnelle digestive ;
 - o Praticien hospitalier.

Cher Maître,

Nous avons été impressionnés par la promptitude et la modestie avec lesquelles vous avez accepté de juger ce travail malgré vos multiples sollicitations.

Nous vous remercions pour votre accueil, votre bonne humeur et votre professionnalisme.

Veillez trouver dans cet ouvrage le témoignage de notre profonde reconnaissance et respect.

➤ **A notre Maitre et juge : Docteur Jean Paul DEMBELE,**

- Médecin infectiologue
- Praticien hospitalier au CHU du Point G
- Membre du conseil d'administration du CHU du point G
- Maitre-assistant à la FMOS
- Secrétaire aux relations extérieures et aux affaires sociales de la société malienne de pathologie infectieuse et tropicale (SOMAPIT)
- Membre de la société africaine de pathologie infectieuse (SAPI)

Cher Maitre,

Nous vous remercions vivement pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail.

Nous sommes très sensibles à votre gentillesse et à votre accueil très aimable.

Que ce travail soit pour nous l'occasion de vous exprimer notre admiration ainsi que notre gratitude.

Veillez croire, en nos sentiments les plus respectueux.

➤ **A notre maitre et codirecteur : Docteur Ibréhima GUINDO,**

- Pharmacien biologiste ;
- Chef de service bactériologie et virologie de l'INRSP ;
- Responsable du laboratoire des IST/VIH de l'INRSP ;
- Maitre-assistant de Bactériologie et Virologie a la faculté Pharmacie.

Cher Maitre,

Nous vous remercions vivement de nous avoir fait l'honneur de diriger ce travail.

Vous nous avez aidé jusqu'au dernier moment avec un grand savoir et des orientations éclairantes accompagnées d'une grande gentillesse.

Sans votre Clairvoyance, vos corrections méticuleuses, ce travail n'aurait pu être préparé et dirigé dans des conditions favorables.

Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles

Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.

- **A notre maitre et directeur de thèse : Professeur Flabou BOUGOUDOGO,**
 - o Maître de conférences Agrégé de bactériologie-virologie à la faculté de pharmacie et de médecine ;
 - o Responsable de l'enseignement de la bactériologie-virologie à la faculté de pharmacie ;
 - o Directeur de l'INRSP (2002-2012) ;
 - o Officier de l'Ordre du Mérite de la Santé.

Cher Maitre,

Nous avons eu le privilège de bénéficier de vos conseils précieux, de votre écoute permanent, et surtout de votre patience. Nous sommes reconnaissants de la confiance que vous nous avez accordée et des discussions enrichissantes que nous avons eues. Nous tenons à vous assurer toute notre admiration et notre respect.

Que chacun d'entre vous soit ici vivement remercié de sacrifier votre temps pour évaluer et juger mon travail ainsi que le plaisir d'assister à ma soutenance. Recevez ici, l'expression de notre respectueuse gratitude pour l'attention et l'intérêt que vous avez portés à ce travail.

Je remercie...

Toute l'équipe du service de bactériologie-virologie de l'INRSP,

- En particulier : **Dr Ibréhima GUINDO, Dr Hamadou Abdou DIALLO, Dr Adama Diarra, Dr Hawa Sanogo Traoré, tantie Traoré Hawa Samaké**

Je saisis cette opportunité pour vous remercier de m'avoir accueilli au sein de votre service. Nous portons une grande considération tant pour votre gentillesse que pour vos qualités professionnelles. Vous nous avez énormément aidés à la réalisation de ce travail.

Veillez trouver ici, l'expression de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

- **Dr Alhadji A DICKO, Dr Hamidou CISSE, Dr Mohamed S SANGARE** et mes camarades **thésards**

Je vous remercie pour votre aide malgré vos occupations personnelles. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.

Qu'Allah vous bénisse !

Sigles et abréviations

µl	: Microlitre
3'NC	: Région 3' non codante
5'NC	: Région 5' non codante
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADN _c	: ADN complémentaire
ARN	: Acide Ribonucléique
BGM	: Buffalo green monkey kidney
CDC	: Center for Diseases Control
CHU	: Centre Hospitalier Universitaire
CNR EV	: Centre National de Référence des Entérovirus
CNR	: Centres nationaux de référence
CV	: Coxsackiévirus
Ec K1	: Escherichia coli K1
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
GBS	: Streptococcus agalactiae
H	: Heure
HAV	: virus de l'hépatite A
Hib	: Haemophilus influenzae sérotype b
HRV	: Rhinovirus humains
ICTV	: Internationale Comitee of Taxonomy of Viruses
IgG	: Immunoglobuline G
IgM	: Immunoglobuline M
INRSP	: Institut National de Recherche en Santé Publique
IRES	: Site d'initiation interne de la traduction
Kda	: Kilo Dalton
L'InVS	: Institut de Veille Sanitaire
LCS	: Liquide cérébro-spinal
Lm	: Listeria monocytogenes
MRC-5	: Medical Research council-5
Nm	: Neisseria meningitidis
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
ORF	: Cadre ouvert de lecture

PCBP	: Poly-C Bing Protein
PCR	: Polymerase chain Reaction
PTC	: Procalcitonine
Rh Mk	: Rhesus monkey kidney
RT	: Recriptance Inverse
SRE	: Réseau de surveillance des entérovirus
STIC	: Soutien aux Techniques Innovantes Couteuses
UV	: Ultra-Violet
VIH	: Virus de l'Immuno- Deficiencie

Table des matières

Introduction : **Erreur ! Signet non défini.**

Objectifs **Erreur ! Signet non défini.**

I. Généralités **Erreur ! Signet non défini.**

II. Méthodologie..... **Erreur ! Signet non défini.**

III. Résultats **Erreur ! Signet non défini.**

IV. Discussions **Erreur ! Signet non défini.**

V. Conclusion..... **Erreur ! Signet non défini.**

VI. Recommandations..... **Erreur ! Signet non défini.**

Annexes **Erreur ! Signet non défini.**

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la capsid des entérovirus	9
Figure 2 : Organisation du génome des entérovirus.	11
Figure 3 : Représentation schématique des structures secondaires de la séquence 5' non codante du génome de l'EV-A71.....	11
Figure 4 : Structure de la séquence 3' Non codante des EV-B.	13
Figure 5 : Physiopathologie connue des entérovirus.	16
Figure 6 : Cartographie des districts sanitaires du Mali (mise à jour du 19/07/2012) (50)	21
Figure 7 : a) Stratagene® Mx3005P™ et b) bloc à support de plaque	25
Figure 8 : Exemple de plan de plaque	27
Figure 9 : Modèle graphique de la RT-PCR où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.	27
Figure 10 : Répartition des patients selon le sexe.....	29
Figure 11 : Répartition des patients par tranche d'âge	30
Figure 12 : Répartition des LCS par mois de réception.....	30
Figure 13 : Répartition des LCS selon la région administrative d'origine	31
Figure 14 : PCR positif à entérovirus selon le sexe des patients	32
Figure 15 : PCR positif à entérovirus selon les tranches d'âge.....	32
Figure 16 : répartition des résultats de la PCR en temps réel en fonction des saisons	34
Figure 17 : Résultats de la PCR en temps réel en fonction des régions administratives	35

Liste des tableaux

Tableau I : Classification des géotypes d'entérovirus humains (www.picornaviridae.com, accès le 29-11-2013) 8

Tableau II : Répartition des LCS selon l'aspect macroscopique et la qualité..... 31

Tableau III : Résultats de la PCR en temps réel 32

Tableau IV: Répartition du résultat de la PCR des LCS selon leurs mois de réception 33

Tableau V: Répartition des résultats selon le milieu de transport 33

Tableau VI : Résultats de la PCR en temps réel en fonction de l'aspect et de la qualité du LCS..... 34

Introduction :

La méningite est une réaction inflammatoire des méninges au niveau de l'espace sous arachnoïdien. Elle se traduit par une triade symptomatologique (fièvre, céphalées et raideur de la nuque) souvent accompagnée de photophobies et de troubles digestifs (vomissements, nausées...) (1,2).

Les méningites inquiètent les patients et les praticiens en raison de leur potentielle gravité, qui varie en fonction de l'étiologie. En effet, elle peut être bactérienne, virale, voire fongique et parasitaire.

Les méningites bactériennes représentent 20 à 25 % des méningites communautaires (3).

Celles virales sont fréquentes et probablement sous diagnostiquées en raison de leurs symptômes moins sévères et d'une absence de recherche étiologique complète. Il est difficile d'avancer des données épidémiologiques précises en absence d'un système de surveillance spécifique et compte tenu du caractère généralement bénin de ces affections. L'évolution est le plus souvent favorable, avec une guérison généralement complète (4). En plus des manifestations cliniques, leur diagnostic est basé sur l'analyse du liquide cérébro-spinal (LCS), qui dans ce cas est clair, normoglycorachique avec une pléiocytose lymphocytaire et négatif aux investigations bactériologiques (examen direct et culture) (5). L'évolution étant bénigne, on ne réalise que rarement de recherche virale détaillée. En cas de suspicion, l'application des nouvelles techniques, notamment de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), peut probablement permettre d'identifier l'agent étiologique dans environ 50 % des cas (6).

Les méningites virales surviennent généralement sous forme sporadique ou épidémique. Des variations saisonnières peuvent être observées et dépendent essentiellement de l'agent causal. Les entérovirus sont la cause la plus fréquente d'épidémies (85% à 95% des méningites virales), qui surviennent généralement à la fin de l'été ou au début de l'hiver dans les zones tempérées, et toute l'année dans les zones tropicales et subtropicales (7).

En période épidémique, les virus ourliens peuvent être responsables de 10 à 30% des cas de méningites dans les populations non immunisées (8).

Les virus herpès simplex représentent l'étiologie la plus fréquente dans les cas de méningites virales sporadiques de l'adolescent et de l'adulte (9) et seraient responsables de 0,5 à 3% des cas de méningite aseptique (10). D'autres herpès virus comme le virus Epstein-Barr, le cytomégalovirus, le virus de la varicelle et du zona ou l'herpès virus humain 6 peuvent être également responsables de cas sporadiques et sont souvent décrits chez des personnes

immunodéprimées. Des méningites associées au virus d'immunodéficience humaine (VIH) sont observées chez 5 à 10% des patients lors de la phase de séroconversion (4) .

Dans les zones où les vecteurs (moustiques ou tiques) sont endémiques, des épidémies de méningites liées à des Flavivirus sont observées ; parmi ces Flavivirus, on retrouve essentiellement le virus West Nile, le virus de l'encéphalite japonaise ou celui de l'encéphalite de Saint-Louis (4) .

Selon l'OMS, c'est dans la ceinture de la méningite qui s'étend du Sénégal à l'Ouest jusqu'en Éthiopie à l'Est que l'on enregistre les taux les plus élevés de méningites bactériennes (11). Ainsi au Mali, un système de surveillance épidémiologique a été mis en place pour alerter à temps opportun les autorités sanitaires nationales de la survenue d'une épidémie et de leur fournir les informations nécessaires afin de prendre les mesures d'urgence nécessaires. Les demandes d'analyse de LCS ne cessent de croître et les cas positifs à la bactériologie dépassent rarement le tiers. Selon les données des trois dernières années : les chiffres étaient de 96 sur 355 (soit 27,04%) en 2014 ; 72 sur 504 (soit 14,28%) en 2015 et 165 sur 690 (soit 23,91%) en 2016. Ces résultats observés nous poussent à poser certaines questions : le faible taux de positivité est-il dû aux mauvaises conditions d'acheminement (conservations et transport) des échantillons au laboratoire ? Ou est-il dû à une antibiothérapie préalable ? Ou ces méningites sont-elles dues à d'autres agents pathogènes hormis les bactéries ? Nous disposons de très peu de données concernant les méningites virales au Mali, quel serait donc leur prévalence dans la surveillance épidémiologique de la méningite ?

Objectifs

Objectif général

Evaluer la place des entérovirus dans le cadre de la surveillance épidémiologique des méningites au Mali.

Objectifs spécifiques

- Décrire la qualité et l'aspect macroscopique des LCS reçus ;
- Déterminer le taux de positivité des entérovirus par la technique de la PCR ;
- Analyser les résultats de la PCR selon les données sociodémographiques des patients.

I. Généralités

I.1 Définition :

Selon l'encyclopédie médico-chirurgicale, la méningite est une inflammation entraînant des anomalies du LCS (12). En effet au cours d'une méningite les différentes cellules de la cascade inflammatoire passent dans le LCS provoquant une pléiocytose(3). Ces infections peuvent être bactériennes, fongiques et le plus souvent virales. Une classification des méningites en fonction de l'aspect macroscopique du LCS est généralement admise. Classiquement les :

- « Méningites dites à liquide clair » (LCS translucide) sont des méningites aseptiques d'origine virale pour la plupart avec une prédominance de lymphocytes dans le LCS ;
- « Méningites dites purulentes » (LCS trouble contenant de nombreux polynucléaires) sont des méningites d'origine bactérienne avec une prédominance de polynucléaires neutrophiles (12).

Plusieurs revues récentes indiquent qu'aucune définition n'est stricte tant que l'étiologie n'est pas précisée (3). En effet une méningite virale peut-être initialement puriforme, aseptique à prédominance de polynucléaires. A l'inverse, la formule cytologique d'une méningite bactérienne peut être panachée voire lymphocytaire. La turbidité du LCS dépend d'avantage de l'abondance de la réaction cellulaire, de l'élévation des concentrations en protéine du LCS, et du type cellulaire majoritaire dans le LCS (3).

L'aspect macroscopique du LCS ne suffit pas à lui seul pour déterminer l'étiologie bactérienne ou virale d'une méningite. D'autres examens pratiqués sur le LCS notamment biochimiques sont mentionnés dans les traités de médecine comme la mesure de la protéinorachie, le calcul du ratio concentration du glucose du LCS/glycémie, le dosage des lactates, et le dosage de la procalcitonine (PTC) dans le LCS (3).

Les méningites bactériennes représentent 20 à 25 % des méningites communautaires (3). Il est difficile d'avancer des données épidémiologiques précises pour les méningites virales en raison de l'absence de déclaration obligatoire et d'une sous-estimation en rapport avec leur bénignité (12).

Selon le CNR (Centres nationaux de référence), du 1^{er} janvier au 13 novembre 2018, les laboratoires du RSE (Réseau de surveillance des entérovirus) ont recensés 1716 LCS positifs aux EV en France. C'est un problème de santé publique important par plusieurs aspects. Si la cause virale est la plus fréquente et le plus souvent d'évolution bénigne, en dehors des méningo-encéphalites, les méningites bactériennes constituent une urgence thérapeutique car

grevée d'une mortalité élevée et de séquelles neurologiques et sensorielles en dépit d'une prise en charge adéquate (3).

Les principales bactéries en cause sont : *Haemophilus influenzae* de type b avec 13%, *Streptococcus pneumoniae* (le pneumocoque) avec 32%, *Neisseria meningitidis* (le méningocoque) avec 46% (11).

Il est difficile d'avancer des données épidémiologiques précises des méningites virales compte tenu de l'absence de surveillance spécifique, cependant quelques données sont disponibles grâce aux études faites à travers le monde.

I.2 Epidémiologie

Les méningites aseptiques sont des inflammations causées généralement par les entérovirus et particulièrement ceux de l'espèce EV-B : echovirus et coxsackievirus B (13).

Les données provisoires de 2018 des laboratoires du RSE ont également prouvés que les génotypes de l'EV-B sont généralement responsables de Méningite : L'E-30 (38%), l'E-9 (21%), l'E-11 (9%).

La sévérité des méningites à entérovirus varie en fonction de l'âge du patient et de son statut immunitaire. Les nouveau-nés de moins de deux semaines présentent plus de risques de développer une atteinte systémique sévère généralement associée à une méningo-encéphalite. Chez des enfants de plus de deux semaines, les entérovirus sont rarement associés à des atteintes systémiques de mauvais pronostic (12). Il existe une prédominance des méningites à EV chez les enfants de moins de dix ans (14,15) Le rapport final de 2009 du programme de soutien aux techniques innovantes couteuses (STIC) de 2006 portant sur « l'évaluation médico-économique du diagnostic moléculaire des méningites à entérovirus », confirme cette prédominance chez les enfants.

Les méningites à EV touchent plus particulièrement les enfants, cependant les adultes peuvent être atteints et représentent environ 20 à 30 % des cas identifiés prospectivement (3). Les entérovirus se distribuent partout dans le monde et circulent tout au long de l'année dans les régions tropicales.

Aux États-Unis, il y aurait 750 000 cas de méningites entérovirales par an dont à peine 10 % seraient recensés par le Center for Diseases Control (CDC) d'Atlanta (3).

Au Canada, entre 1980-1992, chaque année 250 à 700 cas de méningites virales étaient déclarés aux services de santé publique (16), soit une incidence annuelle de 1,1 à 2,6 cas pour 100 000 habitants. Selon toute probabilité, ce chiffre n'estime pas l'incidence réelle de la méningite virale puisque les cas ne sont pas toujours déclarés. Pour mieux comprendre

l'épidémiologie, il faudrait déclarer aux services de santé publique à la fois les cas confirmés en laboratoire et diagnostiqués en clinique.

En France de 2008 à 2012, le réseau de surveillance des EV coordonné par le Centre national de référence des entérovirus et parechovirus (CNR EV) ont identifié en moyenne plus de 1400 cas par an de méningites à EV. Elles sont caractérisées par une saisonnalité avec un pic principal du nombre de cas en été et un second à l'automne. Cette augmentation peut s'observer dès le mois de mai mais survient le plus souvent en juin-juillet (17).

En Afrique, nous disposons de peu de données ; Une étude réalisée à l'hôpital Hassan II à Agadir en 1996 sur 268 cas de méningites aiguës chez l'enfant, a rapporté 8% de méningites virales (18). Dans une autre étude réalisée au service de pédiatrie CHU Hassan II Fès en 2009, sur 88 cas de méningites aiguës, les méningites virales représentaient 25% des cas (18).

I.3 Physiopathologie

Le début d'une méningite à entérovirus est généralement brutal avec la présence d'un pic fébrile entre 38 et 40°C, qui est observé dans 75 % des cas. Les manifestations cliniques d'une méningite entérovirale sont non spécifiques ; les symptômes présents chez la plupart des patients sont : des fièvres de type bi phasique, des céphalées, une irritabilité, des vomissements et une photophobie, parfois associés à un rash cutané et à une conjonctivite hémorragique, une diarrhée ou une toux. Les complications neurologiques (convulsions fébriles, hypertension intracrânienne) sont rares et principalement observées chez les nourrissons (15).

I.4 Traitements

Il n'y a pas d'indication pour un traitement antiviral spécifique puisque l'évolution est spontanément bénigne. Le traitement symptomatique est en règle générale suffisant pour assurer une guérison sans séquelle. Ajuster minutieusement les apports hydrosodés dans le contexte d'un syndrome inapproprié d'hormone antidiurétique et/ou d'un œdème cérébral. En cas de crises convulsives, on pourra utiliser des benzodiazépines et/ou du phénobarbital. Le traitement des pic fébriles repose sur le paracétamol (19).

I.5 Etude bibliographique

Les agents pathogènes sont multiples, ayant en commun les caractéristiques biologiques suivantes : un LCS clair, lymphocytaire, normoglycorachique et une protéinorachie normale parfois augmentée. Cependant les entérovirus restent la première cause de méningites aseptiques.

I.5.1 Classification et historique

La plasticité génétique des picornavirus a permis l'émergence de multiples groupes viraux chez un grand nombre d'espèces parmi les vertébrés. Selon le comité international de taxonomie virale (Internationale Comitee of Taxonomy of Viruses : ICTV, 2012), la famille des Picornaviridae regroupent 17 genres viraux : Aphthovirus, Aquamavirus, Avihepatovirus, Cardiovirus, Dicipivirus, Entérovirus, Erbovirus, Hepatovirus, Kobuvirus, Mergrivirus, Parachovirus, Salivirus, Sapelovirus, Senecavirus, Teschovirus et Tremovirus. Parmi les Picornaviridae, on recense aussi plusieurs genres dans lesquels sont classés des virus humains. Celui des Hepatovirus comprend un seul type pathogène chez l'homme, le virus de l'hépatite A (HAV). Le genre des Parechovirus comprend 12 génotypes, dont le type 3 est reconnu depuis quelques années seulement comme agent d'infections neuro-méningées chez le jeune enfant (29). IL n'y a pas de genre qui regroupe des virus d'origine exclusivement humaine, à l'exception du genre Hepatovirus.

La diversité des entérovirus humains est connue depuis qu'ils ont pu être obtenus en culture in vitro et différenciés par la technique de séroneutralisation, c'est-à-dire depuis la fin des années 1940, lorsque l'on s'est aperçu que des virus isolés de selles d'enfants de la ville de Coxsackie (Etats-Unis) présentant une poliomyélite paralytique, ne pouvaient pas être neutralisés par les antisérums contre les poliovirus. La séroneutralisation a amené une première vague de sérotypes jusque dans les années 1980, puis les techniques de typage moléculaire ont pris le relais et ont amené à une seconde vague de nouveaux Entérovirus Humains. L'analyse des génomes et les techniques d'identification multi-locus ont ensuite permis de montrer que la recombinaison génétique et les mutations favorisaient l'émergence de virus variant à l'intérieur de chaque génotype (30).

Le genre entérovirus regroupe 4 espèces (A à D) de virus humains et simiens, 5 espèces (E à H et J) de virus animaux et les « espèces (A à C) de rhinovirus humains (HRV). On retrouve actuellement parmi les entérovirus humains A : 11 génotypes de coxsackievirus A et 9 génotypes d'entérovirus. Pour les entérovirus B : 1 génotype de coxsackievirus A, 6 génotypes de coxsackievirus B, 28 génotypes d'echovirus et 24 génotypes d'entérovirus. Pour les entérovirus humains C : les 3 génotypes de poliovirus, 9 génotypes de coxsackievirus A et 11 génotypes d'entérovirus. L'espèce des entérovirus humains D ne compte que 4 génotypes d'entérovirus.

Tableau I : Classification des géotypes d'entérovirus humains (www.picornaviridae.com, accès le 29-11-2013)

Espèce	Géotypes
A	CV-A 2,3,4,5,6,7,8,10,12,14,16 EV-A 71, 76, 89, 90, 91, 114, 119
	CV-A 9 CV-B 1, 2, 3, 4, 5, 6
B	E 1,2,3,4,5,6,7,9,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,24,25,26,27,29,30,31,32,33 EV-B 69,73,74,75,77,78,79,80,81,82,83,84 ,85,86,87,88,93,97,98,100,101,106, 107,111
	PV 1, 2, 3
C	CV-A 1, 11, 13, 17, 19, 20, 21, 22, 24 EV-C 95,96,99,102,104,105,109,113,116,117,118
D	EV-D 68, 70, 94, 111

I.5.1 Structure

I.5.1.1 Structure de la capsid

La capsid des entérovirus présente la structure d'un icosaèdre d'environ 30 nm, elle est formée de 60 protomères, chacun constitué d'un exemplaire des 4 protéines structurales, VP1, VP2, VP3 et VP4. Sa structure tridimensionnelle et les interactions qu'elle établit avec des récepteurs cellulaires ont été résolues pour un certain nombre d'entérovirus par cristallographie. Malgré des différences dans les séquences en acides aminés et des subtilités structurales d'un type ou d'un genre (**figure 1**), l'architecture de la capsid est fondamentalement conservée (31). Les protéines VP1, VP2 et VP3, qui constituent la surface de la capsid, possèdent une organisation commune de 8 feuillets antiparallèles formant une structure dite en tonneau ou « jelly roll » (gâteau roulé). L'association des différentes protéines est assurée par des interactions entre leurs extrémités N-terminales et par la protéine VP4 qui est positionnée à l'intérieur de la capsid et contribue à sa stabilité structurale et son interaction avec le génome viral (**figure 1**). Les boucles peptidiques exposées à la surface des protéines VP1, VP2 et VP3 sont les régions les plus variables de la capsid. Elles forment différents reliefs dont la topologie définit la reconnaissance des récepteurs cellulaires et expose les épitopes viraux. La zone de jonction entre les protomères au niveau de VP1 forme un plateau proéminent « mesa » en étoile à 5 branches, entourée de dépressions « canyons ».

Ces dépressions abritent pour certains entérovirus, comme le PV ou le CV-A21, les sites de fixation de différents récepteurs cellulaires de la superfamille des immunoglobulines (32,33). Pour d'autres entérovirus comme l'EV-A71, le « canyon » n'est pas assez profond pour permettre la fixation d'un récepteur. D'autres récepteurs n'appartenant pas à la super famille des immunoglobulines, comme le ligand 1 de la P-selectine, peuvent se fixer au niveau de deux régions formées par VP2 et VP3. La bordure sud du « canyon » est formée d'une boucle particulièrement proéminente de VP2, appelée « Puff », et des boucles de VP3 forment une importante protrusion appelée « knob » (34). L'interaction des récepteurs cellulaires avec la capside va entraîner la fixation, l'internalisation et la déstabilisation de la capside, processus qui permettront la libération du génome viral dans le cytoplasme.

Les entérovirus sont des virus non enveloppés. La capside forme une véritable armure qui protège le génome viral aussi bien de l'environnement interne tel que l'acide du tube digestif que de l'environnement extérieur. Cette propriété explique également leur résistance aux solvants des lipides (alcool à 70°, éther et chloroforme), aux désinfectants et aux acides faibles. Les entérovirus sont cependant thermolabiles à 50°C et sensibles au formol, à la glutaraldehyde, à l'hypochlorite de sodium (Javel) et aux acides forts (35,36).

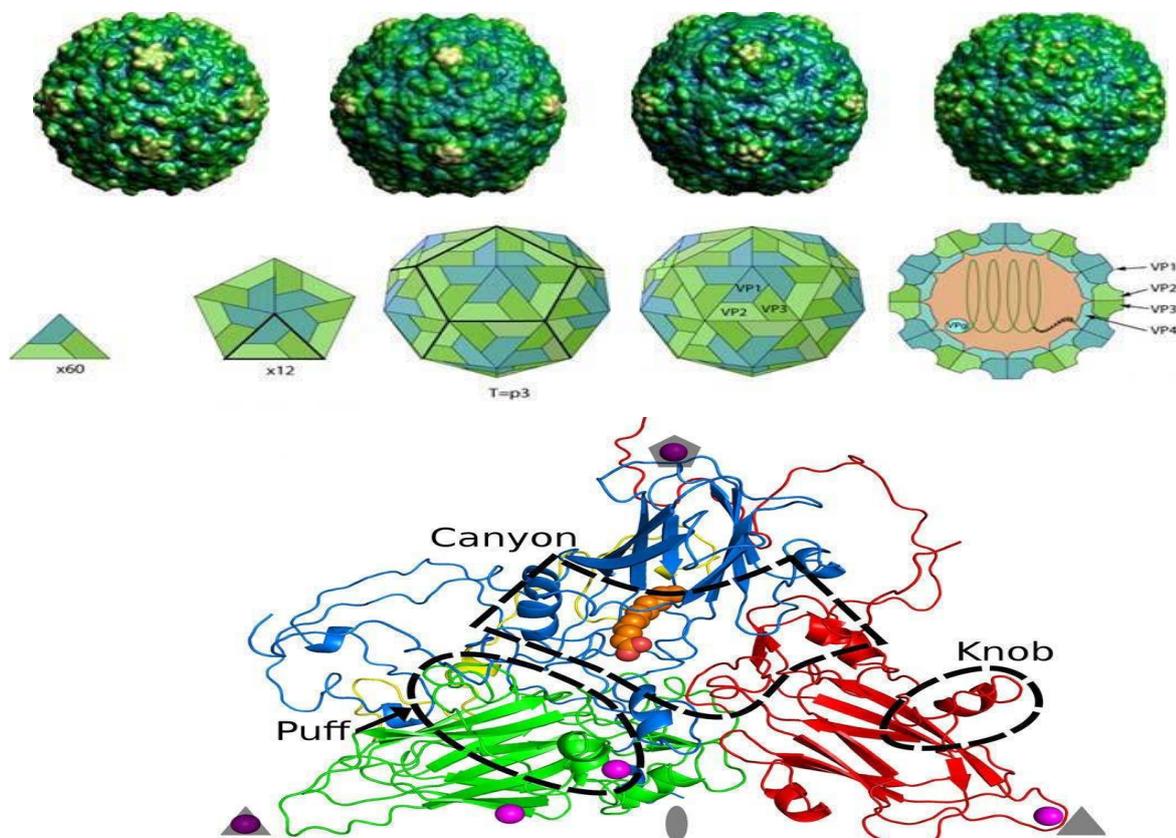


Figure 1 : Structure de la capside des entérovirus

Représentation tridimensionnelle des capsides du poliovirus-1 (A), du coxsackievirus B3 (B), de l'échovirus 11 (C) et de l'EV-A71 (D). (Source : VIPERdb <http://viperdb.scripps.edu/>)

La capside est formée de 60 protomères constitués chacun d'un exemplaire des protéines de structure VP1-4. Cinq protomères forment un pentamère et 12 pentamères forment une capside. Les protéines VP1, VP2 et VP3 sont exhibés à la surface de la capside et VP4 est en position interne (E) (37)

Diagramme d'un protomère d'EV-A71 montrant les différentes protéines de capside VP1 (bleu), VP2 (vert), VP3 (rouge), VP4 (jaune). Les positions caractéristiques de la surface de la capside : le canyon, le puff et le knob, sont indiquées par des pointillés (34).

I.5.1.2 Structure du génome

Le génome des entérovirus est un ARN monocaténaire, de polarité positive, non segmenté et infectieux, c'est-à-dire pouvant être directement traduit. La structure primaire, l'organisation génique et l'expression du génome des entérovirus fut décrite pour la première fois par Kitamura. (1981) à partir de la souche Mahoney du PV-1. Puis assez vite, d'autres types seront décrits, *, extraits de genbank (NCBI) : coxsackievirus B3 (38), entérovirus 71 (39), echovirus 30 [Zell., 1999 non publié]. L'organisation génomique décrite chez les poliovirus est globalement conservée parmi les picornavirus, malgré des différences de taille et de séquence, mais les entérovirus ne présentent pas de séquence codant une protéine « Leader » en 5' de leur génome. Le génome des entérovirus a une longueur d'environ 7500 nucléotides (**figure 2**). Il ne contient qu'un seul cadre ouvert de lecture (ORF) flanqué de 2 régions non codantes. La région située en 5' (environ 750 nucléotides), dépourvue de coiffe, est associée à une petite protéine virale VPg (3B) qui après clivage donnera un ARN pouvant être traduit. La région en 3' d'environ 300 nucléotides est terminée par une queue poly adénylée (38,39).

I.5.1.3 Région 5' non codante (5'NC)

Cette région du génome est caractérisée par 6 structures secondaires (I à VI) en tige boucle (stem-loop) consécutives aux repliements de l'ARN (**figure 2**). La première structure, qui a la conformation d'une feuille de trèfle « cloverleaf » porte un élément multifonctionnel Ori L. Cet élément Ori L intervient en association avec la région 3'NC dans la traduction et la réplication du génome viral (40,41). Les structures (II à IV) forment un site d'initiation interne de la traduction (IRES), qui va amarrer les ribosomes sur l'ARN viral et différents inducteurs cellulaires de la traduction (42–44). Cette région IRES est obligatoire pour la traduction du génome viral à cause de l'absence de coiffe en 5' (45). L'importance fonctionnelle de cette région 5'NC explique la présence de séquences nucléotidiques hautement conservées parmi les entérovirus. Grâce à cette conservation de séquence, des amorces oligonucléotidiques ont

pu être dessinées et utilisées pour réaliser le diagnostic positif des infections à EV par RT-PCR (46).

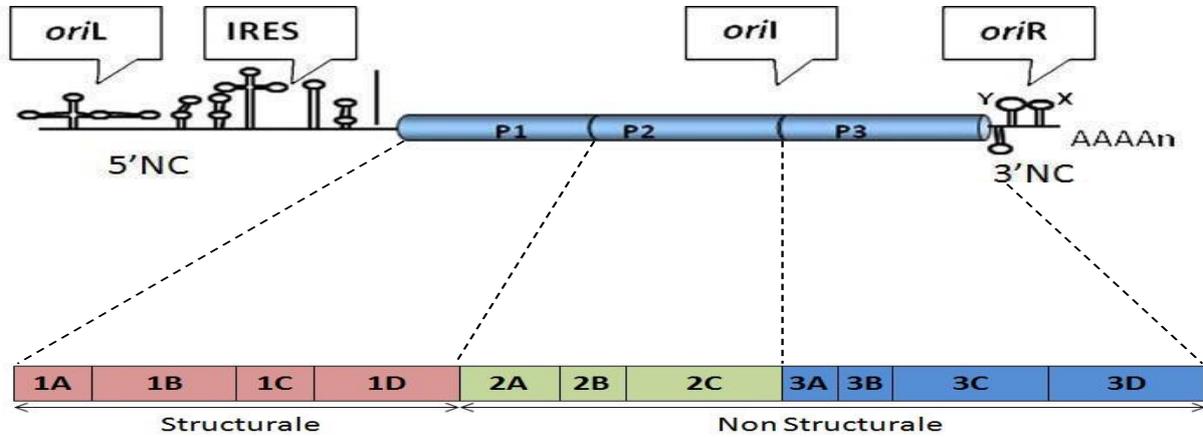


Figure 2 : Organisation du génome des entérovirus.

Le cadre ouvert de lecture est composé des segments génomiques P1, P2 et P3 et il est borné par 2 séquences non codantes (NC) en 5' et 3'. Les séquences 5' et 3'NC, sont impliquées dans la traduction (IRES) et la réplication du génome viral (ORI). Elles se caractérisent par la présence de repliements secondaires de l'ARN (41) (A). Le segment P1 code les protéines de la capsidie dans l'ordre VP4, VP2, VP3 et VP1 ; Les segments P2 et P3 codent des protéines non structurales impliquées dans la réplication du génome viral (polymérase 3D), la maturation des protéines virales (protéases 3C et 2A) et interfèrent avec le métabolisme cellulaire (B).

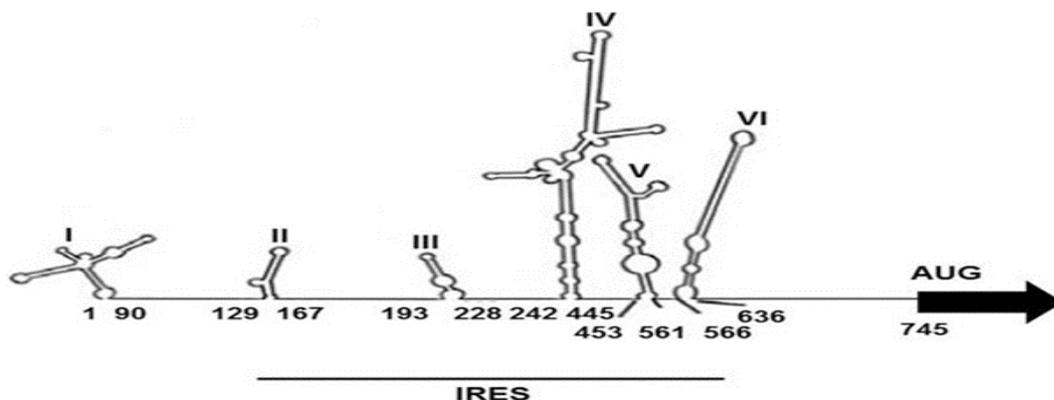


Figure 3 : Représentation schématique des structures secondaires de la séquence 5' non codante du génome de l'EV-A71.

Les 6 structures secondaires en tige boucle sont notées en chiffres romains de I à VI. Le premier et le dernier nucléotide de chaque structure ainsi que le codon initiateur (AUG) sont indiqués. La région d'initiation interne de la traduction (IRES) est soulignée.

(Source : www.sinobiological.com/Biological-Characteristics-of-Enterovirus-71-EV71-a-6404.html)

I.5.1.4 Cadre ouvert de lecture

Le cadre ouvert de lecture (ORF) code une poly protéine d'environ 250 kDa, qui après un clivage auto catalytique donnera 11 protéines virales. Le cadre ouvert de lecture se subdivise en 3 régions P1, P2 et P3 (31). La région P1 code les quatre protéines structurales composant la capsid virale : dans l'ordre VP4, VP2, VP3 et VP1. La région P2 code trois protéines non structurales : 2Apro, 2B et 2C. La région P3 code quatre protéines non structurales 3A, 3B (VPg), 3Cpro et 3Dpol.

- 2Apro et 3Cpro sont des protéases impliquées dans la maturation par clivage de la poly protéine virale et dans la modulation des mécanismes métaboliques de la cellule hôte. La protéase 2Apro intervient aussi dans la régulation de la réplication du génome viral (47).

- 2B, 2C et 3A sont des protéines hydrophobes s'associant aux membranes des organites cellulaires. Elles agissent comme perturbateurs et inhibiteurs des voies métaboliques. Ces protéines interviennent également dans la réplication du génome en induisant la formation de structures vésiculaires issues des membranes intracellulaires, qui servent de plateforme répllicative. D'une manière concentration dépendante, elles stimulent la synthèse de l'anti génome (ARN négatif), qui servira de matrice pour la synthèse de génomes viraux (ARN positifs).

- 3Dpol présente une fonction ARN polymérase ARN dépendante assurant la réplication du génome viral. Elle est dépourvue d'activité éditrice et peut changer de matrice au cours de l'élongation du génome. Elle constitue le principal moteur de la variabilité génétique des entérovirus. Son intermédiaire 3CDpro va induire un changement dans l'utilisation du génome viral en stoppant sa traduction pour initier sa réplication.

- 3B (aussi dénommée VPg) est liée de façon covalente à l'extrémité 5' du génome viral. Sous sa forme poly uridylée VPg-pUpU, elle participe à la réplication du génome viral en servant d'amorce à l'ARN polymérase 3D.

Le cadre ouvert de lecture présente également un élément régulateur de la réplication du génome viral (séquence CRE ou Ori I). Cet élément forme une structure ARN secondaire en tête d'épingle « hairpin » au sein de la région P2. Il sert de matrice pour l'uridylation de la protéine VPg (41).

I.5.1.5 Région 3' non codante (3'NC)

Cette région terminée par une queue poly adénylée est de taille variable selon les génotypes d'entérovirus (**figure 2**). Elle présente comme pour la région 5'NC différents repliements complexes de l'ARN. La conformation globale des repliements secondaires en tige boucle « stem-loop » forme une structure en L. Deux tiges-boucles X et Y, dont la longueur des tiges est hautement conservée (8 et 12 paires de bases respectivement), forment au niveau de leurs boucles des interactions ARN tertiaires par un mécanisme de « pseudoknot » ou « kissing ». Cette organisation spatiale tertiaire forme un élément régulateur Ori R. L'élément Ori R est impliqué dans la synthèse de l'anti génome (polarité négative), qui sert de matrice pour la réplication du génome (polarité positive). L'activité de l'élément Ori R nécessite une connexion avec l'élément Ori L situé dans la région 5' (NC) ! la circularisation du génome viral par un pont protéique (41,48,49).

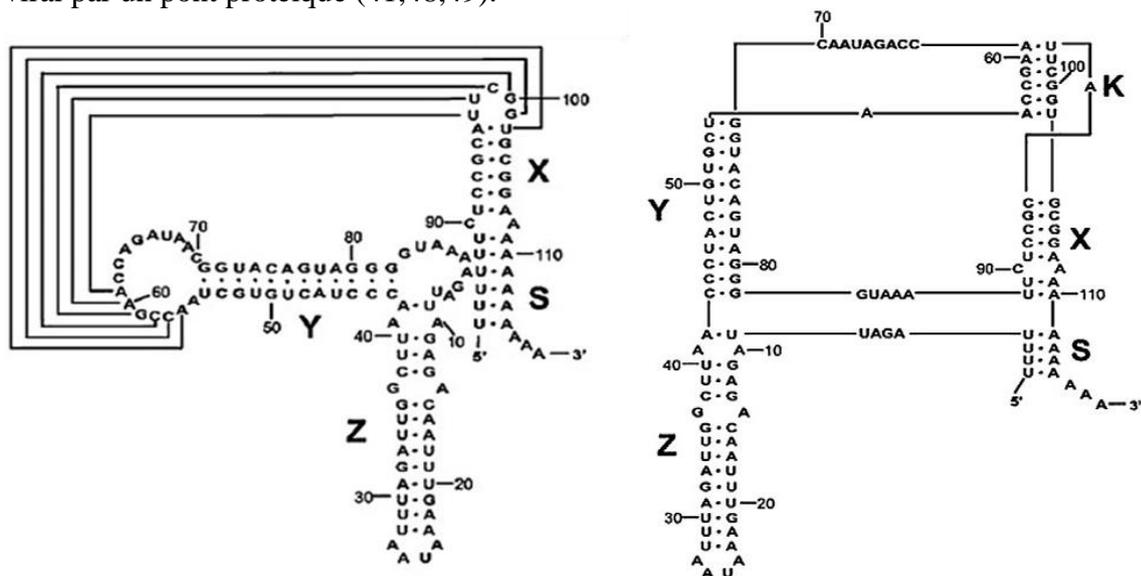


Figure 4 : Structure de la séquence 3' Non codante des EV-B.

Structure secondaire de l'ARN 3' non codant avec les domaines X, Y et Z. Les interactions ARN par un mécanisme de « pseudoknot » ou « kissing » sont désignées par les connecteurs entre les boucles X et Y (A). Structure tertiaire de l'ARN 3' non codant résultante de l'interaction entre les boucles X et Y (B) (41).

I.6 Réplication virale

Lorsqu'une quantité suffisante de protéines virales sont produites, une bascule de la traduction vers la réplication du génome viral aurait lieu, ces deux phénomènes ne pouvant a priori pas se produire simultanément. L'initiation de la réplication serait, elle aussi, sous le contrôle de la structure en feuille de trèfle présente à l'extrémité 5' du génome entéroviral. La boucle IV de la feuille de trèfle interagirait spécifiquement avec la PCBP cellulaire, sous régulation de la protéine virale 3CD (40). La réplication et la traduction ne peuvent avoir lieu simultanément sur le même brin (+). En effet, la polymérase 3Dpol est incapable de répliquer un ARN en cours de traduction.

De nombreux travaux ont permis le développement d'un modèle représentatif des mécanismes de réplication des entérovirus (50). La synthèse du brin négatif (complémentaire de l'ARN génomique positif) serait contrôlée par la région 3'NC, en collaboration avec les

protéines virales 3Dpol et 3AB. Par ailleurs, il est maintenant admis que l'uridylation de VPg est la première étape de cette réplication, Vp_gpU (pU) fournissant alors une amorce à la polymérase virale 3Dpol (51). La synthèse du brin positif est initiée à partir de l'extrémité 3' du brin négatif néo synthétisé (52). L'extrémité gauche de la forme répliquative servirait d'origine de réplication dont la structure en hétéroduplex serait reconnue par les protéines du complexe de réplication et stabilisée au niveau de la structure en feuille de trèfle de l'ARN positif par des protéines virales (2A, 3AB, 3CD) et cellulaires non identifiées. Un complexe ribonucléoprotéique se formerait alors à l'extrémité 5' du brin positif (53). La libération de l'extrémité 3' du brin négatif surviendrait ensuite, suivie de l'uridylation de VPg par 3Dpol. Enfin, VPg nouvellement uridylée (VPg pU (pU)) et 3Dpol serait transférée vers l'extrémité 3' du brin négatif pour initier la synthèse du brin positif (53). L'enzyme responsable de la réplication est 3Dpol, une ARN polymérase ARN dépendante. Cette enzyme commet de nombreuses erreurs à chaque cycle de réplication, estimées à une tous les 103 à 104 nucléotides, qu'elle n'est ensuite pas capable de corriger. Ce taux élevé de mauvais appariements au cours de l'étape de réplication a pour conséquence l'accumulation de mutations dans le génome des virus nouvellement synthétisés. Ainsi, chaque virus va différer des autres par au moins une mutation (54). Une souche d'EV n'est donc pas constituée d'un génotype unique mais plutôt d'une quasi-espèce virale.

➤ **Discrimination entre l'ARN viral et cellulaire**

Les ARN polymérases ARN-dépendantes des EV sont des enzymes matrice-dépendantes. Dans les cellules infectées, la protéine virale 3Dpol copie exclusivement l'ARN viral et non les ARNm cellulaires. Cette spécificité de matrice réside probablement dans l'interaction des protéines de réplication avec des séquences d'ARN spécifiques localisées au niveau des régions 3' et 5' non codantes du génome viral. La région 3'NC du brin d'ARN positif contient un pseudo-nœud, de structure très conservée chez les EV, qui joue un rôle essentiel dans la spécificité de matrice. Il a été démontré que 3Dpol ou 3CDpro ne sont pas capables de se lier à cette structure secondaire en l'absence de 3AB, ce qui suggère que l'interaction de ces deux protéines (3AB-3CD) pourrait déterminer la spécificité de la fixation au niveau du pseudo-nœud de l'extrémité 3' de l'ARN viral. Dans la région 5'NC, la structure en forme de trèfle joue également un rôle important dans la spécificité de matrice. En effet, 3CDpro se lie spécifiquement à cette structure du brin positif, ainsi qu'à la protéine cellulaire PCBP, permettant ainsi la formation du complexe de réplication (31) (55).

➤ **Etapas tardives : morphogénèse et libération des virions**

Bien qu'encore sujette à interrogations, la morphogenèse entérovirale a été appréhendée grâce à l'étude de la capsidite du PV (56). Tout débute par la libération de P1 par la protéase 2A, puis par la libération de VP0, VP1 et VP3 par la protéase 3CD (57). Ces protéines s'associent ensuite pour former un protomère, puis un pentamère (5 protomères), puis la pro capsidite. L'ARN viral néo synthétisé s'associe ensuite avec cette capsidite immature pour former le pro virion. Une étape de maturation au cours de laquelle VP0 est clivée en VP4 et VP2 intervient ensuite, ce qui, couplé à l'encapsidation de l'ARN viral, a pour effet de stabiliser la capsidite (56). L'encapsidation de l'ARN génomique est un processus exclusif, de telle sorte que ni l'ARN négatif, ni les ARNs cellulaires ne peuvent être encapsidés. L'assemblage effectué, les particules virales s'accumulent dans le cytoplasme, sous forme de vésicules cristallines, puis sont ensuite libérées par éclatement des vacuoles à la surface des cellules. La libération des nouveaux virions est concomitante de la lyse cellulaire, au cours de laquelle la protéine virale 2B serait impliquée (41) (58). Les EV sont le plus souvent responsables d'infections aiguës au cours desquelles l'aspect cellulaire est profondément modifié, traduisant l'effet cytopathogène du virus (condensation du noyau, accumulation de vésicules membranaires, ainsi que des réarrangements du cytosquelette). Ces modifications, donnant à la cellule un aspect arrondi, traduisent les changements métaboliques du fait du détournement de la machinerie cellulaire au profit du cycle viral (55). D'autres mécanismes tels que le « shut-off » de la synthèse des protéines cellulaires induit par la protéase 2A participent aux perturbations subies par la cellule infectée (59).

I.7 Pathogénie

La porte d'entrée est habituellement la voie orale, toutefois la voie aérienne est possible pour certains Sérotypes à tropisme oropharyngé (coxsachievirus A 21, échovirus 11, 21) et dans le cas des conjonctivites (entérovirus 70).

La multiplication initiale s'observe dans le tissu lymphoïde de l'oropharynx puis l'entérovirus suit le tractus intestinal et se multiplie probablement au niveau des cellules M des plaques de Peyer environ 1 à 3 jours après l'ingestion.

De là, il passe dans le sang et se multiplie dans les tissus du système réticulo-endothélial (ganglions, rate, foie, moelle osseuse...) (60,61). C'est alors qu'il occasionne une faible virémie souvent non détectable. La plupart du temps l'infection s'arrête à ce stade infra clinique car la réplication virale cesse ou est bien contenue dans le système immunitaire de l'hôte. Jusqu'à 60% des infections sont infra cliniques (62) Toutefois dans quelques cas la virémie est plus importante et donne lieu à une symptomatologie clinique souvent non spécifique.

Suite à cette virémie, le virus gagne alors un organe cible tel que le système nerveux central, le cœur, les muscles et on pourra observer dans les tissus des lésions de nécrose et d'inflammation (63).

L'intensité des lésions dépend du titre de virus (63). Au total, l'incubation clinique peut varier de 7 à 14 jours, avec des extrêmes de 2 à 35 jours.

Une fois dans l'organe cible et l'apparition des signes cliniques, le virus disparaît de l'oropharynx (où il peut rester 3 à 4 semaines au maximum) mais il peut poursuivre sa multiplication intestinale encore plusieurs semaines (5 à 6 semaines).

Quand les signes cliniques apparaissent les anticorps neutralisant sont généralement déjà décelables dans le sang ; toutefois leur présence n'est pas constante notamment dans les méningites (64) .

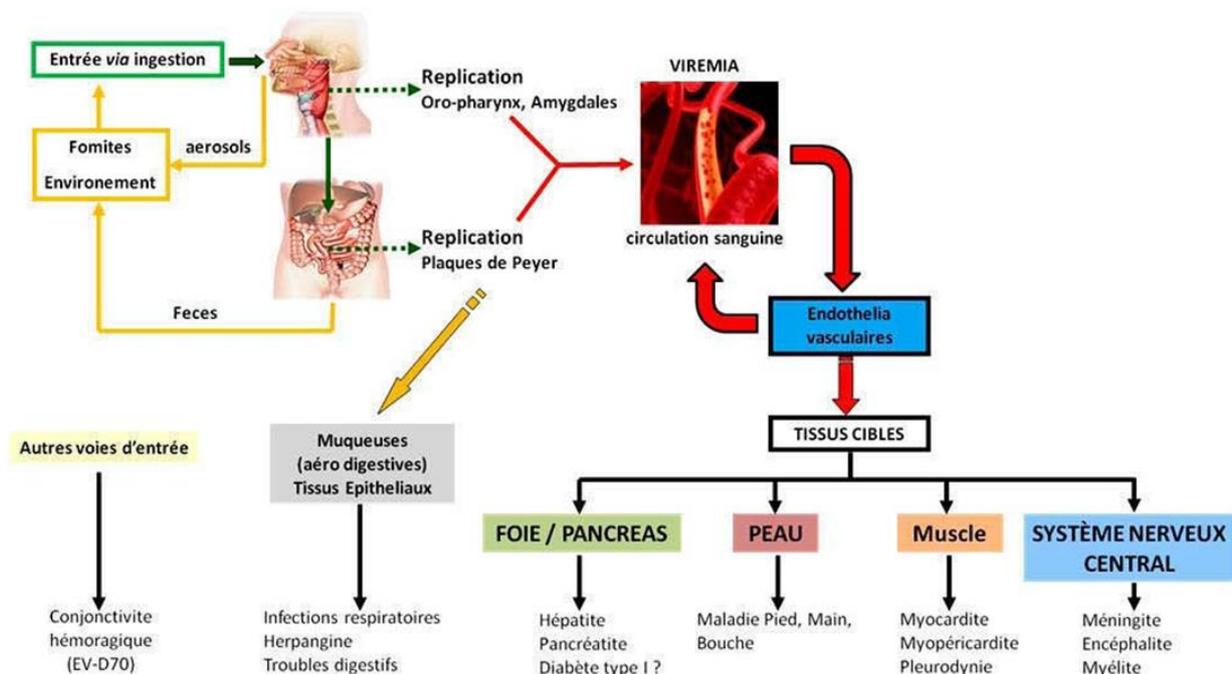


Figure 5 : Physiopathologie connue des entérovirus.

Après contamination par voie orale, les entérovirus pénètrent au niveau des muqueuses aéro-digestives et se multiplient au niveau des tissus lymphoïdes secondaires (Amygdales – Plaques de Peyer). Après multiplication, les entérovirus passent dans la circulation sanguine (virémie) et diffusent vers différents organes.

I.8 Transmission

L'homme est le seul réservoir naturel des entérovirus. L'absence d'enveloppe les rend résistants dans l'environnement, où ils peuvent conserver leur pouvoir infectieux pendant des mois dans des conditions de température et de pH favorables. Ils peuvent être retrouvés dans les coquillages, sur des végétaux contaminés par des aérosols, dans les eaux de surface, les

eaux usées, les boues (65). Leur persistance dans l'eau de consommation est inversement associée au niveau socioéconomique. La transmission des entérovirus se fait principalement par voie fécale-orale et/ou respiratoire, par contacts directs ou indirects avec des personnes, objets ou aérosols contaminés. Les contacts directs ou indirects avec des fluides corporels (larmes, salive, liquide de vésicules) contaminés peuvent contenir le virus des génotypes associés aux conjonctivites hémorragiques et infections cutanéomuqueuses. La transmission des entérovirus est facilitée dans les communautés urbaines denses et/ou fermées : crèche, écoles, maison.

Des cas d'infections nosocomiales à entérovirus ont également été rapportés, principalement au sein d'unités pédiatriques (30,66).

I.9 Diagnostic

La symptomatologie d'une infection à EV ne présente aucun signe clinique caractéristique. C'est pourquoi le diagnostic virologique reste primordial et permet de déterminer le rôle des EV dans l'étiologie du syndrome clinique observé. Comme pour la plupart des virus, le diagnostic virologique est basé sur la mise en évidence de l'un des constituants de la structure du virus (diagnostic virologique direct) ou sur la mise en évidence de la réponse du système immunitaire de l'hôte vis-à-vis de l'infection virale (diagnostic virologique indirect). En raison de la diversité antigénique des EV et de la possibilité de réactions croisées, le diagnostic indirect a un intérêt limité dans le cas des infections à EV. En revanche, une meilleure connaissance de la structure du génome des EV a permis le développement des techniques directes par détection du génome viral. L'introduction des techniques moléculaires, plus sensibles, plus spécifiques et plus rapides dans le diagnostic des EV a constitué un progrès considérable tant dans les pathologies aiguës que dans les infections chroniques liées à ces agents.

I.9.1 Prélèvements et conservation des échantillons

Les EV peuvent être isolés à partir de prélèvements pathologiques (liquide céphalo-rachidien (LCR), selles, sécrétions rhino-pharyngées, sang périphérique, biopsies...) ou des prélèvements environnementaux (eaux, boues, coquillages...). Pour les infections des voies respiratoires supérieures, les prélèvements de gorge et de nez sont les plus utiles. Le lavage nasal et l'aspiration naso-pharyngée sont des prélèvements pouvant contenir les plus hauts titres de virus et peuvent fournir un grand nombre de cellules, notamment pour les techniques d'immunofluorescence. Les écouvillons naso-pharyngés sont plus faciles à obtenir et peuvent également être utilisés pour la culture (67). Le rendement des cultures virales peut être

optimisé en combinant un frottis de gorge à un prélèvement naso-pharyngé dans le même tube de transport. Au laboratoire les échantillons biologiques destinés à la biologie moléculaire doivent être conservés à -70°C pour préserver l'intégrité du génome. Les autres prélèvements peuvent être conservés à -20°C .

I.9.2 Diagnostic direct

I.9.2.1 Isolement par culture cellulaire

La culture cellulaire permet l'isolement de la souche virale à partir d'une variété d'échantillons cliniques tels que le LCR, les selles et le pharynx. Avant l'arrivée des outils de diagnostic moléculaire, la technique de référence pour la détection des EV au laboratoire était l'isolement du virus en culture cellulaire. La mise en évidence d'un EV en culture cellulaire se fait par l'observation de la survenue d'un ECP caractéristique de l'infection à EV qui est facilement observable par microscopie optique, à partir de cellules arrondies qui se détachent de la boîte de culture et finissent par subir la lyse.

La technique de culture cellulaire est relativement lente, nécessitant au moins 3 à 6 jours pour voir apparaître un ECP. La culture cellulaire est également limitée par les faibles titres viraux dans certains types d'échantillons tels que le LCR et par la difficulté d'isoler certains sérotypes qui poussent mal ou pas du tout dans les cultures cellulaires. Ainsi, CV-A1, CV-A19 et CV-A22 n'ont jamais pu être cultivés *in vitro*, mais exigent l'inoculation à des souriceaux nouveau-nés (68).

Malgré l'utilisation de systèmes de culture en format microplaques ou en cupules, cette technique reste très lourde, avec des résultats souvent tardifs (apparition d'un ECP sur culture cellulaire 2 à 12 jours après l'inoculation). Du fait de l'existence de quatre espèces d'EV (hors rhinovirus) qui n'utilisent pas les mêmes récepteurs cellulaires pour entrer dans la cellule cible, il faut utiliser au moins deux à trois lignées cellulaires afin d'augmenter les chances d'isoler la souche virale pathogène. Classiquement on utilise des lignées continues de fibroblastes humains type MRC-5 associées à des cellules de rein de singe type Rhesus monkey kidney (Rh Mk) ou Buffalo green monkey kidney (BGM). Une lignée type MRC-5 seule ne permet qu'un taux de détection de 30 à 43% des souches d'EV ; d'où l'intérêt d'effectuer l'isolement sur deux ou trois types de lignées. En associant aux fibroblastes humains des cellules BGM et des cellules Hep-2 dérivées d'un carcinome épidermoïde du larynx, il est possible d'augmenter de 18% le nombre d'isollements positifs et de raccourcir le délai de positivité (32). L'ECP caractéristique des EV se traduit par l'apparition de grandes cellules réfringentes se généralisant à l'ensemble du tapis cellulaire. Pour confirmer que le

virus isolé dans des cultures cellulaires est un EV, il est possible d'effectuer un test rapide à l'aide d'un antigène spécifique de groupe partagé par la plupart des sérotypes d'EV et situé dans la protéine VP1. Ce motif PALTAVETG (69) est reconnu par les anticorps monoclonaux disponibles dans le commerce qui peuvent être utilisés dans des tests fluorescents ou enzymatiques (70–72).

I.9.2.2 Hybridation moléculaire

L'hybridation moléculaire a constitué la première approche moléculaire pour la détection des EV (73). Cette technique est basée sur l'utilisation de sondes complémentaires avec des séquences spécifiques du génome des EV. Ces sondes peuvent être des ARN (ribosondes), des ADN complémentaires (ADNc) (74,75) ou des sondes oligonucléotidiques (46,76). Les sondes ARN sont plus sensibles mais moins spécifiques que les sondes ADNc ; les sondes oligonucléotidiques sont les plus spécifiques mais se révèlent aussi les moins sensibles. Les sondes ciblent différentes régions génomiques en fonction des objectifs : sondes universelles au niveau des régions 5'NC, 3'NC et la région codant la polymérase reconnaissent tous les EV ou sondes spécifiques d'un sérotype ou d'un variant sérotypique au niveau des régions codant les protéines structurales. L'hybridation moléculaire a été appliquée avec succès sur des cellules en culture infectées par les EV. Cependant, elle demeure insuffisamment sensible pour la détection directe d'EV à partir des prélèvements pathologiques dont la plupart contient une faible quantité de virus (77).

I.9.2.3 Techniques d'amplification du génome des entérovirus

Les limites de la culture cellulaire et de l'hybridation moléculaire ont favorisé le développement de techniques d'amplification par PCR pour la détection universelle des EV ciblant des amorces localisés dans le domaine V de la région 5'NC, hautement conservée parmi tous les EV, de sorte que tous les sérotypes soient détectés (76).

Comparativement à la culture cellulaire et à l'hybridation moléculaire, la RT-PCR est une technique très sensible (entre 10 à 100 copies d'ARN génomique pour 200 µl de liquide biologique) et très spécifique (78). Elle permet un diagnostic étiologique en moins de 48H des infections à EV et ceci quel que soit le type de prélèvement. C'est une technique universelle qui se décline selon différentes variantes en fonction du type de sondes et du mode de révélation du produit d'amplification. Les amorces le plus souvent choisies sont localisées dans la région 5'NC ou bien au niveau de l'extrémité 3' du génome des EV (41,78). Afin de mieux standardiser et de rendre plus rapidement la détection des EV dans les échantillons cliniques, des techniques de RT-PCR en temps réel avec hybridation spécifique des produits

d'amplification ont été développées et permettent de rendre un résultat qualitatif (positif ou négatif) rapide (24 heures) ou quantitatif en utilisant une gamme standardisée de plasmide ou d'ARN transcrits (Pozzetto B. (2009). Des entérovirus et autres picornavirus pathogènes pour l'homme (à l'exception du virus de l'hépatite A), EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), (78–80).

Le test GeneXpert est une méthode de RT-PCR sensible et spécifique pour la détection de l'ARN d'EV dans les échantillons de LCR. Elle est entièrement automatisée et combine sur une seule cartouche réactionnelle (ex : Xpert EVTM) les étapes d'extraction et d'amplification. Le temps de manipulation est très court et le test ne nécessite aucune expertise en biologie moléculaire. Sa durée totale est de l'ordre de 2,5 H (81).

I.9.3 Diagnostic indirect : sérologie

Les techniques indirectes ou sérologiques sont basées sur la recherche des anticorps anti-EV dans le sérum. Ces techniques ont connu un développement limité en raison de la multiplicité des sérotypes et de l'absence d'antigène de groupe pour les EV. La séroneutralisation, bien qu'elle soit lourde et onéreuse, reste la méthode sérologique la plus utilisée. Elle est basée sur l'inhibition du pouvoir infectieux du virus avec un antisérum donné. Deux sérums correspondant aux périodes aiguë et convalescente sont testés en parallèle à la recherche d'une séroconversion ou d'une variation significative du titre d'anticorps dans la phase tardive par rapport à celui de la phase précoce. D'autres techniques indirectes telle que la fixation du complément et l'inhibition de l'hémagglutination ont également été développées mais sont rarement appliquées par manque de sensibilité. En effet, les anticorps qui fixent le complément présentent de nombreuses réactions croisées hétérotypiques. De même, tous les EV n'agglutinent pas les érythrocytes. Des tests ELISA détectant les IgM et les IgG sont également disponibles mais les réactions croisées entre sérotypes rendent l'interprétation des résultats très complexe.

II. Méthodologie

II.1 Design de l'étude

II.1.1 Description de la surveillance épidémiologique

La surveillance épidémiologique a pour but principal d'alerter à temps opportun les autorités sanitaires nationales de la survenue d'une épidémie et de leur fournir les informations nécessaires afin de prendre les mesures d'urgence nécessaires. À plus long terme, les investigations épidémiologiques devraient permettre d'anticiper les risques d'épidémies et prévoir leur diffusion.

La mise en place d'un réseau de laboratoires pour le diagnostic étiologique des méningites bactériennes dans tous les différents districts sanitaires et aires de santé (Figure 7) a permis d'élargir la base de la surveillance dans notre pays.

La direction nationale de la santé, l'Organisation mondiale de la Santé et le CDC, branche méningite sont les structures partenaires pour la surveillance de la méningite.

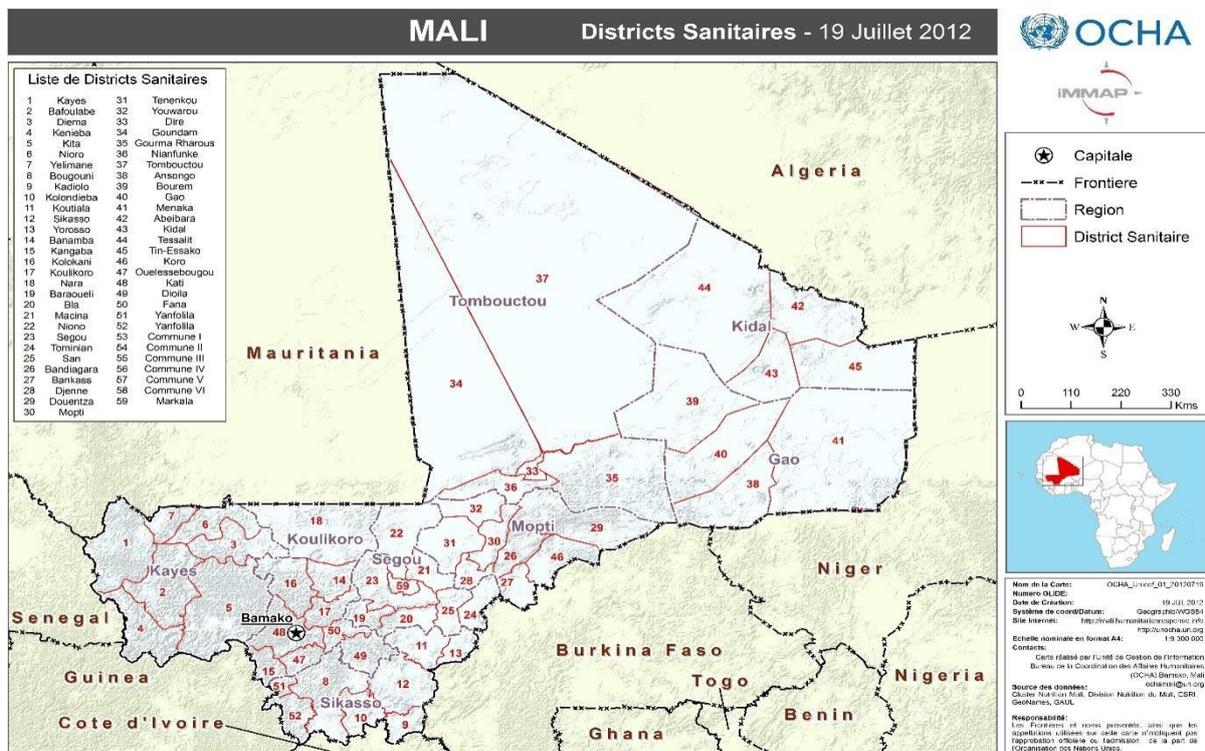


Figure 6 : Cartographie des districts sanitaires du Mali (mise à jour du 19/07/2012) (50)

II.1.2 Description de l'INRSP

Créé par la loi N° 81-17/AN-RM du 31 mars 1981, et érigé en Établissement Public à caractère Administratif (EPA) par la loi N° 93-014 du 11 février 1993, l'INRSP est passé de ce statut à celui d'Établissement Public à caractère Scientifique et Technologique (EPST) par l'ordonnance N° 06-007/P- RM du 28 Février 2006.

Ses missions se résument comme suit :

- Promouvoir la recherche médicale et pharmaceutique en santé publique, notamment dans les domaines des maladies infectieuses, néoplasiques et sociales, de la santé familiale, de l'éducation sanitaire, de l'hygiène du milieu, de la biologie clinique appliquée à la nutrition et aux affections endémo-épidémiques, de la toxicologie médicale et expérimentale, de la bromatologie, de la génétique, de la socio économie, de la médecine et pharmacopée traditionnelle ;
- Participer à la formation technique, au perfectionnement et à la spécialisation dans le domaine de sa compétence ;
- Assurer la référence dans le domaine de la biologie clinique ;
- Assurer la mise au point et la formulation des médicaments traditionnels améliorés ;
- Assurer la protection du patrimoine scientifique relevant de son domaine ;
- Promouvoir la coopération nationale et internationale dans le cadre des programmes et d'accords d'assistance mutuelle ;
- Gérer les structures de recherche qui lui sont confiées.

L'INRSP comprend cinq départements et une agence comptable qui sont :

- Département Santé Communautaire (DSC) ;
- Département Médecine Traditionnelle (DMT) ;
- Département Formation (DF) ;
- Département Administration et Personnel (DAP) ;
- Département de Diagnostic et de Recherche Biomédicale (DDRBR).

Le Département de Diagnostic et de Recherche Biomédicale (DDRBR) se compose de laboratoires de : Sérologie-Immunologie ; Bactériologie-virologie ; Hématologie biologie ; Biochimie clinique ; Parasitologie ; Cytogénétique.

En outre, l'institut dispose des centres de formation en zone rurale qui sont :

- Le centre de Sélingué ;
- Le centre de Kolokani ;
- Le Centre Régional de Médecine traditionnelle de Bandiagara (CRMT).

➤ **Description du service de Bactériologie-Virologie**

Le service de bactériologie-virologie relève du Département de diagnostic et recherche biomédicale. Il a servi de cadre de travail à notre étude. Il comprend :

- Une section de bactériologie générale où sont réalisées les analyses sur les prélèvements de frottis vaginal, de pus (liquide d'ascite, prélèvement urétral, liquide d'épanchement etc.), d'urines, de sang (hémoculture), de coprocultures et les des prélèvements pathologiques divers ;
- Le laboratoire de référence pour la tuberculose ;
- Une section de stérilisation et de préparation des matériels de travail ;
- Un laboratoire de référence pour la méningite doté d'équipements permettant l'identification des espèces bactériennes responsables de la méningite ;
- Un Laboratoire de PCR pour la détermination de la charge virale et le diagnostic précoce du VIH chez le nouveau-né de mère séropositive.

Il existe une relation de contrôle de qualité mutuelle entre l'INRSP et d'autres laboratoires africains et occidentaux. A ce titre, il reçoit plusieurs prélèvements émanant d'ailleurs.

Les partenaires de l'INRSP dans le cadre de la méningite sont : CQNICD, CDC Atlanta branche méningite.

II.1.3 Cadre et Lieu d'étude

L'étude a été réalisé au laboratoire de bactériologie-virologie de l'INRSP. Elle a porté sur les LCS reçus dans le cadre de la surveillance épidémiologique des méningites au Mali.

II.1.4 Type et période d'étude

Il s'agissait d'une étude prospective, transversale et descriptive qui a porté sur les LCS reçus au courant de 2016. La RT-PCR pour l'identification des entérovirus a été fait de janvier 2017 en avril 2018.

II.2 Matériels

II.2.1 Matériel biologique

Le liquide cérébro-spinal a été le spécimen d'échantillon utilisé dans notre étude.

II.2.2 Définitions opérationnelles

➤ **LCS adéquat**

- Tout LCS prélevé sur tube sec et acheminé au LNR dans les 3h.
- Tout LCS prélevé sur le milieu Trans-Isolate sans aiguille d'aération et acheminé au LNR avant une semaine.

➤ **LCS non adéquat**

- Tout LCS prélevé sur tube sec et acheminé au LNR au-delà de 3h.
- Tout LCS prélevé sur le milieu Trans-Isolate mini d'une aiguille d'aération ou acheminé au LNR après une semaine.

II.2.3 Matériels, équipements, consommables et réactifs de la technique PCR

II.2.3.1 Matériels et consommables

- Hotte de biosécurité avec lumière UV ;
- Micro-tubes 2ml, 1,5ml ;
- Micropipettes P20, P200 et P1000 ;
- Cône à filtre 2 μ l ;
- Portoirs ;
- Congélateur -20 ;
- Réfrigérateur +4 ;
- Vortex ;
- Blouse et gant ;
- Désinfectant spray ;
- Poubelle ;
- Minuteur chrono-rebours ;
- Plaque chauffante ;

II.2.3.2 Equipements et réactifs de la PCR en temps réel

➤ **Le Stratagène Mx 3005P**

L'automate Stratagene[®] Mx3005P[™] (Agilent technologies, La Jolla, California) est un système fermé d'amplification et de détection en temps réel (**Figure 6**). Sa source d'excitation est une lampe halogène tungstène-quartz et la détection se fait par photomultiplicateur PMT. Elle comporte cinq filtres de longueurs d'ondes différentes variant de 350 à 700nm et un block chauffant de 25 à 99°C à support de plaque de 96 puits (Figure 6).

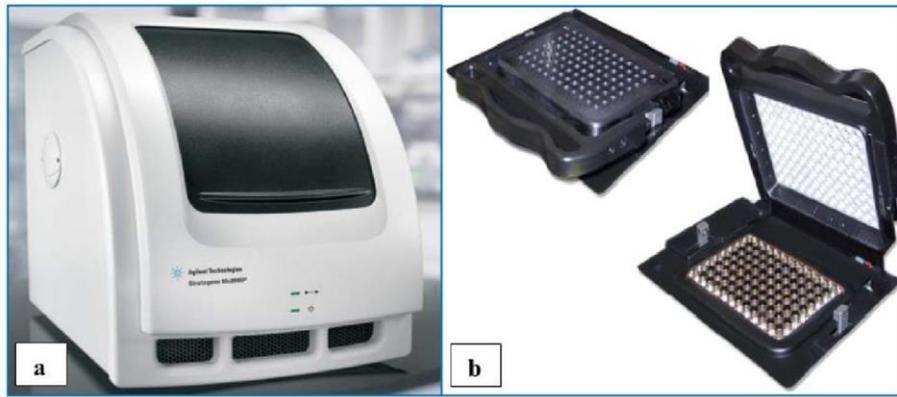


Figure 7 : a) Stratagene® Mx3005P™ et b) bloc à support de plaque

➤ Réactifs d'extraction, d'amplification et de détection

La liste complète des réactifs d'amplification et de détection est citée dans la partie annexe.

II.3 Méthodes

II.3.1 Population d'étude

Notre étude a porté sur l'ensemble des cas suspects de méningite au Mali dont les LCS ont été acheminés au laboratoire national de référence.

II.3.1.1 Critères d'inclusion

Ont été inclus dans notre étude :

- Les LCS reçus dans le cadre de la surveillance épidémiologique des méningites au Mali au cours de 2016 dont la culture et la biologie moléculaire (RT-PCR) pour l'identification des trois bactéries classiquement responsables de méningite (*Neisseria meningitidis* ; *Streptococcus pneumoniae* ; *Haemophilus influenzae*) ont été négatifs.

II.3.1.2 Critères de non inclusion

N'ont pas été inclus de notre étude :

- Les LCS positifs aux examens de la bactériologie classique et de la biologie moléculaire (RT-PCR) pour l'identification des bactéries.
- Les LCS de quantités insuffisantes pour la réalisation de la RT-PCR pour l'identification des EV.

II.3.1.3 Échantillonnage

Nous avons adopté un échantillonnage en mode de sélection systématique portant sur les prélèvements de LCS du 1^{er} janvier au 31 octobre 2016.

II.3.2 Extraction du génome viral

Les ARN génomiques viraux contenus dans les LCS ont été extraits avec la trousse d'extraction manuelle QIAamp® MinElute. Elle est composée des réactifs suivants : le tampon AVE, le tampon AL, les tampons AW1 et AW2, l'ARN entraîneur (potentialise le rendement du matériel génétique), le contrôle d'extraction + inhibition IC1 et le contrôle négatif d'extraction W0.

La 1^{ère} étape est la lyse qui permet la fragmentation des cellules pour libérer l'ARN viral, suivie du lavage avec les tampons AW1 et AW2 qui a pour but de purifier l'ARN. En fin une étape d'éluion avec le tampon AVE pour obtenir l'extrait d'ARN. La solution était conservée à -20°C jusqu'à l'étape d'amplification.

II.3.3 Amplification et détection par RT-PCR

L'ARN extrait était amplifié par la méthode semi-automatique avec l'automate Stratagene® Mx3005P™.

Un mélange réactionnel d'amplification était préparé avec le kit ENTEROVIRUS R-gene® comprenant le premix R9, le premix RT et le contrôle positif PC9. Ce mélange était partagé sur une plaque formée de 96 puits en fonction du nombre d'échantillon. Puis 10µl de l'ARN extrait était ajouté au puits correspondant. Enfin la plaque était déposée dans l'automate en utilisant les conditions suivantes : 5 minutes à 50°C pour la transcription inverse, 15 minutes à 95°C pour l'activation de l'ADN polymérase, et 45 cycles comprenant une étape de dénaturation de 10 secondes à 95°C, une étape d'hybridation de 40 secondes à 60°C et une étape d'élongation de 60 secondes à 72°C.

Date: 05/12/2017		PCR Entérovirus: 12		File name: Aicha Diallo									
										n=28			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
A	366		375		384		393		W0+IC1		R9	15	420
B	367		376		385		394				RT	0,15	4,2
C	368		377		386						Eau Rtdil		37,8
D	369		378		387				PC9		Total		462
E	371		379		388						ARN	10	
F	372		380		389								
G	373		381		390								
H	374		383		391								

La RT doit être au préalable diluée au 1/10 dans l'eau

n= nombre d'échantillon + 2

Figure 8 : Exemple de plan de plaque

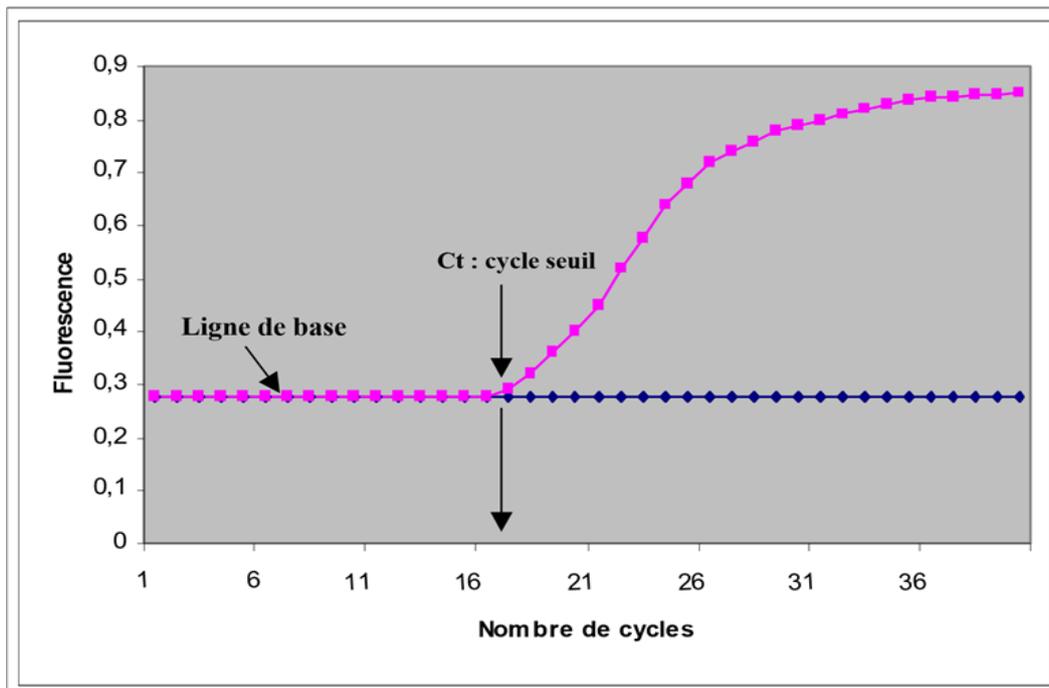


Figure 9 : Modèle graphique de la RT-PCR où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.

L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base.

➤ **Les critères de validation des résultats**

Tout résultat répondant aux conditions ci-dessous était validé.

- 1ère Condition : Le contrôle négatif d'extraction + amplification IC1WO ne doit donner aucun signal « CT » à 560nm.
- 2ème Condition : Le contrôle positif d'amplification (PC9) doit donner un signal « CT » compris entre 20 et 27 cycles à 530nm « FAM »

II.4 Saisie et analyse des données

Les données ont été saisies sur Excel 2016 et analysées avec IBM SPSS statistics 21. Le test de Khi-deux a été utilisé pour la recherche de lien entre les variables avec un seuil de signification statistique fixé à $p=0,05$.

II.5 Collecte des données

Les données sociodémographiques ont été extraites de la base de la surveillance épidémiologique des méningites.

II.6 Considérations éthiques

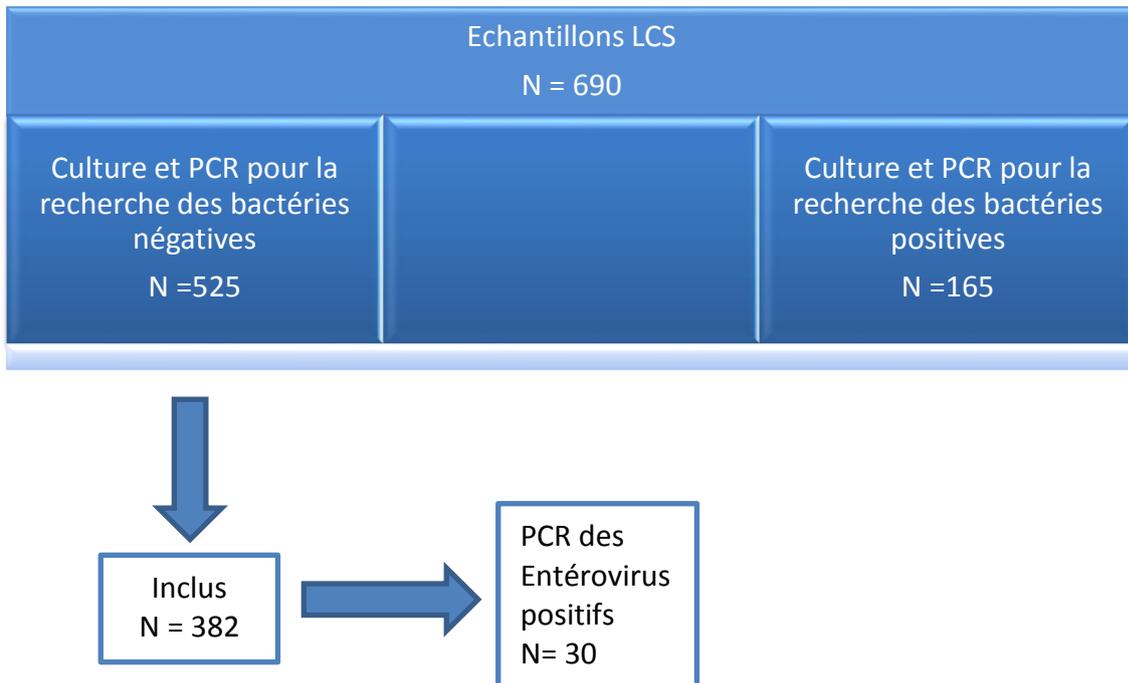
Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de l'INRSP.

L'étude étant réalisée dans le cadre de la surveillance épidémiologique, elle a été dans le cadre du diagnostic et aucun contact n'a été établi avec les patients en dehors de leur médecin traitant qui obtenait leur accord verbal pour la ponction lombaire.

Les données sont confidentielles et ne sont communiquées à aucune personne en dehors de l'équipe de recherche et les responsables de la surveillance épidémiologique.

III. Résultats

Diagramme de Flux



III.1 Description de la population prélevée

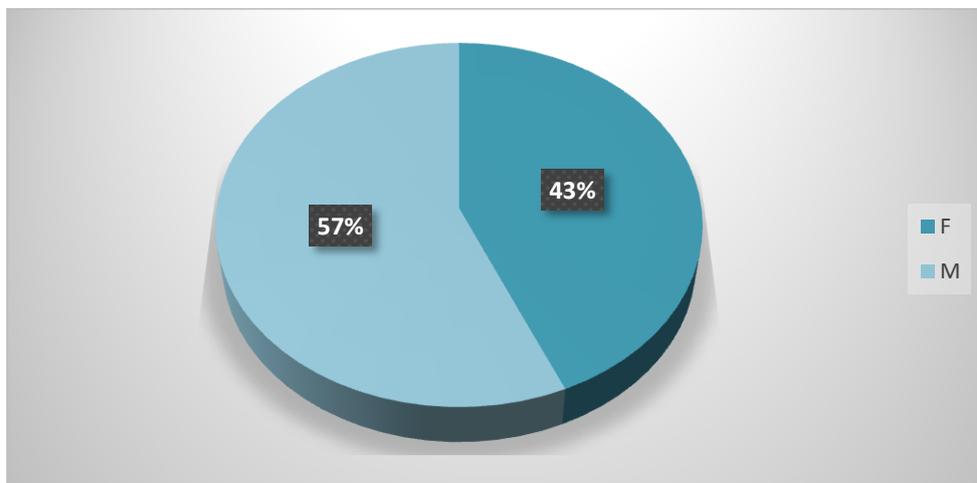


Figure 10 : Répartition des patients selon le sexe

Les patients étaient en majorité de sexe masculin (57%) avec un sex-ratio H/F de 1,30.

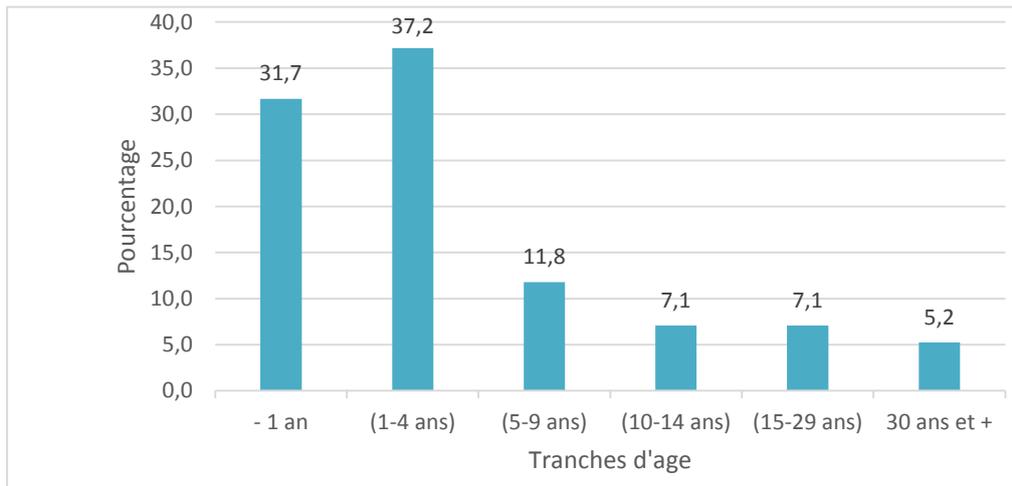


Figure 11 : Répartition des patients par tranche d'âge

Le prélèvement de LCS a été majoritairement effectué chez les enfants de moins de 14 ans (86%) dont la tranche d'âge 1- 4 ans était la plus représentée avec 37,2%.

III.2 Description du spécimen utilisé

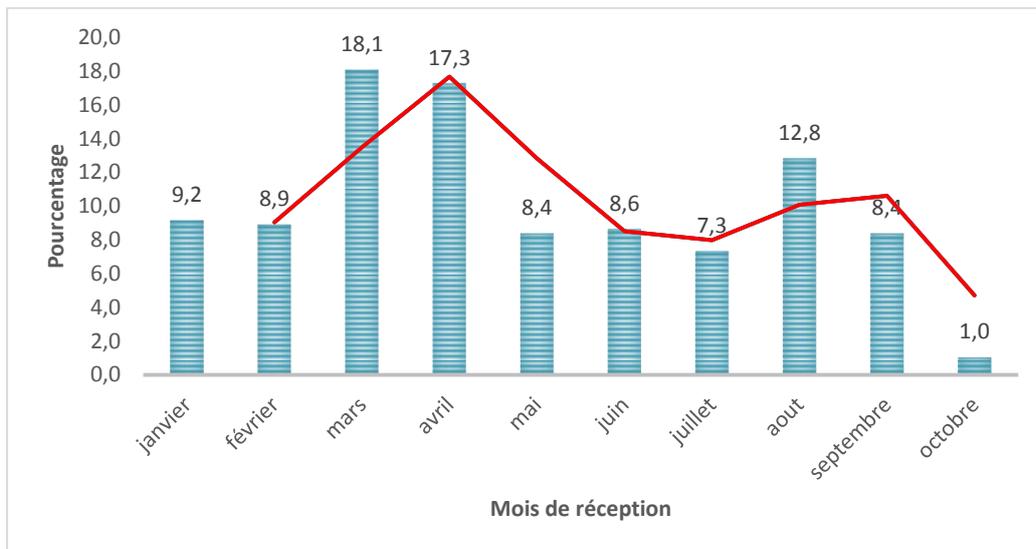


Figure 12 : Répartition des LCS par mois de réception

L'évolution du nombre d'échantillons au cours de notre période d'étude a été en dent de scie avec des pics aux mois de mars et d'avril soient respectivement 18,1% et 17,3%.

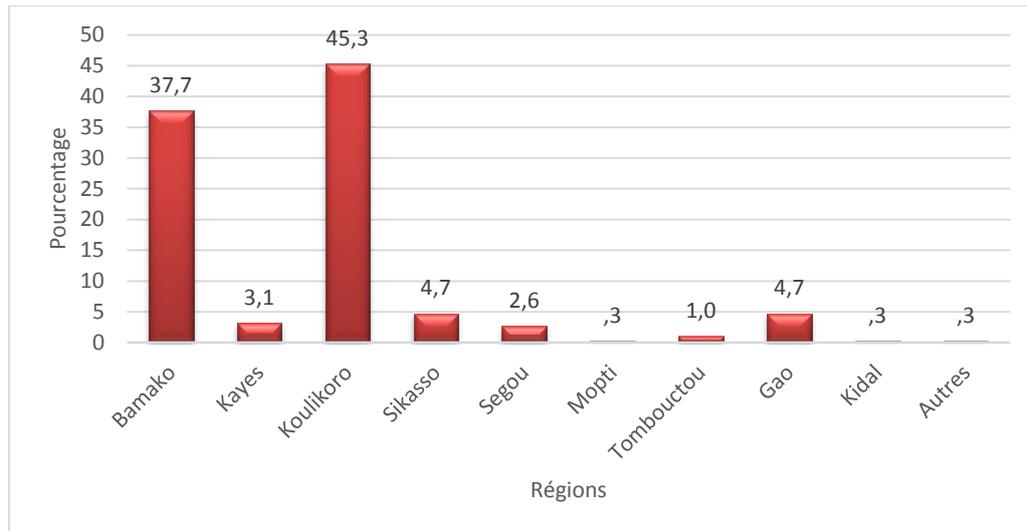


Figure 13 : Répartition des LCS selon la région administrative d'origine

La majorité de nos LCS provenaient de la région de Koulikoro soit 45,3% de nos échantillons.

Tableau II : Répartition des LCS selon l'aspect macroscopique et la qualité

	Effectifs	Pourcentage
CLAIR	255	66,8
Hématique	32	8,4
Xanthochromique	5	1,3
Aspect Trouble	26	6,8
Non applicable	64	16,8
Total	382	100,0
Adéquat	344	90,1
Qualité Non adéquat	38	9,9
Total	382	100,0

Les LCS étaient pour la plupart acheminés au laboratoire dans les conditions adéquates soit 90,1% et 66,8% des échantillons étaient des LCS clairs.

Tableau III : Résultats de la PCR en temps réel

Résultat	Effectifs	Pourcentage
Entérovirus	30	7,9
Négatif	352	92,1
Total	382	100,0

La PCR en temps réel, a permis de détecter l'ARN d'entérovirus dans 30/382 échantillons soit 7,9%.

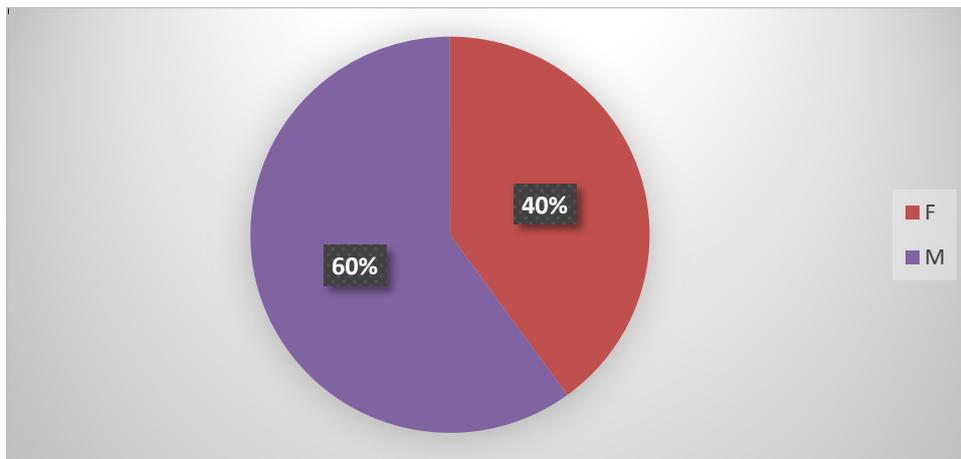


Figure 14 : PCR positif à entérovirus selon le sexe des patients

$P=0,691$; $\chi^2=0,848$

La majorité des cas positifs ont été recensés chez le sexe masculin avec un taux de 60%.

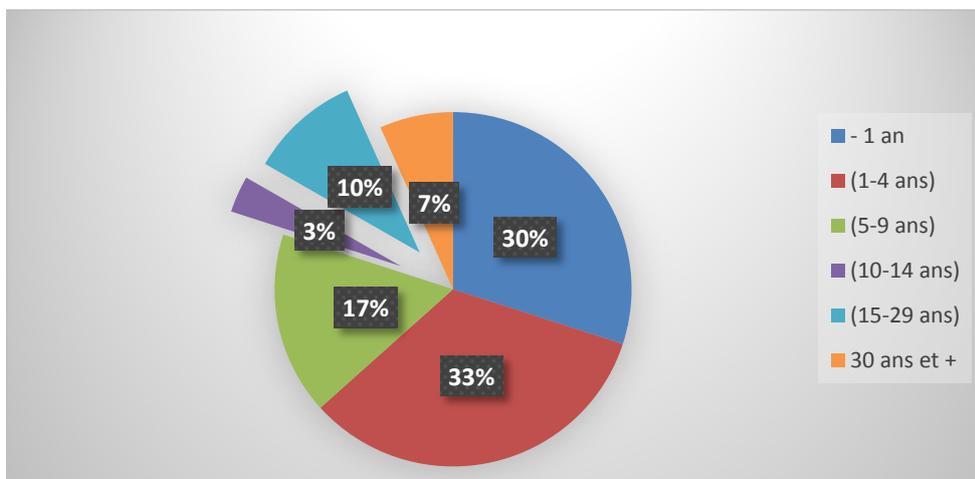


Figure 15 : PCR positive à entérovirus selon les tranches d'âge

$P=0,851$; $\chi^2=0,847$

L'entérovirus a été identifié dans les LCS de toutes les tranches d'âge avec un taux élevé dans la tranche (1-4 ans).

Tableau IV: Répartition du résultat de la PCR des LCS selon leurs mois de réception

Mois de réception	Résultats		Total
	Entérovirus	Négatif	
janvier	3	32	35
février	4	30	34
mars	13	56	69
avril	4	62	66
mai	3	29	32
juin	0	33	33
juillet	0	28	28
août	3	46	49
septembre	0	32	32
octobre	0	4	4
Total	30	352	382

$P= 0,012$; $X^2 = 0,002$

Le nombre élevé de cas positifs a été enregistré en mois de Mars avec un taux de 43,33%.

Tableau V: Répartition des résultats selon le milieu de transport

Résultats	Milieu de transport		Total
	TI	TUBE	
Entérovirus	6	24	30
Négatif	58	294	352
Total	64	318	382

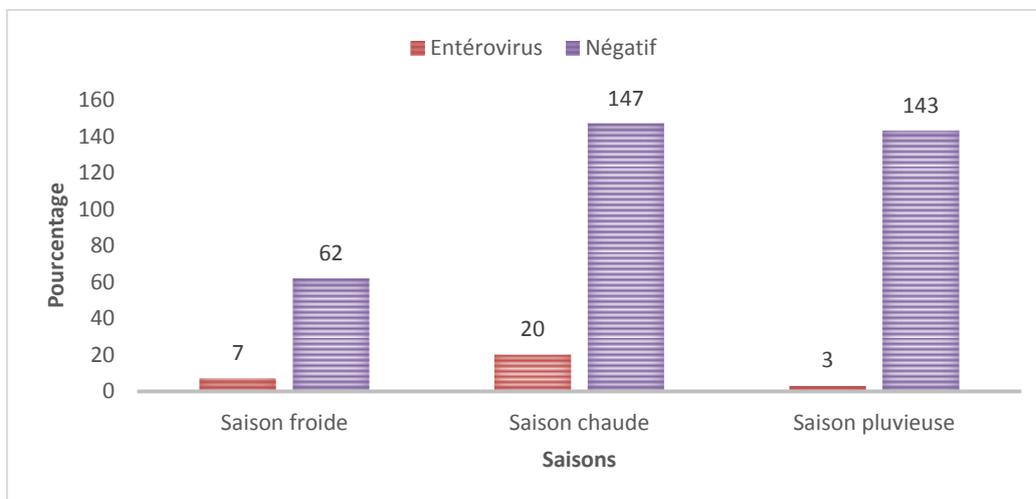
$P= 0,620$; $X^2 = 0,612$

La majorité de nos échantillons (83,25%) ont été acheminés au laboratoire dans les tubes secs et 80% des cas positifs était de ce lot.

Tableau VI : Résultats de la PCR en temps réel en fonction de l'aspect et de la qualité du LCS

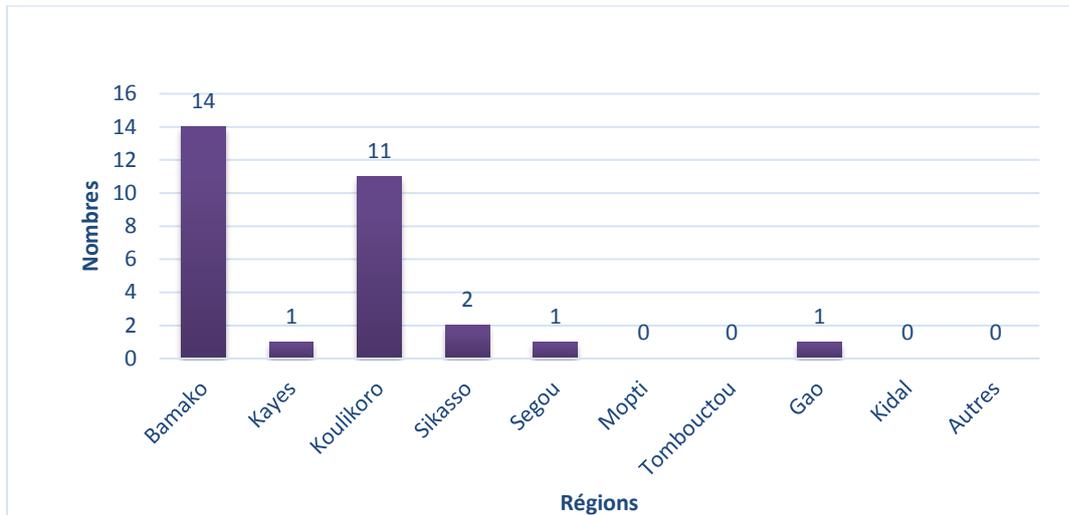
Effectif	Résultat		Total
	Entérovirus	Négatif	
CLAIR	19	236	255
HEMATIQUE	2	30	32
Xanthochromique	0	5	5
Trouble	3	23	26
Aspect Non applicable	6	58	64
Total	30	352	382
Adéquat	24	320	344
Non adéquat	6	32	38
Qualité Total	30	352	382

La PCR en temps réel a détecté l'ARN d'entéroviral dans 19 LCS clairs et dans 24 LCS qui étaient dans les situations adéquates.



$P = 0,004$; $X^2 = 0,001$

Figure 16 : répartition des résultats de la PCR en temps réel en fonction des saisons
La PCR a détectée l'entérovirus dans 7 LCS prélevés pendant la saison froide, 20 dans ceux prélevés en saison chaude et 3 dans ceux prélevés en saison pluvieuse.



P= 0,012 ; $\chi^2 = 0,002$

Figure 17 : Résultats de la PCR en temps réel en fonction des régions administratives

La majeure partie de nos échantillons positifs provenaient du district de Bamako soit 14/30 positifs.

IV. Discussions

Nous avons mené notre étude sur les 382 échantillons de LCS prélevés de janvier à octobre 2016, traités par la technique de PCR en temps réel. Le but a été de déterminer la place des entérovirus dans les affections méningées afin d'améliorer le système de surveillance des épidémies.

➤ **Limites de l'étude**

L'étude étant réalisée via la surveillance épidémiologique des méningites bactériennes, certains échantillons ont été collectés dans le milieu de transport, le Trans-Isolate qui est un milieu de transport, de conservation et de culture primaire pour les bactéries. Ce milieu n'étant pas favorable à la bonne conservation des virus, ce mode de transport pourrait avoir un impact sur leurs recherches.

Les échantillons de LCS ont été initialement utilisés pour la recherche des bactéries. Les quantités restantes n'étaient pas suffisantes pour la réalisation de la technique PCR, cela a impacté le nombre d'échantillons pour notre étude.

➤ **Les données sociodémographiques**

• **Le sexe et l'âge**

Nous avons constaté une prédominance masculine avec un sex-ratio H/F de 1,30.

Dans notre étude, 86,4% des patients étaient âgés de moins de 14 ans avec une prédominance de la tranche d'âge 1- 4 ans représentant 37,2%.

Le même sex-ratio a été rapporté par **Coulibaly et al** au cours d'une étude réalisée à l'INRSP en 2014. Ils ont également constaté que la majorité des LCS étaient prélevés chez les enfants de la tranche d'âge (0-5 ans) avec un taux de 59,3% (51).

• **Provenance, matériel de transport, et période de prélèvement des LCS**

Les prélèvements de LCS ont été envoyés de toutes les localités du Mali. Sur les 382 LCS recensés, la majorité provenait de la région de Koulikoro soit 45,3%, suivi du district de Bamako (37,7%). Cela peut s'expliquer par la proximité de certains districts sanitaires de la région de Koulikoro à Bamako où se trouve le laboratoire de référence de bactériologie ; cette proximité des districts sanitaires rend l'accès au LNR (Laboratoire national de référence) plus facile. D'autres études réalisées au Mali ont montré les mêmes tendances tels que les résultats obtenus par **Coulibaly et al** avec 46,90% à Bamako suivi de Koulikoro avec 27,80% (52).

Une faible provenance des échantillons des districts éloignés seraient sans doute dû aux difficultés liés au circuit d'acheminement. Il faut cependant noter que tous les cas notifiés ne sont pas accompagnés de prélèvements de LCS.

Nous avons constaté que les LCS sont prélevés pendant toute l'année. Une proportion élevée a été enregistrée en mois de Mars avec un pic de 18,1% (**Tableau II**).

➤ **Qualité et aspects des LCS**

Les échantillons étaient dans les conditions adéquates dans 90,1% des cas et non adéquates dans 9,9% des cas. Le Mali est un vaste territoire, certains sites étant distants de la capitale qui abrite le LNR, ainsi que les infrastructures et les ressources financières limitées expliqueraient l'écart des délais d'acheminement. Ce taux est élevé car la limite supérieure acceptable par l'OMS est de 3% d'échantillons non adéquats (52).

La majorité des LCS étaient clairs soit 66,8% et l'aspect de 16,8% des échantillons n'ont pas pu être connu vu que ces LCS ont été envoyés au LNR inoculés sur le milieu Trans-Isolate.

➤ **Résultats de la PCR**

Les cas positifs ont été recensés dans toutes les tranches d'âges particulièrement chez les enfants avec un taux élevé dans la tranche d'âge 1- 4 ans soit 33%.

Des résultats similaires ont été rapportés selon les données du **réseau OSCOUR[®]** en 2011 lors de la recrudescence des méningites virales dans l'ouest de l'île de France dont 72% des cas concernait les 15 ans et moins (53). Une autre étude réalisée en Iran par **HOSSEININASAB et al** en 2011 a rapporté une positivité élevée chez les enfants de 0-5 ans soit 43,3% (54).

Nous avons recensé une prédominance du sexe masculin avec un taux de 60%.

Ce taux est proche de celui rapporté par **HAMAM** en 2018 à wilaya de Bejaia en Algérie avec 69,1% (55).

Nous avons constaté que la méningite à EV est constante pendant toute l'année.

Les entérovirus restent la cause la plus fréquente d'épidémies, qui surviennent généralement à la fin de l'été ou au début de l'hiver dans les zones tempérées, et toute l'année dans les zones tropicales et subtropicales (56).

L'ARN d'entérovirus a été détecté majoritairement dans les LCS clairs représentant 63,3% des cas positifs. Selon la littérature, dans les méningites virales les LCS sont le plus souvent clairs(57).

Au regard de certaines atteintes cérébrales, une méningite à EV est une infection rapidement limitée par les réponses immunitaires et déterminer la charge virale ne présente pas d'intérêt diagnostique. Par contre, elle permet d'éviter une antibiothérapie et une hospitalisation.

Les méningites constituent un modèle d'étude de l'atteinte du système nerveux central et la charge virale est nécessaire pour identifier les processus physiopathologiques. Déterminer la charge virale dans le LCS lors du diagnostic des infections néonatales pourrait cependant

avoir un intérêt, car les infections à EV chez les nouveau-nés peuvent être sévères et à l'origine de séquelles (58).

Les méningites à entérovirus représentent environ 85% des méningites aseptiques (59) et peuvent être difficiles à distinguer des méningites due aux bactéries et aux virus de l'herpès simplex, en particulier chez les nourrissons et les enfants. Il en résulte une hospitalisation et un traitement inutiles, avec des antibiotiques et / ou des médicaments anti-herpétiques, chez des milliers d'enfants chaque année. Les cultures cellulaires du liquide cérébro-spinal (LCS) pour les EV prennent en moyenne 6 à 7 jours pour l'identification de la croissance (60) et sont généralement observées pendant 2 ou 3 semaines avant d'être signalées comme négatives. Ces cultures sont sensibles à 65-75%. Même avec ces inconvénients, elles ont un impact significatif sur la prise en charge des patients atteints de méningite à EV (60).

La détection de l'ARN viral dans le LCS présente plusieurs avantages. Elle permet un diagnostic étiologique rapide et plus sensible. Avec une sensibilité de 85 à 95% et une spécificité proche de 100%, la plupart des ARN viraux peuvent être détectés alors que 25 à 35% des souches échappent aux méthodes conventionnelles de dépistage du fait de leur variabilité (61). Autre avantage par rapport à la culture cellulaire : la recherche du génome viral est positive dès l'apparition des symptômes et en moyenne pendant la première semaine qui suit (62).

En cas de suspicion, l'application des nouvelles techniques, notamment de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), peut probablement permettre d'identifier l'agent étiologique dans environ 50 % des cas (63).

Dans notre étude, la RT-PCR nous a permis de détecter l'ARN des EV dans 30 LCS sur une totalité de 382 échantillons traités soit 7,9%.

Ce taux est Comparable à celui d'une étude menée par **Vilain et al** en 2011 en Ile de France, qui avaient eu 4 positifs sur 53 échantillons.

Ces faibles taux de positivité ne sont pas surprenant puisque, selon la littérature, l'agent pathogène n'est pas identifié plus d'une fois sur deux (64).

V. Conclusion

Sur 690 échantillons reçus au cours de 2016 dans la surveillance épidémiologique des méningites à l'INRSP, 525 (76,09%) ont été négatifs à la PCR pour la recherche des trois bactéries classiquement responsables de méningite aiguë.

La détection de l'entérovirus dans le liquide cérébro-spinal s'est révélée efficace pour différencier la méningite bactérienne de la méningite virale.

Nous avons obtenu une prévalence de moins de 10% d'entérovirus avec une prédominance chez les enfants de la tranche d'âge 1- 4 ans.

Ce travail doit être poursuivi pour la recherche d'autres pathogènes viraux, ce qui pourrait conduire à une réduction du taux d'hospitalisations et d'antibiothérapies.

VI. Recommandations

Au terme de cette étude, nous avons jugé nécessaire de formuler quelques recommandations :

Au Ministre de la santé et de l'hygiène publique

- Renforcer le plateau technique, les capacités du personnel et les ressources humaines des principaux laboratoires nationaux pour une détection précoce des méningites

Aux responsables de la surveillance épidémiologique des méningites

- Promouvoir la formation continue des agents de la surveillance des méningites ;
- Appuyer des études spécifiques portant sur les méningites virales au Mali.

Aux cliniciens des structures de santé

- Prélever le LCS devant tout tableau clinique de méningite
- S'assurer du transfert rapide et dans les bonnes conditions des échantillons au laboratoire

Au Directeur général de l'INRSP

- Assurer la pérennité des réactifs et consommables pour la réalisation de la RT-PCR
- Instaurer la recherche des virus responsables de méningites dans la routine

VII. Références

1. Abzug MJ. The enteroviruses: Problems in need of treatments. *J Infect* 2014 ; 68:S108– 14.
2. Lee BE, Chawla R, Langley JM, Forgie SE, Al-Hosni M, Baerg K, et al. Paediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study of aseptic meningitis. *BMC Infect Dis* 2006 ;6(1):68.
3. Egique, détection du génome des entérovirus dans le liquide céphalo-rachidien par amplification géniques des méningites, Rapport d'évaluation technologique; 2004
4. Vilain P, Ernould S, Caillère N, Larrieu S, Belmonte O, Mougin-Damour K, et al. intérêt du réseau oSCoUr® pour la validation d'un signalement de méningite virale dans l'ouest de la Réunion. *Bull Epidemiol Hebd.* 2014;(3-4):53-7.
5. Berlin LE, Rorabaugh M, Lou, Heidrich F, Roberts K, Doran T, Modlin JF. Aseptic meningitis in infants < 2 years of age: diagnosis and etiology. *J Infect Dis* 1993;168(4):888–92.
6. Tunkel AR, Scheld WM. Acute bacterial meningitis. *Lancet.* 1995;346(8991– 8992):1675–80.
7. Gnann Jr JW. Meningitis and encephalitis caused by mumps virus. *Infect Cent Nerv Syst* 1997;231–41.
8. Corey L, Spear PG. Infections with herpes simplex viruses. *N Engl J Med* 1986;314(11):686–91.
9. Antona D, Chomel JJ, Enterovirus SLN. Increase in viral meningitis cases reported in France. Summer 2005. *Euro Surveill* 2005;10:E050908.
10. Lam K, Tsang OT, Yung RW, Lau KK. Japanese encephalitis in Hong Kong. *Hong Kong Med J* 2005;11(3):182–8.
11. Lapeysonnie L. Cerebro-Spinal Meningitis in Africa. *Bulletin of the world Health organization.* 1963; 28; Supp 1:1-114.
12. Stahl JP. Méningites aiguës. *Encycl Méd Chir Neurologie* 2013 ; 10(1) : 17-160-C-10.
13. Chalouhi C, Faesch S, Chappuy H, Chéron G. Méningites lymphocytaires aiguës. *Encycl Méd Chir Pédiatrie* 2007 ; 4-098-C-10.
14. Jouan M. Méningite infectieuse aiguë de l'adulte. *EMC - Trait médecine AKOS* 2006 ;1(2):1–9.
15. Bourrillon A, Bingen E. Méningites du nourrisson et de l'enfant. *Encycl Méd Chir Pédiatrie / Maladies Infectieuses* 2013 ; 8(3) : 4210-B-10.
16. Société de pathologie infectieuse de langue française. Prise en charge des méningites bactériennes aiguës communautaires (à l'exclusion du nouveau-né). 17e Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse, mercredi 19 novembre 2008.
17. Archimbaud C, Chambon M, Bailly JL, Petit I, Henquell C, Mirand A, et al. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. *J Med Virol* 2009;81(1):42-8.

18. Haute Autorité de Santé. Évaluation de la détection du génome des entérovirus dans le liquide céphalorachidien par amplification génique dans les suspicions de méningites virales. Note de cadrage. Saint-Denis La Plaine : HAS; 2014
19. Andréoletti L. Entérovirus. *Encycl Méd Chir Maladies Infectieuses* 2010 ; 8-056-A-10.
20. Peigue-Lafeuille H, Archimbaud C, Mirand A, Regagnon C, Chambon M, Henquell C. Intérêt du diagnostic moléculaire des méningoencéphalites virales. *Spectra Biol* 2006(154) : 44-55.
21. de Ory F, Avellón A, Echevarría JE, Sánchez-Seco MP, Trallero G, Cabrerizo M, et al. Viral infections of the central nervous system in Spain: A prospective study. *J Med Virol* 2013 ;85(3):554–62.
22. Parent I. Epidémiologie des méningites aiguës en France. SFM, Paris, 11 avril 2012. Saint-Maurice : INVS ; 2012. http://opac.invs.sante.fr/doc_num.php?explnu m_id=8208).
23. Peigue-Lafeuille H, Croquez N, Laurichesse H, Clavelou P, Aumaître O, Schmidt J, et al. Enterovirus meningitis in adults in 1999-2000 and evaluation of clinical management. *J Med Virol* 2002 ;67(1):47–53.
24. Archimbaud C, Chambon M, Bailly JL, Petit I, Henquell C, Mirand A, et al. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. *J Med Virol* 2009 ;81(1):42–8.
25. Notifiable Diseases Annual Summary. *Can Commun Dis Rep* 1994;20S1(Supplement):73.
26. Institut de veille sanitaire. Point sur les infections à entérovirus au 7 août <http://www.invs.sante.fr/Dossierthematiques/Maladiesinfectieuses/Maladiesa-prevention-vaccinale/Poliomyelite/Pointsenterovirus/Point-surles-infections->
27. (Ben Cheikh Naima : Tuberculose au Maroc : épidémiologie et facteurs de risqué. Service de maladies respiratoires.
28. F Bruneel, M Wolf, *Encyclopedie Médico-chirurgicale* 17-160- C-10. Méningites Aigues 2000 Editions Scientifiques et Médicales
29. Han, T.H., Chung, J.Y., You, S.J., Youn, J.L., Shim, G.h. 2013. Human parechovirus-3 infection in children, South Korea. *Journal of Clinical Virology*. 58(1) :194-9.
30. Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, Peigue-Lafeuille H, Bailly J-L. Emergence of recent echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events. *J Gen Virol* 2007 ;88(1):166–76.
31. Racaniello, V.R. 2006. Picornaviridae : The viruses and their replication. In Lippincott, W & W., Diane, Griffin, D.E., Howley, P.M., Lamb, R.A., Malcolm, M.A. ed *Fields Virology* 5th edition. Vol 1. LWW
32. Belnap, D. M., McDermott JR, B. M., Filman, D. J., Cheng, N., Trus, B. L., Zuccola, H. J., Racaniello, V. R., Hogle, J. M., Steven, A. C. 1999. Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *PNAS*. 97(1):73–78.).

33. Xiao, C., Bator-Kelly, C. M., Rieder, E., Chipman, P. R., Craig, A., Kuhn, R. J., Wimmer, E., Rossmann, M. G. 2005. The Crystal Structure of Coxsackievirus A21 and Its Interaction with ICAM-1. *Structure*. 13(7):1019–1033.
34. Plevka, P., Perera, R., Cardoso, J., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G. 2012. Crystal Structure of Human Enterovirus 71. *Science*. 336(6086) :1274.).
35. Melnick, L. J. 1996. My role in the discovery and classification of Enteroviruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 50:1–24.
36. Chambon, M., Archimbaud, C., Bailly, J. L., Gourgand, J. M., Charbonné, F., PeigueLafeuille, H. 2004. Virucidal Efficacy of Glutaraldehyde against Enteroviruses is Related to the Location of Lysine Residues in Exposed Structures of the VP1 Capsid Protein. *Applied and Environmental Microbiology*.70(3):1717–1722
37. Source : Swiss Institut of Bioinformatique 2008.
38. Lindberg, A. M., Stålhandske, P. O., Pettersson, U. 1987. Genome of coxsackievirus B3. *Virology*. 156(1) : 5063.).
39. Brown, B. A., Pallansch, M. A. 1995. Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus. *Virus Research*. 39(2-3):195-205.
40. Gamarnik, A.V., Andino, R. 1998. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes & Development*. 12(15):2293-2304.
41. Zoll, J., Heus, H. A., Van Kuppeveld, F. J., Melchers, W. J. 2009. The structurefunction relationship of the enterovirus 3'-UTR. *Virus Research* 139(2):209–216.
42. Ohlmann T, Rau M, Pain VM, Morley SJ. The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *EMBO J* 1996 ;15(6):1371–82.
43. Kempf, B. J., Barton, D. J. 2008a. Poliovirus 2A(Pro) increases viral mRNA and polysome stability coordinately in time with cleavage of eIF4G. *Journal of Virology*. 82(12):5847-5859.
44. Kempf, B. J., Barton, D. J. 2008b. Poly(rC) Binding Proteins and the 5' Cloverleaf of Uncapped Poliovirus mRNA Function during De Novo Assembly of Polysomes. *Journal of Virology*. 82(12):5835-5846.
45. Pelletier, J., Sonenberg, N. 1989. Internal Binding of Eucaryotic Ribosomes on Poliovirus RNA:Translation in HeLa Cell Extracts. *Journal of Virology*. 63(1):441 444.
46. Rotbart H, ... JK-J of I, 1990 U. Persistent enterovirus infection in culture-negative meningoencephalitis: demonstration by enzymatic RNA amplification. academic.oup.com.
47. Jurgens, C. K., Barton, D. J., Sharma, N., Morasco, B. J., Ogram, S. A., Flanagan, J. B. 2006. 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA. *Virology*. 345(2):346-357.

48. Pilipenko, E. V., Poperechny, K. V., Maslova, S. V., Melchers, W. J., Slot, H. J., Agol, V. I. 1996. Cis-element, oriR, involved in the initiation of (-) strand poliovirus RNA: a quasi-globular multi-domain RNA structure maintained by tertiary ('kissing') interactions. *The EMBO Journal*. 15(19):5428-5436.
49. Herold, J., Andino, R. 2001. Poliovirus RNA Replication Requires Genome Circularization through a Protein-Protein Bridge. *Molecular Cell*. 7(3):581-591
50. Xiang, W., Cuconati, A., Hope, D., Kirkegaard, K. & Wimmer, E. (1998). Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol* 72, 6732-6741.
51. Paul, A. V., van Boom, J. H., Filippov, D. & Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis 203bp purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* 393, 280-284.
52. Agol, V. I., Paul, A. V. & Wimmer, E. (1999). Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Res* 62, 129-147
53. Andino R, Rieckhof GE, Achacoso PL, Baltimore D. Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J* 1993 ;12(9):3587-98.
54. Crotty M, Miller M, Whitehead C, Krisnan J, Hearn T. Hip fracture treatments - what happens to patients from residential care? *J Qual Clin Pract* 2000 ;20(4):167-70.
55. virology VR-F, 2007 U. Picornaviridae, The virus and their replication. ci.nii.ac.jp.
56. Basavappa R, Filman DJ, Syed R, Flore O, Icenogle JP, Hogle JM. Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: Structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci* 1994 ;3(10):1651-69.
57. Hellen, C. U. & Wimmer, E. (1995). Translation of encephalomyocarditis virus RNA by internal ribosomal entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 203, 31-63.
58. VAN KUPPEVELD, Frank JM, VAN HORSSSEN, A. Martin, et MARTENS, Gerard JM. Intracellular transport, sorting, and proteolytic processing of regulated secretory proteins does not require protein sulfation. *Molecular and cellular endocrinology*, 1997, vol. 136, no 1, p. 29-35.
59. Hellen, C. U., Lee, C. K. & Wimmer, E. (1992). Determinants of substrate recognition by poliovirus 2A proteinase. *J Virol* 66, 3330-3338.
60. Martell, M. Gomez, J., Esteban, J. I., Sauleda, S., Quer, J., Cabot, B., Esteban, R. and Guardia, J. 1999. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of Hepatitis C virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 327-332.
61. Heymann DL, American Public Health Association. Control of communicable diseases manual. American Public Health Association; 2008. 746 p.

62. Kenneth LT. Maladies du système nerveux induites par les virus et les prions dans. Isselbacher KJ, Braunxald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, eds. Harrison Medecine Interne. Paris : Arnette S.A., 1995 :2309-2320
63. diseases JM-P and practice of infectious, 2000 U. Introduction to Picorunaviridae. ci.nii.ac.jp.
64. Gaudin O.G. Entérovirus dans Editions Techniques-infectieuses et parasitaires.Paris 8056 A10, 1991 :8
65. Fuhrman, J. A., Liang, X., Noble, R. T. 2005. Rapid detection of enteroviruses in small volumes of natural waters by real-time quantitative reverse transcriptase PCR. Applied and Environmental Microbiology. 71(8) : 452330.
66. Civardi, E., Tziella, C., Baldanti, F., Strocchio, L., Manzoni, P., Stronati, M. 2013. Viral outbreaks in neonatal intensive care units: What we do not know. American Journal of Infection Control. 41(10):854-6.
67. KE, Po-Yuan et CHEN, Steve S.-L. Hepatitis C virus and cellular stress response: implications to molecular pathogenesis of liver diseases. Viruses, 2012, vol. 4, no 10, p. 2251-2290.
68. Lipson, S. M., Walderman, R., Costello, P. & Szabo, K.(1988). Sensitivity of rhabdomyosarcoma and guinea pig embryo cell cultures to field isolates of difficult-to-cultivate group A coxsackieviruses. J Clin Microbiol 26, 1298–1303.
69. (Samuelson A. (1990). Aspects on the serodiagnosis of enterovirus infections by ELISA. Serodiagn ImmunotherInfect4, 395–406.).
70. Yousef G, Brown I, Intervirology JM-, 1987 U. Derivation and biochemical characterization of an enterovirus group-specific monoclonal antibody. karger.com.
71. Armengaud M, Auvergnat J-C, Le Net R, Massip P, Van TT. Des concentrations des antibiotiques dans le LCR au cours des traitements des méningites bactériennes aiguës. Conséquences pratiques. Med Hyg. 1979;37:394–400.
72. Trabelsi A, Grattard F, Nejmeddine M, Aouni M, Bourlet T, Pozzetto B. Evaluation of an enterovirus group-specific anti-VP1 monoclonal antibody, 5-D8/1, in comparison with neutralization and PCR for rapid identification of enteroviruses in cell culture. J Clin Microbiol 1995 ;33(9) :2454–7.
73. Rotbart, H. A., Levin, M. J. & Villarreal, L. P. (1984). Use of subgenomic poliovirus DNA hybridization probes to detect the major subgroups of enteroviruses. J Clin Microbiol 20, 1105–1108
74. Hyypiä, T., Stålhandske, P., Vainionpää, R. & Pettersson, U. (1984). Detection of enteroviruses by spot hybridization. J Clin Microbiol 19, 436–438.
75. Funahashi S, Bruce CJ, Goldman-Rakic PS. Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. J Neurophysiol 1989 ;61(2) :331–49.
76. Muir, P., Kämmerer, U., Korn, K., Mulders, M. N., Pöyry, T., Weissbrich, B., Kandolf, R., Cleator, G. M. & Loon, A. M. van. (1998). Molecular Typing

- of Enteroviruses: Current Status and Future Requirements. *Clin Microbiol Rev* 11, 202–227.
77. VILLANUEVA, Itamar Davi Schabert. Selected studies on avian RNA viruses. Texas A&M University, 2010.
78. PILLET, Sylvie, BILLAUD, Geneviève, OMAR, Shabir, et al. Multicenter evaluation of the ENTEROVIRUS R-gene™ real-time RT-PCR assay for the detection of enteroviruses in clinical specimens. *Journal of Clinical Virology*, 2010, vol. 47, no 1, p. 54-59.
79. Leveque N, Renois F, Talmud D, Nguyen Y, Lesaffre F, Boulagnon C, et al. Quantitative Genomic and Antigenomic Enterovirus RNA Detection in Explanted Heart Tissue Samples from Patients with End-Stage Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *J Clin Microbiol* 2012 ;50(10):3378–80.
80. Volle, R., Nourrisson, C., Mirand, A., Regagnon, C., Chambon, M., Henquell, C., Bailly, J.-L., Peigue-Lafeuille, H. & Archimbaud, C. (2012). Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system. *J Virol Methods* 185, 142–148.
81. MARLOWE, Elizabeth M., NOVAK, Susan M., DUNN, James J., et al. Performance of the GeneXpert® enterovirus assay for detection of enteroviral RNA in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Virology*, 2008, vol. 43, no 1, p. 110-113.
82. (OCHA Bureau de coordination des humanitaires, Unité de gestion de l'information Division nutrition du Mali, 2012 (Updated juillet 2013): Available from : www.unocha.un.org).
83. Coulibaly S, Sanogo H, Guindo I, Abdou M, Diarra S, Oumou Y, et al. Etiologies des germes. 2017;14(1):55–119.
84. S. Coulibaly¹, I. Guindo¹, A. Mahamadou¹, A. Kéita¹, K. Dao¹, S. Diarra¹, B. Traoré², K. Touré³, Y.S. Koné⁴, Y. Ndjakani⁵, F. Bougoudogo^{1, 6}, L. Sangaré⁷ BK. Evaluation de la qualité des examens bactériologiques dans la surveillance des méningites au Mali de 2006 à 2010. 2014 ;1–6.
85. Hosseininasab A, Alborzi A, Ziyaeyan M, Jamalidoust M, Moeini M, Pouladfar G, et al. Viral etiology of aseptic meningitis among children in Southern Iran. *J Med Virol* 2011 ;83(5):884–8.
86. En C. Thème Etude épidémiologique des cas de wilaya de Bejaia. 2018;
87. SAWYER, MARK H., HOLLAND, Diane, AINTABLIAN, NECTAR, et al. Diagnosis of enteroviral central nervous system infection by polymerase chain reaction during a large community outbreak. *The Pediatric infectious disease journal*, 1994, vol. 13, no 3, p. 177-182.
88. Chonmaitree, T., Menegus, M. A., Schervish-Swierkosz, E. M. & Schwalenstocker, E. (1981). Enterovirus 71 infection: report of an outbreak with two cases of paralysis and a review of the literature. *Pediatrics* 67, 489–493.
89. GRANDADAM, M., NICAND, E., VAN CUYCK-GANDRÉ, H., et al. Répartition géographique des géotypes du virus de l'hépatite E. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 1999, vol. 92, no 4, p. 274-277.

90. Baldanti F, Sarasini A, Furione M, Gatti M, Comolli G, Revello MG, et al. Coinfection of the immunocompromised but not the immunocompetent host by multiple human cytomegalovirus strains. *Arch Virol* 1998;143(9):1701–9.

VIII. Annexes :**Mode opératoire de l'extraction manuelle de l'ADN/ARN des entérovirus avec la trousse d'extraction manuelle QIAamp® MinElute****1. Lyse**

– Préparer autant de tubes de microcentrifugation de 1,5 ml qu'il y a d'échantillons à analyser et ajouter un tube dans lequel le mélange (IC1 + W0) sera extrait ; les identifier en les marquant sur le bouchon.

- Ajouter 25 µL de protéase (H).
- Déposer 200 µL de tampon AL/ARN entraîneur dans chaque tube.
- Ajouter 10 µL de contrôle d'extraction et inhibition IC1.
- Ajouter 200 µL de W0 dans le tube identifié pour (W0+ IC1).
- Ajouter 200 µL d'échantillon, mélanger au vortex pendant 15 secondes. Pour que la lyse soit efficace, il est nécessaire de bien mélanger afin d'avoir une solution parfaitement homogène.
- Si le volume d'échantillon de départ est inférieur à 200 µL, ajuster ce volume à 200 µL avec de l'eau stérile.
- Incuber à 56°C pendant 15 minutes.
- Centrifuger brièvement les tubes pour enlever les gouttes présentes dans les bouchons.

2. Chargement de la colonne

- Ajouter 250 µL d'éthanol 96-100 % par tube et mélanger au vortex pendant 15 secondes. Seul l'éthanol doit être utilisé car d'autres alcools réduiraient le rendement et la pureté de l'ARN extrait.
 - Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
 - Centrifuger brièvement les tubes pour enlever les gouttes présentes dans les bouchons.
 - Préparer et identifier autant de colonnes qu'il y a d'échantillons.
 - Placer les colonnes sur des tubes collecteurs de 2 mL et déposer avec précaution le volume d'échantillon au sommet de la colonne en prenant soin de ne pas mouiller la zone de contact avec le bouchon.
 - Fermer le bouchon et centrifuger à 6000 g. pendant 1 minute.
- Note : Chaque colonne doit être fermée durant la centrifugation afin d'éviter les contaminations croisées entre échantillons

3. Etape de lavage

- Ouvrir les colonnes avec précaution et ajouter 500 µL de tampon AW1 (D).
- Fermer les tubes et centrifuger à 6 000 g pendant 1 minute. Eliminer les tubes contenant les filtrats et placer les colonnes sur un tube de 2 mL propre.
- Ouvrir les colonnes avec précaution et ajouter 500 µL de tampon AW2 (E).
- Fermer les tubes et centrifuger à 6 000 g pendant 1 minute.
- Placer les colonnes sur un tube de 2 ml propre et éliminer les tubes contenant les filtrats.
- Il est nécessaire de rajouter une étape intermédiaire en plaçant les colonnes sur un tube de 2 ml propre, centrifuger 3 minutes à pleine vitesse (12 000 g) avant de réaliser l'élution sur un nouveau tube de 2 ml. Cette étape sert à éliminer tout risque de remontée d'éthanol sur la colonne lors de la décélération de la centrifugeuse, ou lors du transfert des colonnes hors du rotor.
- Placer chaque colonne sur un tube de 1,5 ml propre identifié et éliminer les tubes contenant les filtrats.

4. Etape d'élution

- Ajouter, au centre de la colonne, 50 µL de tampon d'élution AVE (F) équilibré à température ambiante.
- Fermer les tubes et incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à pleine vitesse (12 000 g) pendant 1 minute

5. Lyse

- Préparer autant de tubes de microcentrifugation de 1,5 ml qu'il y a d'échantillons à analyser et ajouter un tube dans lequel le mélange

(IC1 + W0) sera extrait ; les identifier en les marquant sur le bouchon.

- Ajouter 25 µL de protéase (H).
- Déposer 200 µL de tampon AL/ARN entraîneur dans chaque tube.
- Ajouter 10 µL de contrôle d'extraction et inhibition IC1.
- Ajouter 200 µL de W0 dans le tube identifié pour (W0+ IC1).
- Ajouter 200 µL d'échantillon, mélanger au vortex pendant 15 secondes. Pour que la lyse soit efficace, il est nécessaire de bien mélanger afin d'avoir une solution parfaitement homogène.

- Si le volume d'échantillon de départ est inférieur à 200 μL , ajuster ce volume à 200 μL avec de l'eau stérile.
- Incuber à 56°C pendant 15 minutes.
- Centrifuger brièvement les tubes pour enlever les gouttes présentes dans les bouchons.

6. Chargement de la colonne

- Ajouter 250 μL d'éthanol 96-100 % par tube et mélanger au vortex pendant 15 secondes. Seul l'éthanol doit être utilisé car d'autres alcools réduiraient le rendement et la pureté de l'ARN extrait.
 - Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
 - Centrifuger brièvement les tubes pour enlever les gouttes présentes dans les bouchons.
 - Préparer et identifier autant de colonnes qu'il y a d'échantillons.
 - Placer les colonnes sur des tubes collecteurs de 2 mL et déposer avec précaution le volume d'échantillon au sommet de la colonne en prenant soin de ne pas mouiller la zone de contact avec le bouchon.
 - Fermer le bouchon et centrifuger à 6000 g. pendant 1 minute.
- Note : Chaque colonne doit être fermée durant la centrifugation afin d'éviter les contaminations croisées entre échantillons

7. Etape de lavage

- Ouvrir les colonnes avec précaution et ajouter 500 μL de tampon AW1 (D).
- Fermer les tubes et centrifuger à 6 000 g pendant 1 minute. Eliminer les tubes contenant les filtrats et placer les colonnes sur un tube de 2 mL propre.
- Ouvrir les colonnes avec précaution et ajouter 500 μL de tampon AW2 (E).
- Fermer les tubes et centrifuger à 6 000 g pendant 1 minute.
- Placer les colonnes sur un tube de 2 ml propre et éliminer les tubes contenant les filtrats.

- Il est nécessaire de rajouter une étape intermédiaire en plaçant les colonnes sur un tube de 2 ml propre, centrifuger 3 minutes à pleine vitesse (12 000 g) avant de réaliser l'élution sur un nouveau tube de 2 ml. Cette étape sert à éliminer tout risque de remontée d'éthanol sur la colonne lors de la décélération de la centrifugeuse, ou lors du transfert des colonnes hors du rotor.
- Placer chaque colonne sur un tube de 1,5 ml propre identifié et éliminer les tubes contenant les filtrats.

8. Etape d'élution

- Ajouter, au centre de la colonne, 50 μ L de tampon d'élution AVE (F) équilibré à température ambiante.
- Fermer les tubes et incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
- Centrifuger à pleine vitesse (12 000 g) pendant 1 minute

Mode opératoire de l'amplification de l'ADN/ARN des entérovirus avec le kit ENTEROVIRUS R-gene®

Elle se fait dans la salle réservée à l'amplification.

Les produits à amplifier correspondent aux produits d'élution des échantillons obtenus par les méthodes d'extractions (ARN extrait)

• Prévoir n tubes :

- 1 tube par prélèvement testé –

1 tube pour le contrôle extraction + inhibition de référence (IC1W0) servant aussi de contrôle négatif d'extraction + amplification

- 1 tube pour le contrôle positif d'amplification (PC9)

1. Préparation du mélange réactionnel d'amplification

- Pipeter $(n+1) \times 15 \mu\text{L}$ de prémix d'amplification (R9) et les déposer dans un tube adapté (0,2 mL – 0,5 mL).
- Ajouter $(n+1) \times 0,15 \mu\text{L}$ de RT diluée au 1/10 dans l'eau. *Exemple pour 7 échantillons ($n=9$) : Pipeter 1,5 μL de RT diluée dans l'eau + 150 μL de R9 et déposer dans un tube adapté.*

ATTENTION : La RT diluée au 1/10 doit être préparée extemporanément et ajoutée immédiatement au Prémix d'amplification. Ne pas conserver la RT diluée.

Note : Pour la préparation de la Transcriptase réverse Superscript® III, il est recommandé d'utiliser des pipettes de précision adaptées. Ne pas pipeter de volume inférieur à 1µL.

2. Ajout des échantillons et des contrôles dans le mélange réactionnel

- Faire un flux et reflux de 15 µL dans le mélange réactionnel préparé comme décrit ci-dessus et distribuer 15 µL de ce mélange dans chaque tube.

ATTENTION : Bien respecter l'ordre d'ajout des échantillons et contrôles.

- Ajouter 10 µL d'échantillon extrait dans chaque tube dédié.
- Ajouter 10 µL d'IC1+W0 extrait dans le tube dédié. Ce tube constitue le contrôle IC1W0
- Ajouter 10 µL de PC9 dans le tube dédié. Ce tube constitue le contrôle positif d'amplification
- Centrifuger les tubes dans l'appareil approprié avant de les transférer dans le thermocycleur.

Etapas	Durée	Température	Cycles	Acquisition de la fluorescence:						
				LC1	LC2, LC480	Applied Biosystems	Rotor-Gene	SC2	Stratagene Versant kPCR Molecular System AD	Dx Real-Time System
Réverse Transcription	5 min.	50°C	1	-	-	-	-	-	-	-
Activation Taq Polymerase	15 min.	95°C	1	-	-	-	-	-	-	-
Amplification	Dénaturation	10 sec.	45	-	-	-	-	-	-	-
	Hybridation	40 sec.		530	530 560	FAM VIC	Green Yellow	FAM Cys	FAM HEX	
	Elongation	25 sec.		En fin d'hybridation						
				-	-	-	-	-	-	-

- Avec le stratagène, sélectionner « NONE » dans « REFERENCE DYE »
- **d. Lecture des résultats :**
- - Vérifier que NONE a bien été sélectionné dans le champ « REFERENCE DYE » car le premix R9 ne contient pas de fluorochrome de référence passive.
- -L'analyse de la cible virale est effectuée sous le bouton « ANALYSIS » puis l'onglet « RESULTATS ».
- -L'analyse des échantillons est réalisée après avoir sélectionné le détecteur « FAM » dans le champ « ASSAYS SHOWM ».
- -Ajuster manuellement la ligne de seuil de manière à couper chaque courbe d'amplification dans sa partie linéaire.
- Cette étape a pour but de déterminer les échantillons positifs pour lesquels un « CT » est calculé. Les échantillons négatifs comportent la mention « NO CT » dans la colonne « CT ».

- L'analyse des contrôles d'extraction + inhibition (IC1 sample et IC1 W0) est réalisée de la même manière après avoir sélectionné le détecteur « HEX » à 560nm dans le « ASSAYS SHOWM ».
- **e. Validation et interprétation des résultats :**
- * **Validation du test** : pour valider l'expérience, toutes les conditions énumérées ci-dessous doivent être impérativement remplies. Dans le cas contraire, l'ensemble de l'expérience doit être réitéré. Ce sont :
 - 1ère Condition : Le contrôle négatif d'extraction + amplification IC1WO ne doit donner aucun signal « CT » à 560nm.
 - 2ème Condition : Le contrôle positif d'amplification (PC9) doit donner un signal « CT » compris entre 20 et 27 cycles à 530nm « FAM »

FICHE SIGNALYTIQUE

Nom : Diallo

Prénom : Aicha

Adresse E-mail : masaramana0@gmail.com

Année universitaire : 2018-2019

Pays : Bamako/ Mali

Titre de la thèse : Méningites à entérovirus dans le cadre de la surveillance épidémiologique au Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS) et de Pharmacie (FAPH), BP.1805 Bamako

Résumé :

Introduction / Objectifs

Les méningites virales sont fréquentes et probablement sous diagnostiquées en raison d'une symptomatologie souvent frustrée et d'une absence de recherche étiologique complète. Il est difficile d'avancer des données épidémiologiques précises en l'absence d'un système de surveillance spécifique et compte tenu du caractère généralement bénin de ces affections. Les entérovirus sont responsables de la plupart des méningites virales (85% à 95% des cas), qui surviennent généralement à la fin de l'été ou au début de l'hiver dans les zones tempérées, et toute l'année dans les zones tropicales et subtropicales. Le but de ce travail était d'évaluer la prévalence des entérovirus au cours des méningites dans la surveillance épidémiologique au Mali.

Méthodes

L'étude a porté sur l'ensemble des cas suspects de méningites pour lesquels la bactériologie classique présentait des résultats négatifs. 382 échantillons ont été passés à la technique de RT-PCR en temps réel pour la détection des Entérovirus. L'extraction de l'ARN a été réalisée en utilisant une méthode manuelle avec le kit Qiagen mini Elute. L'amplification a été faite avec le kit Enterovirus R-gene (Argene®) ciblant la région 5' non codante avec l'instrument Stratagene® Mx3005P™.

Résultats

Les patients étaient majoritairement de sexe masculin (57%) avec un sex-ratio H/F de 1,30. Les enfants de moins de 14 ans ont été les plus représentés soit 86%. On a constaté une diminution progressive du nombre de cas dans les tranches d'âges supérieures. Sur les 382 échantillons traités pendant la période d'étude, le génome d'Entérovirus a été détecté dans 30 LCR soit 7,9%. 20 des LCR positifs ont été prélevés en saison chaude (entre Février et Mai). Le district de Bamako nous a fourni le plus grand nombre de nos échantillons. Parmi les positifs, 19 LCR étaient d'aspect claire, 24 ont été prélevés dans des tubes secs et 24 ont été acheminés dans des conditions adéquates.

Conclusion

Nous avons obtenu une prévalence de moins de 10% d'entérovirus. Ce travail doit être poursuivi pour la recherche d'autres pathogènes.

Mots clés : Entérovirus ; Méningites virales ; RT PCR

SIGNALYTIC SHEET

Name: Diallo

First Name: Aicha

E-mail address: masaramana0@gmail.com

Academic year: 2018-2019

Country: Bamako / Mali

Title of thesis: enterovirus meningitis in the context of epidemiological surveillance in Mali

Place of deposit: Library of the Faculty of Medicine and Odontostomatology (FMOS) and Pharmacy (FAPH), BP.1805 Bamako.

Summary:

Introduction / Objectives

Viral meningitis is common and probably underdiagnosed due to often frustrating symptomatology and lack of complete etiological research. It is difficult to put forward precise epidemiological data in the absence of a specific surveillance system and given the generally benign nature of these conditions. Enteroviruses are responsible for most viral meningitis (85% to 95% of cases), which usually occur in late summer or early winter in temperate zones, and throughout the year in tropical and subtropical. The aim of this work was to evaluate the prevalence of enteroviruses during meningitis in epidemiological surveillance in Mali.

Methods

The study looked at all suspected cases of meningitis for which classical bacteriology presented negative results. 382 samples were passed to the real-time RT-PCR technique for Enterovirus detection. RNA extraction was performed using a manual method with the Qiagen Mini Elute kit. Amplification was done with the Enterovirus R-gene kit (Argene®) targeting the 5' non-coding region with the Stratagene® Mx3005P™ instrument.

Results

Patients were predominantly male (57%) with a H / F sex ratio of 1.30. Children under 14 years were the most represented, with 86%. There has been a gradual decline in the number of cases in older age groups. Of the 382 samples processed during the study period, Enterovirus genome was detected in 30 CSF corresponding to 7.9%. 20 positive CSF were collected during the hot season (between February and May). The district of Bamako provided us with the largest number of our samples. Of the positives, 19 CSFs were clear in appearance, 24 were collected in dry tubes and 24 were delivered under adequate conditions.

Conclusion

We obtained a prevalence of less than 10% enterovirus. This work must be continued for the research of other pathogens.

Keywords: Enteroviruses; Viral meningitis; RT PCR.

LE SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples : D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ; D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ; De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; En aucun cas, je ne consentirais 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 !