

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI

UN peuple - Un But - Une Foi



FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2020-2021

Thèse de Pharmacie

N°.....

Epidémiologie génomique du SARS-CoV-2 au Mali

Présentée et soutenue publiquement le.../.../2022

devant le jury de la faculté de Pharmacie (FAPH) par

M. AMADOU DAOU

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

Président du Jury : Pr Akory AG IKNANE

Directeur de thèse : Pr Abdoulaye A DJIMDE

Co-directeur de thèse : Dr Antoine DARA

Membres du Jury: Pr Almoustapha I MAIGA,

Pr Seydou DOUMBIA

Dédicaces

Je rends grâce : A Allah le tout puissant, le miséricordieux, l'omnipotent de m'avoir donné la vie et m'avoir guidé sur le droit chemin. Merci DIEU de m'avoir donné la force, le courage, la patience et la santé de mener à bien ce travail. Je prie également sur le prophète Mohamed paix et salut sur lui qui nous a montré cette voie de reconnaissance envers DIEU et les Hommes.

Je dédie ce travail à :

✓ A mon père Feu Moussa DAOU

Maitre coranique vous avez toujours encouragé tous vos enfants à la recherche de toute connaissance de cette vie. Tu as toujours incité tes enfants au travail bien fait. Nous prions pour le repos éternel de ton âme que le Tout Puissant vous accorde le paradis « firdaous ». Amen.

✓ A ma mère Hawa THERA

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

✓ A mon frère Bakary Daou

Ton amour, tes soutiens moraux et financiers m'ont permis d'arriver là où je suis. Je te serai toujours redevable. Je prie DIEU pour qu'il t'accorde longue vie pour bénéficier du fruit de ce travail qui est le tien.

✓ A Madiara DIABY et Oumou TANGARA

Mon séjour avec vous a été agréable. En l'absence d'une mère vous avez comblé cette place.

✓ A mes sœurs Haby DAOU, Nana DAOU, Mariam DAOU et Salimata DAOU

Vos gentilleses, vos soutiens moraux et financiers m'ont permis d'atteindre cet objectif. Que DIEU renforce nos liens de fraternité.

✓ A Dr CAMARA Check Abdoul Kadr de la Pharmacie moderne de Quinzambougou

Personne honnête, de confiance, pharmacien exemplaire de hautes qualités humaines, vous m'avez donné l'amour de la profession pharmaceutique. Vous avez toujours su me conseiller, me consoler et me soutenir dans les moments les plus difficiles de cette thèse. Que Dieu vous donne longue vie. Ce travail est le vôtre.

- ✓ A Docteur CISSE Aminata Gakou, pharmacienne titulaire de la pharmacie Amina de Torokorobougou

Vous qui avez guidé mes premiers pas dans l'exercice de la profession pharmaceutique. Vous n'avez jamais cessé de m'encourager tout au long de ce travail. Que Dieu vous donne longue vie.

- ✓ A tout le personnel de la Pharmacie moderne et de la pharmacie Amina

Merci pour votre accompagnement sans faille.

- ✓ A mon ami Mama DENON

J'ai été impressionné par tes qualités humaines. Tu as toujours répondu à mes appels. Je prie DIEU d'éterniser ce lien entre nous jusqu'au paradis. AMEN

- ✓ A mes amis et camarades :

Lamine Traoré, Hassane KANTE, Alhousseini CAMARA, Aboubacar KONTA, Bilaly TRAORE, Fanta SOGORE, Bintou DIARRA, BARRE Nani Yacouba, Fatoumata CISSE, Boï KONE, Bassirou DIAKITE, Bakoroba DIARRA, Abdoul Karim SAMAKE, Souleymane KONE, Adam GARANGO, Djeneba DIALLO.

Vos encouragements et conseils m'ont rémônté le moral à chaque obstacle.

- ✓ Au personnel de l'Institut National de Santé Publique (INSP) pour votre franche collaboration
- ✓ Au personnel du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) pour votre franche collaboration
- ✓ Au personnel du Centre universitaire de Recherche Clinique (UCRC) pour votre franche collaboration
- ✓ Au corps professoral de la Faculté de Pharmacie, pour la qualité de l'enseignement que nous avons reçu.
- ✓ Au personnel du MRTC/DEAP, pour votre disponibilité et votre franche collaboration.

- ✓ A nos maîtres du MRTC/DEAP, pour votre engagement et votre souci constant pour une formation de qualité.
- ✓ A l'équipe de l'unité de chimiorésistance du MRTC/DEAP: Particulièrement au Professeur Abdoulaye DJIMDE, aux Docteurs, Antoine DARA, Aminatou KONE, Mamadou TEKETE, Dinkorma OUOLOGUEM, Souleymane DAMA, Nouhoum DIALLO, Sekou CISSOKO, Mr Aliou TRAORE, Mme GOITA Fanta SOGORE, Mr Boï KONE pour le soutien dont vous avez fait preuve tout le long des travaux de cette thèse. Elle est la vôtre.

Hommages aux membres du jury

❖ **A notre maître et Président de jury** Professeur AKORY AG

- ✓ Professeur titulaire en santé publique spécialiste en nutrition à la FMOS et FAPH ;
- ✓ Président du réseau malien de nutrition (REMANUT) ;
- ✓ Secrétaire général de la société malienne de santé publique (SOMASAP) ;
- ✓ Ancien conseiller technique de la division de suivi de la situation alimentaire et nutritionnelle à Koulouba (DSSAN) ;
- ✓ Premier Médecin Directeur de l'ASACOBA ;
- ✓ Ancien Directeur Général de l'Agence Nationale pour la Sécurité Sanitaire des Aliments (ANSSA) ;
- ✓ Ancien Directeur Général de l'Agence Nationale d'investissement pour la collectivité territoriale (ANICT)
- ✓ Ancien Directeur Général de l'Institut National de Santé Publique (INSP)

Cher maître, nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury. Auprès de vous nous avons pu bénéficier d'un enseignement de qualité. Nous avons admiré vos qualités scientifiques et pédagogiques. C'est un immense honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury. Recevez ici cher Maître l'expression de notre profonde reconnaissance.

❖ **A notre maître et Directeur de thèse Professeur Abdoulaye A. DJIMDE**

- ✓ Professeur titulaire en Parasitologie-Mycologie à la FAPH ;
- ✓ Directeur du MRTC Parasitologie ;
- ✓ Chef de l'Unité d'Epidémiologie Moléculaire et de la Chimiorésistance (MEDRU/MRTC) ;
- ✓ Directeur du Programme DELGEME ;
- ✓ Membre de l'Académie Africaine des Sciences (AAS)

Cher maître, permettez-nous de vous témoigner notre satisfaction pour l'honneur et le privilège que vous nous avez accordé en acceptant d'encadrer cette thèse. Vos qualités humaines et scientifiques nous ont beaucoup émus tout le long de ce travail.

Vous avez cultivé en nous, le sens du travail bien fait et la rigueur scientifique. Malgré vos multiples occupations vous n'avez pas hésité à donner le meilleur de vous-même pour la réalisation de ce travail. Trouver ici, cher maître l'expression de notre profonde gratitude et de notre indéfectible attachement.

❖ **A notre maître et Membre du jury** Pr Almoustapha I MAIGA

- ✓ Maître de recherche en Virologie
- ✓ Responsable de l'unité d'épidémiologie moléculaire de résistance du VIH aux ARV du centre de recherche SEREFO ;
- ✓ Chef du département de biologie médicale du CHU Gabriel Touré ;
- ✓ Membre de plusieurs sociétés savantes internationales de lutte contre le VIH dans le monde ;

Cher maître, c'est un grand honneur et un réel plaisir que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Nous ne pourrions soumettre ce travail sans reconnaître votre rigueur scientifique. Nous vous assurons notre profond attachement.

❖ **A notre maître et Membre du jury** Pr Seydou DOUMBIA

- ✓ Professeur titulaire en épidémiologie ;
- ✓ Directeur adjoint au département d'entomologie du MRTC ;
- ✓ Doyen de la faculté de médecine et d'Odonto stomatologie de Bamako ;
- ✓ Directeur adjoint d'International Center for Excellence in Research (ICER) – NIH/USTTB Bamako Mali ;
- ✓ Directeur du Programme ICEMR-WAF « International Center for Excellence in Malaria Research in West Africa»;
- ✓ Directeur du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) de l'USTTB au Mali
- ✓ Membre d'honneur de l'Association Américaine de Médecine Tropicale et Hygiène des Etats Unis (ASTMH).

Cher maître, votre générosité, courage, et votre savoir de transmettre font de vous un enseignant hors pairs aimé par les étudiants. Votre présence dans ce jury rehausse le niveau de ce travail. Veuillez accepter, cher Maître, tous nos remerciements et notre profonde reconnaissance

❖ **A notre maître et Co-Directeur** Dr Antoine DARA

- ✓ Docteur en Pharmacie ;
- ✓ PhD en Microbiologie moléculaire et Immunologie ;
- ✓ Maître assistant en Biologie Moléculaire à la Faculté de Pharmacie ;
- ✓ Responsable du laboratoire de Génomique au MRTC-Parasitologie

Cher maître, de ce temps passé à vos côtés nous avons beaucoup appris de vos valeurs humaines et scientifiques. Cher maître nous avons été impressionnés par votre pédagogie. Votre courage, intelligence, rigueur et votre disponibilité nous ont permis de réaliser ce travail. Nous ne saurions être assez reconnaissants envers vous pour tout l'intérêt et toute la considération que vous avez porté à ce travail.

Liste des abréviations :

A	Adénine
ACE-2	Récepteur de Conversion de l'Angiotensine 2
Ac	Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Ag	Antigène
ARN	Acide Ribonucléique
ARNt	ARN de Transfert
APS	Adenosine Phosphosulphate
ATL	A-Tailing-Mix
ATP	Adenosine Triphosphate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BWA	Burrows Wheeler Aligner
C	Cytosine
CABOG	Celera Assembler With The Best Overlap Graph
CAP	Contig Assembly Program
CCD	Charge-Coupled Device
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CICM	Centre d'Infectiologie Charles Mérieux
COVID-19	Maladie Coronavirus de 2019
CRP	Protéine C Réactive
CTA	A-Tailing Control
CTD	Domaine C-Terminal
CTE	End Repair Control
CTL	Ligation Control
dATP	Désoxyadénosine Triphosphate
DELGEME	Developing Excellence in Leadership And Genetics Training For Malaria Elimination
dTTP	Désoxythymidine Triphosphate
dCTP	Désoxycytidine Triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine Triphosphate
ddATP	Didesoxyadénosine Triphosphate
ddTTP	Didesoxythymidine Triphosphate

ddCTP	Didesoxycytidine Triphosphate
ddGTP	Didesoxyguanosine Triphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxide
DMV	Vesicule Double Membrane
dNTP	Dinucleotide Triphosphate
ECDC	European Center of Disease and Control
ELB	Elution Buffer
EP	Embolie Pulmonaire
EPH	Elute Prime Fragment High Mix
ETOH	Ethanol
ER-GIC	Compartiment Réticulum Endoplasmique-Appareil de Golgi
EUAC	Autorisation d'Utilisation d'urgence
FC	Flow Cell
FDA	Food and Drug Administration
FSA	First Strand Synthesis Act D Mix
g	Gramme
G	Guanine
GISAID	Initiative Global pour le Partage des Données de Virus Influenza
HCoV-229 E	Human Coronavirus-229 E
HCoV-OC43	Human Coronavirus Organ Culture 43
HCoV-NL63	Human Coronavirus Netherland 63
HCoV-HKU1	Human Coronavirus Hong Kong University 1
HT1	Hybridization Buffer
IgA	Immunoglobulin A
IgM	Immunoglobulin M
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukine
INF	Interféron
INSP	Institut National de Santé Publique
L	Litre
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LIG	Ligation Mix
MCM	Contre Mesure Médicale

MERS-CoV	Coronavirus du Syndrome Respiratoire Du Moyen-Orient
Min	Minute
mM	Milli-Molaire
ml	Millilitre
MPI	Message Passif Interface
MRTC	Malaria Research and Training Center
MVTE	Maladie Veineuse Thromboembolique
Nachr	N-Acetylcholine
NaOH	Hydroxide de Sodium
Ng	Nanogramme
nM	Nano-Molaire
Nsp	Protéine Non Structurale
NTD	Domaine N Terminal
OMS	Organisation Mondiale de La Santé
ORF	Open Reading Fragment
Pb	Paire de Base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIB	Produit Intérieur Brut
PEDV	Porcine Epidemic Diarrhea Virus
PGM	Personal Genome Machine
PMM	PCR Master Mix
PP1a	Polyprotéine 1 A
PP1ab	Polyprotéine 1ab
PPC	PCR Primer Cocktail
PM	Poids Moléculaire
RBD	Receptor Binding Domain
RRB	Rna Removal Beads
RRMG	Rna Removal Mix-Gold
rRNA	Ribosomal RNA
RSB	Resuspension Buffer
RT	Room Temperature
RT-LAMP	Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification
RT-PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne en Temps Reel

SBS	Séquençage par Synthèse
SDRA	Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
Sec	Seconde
SGB	Syndrome de Guillain Barré
SMM	Second Strand Marking Master Mix
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOLID	Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection
SARS-CoV	Coronavirus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
SARS-CoV-2	Coronavirus du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère 2
STL	Stop Ligation Buffer
TAAN	Tests d'Amplification des Acides Nucléiques
TDR	Tests de Diagnostic Rapide
TVP	Thrombose Veineuse Profonde
TMPRSS2	Protéase Transmembranaire de Type Serine
Tr	Tour
UCRC	Centre Universitaire de Recherche Clinique
Ug	Microgramme
µl	Microlitre
USI	Unité de Soins Intensifs
VIH	Virus de l'Immunodeficiency Humaine

Table des matières

I-Introduction	1
II. Objectifs de l'étude	4
II. 1. Objectif général	4
II. 2. Objectifs spécifiques	4
III. Généralités	5
III. 1. Historique et épidémiologie	5
III. 2. Organisation du génome de SARS-CoV-2	7
III. 3. Cycle de réplication	10
III. 4. Physiopathologie	12
III. 4. 1. Au niveau respiratoire et pulmonaire	13
III. 4. 2. Au niveau des vaisseaux sanguins	13
III. 4. 3. Au niveau tube digestif	13
III. 4. 4. Au niveau hépatique	14
III. 4. 5. Au niveau des neurones ou neuro-invasion	14
III. 4. 6. Au niveau rénal	14
III. 4. 7. Au niveau cardiaque	15
III. 4. 8. Au niveau des cellules endothéliales	15
III. 4. 9. Impact sur la glycémie	15
III. 4. 10. Autres atteintes	15
III. 5. Clinique	17
III. 5. 1. Manifestations pulmonaires	17
III. 5. 2. Manifestations neurologiques	17
III. 5. 3. Manifestations au niveau des vaisseaux sanguins : Maladie Veineuse Thromboembolique(MVTE)	17
III. 5. 4. Manifestations cardiaques	18
III. 5. 5. Manifestations hépatiques et du tractus gastro-intestinal	18
III. 5. 6. Manifestations rénales	18

III. 5. 7. Manifestations oculaires	18
III. 5. 8. Manifestations cutanées	18
III. 6. Diagnostic	19
III. 6. 1. PCR à temps réel ou qPCR (PCR quantitative)	19
III. 6. 2. Tests antigéniques	20
III. 6. 2. 1. Avantages	20
III. 6. 2. 2. Inconvénients	20
III. 6. 3. Tests sérologiques	20
III. 6. 3. 1. Avantages	21
III. 6. 3. 2. Inconvénients	21
III. 6. 4. Séquençage	21
III. 7. Traitement	21
III. 7. 1. Inhibiteurs d'entrée dans la cellule hôte	22
III. 7. 2. Inhibiteurs de réplication	25
III. 7. 3. Autres stratégies antivirales	26
III. 8. Prophylaxie	27
III. 8. 1. Protection individuelle	28
III. 8. 2. Protection collective	28
III. 8. 3. Vaccins anti-COVID-19	29
III. 8. 3. 1. Vaccins à ARN	29
III. 8. 3. 2. Vaccins à vecteurs adénovirus	30
III. 8. 3. 3. Vaccins viraux inactivés	30
III. 8. 3. 4. Vaccins sous-unitaires	30
III. 8. 3. 5. Autres types de vaccins	30
III. 9. Variants SARS-CoV-2	31
III. 9. 1. Variants préoccupants ou VOC (« variant of concern » en anglais)	32
III. 9. 1. 5. Variant Omicron ou lignée B.1.1.529	34

III. 9. 2. Variants à suivre ou VOI (« variant Under investigation » ou « variant of interest » en anglais)	35
III. 9. 3. « Variants en cours d'évaluation »	35
III. 9. 4. Variants de haute conséquence	35
III. 10. Génomique	36
III. 10. 1. Définition	36
III. 10. 2. Historique	36
III. 10. 2. 1. Séquenceurs de première génération	39
III. 10. 2. 1. 1. Méthode de Sanger	39
III. 10. 2. 1. 2. Méthode de Maxam et Gilbert	40
III. 10. 2. 1. 3. Pyroséquençage: Méthode non Sanger de séquençage	41
III. 10. 2. 1. 3. 1. Principe du pyrosequençage	41
III. 10. 2. 1. 3. 2. Avantages et limites	42
III. 10. 2. 2. Séquenceurs de deuxième génération	42
III. 10. 2. 2. 1. Roche 454	43
III. 10. 2. 2. 2. Illumina/Solexa	43
III. 10. 2. 2. 3. SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection)	44
III. 10. 2. 2. 4. Ion Torrent	44
III. 10. 2. 3. Séquenceurs de 3ème génération	44
III. 10. 3. Types de génomique	45
III. 10. 3. 1. Génomique structurelle	45
III. 10. 3. 2. Génomique fonctionnelle	45
III. 11. Assemblage du génome	45
III. 12. Annotation du génome	45
IV. Méthodologie	47
IV. 1. Sites d'étude	47
IV. 2. Type d'étude	47
IV. 3. Période d'étude	47

IV. 4. Population d'étude	47
IV. 5. Echantillonnage	47
IV. 6. Critères d'inclusion	47
IV. 7. Critères de non inclusion	47
IV. 8. Procédure de l'étude	48
IV.8. 1. Méthodes de collecte des données	48
IV. 8. 1. 1. Données cliniques	48
IV.8. 1. 2. Données biologiques	48
IV.8. 1. 2. 1. Techniques de laboratoires	48
1. Prélèvement	48
2. Extraction d'ARN et diagnostic moléculaire	48
3. Préparation de la librairie	48
3. 1. Quantification des échantillons et évaluation de la qualité	48
3. 2. Différentes étapes	48
3. 3. Séquençage sur MiSeq	49
IV. 8. 1. 2. 2. Analyses bio-informatique des séquences	49
V. Résultats	51
VI. Commentaires et Discussions	64
VII. Conclusion	64
VIII. Recommandations	70
IX. Références	71
X. Annexes	81
10. 1. Denovix RNA assay	81
10. 2. Différentes étapes de préparation de la librairie	82
10. 2. 1. Étape 1: Déplétion de l'ARN ribosomale (ARNr)	83
10. 2. 2. Étape 2: Fragmenter l'ARN	85
10. 2. 3. Étape 3: Synthèse du premier brin de l'ADN	86
10. 2. 4. Étape 4: Synthèse du second brin de l'ADN	86

10. 2. 5. Étape 5: Purification de l'ADN	87
10. 2. 6. Étape 6: Adénylation de l'ADNc	88
10. 2. 7. Étape 7: Ligaturer les adaptateurs aux extrémités des fragments d'ADNc	89
10. 2. 8. Étape 8: Amplification/enrichissement de la librairie par PCR	91
10. 2. 9. Evaluation de la concentration et de la qualité des fragments	92
10. 2. 9. 1. Agilent DNA assay	93
10. 2. 9. 2. Denovix DNA assay	98
10. 2. 10. Normalisation, regroupement et dénaturation	99
10. 2. 10. 1. Normalisation de la librairie à 4nM	99
10. 2. 10. 2. Regroupement des échantillons	100
10. 2. 10. 3. Dénaturation	100
10. 3. Fiche signalétique	101

Liste des Tableaux

Tableau I : Les inhibiteurs de liaison ACE-2-proteine spike	23
Tableau II: Inhibition de la protéase du SARS-CoV-2	24
Tableau III: Inhibiteurs de réplication	25
Tableau IV : Traitements symptomatiques	26
Tableau V: Répartition des échantillons en fonction du sexe	51
Tableau VI : Répartition des échantillons en fonction de l'âge	52
Tableau VII : Répartition des échantillons séquencés avec succès en fonction des vagues	52
Tableau VIII: Mutations sur les deux premiers génomes séquencés	55
Tableau IX : Polymorphismes sur le génome de SARS-CoV-2	56
Tableau X: Mutations sur les protéines structurales	59
Tableau XI: Mutations sur les protéines non structurales indispensable à la réplication virale .	59
Tableau XII: Mutations sur les protéines accessoires ORF3a et ORF8	60
Tableau XIII: Prévalences des mutations notables non spécifiques	63
Tableau XIV: Denovix RNA assay	81
Tableau XV: Agilent DNA 1000 Kit	93
Tableau XVI : Spécification physiques	93
Tableau XVII: Kit Denovix dsDNA Broad Range	98

Liste des Figures

Figure 1: Présentation schématique de l'organisation du génome du SARS-CoV-2, des ARNm sous-génomiques canoniques et de la structure du virion.....	8
Figure 2: Cycle biologique de SARS-CoV-2	12
Figure 3: Physiopathologies du COVID-19.....	16
Figure 4: Répartition des échantillons analysés	51
Figure 5: Taille de la librairie sur le gel d'agarose (A) et des fragments après séquençage (B) ..	53
Figure 6 : Scores qualité des données	53
Figure 7 : Profondeur de lectures des séquences.....	54
Figure 8: Types de polymorphismes sur le génome.....	56
Figure 9: Co-mutations sur le génome de SARS-CoV-2.....	57
Figure 10: Répartition des variants en fonction des vagues	58
Figure 11: Variants retrouvés chez les échantillons séquencés au Mali	60
Figure 12 : Pourcentages des variants circulants au Mali	61
Figure 13: Arbre phylogénétique des échantillons de SARS-CoV-2	62
Figure 14: QuadroMACS.....	84

I-Introduction

La maladie à coronavirus de 2019 (en anglais 2019 coronavirus disease) ou COVID-19 est une affection des voies respiratoires supérieures et inférieures causée par un virus de la famille des Betacoronavirus. Actuellement, sept (7) espèces sont incriminées dans les infections humaines dont quatre (4) provoquent des infections respiratoires légères à savoir le human coronavirus-229E (HCoV-229 E), human coronavirus Netherland 63 (HCoV-NL63), human coronavirus organ culture 43 (HCoV-OC43), human coronavirus Hong Kong (HCoV-HKU1). Les trois (3) autres sont impliquées dans les formes sévères dont le premier coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS-CoV-1), le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) et le deuxième coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2). Les coronavirus sont divisés en quatre genres : les *Alphacoronavirus*, les *Betacoronavirus*, les *Gammacoronavirus* et les *Deltacoronavirus*. Les genres *Alphacoronavirus* et *Betacoronavirus* infectent les mammifères et les oiseaux. Les genres *Gammacoronavirus* et les *Deltacoronavirus* infectent les oiseaux[1], [2].

Les coronavirus ont été découverts pour la première fois chez les volailles en 1930. Quelques années plus tard, le virus a franchi la barrière humaine dans les années 1960 avec l'espèce HCoV-229E en premier et ensuite les autres espèces [3].

Le SRAS-CoV-1, MERS-CoV et le SARS-CoV-2 furent les trois espèces qui ont fortement attiré l'attention mondiale par leurs pathogénicités. Le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère-1 (SARS-CoV-1) a été découvert pour la première fois dans le Guangdong en Chine en février 2003 avec comme hôte intermédiaire les civettes. Cette épidémie a touché vingt-neuf (29) pays avec 8096 cas, 774 décès et un taux de létalité de 9,6%.

Le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) a été découvert à Djeddah en Arabie Saoudite en 2012 avec comme hôte intermédiaire les dromadaires. Elle a touché vingt-sept (27) pays avec 2502 cas, 861 décès et un taux de létalité de 34,4%.

Le dernier virus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère est le SARS-CoV-2. Il avait été nommé d'abord nCoV-2019 avant l'actuelle appellation SARS-CoV-2 le 11 février 2020 par le comité international de taxonomie des virus[4] et la maladie par COVID-19 par l'OMS. Cette appellation est due à ses similitudes moléculaires et structurales avec le virus du Syndrome respiratoire aigu sévère de la Chine de 2002-2003 [1], [2], [5].

Selon l'OMS au 25 mars 2022, le monde était à 478 614 410 cas de COVID-19 avec 6 135 385 cas de décès et 413 297 131. A la même date l'Afrique avait enregistré au total 11 490 404 cas de COVID-19 avec 227 000 décès [6]. Le nombre cas cumulés au Mali était de 30 466, 29 615 guéris et 727 décès [7].

Cette pandémie a fortement affectée l'économie mondiale. Les mesures suivantes adoptées pour freiner la propagation du virus ont entraîné une grave récession économique. Il s'agit de la fermeture des frontières, les couvre-feux, les confinements, la fermeture des lieux de loisirs, et celle des écoles, etc... Une diminution de 5,2% du produit intérieur brut (PIB) mondial était attendu en 2020 [8]. Avec la vaccination, empêchant l'apparition des formes graves de la maladie nécessitant un fort cout de soin, l'économie devrait se rétablir à 6% en 2021 [9]. Cette pandémie a fortement touché le Mali : lourde chute de la croissance économique et augmentation de la pauvreté, endettement des générations futures et retardement des progrès pour le développement durables, des pertes d'emplois et la détérioration du capital humain [10].

Les stratégies actuelles de lutte contre la pandémie reposent sur les moyens de prévention que sont les mesures barrières, les restrictions de voyage, l'utilisation des masques et les vaccins. En absence d'un traitement antiviral efficace, l'espoir repose sur les vaccins. Cependant, l'évolution du virus avec l'apparition de nouveaux variants constitue un défi majeur dans la lutte contre la pandémie à coronavirus. Différents variants ont été à l'origine des vagues de la pandémie dans le monde. En fonction de l'importance clinique des mutations qu'ils portent, l'OMS classe les variants en trois catégories : variants préoccupants, variants d'intérêt et variants en observation. Il existe une quatrième catégorie encore jamais détectée qui est le variant de haute conséquence. Les variants préoccupants qui ont été décrits à nos jours sont le variant Alpha qui tire son origine en Grande-Bretagne, le variant Beta détecté pour la première fois en Afrique du Sud, le variant Gamma du Brésil, le variant Delta qui provient de l'Inde, et récemment le variant Omicron (Botswana/Afrique du Sud). Ces variants peuvent avoir des impacts négatifs sur la transmissibilité, la sévérité de l'infection et sur les stratégies de lutte contre la pandémie. Ainsi, il est nécessaire de mettre en place un système de surveillance dans chaque pays comme recommandé par l'OMS afin de détecter les nouveaux variants qui peuvent être des obstacles pour le contrôle de la pandémie.

Au Mali, le système de surveillance épidémiologique de la pandémie est principalement basé sur la détection des cas par les tests antigéniques et la RT-PCR qualitative. Cependant, le suivi

de l'évolution des variants nécessite des outils de génomique constitués de séquenceur du matériel génétique du virus suivi de l'analyse des séquences. Au Mali, les données sur les variants qui circulent sont très limitées. Les tous premiers génomes maliens ont été séquencés en Allemagne [11]. Au vu des difficultés de transport aérien des matériels biologiques et de la nécessité d'obtenir des résultats rapidement, il était nécessaire de développer une capacité locale de séquençage afin de suivre l'évolution du virus.

Hypothèse de Recherche

Plusieurs variants de SARS-CoV-2 circuleraient déjà au Mali!

II. Objectifs de l'étude

II. 1. Objectif général

Etudier l'épidémiologie génomique du SARS-CoV-2 au Mali.

II. 2. Objectifs spécifiques

1. Générer le premier génome de SARS-CoV-2 localement au Mali ;
2. Déterminer l'évolution de SARS-CoV-2 au Mali;
3. Identifier les variants de SARS-CoV-2 circulants au Mali ;
4. Déterminer l'origine géographique des variants de SARS-CoV-2 détectés au Mali ;
5. Déterminer l'importance des mutations notables détectées de SARS-CoV-2 au Mali.

III. Généralités

III. 1. Historique et épidémiologie

Les coronavirus sont une grande famille de virus à ARN simple brin de sens positif avec une enveloppe de forme sphérique, un diamètre de 100-160 nm. Ils appartiennent à la famille des *Coronaviridae*, sous famille des *Coronavirinae*, ordre des *Nidovirales* repartis en quatre genres: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* et *Deltacoronavirus* [3].

Connus à ce jour les coronavirus infectaient les oiseaux avec un premier cas en 1930 chez les volailles avec le virus de la bronchite infectieuse aviaire (*Gammacoronavirus*) chez la poule. En 1968, le terme de coronavirus a été inventé par leur forme d'apparition à la microscopie électronique montrant l'aspect d'une couronne. Tous les cas d'infections humaines ont toutes comme source des animaux qui sont les hôtes naturels et intermédiaires. La majorité des infections dues aux coronavirus infectant les animaux se traduisent par des infections gastro-intestinales dont le porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) qui a fait des ravages dans les élevages porcins en Amérique et en Asie en 2013[1]–[3], [12].

Quelques années plus tard, le virus a franchi la barrière humaine avec comme première espèce HCoV-229E en 1960 à Chicago. Par la suite, le HCoV-OC43 en 1967 aux USA, HCoV-NL63 en 2004 au Pays Bas, HCoV-HKU1 en 2005 à Hong Kong ont été décrites dans les infections humaines. Ces quatre virus provoquent des infections respiratoires légères. Les trois espèces responsables d'infections humaines graves sont : le SRAS-CoV-1 (Chine de 2002-2003) ; MERS-CoV (Moyen-Orient 2012) ; et le SARS-CoV-2 (2019 Wuhan, Chine). En termes de classification, le HCoV-229E et le HCoV-OC43 sont les coronavirus classiques. HCoV-NL63 et HCoV-HKU1 sont les coronavirus de classe 2A le SRAS-CoV-1, MERS-CoV et le SARS-CoV-2 sont classés comme coronavirus de classe 2B [3].

Quelques dates importantes ont marqué l'histoire de SARS-CoV-2. Tout commence en Chine le 31 décembre 2019 quand le bureau de l'OMS en Chine a été informé d'une épidémie de pneumonie dans la ville de Wuhan, province du Hubei. Grâce aux avancées technologiques de séquençage et des connaissances antérieures sur les coronavirus, en une semaine le pathogène fut identifié. Un nouveau coronavirus, plus précisément un *Betacoronavirus* proche du coronavirus de l'épidémie du syndrome respiratoire aigu sévère apparu en Chine en 2003 est l'agent pathogène de cette pneumonie. La Thaïlande fut le premier pays à rapporté un cas après la Chine le 13 janvier 2020. Le nombre de cas et de décès provoqués par l'épidémie a dépassé en un mois ceux de l'épidémie de SRAS-CoV-1 avec 910 morts et 4000 cas rien

qu'en Chine. Le 11 février 2020, le comité international de taxonomie des virus a nommé le nouveau coronavirus SARS-CoV-2, sur la base de sa similitude génétique avec le SRAS-CoV-1. La maladie causée par ce virus fut nommée COVID-19 par l'OMS. Cette nomination est due à sa ressemblance structurale et moléculaire avec le SRAS-CoV-1. Sur le plan moléculaire le SARS-CoV-2 à une similitude de séquence génétique d'environ 80% avec le SRAS-CoV-1. Au niveau structural, ils partagent en commun quatre (4) protéines structurales avec quelques différences spécifiques au SARS-CoV-2 [1], [2].

En mi-février, l'épidémie a rapidement atteint d'autres pays tels que l'Égypte et la France. À la fin du mois de février 2020, onze (11) autres pays européens ont signalé des cas avec 82 000 infections confirmées et 2800 personnes décédées dans le monde. Le 11 mars 2020, l'OMS a officiellement déclaré l'épidémie de pandémie et les gouvernements du monde entier ont commencé à mettre en œuvre des stratégies pour ralentir la propagation de l'infection. L'épidémie fut rapidement maîtrisée en Chine par leur rigueur et respects des mesures de propagation de virus car aucun cas n'a été rapporté le 16 mars 2020. Elle continue d'évoluer dans d'autres parties du monde telles que l'Italie qui est rapidement devenue le nouvel épice centre émergent avec un pic de nouveaux cas quotidiens signalés à 6557 le 21 mars 2020. Les États-Unis, avec au moins 100 000 cas cumulés le 27 mars et plus de 2700 décès. Le 29 mars, l'Espagne a enregistré 838 nouveaux décès en 24 h [1], [2]. Les premiers cas de COVID-19 en Afrique ont été signalés en Février en 2020. Le Mali a rapporté son premier cas le 25 mars 2020[13].

Des mesures de confinement, fermetures des lieux de loisirs, des frontières et l'arrêt de plusieurs activités bénéfiques furent adoptés partout dans le monde avec des répercussions catastrophiques sur l'économie mondiale. Le nombre mondial de cas était à plus de 600 000, dont plus de 29 000 décès à la date du 29 mars 2020. À la fin du mois de mars, il restait peu de pays avec des cas non signalés. Une baisse mondiale de cas a été rapportée en fin Avril 2020 grâce aux mesures de riposte contre la pandémie. Les frontières ont été ouvertes, les confinements furent levés et certaines activités ont repris mais ces décisions devraient être retardées ou accompagnées de plus de sensibilisation car les conséquences ont été une deuxième vague. Au 12 juillet 2020, plus de 12,7 millions d'infections au SARS-CoV-2 étaient confirmées dans 213 pays et territoires, dont plus de 560 000 décès, avec la plus forte proportion de cas et de mortalité aux États-Unis.

Le Mali a fait face à la deuxième vague en décembre 2020 accentuée par le harmattan, ce vent du désert qui véhicule de nombreuses infections respiratoires aiguës. À la mi-décembre, le

nombre total de cas hebdomadaires détectés dans le pays était de 679, contre moins de 300 au plus haut sommet de la première vague [14].

Le développement de vaccin fut entrepris pour freiner rapidement la propagation du virus par plusieurs laboratoires pharmaceutiques (Pfizer, Moderna, Oxford/Astrazeneca, etc). Une première administration du vaccin a commencé en mois de décembre aux Etats-Unis par une infirmière. Le vaccin ciblait les personnes vulnérables et les plus exposées à l'infection (personnes âgées>70ans, agent de santé, personnes obèses, les malades mentaux, maladies chroniques...). Avec la vaccination des personnes vulnérables et des relâchements des mesures une troisième vague a surgit, dominée par certains variants tels que le variant Alpha, Beta et le B.1 touchant les personnes jeunes. Les personnes âgées ont été moins représentées durant cette vague grâce à la vaccination.

Le Mali a fait face à la troisième vague en Avril 2021 avec un pic record de 157 cas confirmés le 1^{er} Avril 2021 incriminant plusieurs causes telles que le non-respect des mesures de prévention lors de nos évènements de regroupement tels que le mariage, les activités sportives, les funérailles et également les fêtes religieuses regroupant plusieurs fidèles.

III. 2. Organisation du génome de SARS-CoV-2

Les coronavirus ont le plus long génome parmi tous les virus à ARN de 27 à 32 kilobases (kb)[3]. Le génome de SARS-CoV-2 est divisé en trois (3) parties : cadres de lecture ouverts 1a (ORF 1a), cadres de lecture ouverts 1b (ORF1b) et les protéines structurales. Lors du processus de réplication les ORF 1a et 1b codent pour deux poly-protéines PP1a et PP1ab qui serviront pour la synthèse des protéines non structurales (nsps). Le génome comprend 6 à 11 ORFs avec des régions non traduites (UTR) en 5' et 3'. Les protéines non structurales sont au nombre de seize (nsp1-nsp16). Les protéines non structurales assurent le bon déroulement de la réplication. La nsp3 code pour la protéase de type papaïne, la nsp5 code pour la protéase de type chymotrypsine, la nsp12 code pour l'ARN polymérase ARN dépendante et la nsp13 pour l'hélicase [15].

Les protéines structurales sont indispensables pour contracter l'infection au SARS-CoV-2. Ces protéines sont aux nombres de quatre.

-Protéine de pointe S : sous forme de spicule elle est présente sur toute la surface du virus les donnant l'apparence d'une couronne d'où le nom coronavirus (Figure 1). Cette protéine joue un rôle très important dans l'entrée du virus dans la cellule cible. La protéine spike a deux sous unité, la sous unité S1 (deux sous-domaines le domaine N-terminal (NTD) et le domaine

C-terminal (CTD) lui permettant de se lier au récepteur d'entrée (ACE-2) dans la cellule hôte suivi de son amorçage par les protéases membranaires (TMPRSS2, Cat B/L). La sous unité S2 facilite la fusion du virus avec les membranes cellulaires. Malgré la présence en commun de la protéine S dans les deux virus, le SARS-CoV-2 se distingue de SRAS-CoV-1 par la présence de six acides aminés dans le domaine de liaison au récepteur ACE-2 lui conférant une affinité plus forte pour le récepteur que le SRAS-CoV-1. Cette protéine offre plusieurs cibles thérapeutiques car la réussite de l'infection dépend de sa liaison avec le récepteur[1]–[3], [16].

Protéines de nucléocapsides (N): protègent le génome viral des cellules hôte extérieures pour le bon déroulement de la réplication.

-Protéines M et E: sont responsables de l'assemblage, du transport transmembranaire, du bourgeonnement et de la libération des virions formés [1], [2]

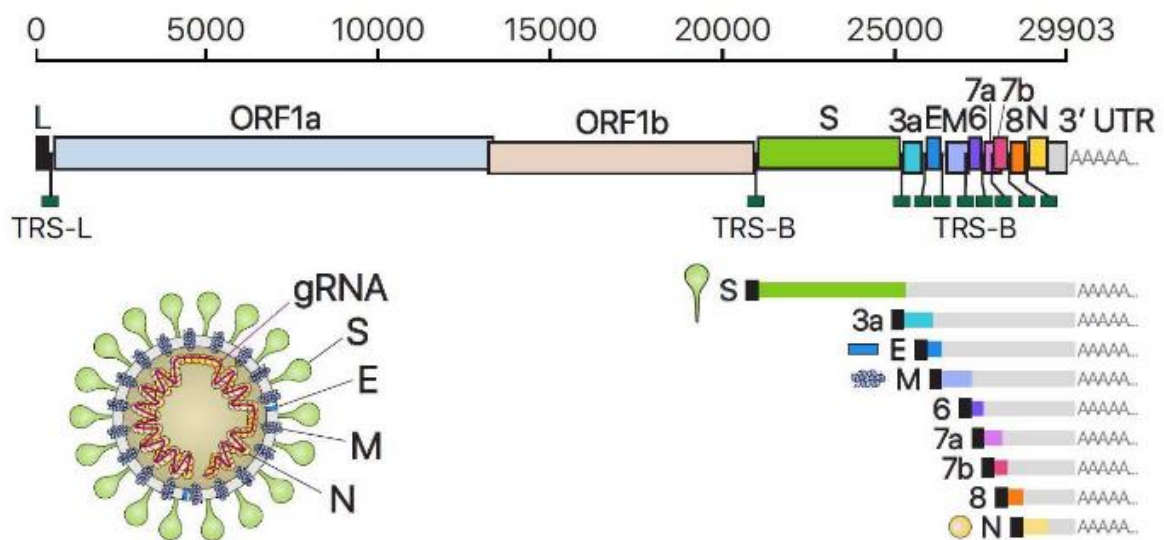


Figure 1: Présentation schématique de l'organisation du génome du SARS-CoV-2, des ARNm sous-génomiques canoniques et de la structure du virion [21]

Le génome de SARS-CoV-2 dans les 2/3 contient deux cadres ouverts de lectures (ORF 1a et ORF1b) qui codent pour deux larges poly-protéines (pp1a et pp1ab) et une petite partie code pour les protéines structurales.

III. 3. Cycle de réplication

Bien qu'encore à éclairer les pangolins, les serpents et les tortues sont tous à ce jour considérés comme les hôtes intermédiaires de SARS-CoV-2. Les chauves-souris sont les réservoirs naturels. Les mécanismes de passage du germe de l'animal à l'homme ou du contraire sont à éclairer[1], [18]. L'infection de l'hôte commence par projection de gouttelettes respiratoires de personnes symptomatiques, pré-symptomatiques et, plus rarement, asymptomatiques sur les muqueuses (nasales, oculaires, buccales...). On peut également s'infecter par l'intermédiaire de mains contaminées, ou en cas de contact avec des surfaces infectées[18]. Le virus s'attaque à plusieurs organes exprimant le récepteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine 2 (ACE-2) mais avec un fort tropisme pour les cellules pulmonaires. La caractérisation principale effrayante de la maladie est l'infection pulmonaire. Après l'attaque du poumon la multiplication virale se déroule en cinq (5) étapes : attachement et entrée cellulaire, la transcription de la réplicase virale, la transcription et la réplication génomique, la traduction des protéines structurales, assemblage et libération de virion.

L'infection est facilitée par l'attachement de la protéine de pointe (S) de SARS-CoV-2 avec l'ACE-2. La liaison initiale commence par l'attachement du virus à la cellule hôte via son domaine S1 au récepteur de l'ACE-2 initiant la fusion suivi également par la fusion de la protéine S via le domaine S2 à la protéine transmembranaire cellulaire (de type furine). Ce qui facilite l'amorçage du virus par la serine protéase transmembranaire (TMPRSS2). Ainsi le virus est clivé et l'entrée dans la cellule hôte se fait par endocytose. La protéine S de SARS-CoV-2 a une forte affinité de liaison pour le récepteur ACE-2.

Le génome de SARS-CoV-2 dans les 2/3 contient deux cadres ouverts de lectures (ORF 1a et ORF1b) qui codent pour deux larges poly-protéines (PP1a et PP1ab) et une petite partie code pour les protéines structurales (Figure 1).

Après l'entrée et le décapsidage réussis du virus, la fusion membranaire libère la nucléocapside entourant l'ARN génomique dans le cytosol, ensuite l'ARN génomique (sgRNA) sert de transcrite et permet la traduction dépendante de la cape de l'ORF1a produisant la polyprotéine pp1a. Ensuite, une séquence glissante et un pseudoknot d'ARN vers la fin d'ORF1a conduit 25 à 30% des ribosomes à subir un décalage de cadre, d'où la poursuite de la traduction sur ORF1b ensuite la production de la poly-protéine pp1ab plus longue. Le clivage auto-protéolytique de la PP1a et de la PP1ab génère seize (16) protéines non structurales

(nsp) qui possèdent des fonctions spécifiques. L'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP) est codé par nsp12. nsp7 et nsp8 sont les cofacteurs de la polymérase. Les nsp3 et nsp5 respectivement codent la papaine-like protéase (PLpro) et la protéase principale (Mpro). Les protéines Nsp3 , Nsp4 et Nsp6 sont spécialisés dans le réarrangement de la membrane cellulaire pour former des vésicules à double membrane (DMV)[1], [19].

Après la libération l'ARN génomique sert de modèle pour la synthèse d'ARN de sens négatif grâce à la polymérase (NSP12) par un mécanisme non encore élucidé. Cet ARN sens négatif sert de matrice pour la production d'ARNm codant pour les différentes protéines structurales et d'ARNs génomique qui seront ensuite encapsidés. Les protéines structurales S, Enveloppe (E), Membrane (M) sont traduites par des ribosomes liés au réticulum endoplasmique (RE). Le réticulum endoplasmique forme des vésicules à double membrane (DMV) dans lesquelles l'ARN viral est répliqué et protégé du système immunitaire inné de l'hôte. Ensuite la Nsp3 crée des pores à travers lesquels l'ARN viral quitte les DMV pour l'assemblage du virion

Une fois la réplication finie le nouvel ARN génomique formé s'associe à la protéine N pour former la nucléocapside. Ensuite il y aura une interaction entre les différentes protéines structurales leur permettant de s'associer à partir de la nucléocapside après différents processus de modification pour former la membrane et ensuite certaines protéines non structurales (Nsp3, Nsp4 et Nsp6) spécialisées dans le réarrangement cellulaire vont intervenir pour compléter l'assemblage[4]. L'ensemble du processus de réplication a lieu dans le cytoplasme et l'assemblage dans le compartiment intermédiaire du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (ERGIC) (Figure 2)[20]. Une fois l'assemblage fini les vésicules doubles membranes sont transportées et relarguées à la surface des cellules via l'appareil de Golgi et ensuite les virions sont libérés par exocytose prêts à attaquer d'autres cellules[1], [19], [21].

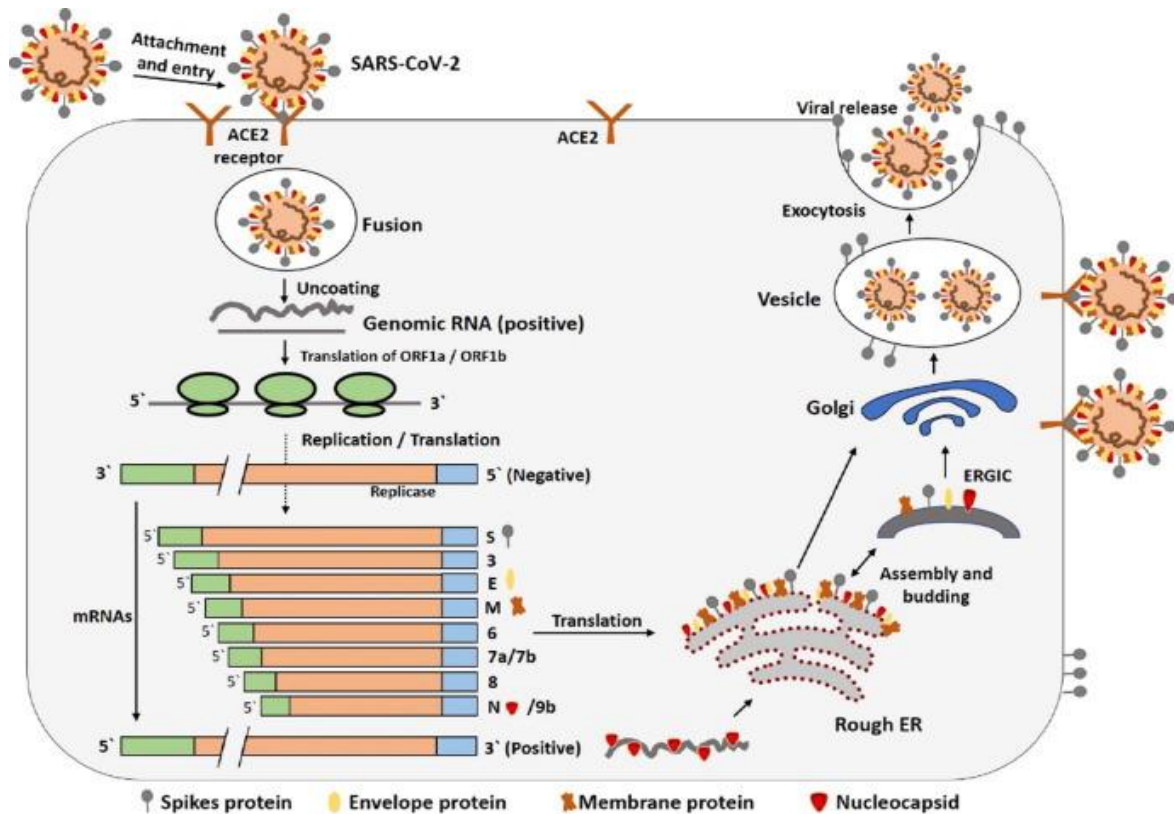


Figure 2: Cycle biologique de SARS-CoV-2

Traduction : attachment and entry= attachement et entrée ; ACE2 receptor= récepteur de conversion de l'angiotensine 2 ; fusion= fusion, uncoating= décapsulation ; genomic RNA (positive)= ARN génomique de sens positive ; replication= réplication ; translation= traduction ; golgi= appareil de golgi ; ER= réticulum endoplasmique ; assembly and budding= assemblage et bourgeonnement ; vesicle= vésicule double membrane ; exocytosis= exocytose ; viral release= libération des virions[20]

III. 4. Physiopathologie

De leur nom coronavirus-2 du syndrome respiratoire aigu sévère ces virus ont un tropisme élevé pour les voies respiratoires (supérieures et inférieures) entraînant des infections allant du simple état grippal au syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS). Par la présence de son récepteur principal (ACE-2) d'entrée dans la cellule au niveau de plusieurs organes tels que le tube digestif, les reins, le cœur, la vésicule biliaire, les glandes séminales et les testicules, le SARS-CoV-2 provoque des atteintes respiratoires, neurologiques, digestives, cardiologiques, hépatiques, oculaires, et/ou cutanées perturbant l'homéostasie de l'organisme dans plusieurs sites [1], [4], [22]

III. 4. 1. Au niveau respiratoire et pulmonaire

La principale caractérisation de la maladie est l'aboutissement au syndrome de détresse respiratoire aigu sévère (SDRA) du fait de l'expression de l'ACE-2 au niveau des pneumocytes. Ce syndrome se manifeste différemment en fonction du terrain de l'infection [1].

Le syndrome respiratoire aigu sévère est provoqué par la forte mobilisation des cellules immunitaires par le SARS-CoV-2 conduisant à une sécrétion exagérée de cytokines (tempête cytokinique) entraînant une hypoxémie, ainsi qu'une défaillance multiviscérale au stade terminal. Le rapport neutrophiles/lymphocytes est utilisé comme indicateur de cette manifestation de la maladie. Une majorité (67-85 %) des patients admis en unités de soins intensifs avec un diagnostic confirmé d'infection à SARS-CoV-2 développent un syndrome respiratoire aigu sévère [1], [4].

III. 4. 2. Au niveau des vaisseaux sanguins

La maladie veineuse thromboembolique (MVTE) est l'une des manifestations secondaires des formes graves de l'infection par le SARS-CoV-2. Le mécanisme n'est pas encore bien élucidé mais des taux de D-dimères ($> 10\,000\ \mu\text{g/L}$), du fibrinogène ($> 8\ \text{g/L}$), de la prothrombine et de la *C-reactive protein* (CRP) ($> 100\ \text{mg/L}$) élevés sont associés à une issue fatale de COVID-19. L'âge, la surcharge pondérale ou l'obésité sont également des facteurs de risque de MVTE. Bien qu'un taux de dimère élevé soit utilisé comme marqueur prédictif de l'apparition des MVTE, cependant une étude n'a pas trouvé de corrélation entre ce taux et la gravité de l'infection [4]. Les complications veineuses associées à la maladie sont des thromboses telles que la thrombose veineuse profonde (TVP) des membres inférieurs et des embolies pulmonaires (EP) mais également des thromboses artérielles et des thromboses micro-vasculaires. L'échographie Doppler permet de mettre en évidence cette atteinte veineuse[4], [23].

III. 4. 3. Au niveau tube digestif

Du fait de la forte expression de l'ACE2 au niveau du tube digestif, le virus peut être détecté dans le tube digestif. Les matières fécales sont plus indiquées pour suivre l'infection que les écouvillonnages nasaux car le virus est longuement détecté dans les selles [4].

III. 4. 4. Au niveau hépatique

Le SARS-CoV-2 peut infecter les hépatocytes car des taux anormaux d'enzymes hépatiques ont été rapportés chez les cas de COVID-19. Des taux élevés de bilirubines et des aminotransférases ont été rapportés chez les cas sévères de COVID-19 [1]. Des cas d'hépatomégalies , œdématisées et infiltrées par des cellules inflammatoires ont été rapportés [1], [4].

III. 4. 5. Au niveau des neurones ou neuro-invasion

Le SARS-CoV-2 possède également une affinité pour les neurones. Des tissus cérébraux hyperémiques et œdémateux ont été rapportés. Le mécanisme expliquant serait le ralentissement de la circulation sanguine au niveau cérébral dû à l'état hypercoagulable dans la microvascularisation facilitant les interactions de la protéine de pointe de SARS-CoV-2 avec l'endothélium capillaire. L'endothélium capillaire possède des récepteurs ACE-2 qui permettent aux particules de virion de traverser la muqueuse endothéliale méningée pour pénétrer dans le cerveau. Dans le cerveau, les particules de virion interagissent ensuite avec le récepteur ACE-2 exprimant les cellules de la névroglie pour initier le cycle de dissémination virale qui cause des dommages neuronaux. Le virus peut aussi pénétrer dans le cerveau par la voie olfactive[1].

Pour autant, il a été rapporté que le tropisme neurologique éventuel de SARS-CoV-2 serait responsable de l'anosmie/agueusie, d'une atteinte neuromusculaire, ainsi que d'une atteinte du centre respiratoire médullaire favorisant les détresses respiratoires aiguës [4], [22]

III. 4. 6. Au niveau rénal

Le SARS-CoV-2 peut infecter les cellules rénales du fait de l'expression de L'ACE2 dans tous les segments tubulaires (par le glomérule). Les paramètres rénaux modifiés incluent la protéinurie, l'hématurie etc.. Le virus peut infecter les podocytes et les cellules épithéliales tubulaires causant plus de dommages au rein[1].

Une insuffisance rénale aiguë est fréquemment rapportée (5 à 20 % des patients infectés) et constitue un facteur de risque indépendant de mortalité. Le mécanisme d'entrée du virus au sein du parenchyme rénal n'est toutefois pas totalement élucidé, puisque l'entrée du virus nécessite, outre la présence d'ACE-2, une protéase TMPRSS2, qui est uniquement faiblement détectable dans la portion S3 du tubule proximal chez la souris [4].

III. 4. 7. Au niveau cardiaque

L'atteinte cardiaque est l'une des facteurs majeurs de mortalité lors de l'infection par le SARS-CoV-2. On peut observer des arythmies, des infarctus du myocarde et des lésions du myocarde. Certains bio-marqueurs sont augmentés en cas d'atteintes cardiaque tels que la troponine plasmatique, et le peptide natriurétique cérébral de la prohormone N-terminale. Ces paramètres étaient augmentés chez les patients atteints de COVID-19 en phase terminale par rapport aux survivants [1]. La figure 3 illustre les dysfonctionnements causés par le virus au niveau de plusieurs organes y compris le cœur[1].

Des études cliniques ont montré que l'insuffisance cardiaque concernait 7 à 20 % des patients COVID-19 [4].

III. 4. 8. Au niveau des cellules endothéliales

Toutes cellules exprimant l'ACE-2 peuvent être touchées par le SARS-CoV-2. Des cas d'atteinte endothéliales ont été rapporté en cas de COVID-19 au niveau de plusieurs organes (les poumons, le cœur, les reins, le foie, et l'intestin grêle) [4].

III. 4. 9. Impact sur la glycémie

Il a été démontré que l'ACE-2 est un important régulateur de la glycémie en améliorant la tolérance au glucose et en favorisant la sécrétion d'insuline. La diminution de l'expression de l'ACE2 induit par le SARS-CoV-2 pourrait donc, aussi, conduire à une dérégulation glycémique. L'utilisation de l'ACE-2 par le virus peut donc conduire à une hyperglycémie. L'hyperglycémie était un facteur indépendant prédictif de morbidité et de mortalité chez les patients infectés par le SARS-CoV-1, qu'ils aient un diabète préexistant ou non [4].

III. 4. 10. Autres atteintes

Cutanée : des atteintes cutanées telles que les érythèmes, vésiculaires, urticaire, macules violacées, livedo, purpura, engelures, angiome ont été rapportées. Elles pourraient être secondaires à la réponse inflammatoire dérégulée comme à l'état d'hypercoagulabilité.

Ophtalmologique : la voie olfactive serait une possible voie de contamination de SARS-CoV-2. Des signes inflammatoires tels que les conjonctivites, kératites ont été rapportés [4].

La COVID-19 est donc une maladie complexe, qui fait intervenir des phases virale, inflammatoire et thrombotique. La meilleure compréhension de chacune d'elles est fondamentale, puisqu'elle permettra de mieux les distinguer en pratique clinique, et de choisir la thérapeutique la plus adaptée à la situation. Pour autant, connaître les mécanismes

physiopathologiques ne se substitue pas à la réalisation d'essais cliniques, qui restent indispensables pour assurer aux patients une prise en charge optimale.

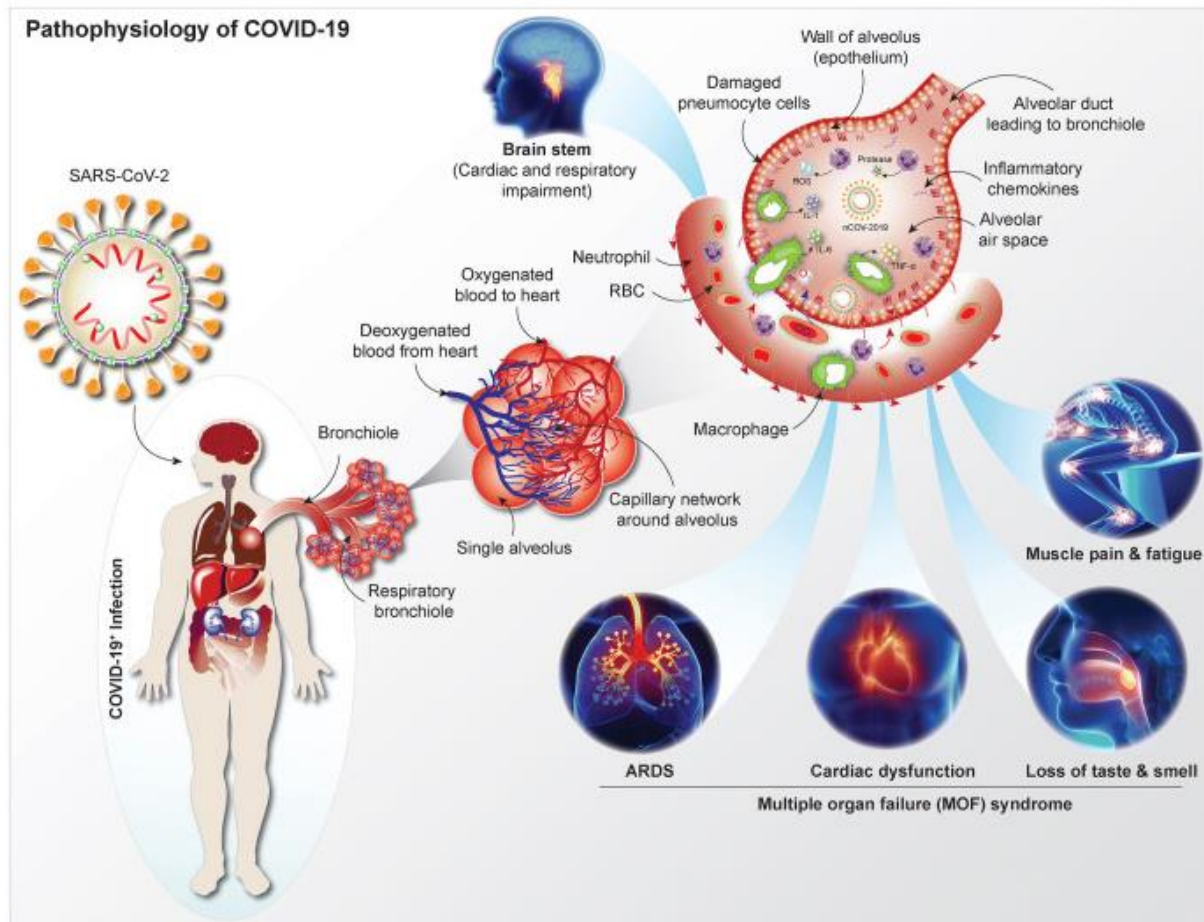


Figure 3: Physiopathologies du COVID-19

Traduction : respiratory bronchiole= bronchiole respiratoire ; single alveolus= alvéole unique ; capillary network around alveolus= réseau capillaire autour des alvéoles ; bronchiole= bronchiole ; deoxygenated blood from heart= sang désoxygénée provenant du cœur ; macrophage= macrophage ; damaged pneumocyte cells= cellules pneumocyte endommagée ; wall of alveolus (epithelium)= paroi de l'alvéole (épithélium) ; inflammatory chemokines= chimiokines inflammatoires ; alveolar air space= espace aérien alvéolaire ; muscle pain and fatigue= douleur musculaire et fatigue ; loss of taste and smell= perte de goût et de l'odorat ; cardiac dysfunction= dysfonction cardiaque[1]

III. 5. Clinique

Les manifestations cliniques du COVID-19 sont variables d'un individu à l'autre allant du simple rhume aux Syndromes des détresses respiratoires aigus sévères (SDRAS). Les données initiales montraient une prévalence élevée des personnes ayant une comorbidité (diabète, hypertension...) telles que les personnes âgées avec une population juvénile moins représentée. L'apparition des variants et les campagnes de vaccination des personnes vulnérables, la maladie se manifeste gravement aussi bien chez les jeunes que chez les personnes âgées. Les manifestations cliniques du COVID-19 se produisent entre 2-14 jours après l'infection (temps d'incubation). Les signes fréquents sont la fièvre, myalgie, maux de tête, toux, maux de gorge, anosmie et agueusie[24]. Les deux derniers sont considérés comme des signes de certitude de l'infection bien avant d'effectuer le test[22]. Les signes cliniques sont les résultats de l'évolution de l'infection dans plusieurs parties de l'organisme

III. 5. 1. Manifestations pulmonaires

La gravité de la COVID-19 est l'apparition du SDRA dans les huit (8) jours après l'infection, par la difficulté à respirer secondaire à la tempête cytokinique due à l'hyper-inflammation provoquée par la forte mobilisation des cellules immunitaires. Les cytokines endommagent les tissus pulmonaires entraînant une hypoxémie par manque d'oxygène traversant les alvéoles vers le sang. Les personnes ayant des comorbidités sont plus exposées au risque de développer des SRASs et sont les plus à risque de décès (40%) [2], [23]

III. 5. 2. Manifestations neurologiques

Les principales manifestations neurologiques de la COVID-19 vont des symptômes cognitifs aux symptômes cérébrovasculaires notamment : des étourdissements, maux de tête, anosmie, agueusie, les maladies cérébrovasculaires aiguës, des troubles de la conscience et du squelette, blessure musculaire, anxiété, maux de tête, étourdissements, confusion, ataxie, syndrome de Guillain-Barré (SGB), méningo-encéphalite, vaisseau ischémique aigu et accidents vasculaires cérébraux hémorragiques chez les jeunes ou personnes d'âge moyen[23].

III. 5. 3. Manifestations au niveau des vaisseaux sanguins : Maladie Veineuse Thromboembolique(MVTE)

Après le syndrome respiratoire aigu sévère, les thromboses sont les deuxième manifestations graves de la maladie. La COVID-19 peut toucher les vaisseaux entraînant une thrombose veineuse profonde (TVP) des membres inférieurs et une embolie pulmonaire (EP) mais

également une thrombose artérielle et une thrombose micro-vasculaire. Ces atteintes peuvent être diagnostiquées par l'échographie-Doppler veineux [25].

III. 5. 4. Manifestations cardiaques

Les complications cardiovasculaires chez les patients atteints de COVID-19 sont des facteurs majeurs de mortalité. Les atteintes cardiaques se manifestent par des arythmies, infarctus du myocarde et des lésions myocardiques. La forte sécrétion cytokinique serait un facteur de risque d'infarctus [23]

III. 5. 5. Manifestations hépatiques et du tractus gastro-intestinal

Des données considérables soutiennent l'idée que l'infection par le SARS-CoV-2 affecte généralement à la fois le tractus gastro-intestinal et le foie du fait de la présence de l'ACE-2 [1], [4]. Les manifestations cliniques rapportées sont les nausées, des vomissements, perte d'appétit, des douleurs abdominales et la diarrhée [23].

III. 5. 6. Manifestations rénales

Des perturbations des fonctions rénales ont été apportées lors de la COVID-19. Les atteintes rénales sont caractérisées par trois signes : la nécrose tubulaire aiguë chez les cas graves, une tubulopathie proximale et une hyalinose segmentaire plus focale chez les sujets prédisposés génétiquement [23], [26].

III. 5. 7. Manifestations oculaires

Plusieurs types d'atteintes oculaires ont été décrits. Ces atteintes sont classées comme faisant partie des coagulopathies associées à la maladie[26]. Les signes cliniques rencontrés sont la conjonctivite, y compris hyperhémie conjonctivale, chémosis, épiphora ou une augmentation des sécrétions chez des cas suspects [23].

III. 5. 8. Manifestations cutanées

Les atteintes cutanées sont peu fréquentes en cas de COVID-19. Les manifestations cliniques sont : rash érythémateux, rougeur, urticaire diffuse ou vésicule, éruptions érythématopapuleuses décrites comme un exanthème, éruption varicelle-like qui se différencie de la varicelle par l'absence de prurit, cicatrices et atteintes des muqueuses [23], [27].

III. 6. Diagnostic

Trois types de tests sont utilisés pour le diagnostic de la COVID-19 à savoir la PCR, les tests antigéniques et les tests sérologiques. A ces tests s'ajoute le séquençage pour le diagnostic profond du germe permettant de suivre l'évolution du virus[2].

III. 6. 1. PCR à temps réel ou qPCR (PCR quantitative)

Le test de référence de dépistage de SARS-CoV-2 repose sur la détection de l'ARN viral par qPCR sur les prélèvements rhinopharyngés dont les performances seraient meilleures que sur prélèvements oropharyngés. La qPCR sur prélèvement salivaire peut être envisagée dans certaines conditions. Le virus a également été détecté dans divers échantillons cliniques, tels que le liquide de lavage broncho-alvéolaire, les expectorations, les prélèvements nasaux, les échantillons de biopsie à la brosse de fibrobronchoscope, les prélèvements pharyngés, les matières fécales, l'urine et le sang. Avec les prélèvements rhino-pharyngés la qPCR a une sensibilité élevée dans la première semaine de l'infection dès le début de l'apparition des symptômes [2], [28].

III. 6. 1. 1. Prélèvement

- Installer le patient sur la chaise, dos contre le dossier du siège, inclinaison de la tête en arrière
- Soulever la pointe du nez pour dégager l'orifice narinaire ;
- Tenir l'écouvillon par l'extrémité distale de la tige et insérer perpendiculairement au plan de la face sans toucher l'orifice narinaire ;
- Tourner l'écouvillon avant le retrait ;
- Décharger l'écouvillon dans le milieu de transport [28].

III. 6. 1. 2. Avantages

La qPCR est une technique de sensibilité et de spécificité élevées.

III. 6. 1. 3. Inconvénients

Le temps d'exécution est trop long (24h). Elle présente des limites importantes du point de vue clinique, car elle ne précise aucune clarté quant à la progression de la maladie contrairement à d'autres tests tels sérologiques [28].

Une autre technique d'amplification utilisée pour le diagnostic est la RT-LAMP

III. 6. 1. 4. RT-Lamp

C'est une technique développée par Notomi et collaborateurs en 2000. C'est une approche moléculaire ciblant le gène *RdRp*. Elle a été validée par la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis permettant d'obtenir des premiers résultats en cinq minutes en cas de positivité et un résultat final en 13 minutes pour les négatifs (ID NOW™ Covid-19) [28]. Technique de sensibilité identique à la qPCR mais avec une spécificité inférieure à celle de la PCR. La RT-LAMP a une spécificité supérieure à la sérologie. Cette technique ne peut être recommandée pour le dépistage car plusieurs évaluations ont mis en évidence une sensibilité insuffisante de l'ordre de 70 % et des cas de faux négatifs[2], [28].

III. 6. 2. Tests antigéniques

Les tests antigéniques détectent les protéines spécifiques de SARS-CoV-2. Ces tests peuvent être réalisés sur des prélèvements nasopharyngés, des prélèvements des voies respiratoires basses. Comme les tests de qPCR, ils assurent le diagnostic précoce de la maladie dès la phase aiguë. Leurs faibles performances en cas de charge virale basse limitent leurs recommandations en usage clinique[28]–[30].

Comme les tests de détection des acides nucléiques (TAAN), les TDR sont plus performants après cinq (5) jours du début de l'infection au moment de l'apparition des symptômes[30].

III. 6. 2. 1. Avantages

Leur principal avantage est le délai de rendu de résultats de l'ordre de quelques minutes (10-15min). Elles permettent une détection plus rapide des patients en cas de charge virale élevée

III. 6. 2. 2. Inconvénients

Ils sont moins sensibles en cas de charge virale faible. Ils ont une sensibilité de moins de 70% Les tests de détection d'antigènes ont une sensibilité inférieure à celle des TAAN [28]–[30].

III. 6. 3. Tests sérologiques

Les tests sérologiques permettent la détection des anticorps (Ac) spécifiques IgG et IgM produits par l'organisme et dirigés contre le SARS-CoV-2. Ces tests se font sur des prélèvements sanguins et pourraient être utilisés pour identifier les patients ayant développé une immunité vis-à-vis de SARS-CoV-2 qu'ils aient été symptomatiques ou pas [28], [29]. Ces tests sont plus performants sept (7) jours après l'infection [28], [29].

III. 6. 3. 1. Avantages

Ces tests peuvent être très utiles pour savoir si les patients ont été ou pas infectés par le SARS-CoV-2 et pour connaître le statut sérologique de personnes exposées (professionnels de santé par exemple). Enfin, ces tests pourraient également avoir une utilité dans le recueil des données épidémiologiques liées à la COVID-19. L'association de ces tests à la qPCR fera un diagnostic complet de l'infection.

Ils peuvent fournir des informations sur l'évolution clinique de la maladie. Les anticorps de type IgM apparaissent à partir de J7 et les anticorps de type IgG à compter de J10 [28], [29].

III. 6. 3. 2. Inconvénients

Ils ont une sensibilité limitée car les anticorps ne sont détectés qu'à un stade tardif de l'infection. Test non exhaustif comme test de diagnostic car un résultat positif au test sérologique indique seulement une infection antérieure, et un test négatif pour les anticorps ne peut exclure une infection active par le SARS-CoV-2 [28], [29]

III. 6. 4. Séquençage

Par définition le séquençage permet de déterminer l'ordre de succession des acides nucléiques constituant une séquence nucléotidique d'ADN ou d'ARN. Avec l'avancée technologique dans ce domaine associée aux outils bio-informatiques le génome complet du virus a été identifié juste après la détection des premiers cas. Ces techniques permettent de détecter de nouveaux variants du virus au fur à mesure de leur évolution[2].

En plus d'autres techniques telles que le scanner, la tomodensitométrie, l'échographie Doppler etc. sont également utilisées pour suivre certaines complications de la maladie [2]

III. 7. Traitement

La COVID-19 est une infection respiratoire pouvant aboutir aux syndromes de détresse respiratoire aiguë sévère (5-20% des patients) principale complication de la maladie sur un terrain fragile (comorbidité, personnes âgées). La majorité des personnes (80%) contractant la maladie guérissent sans souvent présenter des signes cliniques et donc sans aucun recours aux moyens thérapeutiques[31].

Actuellement, le traitement principal des patients sévèrement atteints de SARS-CoV-2 admis dans les hôpitaux comprend la ventilation mécanique, l'admission en unité de soins intensifs (USI), les thérapies symptomatiques et de soutien[32].

Les agents thérapeutiques qui ont une activité anti-SARS-CoV-2 peuvent être globalement classés en trois catégories: les médicaments qui bloquent l'entrée du virus dans la cellule hôte, les médicaments qui bloquent la réplication virale ainsi que sa survie dans la cellule hôte et les médicaments qui atténuent les effets secondaires de la réaction du système immunitaire. Certains de ces médicaments ont été utilisés dans les épidémies précédentes de coronavirus ou dans d'autres infections grippales[2].

III. 7. 1. Inhibiteurs d'entrée dans la cellule hôte

La première stratégie vise à empêcher le virus de pénétrer dans la cellule en jouant sur les mécanismes nécessaires à la fixation du virus à son récepteur ou la fusion membranaire empêchant son endocytose. A ce niveau plusieurs médicaments ont été testés (Tableau I)[2], [24], [33]

Tableau I : Les inhibiteurs de liaison ACE-2-proteine spike

Inhibiteurs de liaison à l'ACE-2		
Médicaments	Mécanismes d'actions	Efficacité
Umifenovir (Arbidol) : utilisé contre le Virus influenza A et B et le Virus Ebola	Inhibition de la fusion du virus avec la membrane cellulaire en d'autres termes Inhibition de la trimérisation de la glycoprotéine virale spike	efficace dans la gestion de la pneumonie au COVID-19
Chlorpromazine : neuroleptique découvert en 1951	Inhibition clathrine-dépendante de l'endocytose virale. Un essai est en cours pour déterminer son intérêt clinique potentiel.	Efficace <i>in vitro</i> sur SRAS-CoV-1 et sur MERS-CoV.
Chloroquine et hydroxy-chloroquine : deux médicaments utilisés dans le paludisme et dans les rhumatismes	leurs mécanismes d'action restent incomplètement élucidés, il a été montré que ces molécules s'accumulent dans les endosomes et lysosomes et augmentent le pH dans ces organelles, altérant ainsi leur fonctionnement essentiel pour l'endocytose des coronavirus. Par ailleurs, des données <i>in vitro</i> suggèrent que la chloroquine modifie la glycosylation d'ACE2 et inhibe ainsi la fixation du SRAS-CoV-1	Des études récentes n'ont trouvés aucune efficacité de ces deux molécules que ça soit dans la prophylaxie (pré ou post exposition), l'évolution clinique ou dans la réduction de la mortalité au virus bien que des données initiaux

		avaient montré une efficacité de ces molécules. De plus leur toxicité cardiaque par un allongement de l'intervalle QTC limite leur utilisation.
--	--	---

Une autre stratégie pour bloquer l'entrée dans la cellule est de cibler les protéases virales indispensables à la réplication. Les protéases permettent d'amorcer la forme du virus de façon à faciliter l'endocytose. Certains médicaments ce sont montrés efficace sur cette étape du cycle d'évolution du virus.

Tableau II: Inhibition de la protéase du SARS-CoV-2

Inhibiteurs de protéase		
Médicaments	Mécanismes d'action	Efficacité
Lopinavir/ritonavir : anti protéase VIH	Inhibiteur de protéase	développés contre la protéase du VIH, des données ont montré une certaine efficacité <i>in vitro</i> contre le SRAS-CoV-1 et le SARS-CoV-2. Ce pendant <i>in vivo</i> un essai prospectif randomisé ouvert incluant 199 patients n'a pas retrouvé d'efficacité clinique ni de différence sur la clairance virale
Darunavir	Inhibiteur de protéase	fait l'objet de plusieurs essais cliniques

Mésylate de Camostat	inhibiteur de TMPRSS2	Efficace <i>in vitro</i> , la molécule fait l'objet de plusieurs essais cliniques[16].
----------------------	-----------------------	--

III. 7. 2. Inhibiteurs de réplication

Bloquer le cycle d'évolution du virus par l'inhibition de la synthèse du matériel génomique a été utilisée avec succès pour le traitement de nombreux virus. La plupart de ces médicaments ciblent les protéines accessoires du virus. Dans le cas de SARS-CoV-2, plusieurs molécules se repositionnent comme des candidats prometteurs [2], [24], [33]

Tableau III: Inhibiteurs de réplication

Inhibiteurs de réplication		
Médicaments	Mécanismes d'action	Efficacité
Remdesivir: utilisé lors de l'épidémie d'Ebola et sur autres coronavirus	inhibe l'ARN polymérase virale (nsp12)	inhibe la réplication du SRAS-CoV-1 dans un modèle murin et de SARS-CoV-2 <i>in vitro</i> . Les essais cliniques dans la COVID-19 ne permettent pas de conclure l'efficacité.
Favipiravir: actif sur le virus de la grippe et divers autres virus	inhibe l'ARN polymérase virale	actif <i>in vitro</i> contre le SARS-CoV-2
Ribavirine: un analogue de la guanine utilisé contre le virus syncytial respiratoire et le virus de l'hépatite C	inhibe l'ARN-polymérase de nombreux virus à ARN	efficacité <i>in vitro</i> limitée contre le SARS-CoV-2

c-phycoyanine de spiruline plantesis	Inhibe l'ARN polymérase de SARS-CoV-2 (nsp12) : inhibition de la formation de plaques virales et ainsi réduit la réplication virale dans les cultures cellulaires,	Efficace sur SARS-CoV-2 : <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> dans les modèles murins[34]
Ivermectine: antiparasitaire		Efficace <i>in vitro</i>
Loperamide		

III. 7. 3. Autres stratégies antivirales

D'autres molécules sont aussi utilisées dans la lutte antivirale pouvant corriger certaines manifestations secondaires de la maladie ou utilisées souvent comme alternative de traitement [2], [24], [33]

Tableau IV : Traitements symptomatiques

Médicaments adjuvants		
Interférons de type I (INF-I): les INF-I sont des cytokines au rôle majeur dans la réponse immunitaire antivirale : Interféron alpha-2b, Interféron bêta-1b	Effet direct sur la perméabilité cellulaire à l'infection virale et stimulation de l'immunité	Ils inhibent la réplication du SRAS-CoV-1 et du MERS-CoV <i>in vitro</i> , particulièrement l'INF- β , en synergie avec d'autres traitements comme le lopinavir/ritonavir

Glucocorticoïdes (dexaméthasone, hydrocortisone) : Anti-inflammatoire et antihistaminique	Atténuent les effets de la forte mobilisation des cellules immunitaire de l'hôte contre le virus	Inhibe les tempêtes cytokiniques
Administration du plasma des patients convalescents contenant des anticorps		Aucune efficacité

Force est de reconnaître, cependant, que, malgré certains résultats préliminaires qui ont suscité quelques espoirs tels qu'avec le remdesivir, mesylate de camostat et d'autres médicaments, le bilan final s'avère décevant et ce, quel que soit le stade de la maladie. Seuls les traitements symptomatiques incluant tels les glucocorticoïdes, les anticoagulants, ont montré une réduction de la mortalité chez les patients hospitalisés.

le 1^{er} Avril 2020 le ministère de la santé du Mali a autorisé l'utilisation de la chloroquine dans le traitement de la COVID-19 en association avec les traitements symptomatiques (corticoïdes, antalgique, vitamine c...).

III. 8. Prophylaxie

La prophylaxie médicamenteuse avait été essayée avec certains médicaments tels que l'hydroxy-chloroquine associé ou non. Cette molécule avait été suggérée dans la prise en charge et dans la prophylaxie (pré ou post-exposition) de la COVID-19 mais des études n'ont montré aucun bénéfice de la dite molécule dans la prévention de l'infection[35]. D'autres essais sont également en cours pour prévenir l'infection, pour l'instant la meilleure alternative est de respecter les mesures de santé publique qui sont déterminantes pour ralentir la propagation du virus comme ce fut le cas avec d'autres infections respiratoires et de se faire vacciner[34].

La prévention efficace de COVID-19 demande l'effort et la contribution de chaque individu de la communauté et également du gouvernement dans la prise de décision.

III. 8. 1. Protection individuelle

Cette partie implique l'effort de chaque individu pour se protéger et protéger les autres en adoptant des comportements appropriés pour lutter contre la pandémie. Ces comportements englobent le respect des mesures suivantes :

- Le respect de la mesure de distanciation sociale (1- 2 m) ;
- Porter un masque facial ;
- Rester chez soi quand on est malade ;
- Se couvrir la bouche et le nez avec le pli du coude ou un mouchoir en cas de toux ou d'éternuement, puis de jeter immédiatement le mouchoir usagé ;
- Se laver fréquemment les mains avec de l'eau et du savon ou appliquer un gel désinfectant ;
- Nettoyer fréquemment les surfaces et les objets que l'on touche ;
- Eviter des rassemblements de plus de cinquante personnes (50) ;
- Se faire vacciner (alternative prophylactique très efficace).

III. 8. 2. Protection collective

Ceci concerne les autorités publiques ou décideurs de prendre des actions comme

- La distribution communautaire des masques faciaux ;
- Fermeture des frontières, des lieux de loisirs et de cultes ;
- des confinements ;
- Mise en place d'une équipe de contrôle du respect des mesures de distanciation et du port des masques dans les lieux de rassemblements (mariage, funérailles, baptême...) ou dans la communauté ;
- Le gouvernement doit assurer l'éducation communautaire sur les actions à entreprendre en cas de positivité ou contact d'un membre avec une personne déclarée positive à la maladie ;
- Des couvre-feux ;
- Collaborer avec les entreprises privées pouvant fournir l'expertise et l'innovation nécessaires pour renforcer et soutenir la riposte, notamment à travers la production et la distribution

équitable de tests diagnostiques de laboratoire, d'équipements de protection individuelle, de respirateurs, d'oxygène médical et d'autres équipements médicaux essentiels à des prix justes;

-Disponibilité de vaccins pour tous ;

-Recherche de médicaments efficaces en collaboration avec les organismes de recherche[36], [37].

III. 8. 3. Vaccins anti-COVID-19

Un vaccin COVID-19 est un vaccin destiné à conférer une immunité acquise contre le SARS-CoV-2, le virus causant la COVID-19. Le développement normal d'un vaccin prend des années. Ce pendant la disponibilité rapide des vaccins contre la COVID-19 a été facilité par la disponibilité des connaissances antérieures sur les coronavirus SRAS-CoV-1 de la Chine de 2002-2003 et du MERS-CoV de 2013 du Moyen Orient et également grâce aux avancées technologiques de séquençages combinées à la bio-informatique. Depuis lors l'industrie pharmaceutique mondiale a annoncé un engagement majeur pour lutter contre la COVID-19[38].

La première campagne de vaccination ciblait en premier lieu les personnes les plus à risques de complication telles les personnes âgées, les personnes avec des comorbidités et les personnes à haut risque d'exposition et de transmission avec en tête les personnels sanitaires.

En mars 2021, 308 candidats vaccins étaient à différents stades de développement, dont 73 en recherche clinique, dont vingt-quatre (24) en essais de phase I, trente-trois (33) en essais de phase I-II et seize (16) en développement de phase III[38].

La majorité des vaccins COVID appartient à quatre (4) types

III. 8. 3. 1. Vaccins à ARN

Les vaccins à ARN contiennent de l'ARN se comportant comme de l'ARNm qui lorsqu'introduit dans un tissu est traduit en une protéine étrangère pouvant stimuler le système immunitaire à engager les cellules de l'immunité acquise comme si c'était lors d'une vraie infection. L'organisme garde en mémoire les réponses de cette riposte qui seront utiles pour identifier et détruire le pathogène en cas d'infection naturelle.

Parmi ces vaccins nous avons le vaccin Pfizer-BioNtech-COVID-19, le vaccin Moderna COVID-19 et le vaccin ARN CVnCoV de curevac[38]–[40].

III. 8. 3. 2. Vaccins à vecteurs adénovirus

Ces vaccins sont des exemples de vecteurs viraux non répliatifs, utilisant une enveloppe d'adénovirus contenant de l'ADN qui code pour une protéine de SARS-CoV-2. Les vaccins à base de vecteurs viraux contre COVID-19 ne se répliquent pas, ce qui signifie qu'ils ne produisent pas de nouvelles particules virales, mais produisent plutôt seulement l'antigène qui déclenche une réponse immunitaire systémique.

Parmi ces vaccins nous pouvons citer: vaccin britannique Oxford-Astra Zeneca COVID-19, le vaccin russe Sputnik V, le vaccin chinois Convidicea et le vaccin Johnson & Johnson COVID-19.

Les vaccins Convidicea et Johnson & Johnson sont tous deux des vaccins à injection unique qui offrent une logistique moins compliquée; et peuvent être stockés sous réfrigération ordinaire pendant plusieurs mois[38], [41]–[43].

III. 8. 3. 3. Vaccins viraux inactivés

Les vaccins viraux inactivés sont des vaccins obtenus à partir de virus vivant inactivés par des méthodes mécaniques (telle la chaleur) ou par des méthodes chimiques (par exemple par le formaldéhyde) après une longue phase d'étude *in vitro* (culture cellulaire). Parmi ces types nous avons le vaccin chinois CoronaVac, le BBIBP-CorV, le Covaxin indien, le CoviVac et le vaccin Valneva COVID-19.

III. 8. 3. 4. Vaccins sous-unitaires

Les vaccins sous-unitaires présentent un ou plusieurs antigènes sans introduire de particules pathogènes entières. Les antigènes impliqués sont souvent des sous-unités protéiques, mais peuvent être n'importe quelle molécule qui est un fragment du pathogène.

Parmi ces types nous pouvons citer : vaccin peptidique EpiVacCorona (seul du type autorisé), le vaccin Novavax COVID-19 et le RBD-Dimer.

III. 8. 3. 5. Autres types de vaccins

D'autres types de vaccins faisant l'objet d'essais cliniques comprennent plusieurs vaccins à ADN plasmidique : au moins deux vaccins vecteurs de lentivirus, un vaccin conjugué, et un virus de la stomatite vésiculaire présentant la protéine de pointe SARS-CoV-2.

En termes d'efficacité, une efficacité vaccinale de 67% peut suffire à ralentir le SARS-CoV-2[38]. Avec l'émergence des variants on constate une diminution de l'efficacité de certains

vaccins sur certains variants comme le vaccin AZD1222® (AstraZeneca) sur le variant Beta (B.1.351) mais néanmoins la plupart de ces vaccins confèrent une protection contre les variants. Les vaccins Moderna, Pfizer et Johnson-Johnson restent efficaces sur les variants Alpha et Beta. La durée de protection de ces vaccins sont encore imprécises et sont en cours d'évaluation. Il faut rappeler qu'aucun vaccin n'est efficace à 100% donc il est possible de contracter, de transmettre et de présenter la maladie après être vacciné [39], [41], [42], [44], [45].

Pour empêcher les infections légères ou modérées, le vaccin Moderna a montré une efficacité de 94% (89-97%) aux Etats-Unis, Pfizer 95% (90-98%) dans plusieurs pays, Oxford/AstraZeneca 81% (60-91%). La majorité de ces vaccins ont une efficacité aux alentours de 100% pour empêcher les formes graves [38].

En termes d'effets secondaires des réactions telles que: des douleurs au site d'injection, de la fatigue, des céphalées, les douleurs musculaires, des frissons, sont les effets secondaires les plus fréquemment rapportés avec les vaccins. D'autres effets sont également rapportés mais dans tous les cas le bénéfice emporte sur les risques [39]–[46].

III. 9. Variants SARS-CoV-2

Les variants sont des sous-types de virus ayant subi une ou des mutations dans la séquence nucléotidique de leur génome comparé par rapport à la souche initiale. Ces mutations peuvent être silencieuses ou entraîner un remplacement, une insertion ou une délétion d'un ou plusieurs acides aminés dans les protéines virales. Ces mutations sont considérées lorsqu'elles altèrent les fonctions des principales protéines impliquées dans l'infection. Le SARS-CoV-2 a une forte capacité de mutation [44].

Les variants sont identifiés par comparaisons de leurs génomes avec celui de la souche initiale du virus détectée en Wuhan en décembre 2019. Ils se distinguent de celle-ci par plusieurs mutations dans le génome leur conférant d'autres caractères (par exemple une plus grande transmissibilité).

Une lignée ou clade (un ensemble de virus descendants d'une même souche virale ancestrale) de SARS-CoV-2 est porteur de plusieurs mutations [47]. Il existe beaucoup de polymorphismes d'acides aminés connus dans la variation du COVID-19 mais cependant certains ont attiré l'attention telle qu'E484K, N501, K417N, D614G. La mutation D614G a été associée à une diminution de l'efficacité des vaccins, une forte stimulation immunitaire de l'hôte et de la contagiosité du virus [44], [48].

L'OMS distingue trois catégories de variants avec un quatrième jamais encore détecté :

III. 9. 1. Variants préoccupants ou VOC (« variant of concern » en anglais)

Sont des variants pour lesquels il a été démontré en comparant avec un ou plusieurs virus de référence une augmentation de la transmissibilité ou un impact défavorable sur l'épidémiologie du COVID-19 ; une augmentation de la gravité ou un changement de présentation clinique ou une diminution de l'efficacité des mesures de contrôle mises en place (mesures de prévention, tests diagnostiques, vaccins, molécules thérapeutiques) [44]. Cinq (5) de ces variants sont identifiés et font l'objet d'une surveillance rehaussée[49].

III. 9. 1. 1. Variant alpha ou lignée B.1.1.7

Identifié le 20 septembre 2020 et signalé à l'OMS le 14 décembre 2020 par les autorités britanniques un nouveau variant de SARS-CoV-2 dénommé VOC 202012/01 pour « Variant Of Concern, year 2020, month 12, variant 01 ». Il est caractérisé par 24 mutations dans son génome. Le variant B.1.1.7 serait de 1,4 à 1,8 fois plus transmissible et de 1,1 à 1,7 fois plus virulent (risque d'hospitalisation ou de décès) que les variants communs. Il pourrait causer des infections d'une durée plus longue et serait associé à une charge virale plus élevée dans les voies respiratoires supérieures, ce qui pourrait contribuer à sa transmissibilité accrue. Cependant il n'apporte aucun changement dans les manifestations cliniques de la COVID-19 ni à la probabilité de réinfection comparé aux variants communs. A ce jour les vaccins et traitements par anticorps monoclonaux validés demeurent efficaces sur ce sous type [44], [48], [50]–[52].

Les mutations caractéristiques sur la protéine de spicule associées à ce variant sont la position N501Y et D614G (première mutation préoccupante décrite à partir de la souche initiale) avec la possibilité d'augmenter la propagation, la contagiosité, la virulence, la détection par PCR [48].

Ce variant a été notifié dans 172 pays [53].

III. 9. 1. 2. Variant beta ou 501.V2, 20C/501Y.V2 de lignée B.1.351

Détecté pour la première fois le 18 décembre 2020 par les autorités nationales sud-africaines un nouveau variant de SARS-CoV-2 nommé 501.V2,20C/501Y.V2 ou lignée B.1.351 se propageant rapidement dans trois provinces sud-africaines. Le variant B.1.351 serait 1,5 fois plus transmissible que les variants communs. Il a été associé à une augmentation de la létalité dans le dit pays. Ce variant a été associé à une diminution de l'efficacité de vaccins (tel que

celui d'AstraZeneca/Oxford), des traitements par des anticorps, de la sensibilité des tests de diagnostics. Les mutations portées par le variant B.1.351 n'affectent pas la performance des TAAN pour le dépistage de SARS-CoV-2 car la délétion 69-70 ne se retrouve pas dans ce variant. Au Québec, la mutation N501Y est la seule cible des tests de criblage utilisés pour détecter les cas présumptifs du variant B.1.351 dans les échantillons positifs pour le SARS-CoV-2. Éventuellement, une deuxième cible, la mutation E484K, serait ajoutée pour certains laboratoires. Ainsi ce variant doit être surveillé dans l'intérêt commun de vaincre le virus car ceci est un phénomène pouvant anéantir les efforts vaccinaux de la maladie. Les mutations impliquées sont K417N, E484K, N501Y, D614G avec la possibilité de lui conférer des caractères telles qu'une propagation rapide, une contagiosité élevée et une évasion immunitaire [44], [48], [50]–[52]. Ce variant a été notifié dans 120 pays.

III. 9. 1. 3. Variant gamma de lignée P.1

Le variant P.1 fait partie de la lignée B.1.1.28 détectée le 5 mars 2020 au Brésil par l'institut Adolfo Lutz. Le variant P.1 a été détecté pour la première fois en décembre 2020 dans la région de Manaus au Brésil mais notifié à l'OMS le 09 janvier 2021. Ce variant est porteur de trente-cinq (35) mutations avec trois mutations préoccupantes dans le RBD (receptor binding domain) de la protéine *spike* : K417N/T, E484K et N501Y.

Le variant P.1 serait de 1,8 à 2,5 fois plus transmissible et de 1,1 à 1,8 fois plus virulent (risque de décès) que les variants communs. Il serait associé à des infections avec une plus haute charge virale comparé à celles causées par les variants communs. Un faible risque de réinfection a été estimé avec ce variant (6,4 %) pour les personnes qui ont déjà été infectées durant la première vague. Les études sur la transmission et les impacts de ce variant sur les manifestations cliniques, les hospitalisations, les décès, les réinfections et la vaccination sont limitées. En raison de mutations partagées avec le variant B.1.351, une diminution de l'efficacité des vaccins et traitements par anticorps monoclonaux est attendue pour le variant P.1. Les mutations retrouvées dans le variant P.1 n'affectent pas la performance des TAAN pour le dépistage de SARS-CoV-2. Des études sont en cours afin d'évaluer l'efficacité des vaccins contre le variant P.1. Toutefois, puisque ce variant possède les mêmes mutations que celles qui ont un impact sur les propriétés biologiques du variant B.1.351 (N501Y, E484K et K471T/N dans la protéine de spicule), une diminution de l'efficacité des anticorps neutralisant du plasma de convalescence ou de personnes vaccinées pour la COVID-19 est attendue. Il en est de même pour l'efficacité des anticorps monoclonaux retrouvés dans certains traitements contre la COVID-19.

Les mutations impliquées sont K417T/ E484K/ N501Y et D614G avec la possibilité de lui conférer des caractères telles qu'une Propagation rapide, une Contagiosité élevée et une Évasion immunitaire [44], [48], [50]–[52].

Ce variant a été notifié dans 72 pays [53].

Actuellement deux variants d'intérêt ont rejoint les trois variants ci-dessus ramenant la liste à cinq il s'agit :

III. 9. 1. 4. Variant delta ou lignée B.1.617.2 ou G / 452R. V3

Découvert pour la première fois en octobre 2020 en Inde, dans la région de Nagpur. L'OMS a classé ce variant parmi les préoccupants le 10 mai 2021 car il serait 40 à 60% plus contagieux que le variant alpha, qui est déjà lui-même beaucoup plus contagieux que la souche historique de SARS-CoV-2. Le variant Delta est caractérisé par plusieurs mutations tout au long de sa structure, mais dont les plus importantes sont situées sur la protéine S : L19R, une délétion à la position 157/158, L452R, T478K, toutes dans le domaine N-terminal ; et D950N dans le domaine de liaison au récepteur (RBD). La mutation L452K est recherchée dans les tests de dépistage. Elle est nécessaire pour confirmer la présence du variant Delta dans un échantillon.[54].

III. 9. 1. 5. Variant Omicron ou lignée B.1.1.529

Le variant Omicron de lignée B.1.1.529 a été signalé pour la première fois à l'OMS en Afrique du Sud le 24 novembre 2021. Il est porteur de soixante-deux (62) mutations sur son génome avec soixante-quinze pourcent (75%) sur les protéines structurales et vingt-cinq pourcent (25%) sur les protéines non structurales. Il est porteur de trente-six (36) mutations sur la protéine S. parmi ces mutations cinq peuvent augmentées son affinité avec le récepteur ACE2: N501Y, G339D, T478K, N440K et S477N

Trois mutations (H655Y, N699K, P681H) sur le site de clivage de la furine peuvent faciliter la pénétration cellulaire. Le pourcentage élevé des mutations sur les protéines structurales suggère que deux médicaments antiviraux (lagevrio et paxlovid) demeureront efficaces sur omicron du faite de leurs cibles sur les protéines non structurales [55].

En terme d'efficacité de neutralisation par des anticorps une étude a montré qu'une neutralisation puissante du variant omicron serait obtenue après plusieurs doses de vaccins

(Pfizer et Moderna). Les personnes ayant reçu plus de doses sont mieux protégées que les naïves d'infections[56]. Bien vrai que le variant Omicron soit connu par une forte transmissibilité que les variants précédents, cependant le virus semble moins virulent. Comme sur tous les autres variants les vaccins n'empêchent pas de contracter mais protègent contre les formes graves. L'efficacité des médicaments antiviraux nécessite encore plus de données[57].

III. 9. 1. 6. Variant epsilon

B.1.427 et B.1.429 qui ont émergé aux États-Unis sont désormais considérés comme VOC par les CDC américains en raison d'une transmissibilité supérieure à celle des virus de référence mais vraisemblablement inférieure à celle du variant alpha. Ils sont considérés actuellement comme VOI par l'OMS et l'ECDC[58].

III. 9. 2. Variants à suivre ou VOI (« variant Under investigation » ou « variant of interest » en anglais)

Sont des variants qui sont caractérisés par un changement phénotypique par rapport à un virus de référence, par des mutations qui conduisent à des changements en acides aminés associés à des implications phénotypiques confirmées ou suspectées et responsables d'une transmission communautaire ou de multiples cas confirmés ou clusters [44].

A ce jour ces variants sont VOI : Lambda et Mu, kappa, Iota, Eta [59]

Ces variants ont été associés à une réduction de l'efficacité des traitements par les anticorps monoclonaux, aux traitements par le sérum des convalescents et certains traitements médicamenteux[49].

III. 9. 3. « Variants en cours d'évaluation »

Ce sont des variants caractérisés par l'absence d'éléments virologiques, épidémiologiques ou cliniques probants en faveur d'un impact en santé publique, malgré la présence de mutations retrouvées chez un ou plusieurs variants d'intérêt/à suivre[44], [49].

III. 9. 4. Variants de haute conséquence

Un variant de haute conséquence a des preuves claires que les mesures de prévention ou les contre-mesures médicales (MCM) ont une efficacité considérablement réduite par rapport aux variants qui circulaient auparavant.

Attributs possibles d'un variant de grandes conséquences:

-Impact sur les contre-mesures médicales (MCM)

-Échec démontré des tests de diagnostics

-Données probantes suggérant une réduction significative de l'efficacité du vaccin, un nombre disproportionnellement élevé de cas de percée vaccinale ou une très faible protection induite par le vaccin contre une maladie grave

-Sensibilité considérablement réduite à plusieurs produits thérapeutiques approuvés

-Maladie clinique plus grave et hospitalisations accrues

Un variant de grande importance nécessiterait une notification à l'OMS en vertu du Règlement sanitaire international, une notification aux CDC, une annonce de stratégies pour prévenir ou contenir la transmission et des recommandations pour mettre à jour les traitements et les vaccins. Actuellement, il n'y a pas de variants de SARS-CoV-2 qui a atteint un niveau élevé de conséquence [49].

III. 10. Génomique

III. 10. 1. Définition

La génomique est l'étude exhaustive des génomes et en particulier de l'ensemble des gènes, de leur disposition sur les chromosomes, de leur séquence, de leur fonction et de leur rôle. Les génomes des organismes vivants ont des tailles considérables allant de quelque milliers à des milliards de nucléotides (3 milliards pour le génome humain)[60].

III. 10. 2. Historique

L'histoire de la génomique est liée à celle de la génétique débutée par les travaux de Gregor Mendel (moine hongrois 1822-1884) sur la transmission des caractères sur le petit pois. Suite à ces expériences, Mendel a établi trois lois expliquant le phénomène de la transmission des caractères : la loi d'uniformité des caractères à la première génération, la ségrégation des caractères et la loi d'association indépendante des caractères. Il présenta en 1865 ses travaux lors d'une conférence et a publié des articles. Mais néanmoins, ces travaux furent ignorés et non considérés qu'après certaines découvertes quelques années plus tard.

1901 : Découverte du phénomène de mutations par trois chercheurs (Hugo de Vries 1848-1935, Carl Correns 1864-1933, Erich Tschermak 1871-1962) pour expliquer l'apparition de

nouveaux caractères. Cette découverte fut d'un apport considérable pour expliquer et comprendre les lois de Mendel. Hugo explique que les mutations sont le principal mécanisme de l'évolution. Les découvertes combinées de Gregor Mendel (lois de l'hérédité) et d'Hugo furent des preuves pouvant expliquer la théorie Darwinienne de l'évolution : apparition (mutations) et transmission (hérédité) des variations au sein des individus d'une population. Selon cette théorie les espèces (animales et végétales) pour évoluer ont dû changer (mutations) ou s'adapter aux variations environnementales. La même année, Bateson publia une traduction anglaise de l'article de Mendel : « Experiments in plant hybridation date » ;

1915 : Morgan et ses élèves apportent l'explication que l'élément à la base de ces évolutions est localisé sur un chromosome (élément de la cellule constitué de macromolécules), support de caractère héréditaire (théorie chromosomique de l'hérédité) appelé gène. Le mot gène a été introduit en 1907 par Wilhelm Johannsen (1866-1945) pour désigner une unité mathématique de l'hérédité. La définition du mot gène s'est progressivement raffinée au cours du vingtième siècle avec les progrès des connaissances et le développement des approches expérimentales (génétique, biologie moléculaire, l'informatique...)

1957 : Découverte de la protéomique par Crick ;

1961 : Élucidation du code génétique détaillant les différentes étapes de la réplication ;

1965 : Holley et ses collaborateurs ont séquencé les deux premiers acides nucléiques de l'histoire : l'ARNt de l'alanine d'*Escherichia coli*, puis celui de la levure ;

1971 : Séquençage de la première molécule d'ADN. Ces premières séquences ont été obtenues à l'aide de réactions chimiques spécifiques, comme la dépurination. Ces méthodes permettaient d'obtenir des séquences de 10 à 20 nucléotides[37], [60]–[64] ;

Par la suite l'histoire de la génomique continue avec celles de la PCR et du séquençage.

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement ou de succession des nucléotides le composant. Cette technique subit toujours des améliorations avec l'apparition de nouveaux séquenceurs[65].

La PCR est une réaction (*in vitro*) enzymatique qui en présence des acteurs (ADN, les amorces, les desoxyribonucléotides (dntps), le tampon, la Taq-polymérase et l'eau) permet de sélectionner puis amplifier en une très grande quantité un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) particulier présent en très faible quantité au départ, parmi plusieurs fragments[66]

Les connaissances sur ces techniques sont récentes au regard de l'histoire de l'humanité mais néanmoins englobent des découvertes de plus d'un siècle dont les principales :

La découverte de l'ADN : isolé pour la première fois par le biochimiste Suisse Friedrich Miescher en 1871 dont il avait peu d'information sur la dite substance mais il réussit à démontrer qu'elle contenait du phosphore (nouveau pour les chercheurs) et qu'elle était acide. Elle fut donc nommée acide désoxyribonucléique.

La fondation de la radiocristallographie en 1912 par le physicien allemand Max Von Laue, permit au britannique W. Astbury d'étudier l'ADN et de démontrer sa structure en long filament et sa constitution par une succession de base.

En 1919 Phoebus Levène travaille aussi sur cette constitution et précise la constitution en bases purines et pyrimidines des acides nucléiques (ADN ou ARN).

Les travaux de Griffith sur la transformation bactérienne à la recherche d'un vaccin pour le pneumocoque permet à Oswald Avery de mettre en évidence que l'information génétique est stockée sur l'ADN.

1947-1950 Erwin Chargaff découvre les proportions des bases adénine-thymine (30%) et cytosine-guanine (20%) chez l'homme. Il les a symbolisés par A=T et G=C montrant que la proportion d'adénine est égale à celle de la thymine et celle de la cytosine à la guanine.

Rosalind Franklin, James Watson et Francis Crick découvrent la structure en double hélice de l'ADN en 1953.

Déjà dans les années soixante l'information nécessaire sur le fonctionnement de l'ADN était disponible (macromolécules à la base des caractères phénotypiques et génotypiques). Les chercheurs cherchent donc les moyens d'intervenir sur la structure de l'ADN afin de corriger certaines situations comme les maladies génétiques, les résistances médicamenteuses...en espérant remplacer les gènes défectueux.

La découverte des enzymes dites endonucléases de restriction en 1965 par W.Arber, D.Nathans et H.Smith qui ont la propriété de couper l'ADN au niveau des séquences spécifiques a facilité cette intervention et rendit opératoire la biologie moléculaire.

En 1971 la première séquence comportant un gène étranger fut créée et qualifiée à l'époque par le terme de manipulation génétique.

De suite en 1983, Kary Mullis inventa la PCR permettant d'amplifier l'ADN de façon exponentielle par l'intermédiaire de la *Taq polymérase* (enzyme thermostable).

En 1980 Osion et D.Burke réussirent à cloner une grande quantité d'ADN (250kb) et construisirent des chromosomes artificiels de levure. Ils ouvrirent la voie à des travaux d'amélioration qui permirent par la suite de cloner jusqu'à deux millions de paires de bases.

A partir de 1990 les travaux de séquençage du génome de nombreuses espèces furent entrepris (virus, bactéries, nématodes...). Le premier génome séquencé fut celui de *Hemophilus influenzae*.

Le projet de séquençage du génome humain a débuté en 1985 et son achèvement a été annoncé en avril 2003. A cette même date furent élaborés les Logiciels d'alignement BLAST et GRAIL pour l'identification de gènes[64], [67].

III. 10. 2. 1. Séquenceurs de première génération

Ces outils de séquençage sont basés sur deux principes diamétralement opposés de séquençage du vingtième siècle. Il s'agit de celui de Frederick Sanger basé sur la synthèse enzymatique et de celui de Maxam et Gilbert basé sur la dégradation chimique. La technique de Sanger a eu le plus de succès d'utilisation grâce à l'évolution des techniques chimiques enzymatiques (invention de la PCR par Kary Mullis en 1985, découverte de la *Taq polymérase*, emploi industriel possible, automatisation facile) alors que celle de Maxam et Gilbert nécessite des réactions chimiques toxiques et est limitée par la résolution de l'analyse et son automatisation est de plus en plus difficile.

Un autre comptant parmi les premières générations est le pyroséquençage introduit en 1988 par Ronaghi, Uhlen et al. 1998, Hyman et al. 1988). Il est principalement basé sur l'addition d'un seul nucléotide qui est révélé en temps réel par détection de la luminescence [68]–[70].

III. 10. 2. 1. 1. Méthode de Sanger [68], [69]

Cette méthode est utilisée classiquement pour effectuer un petit séquençage ponctuel (kilo-paire de base). Développée par Sanger entre 1975-77 à Cambridge en Grande-Bretagne appelée méthode des dideoxynucléotides.

Le principe de cette méthode consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN (matrice) à séquencer. L'élongation de l'amorce hybridée au brin matrice est réalisée en présence des

quatre désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), monomères utilisés par la polymérase, et d'un analogue didésoxyribonucléotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) qui joue le rôle de terminateur de chaîne. Du fait de l'incorporation spécifique de l'analogue par la polymérase, on obtient un mélange de fragments qui se terminent sélectivement aux positions correspondant au nucléotide choisi. On effectue ainsi quatre réactions en parallèle, chacune avec l'un des quatre ddNTP, et l'on sépare les fragments obtenus par électrophorèse. Afin de pouvoir identifier les fragments d'ADN synthétisés par la polymérase et en particulier pour pouvoir les distinguer de l'ADN matrice, on les marque avec un traceur fluorescent. Celui-ci est accroché à l'une de ses deux extrémités, soit en 5' sur l'amorce de séquençage, soit en 3' sur le didésoxyribonucléotide terminateur.

Les séquenceurs automatiques modernes utilisent un système de détection *in situ* pendant l'électrophorèse. Le faisceau d'un laser émettant dans la bande d'absorption du fluorophore traverse le gel. Pendant la migration, lorsqu'une bande d'ADN passe devant le faisceau, un signal de fluorescence est émis. Celui-ci est capté par une photodiode située en regard du gel. Le signal est amplifié puis transmis à l'ordinateur de contrôle et analysé par un logiciel spécialisé. Dans des conditions favorables, cette technique permet de lire jusqu'à 1000 nucléotides par fragment séquencé. En routine, la moyenne est de l'ordre 500 à 800 nucléotides par expérience.

III. 10. 2. 1. 2. Méthode de Maxam et Gilbert [68], [69]

Cette méthode est basée sur une dégradation chimique de l'ADN et utilise les réactivités différentes des quatre bases A, T, G et C, pour réaliser des coupures sélectives. En reconstituant l'ordre des coupures, on peut remonter à la séquence des nucléotides de l'ADN correspondant. On peut décomposer ce séquençage chimique en six étapes successives :

Marquage: Les extrémités des deux brins d'ADN à séquencer sont marquées par un traceur radioactif (^{32}P). Cette réaction s'effectue en général au moyen d'ATP radioactif et de polynucléotide kinase.

Isolement du fragment d'ADN à séquencer: Celui-ci est séparé au moyen d'une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide. Le fragment d'ADN est découpé du gel et récupéré par diffusion.

Séparation de brins: Les deux brins de chaque fragment d'ADN sont séparés par dénaturation thermique, puis purifiés par une nouvelle électrophorèse.

Modifications chimiques spécifiques: Les ADN simple-brin sont soumis à des réactions chimiques spécifiques des différents types de base. Walter Gilbert a mis au point plusieurs types de réactions spécifiques, effectuées en parallèle sur une fraction de chaque brin d'ADN marqué : par exemple, une réaction pour les G (alkylation par le sulfate de diméthyle), une réaction pour les G et les A (dépurination), une réaction pour les C, ainsi qu'une réaction pour les C et les T (hydrolyse alcaline). Ces différentes réactions sont effectuées dans des conditions très ménagées, de sorte qu'en moyenne chaque molécule d'ADN ne porte que zéro ou une modification.

Coupure: Après ces réactions, l'ADN est clivé au niveau de la modification par réaction avec une base, la pipéridine.

Analyse: Pour chaque fragment, les produits des différentes réactions sont séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes et analysés pour reconstituer la séquence de l'ADN. Cette analyse est analogue à celle que l'on effectue pour la méthode de Sanger.

III. 10. 2. 1. 3. Pyroséquençage: Méthode non Sanger de séquençage

Le pyroséquençage est de loin la technique non Sanger qui a connu le plus de succès. Cette technique de séquençage d'ADN introduite depuis 1988, par Hyman et collaborateurs (Hyman 1988), et amélioré par un groupe suédois (Ronaghi, Karamohamed et al. 1996; Ronaghi, Pettersson et al. 1998; Ronaghi, Uhlen et al. 1998) par introduction de la PCR. Il s'agit d'un séquençage par synthèse (SBS) et qui se caractérise par la révélation en temps réel de l'activité de l'ADN polymérase (real time sequencing) qui ajoute un seul nucléotide non fluorescent à la fois.

III. 10. 2. 1. 3. 1. Principe du pyroséquençage [70]

Le pyroséquençage se déroule en 5 étapes

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

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

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

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

Etape 5 : Le signal lumineux est capté par un capteur CCD puis reproduit sous forme d'un pic sur le pyrogramme. La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité[70].

III. 10. 2. 1. 3. 2. Avantages et limites

Le pyroséquençage est une technique qui permet d'effectuer un séquençage rapide et à moindre coût qu'un séquençage par la méthode de Sanger. En effet, cette technique ne nécessite pas de clonage (donc gain de temps et d'argent), et permet une lecture directe de la séquence obtenue après le séquençage. Cependant, malgré sa conception élégante, le pyroséquençage présente par ailleurs des limitations dont la principale est liée à son utilisation pour le séquençage des génomes complets, puisque la longueur de la séquence lue ne dépasse pas les 100pb. Avec une telle capacité de lecture le pyroséquençage trouve par ailleurs des applications potentielles dans l'identification d'étiquettes des séquences (sequence tag) comme dans la cas de l'analyse en série de l'expression des gènes (serial analysis of gene expression: SAGE), pour le miniséquençage de SNP connu, et pour la cartographie relative des génomes par rapport à une séquence de référence[70].

III. 10. 2. 2. Séquenceurs de deuxième génération

Les techniques de première génération ont été améliorées pour augmenter la résolution et le temps du séquençage.

Depuis 2005, ces machines sont sur le marché appelées nouvelle ou seconde génération de séquençage (NGS, next generation sequencing ou séquençage à haut débit) en raison du faible débit et du coup élevé des séquenceurs de première génération. Quatre plateformes de séquençage de seconde génération sont actuellement disponibles sur le marché, proposant différentes versions de machines[68] : Roche 454 (2005), Illumina/Solexa (2006), SoliD (life technologies Applied Biosystems 2007), Ion Torrent (life technologies Ion Torrent 2010).

Elles se décomposent cependant toutes en 4 grandes étapes principales : la préparation des bibliothèques qui contient une étape d'amplification par PCR, les Cycles de réactions de séquençage, la prise d'image après chacun de ces cycles pour déterminer le nucléotide correspondant, puis l'analyse des données.

Ces nouvelles générations de machines ont pour avantage leur capacité à analyser de grands génomes à haute résolution grâce à la parallélisation des réactions.

III. 10. 2. 2. 1. Roche 454

Le laboratoire 454 Life Sciences est le premier à commercialiser ces appareils en 2005. Ensuite acheté par Roche d'où l'appellation Roche 454. La technologie nécessite une étape de PCR sur bille pour enrichir les fragments à séquencer afin d'obtenir plusieurs copies du même fragment d'ADN. Les ADN sont combinés avec des billes, ensuite les billes sont déposées dans des puits sur un support solide pour effectuer le pyroséquençage. On obtient jusqu'à 900 Mb de données en une dizaine d'heures, soit 15000 fois plus qu'avec la première génération de séquenceurs. Cette technologie présente la plus grande taille de lecture (jusqu'à 700 pb par rapport à 100 pb à ses débuts) et sa grande précision la rend appropriée au séquençage de novo[71].

III. 10. 2. 2. 2. Illumina/Solexa

Premier séquenceur avec succès fut commercialisé en 2006 (le Genome Analyzer GA). La spécificité de cette technologie repose sur une amplification en pont (bridge PCR) des fragments à séquencer. Elle a lieu sur une surface de verre appelée « flow cell » (FC) similaire à une lame de microscope. Les fragments de la librairie à séquencer possèdent des adaptateurs à leurs extrémités. Ceux-ci vont leur permettre de se fixer de façon aléatoire sur la FC, par hybridation sur les amorces qui en couvrent la surface. Un nouveau brin est alors synthétisé par une polymérase : il est fixé de façon covalente à la FC. Le brin d'origine est alors éliminé par dénaturation, et l'extrémité libre du brin restant s'hybride à une amorce adjacente pour former un pont. La polymérase synthétise à nouveau le brin complémentaire pour former un pont d'ADN double brin, puis les deux copies sont libérées par dénaturation. Le cycle d'amplification en pont recommence pour former à terme un regroupement d'ADN clonal en une zone appelée cluster. Le séquençage s'effectue sur des centaines de millions de clusters simultanément, grâce à une chimie de terminateurs réversibles : des nucléotides bloqués marqués par fluorescence sont ajoutés, lorsque l'un d'entre eux est incorporé, la fluorescence émise est relevée puis le fluorophore et le bloqueur sont clivés permettant l'ajout d'un nouveau nucléotide. A chaque cycle d'incorporation, une base peut être déterminée. Cette chimie a pour avantage de séquencer correctement les homopolymères. Le Genome Analyzer a cependant pour inconvénient de lire peu de bases, ce qui le rend toutefois approprié à

l'analyse de génomes dont on a une bonne annotation. Les instruments plus modernes sur le marché comprennent le MiSeq, l'iSeq, le NextSeq, et le NovaSeq [71].

III. 10. 2. 2. 3. SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection)

Troisième plateforme de séquençage de nouvelle génération, il est commercialisé par Applied Biosystems (actuellement Life Technologies) depuis 2007. La technologie repose également sur une PCR en émulsion sur billes. Le séquençage ne s'effectue pas par synthèse comme sur les plateformes précédentes mais par ligation. Une amorce de séquençage universelle se fixe sur l'adaptateur puis des oligonucléotides dégénérés de 8 bases, marqués par fluorescence, sont ajoutés. Dès que l'un d'entre eux correspond à la séquence adjacente à l'amorce, la ligase le fixe et la fluorescence est émise, permettant d'identifier l'oligonucléotide fixé et d'interroger ainsi ses deux premières bases. Le nombre de cycles de ligature, détection et clivage détermine ainsi la longueur de lecture. Chaque base est lue deux fois avec cette technologie, ce qui explique sa grande précision et qui la rend adaptée au reséquençage ou à l'analyse de polymorphismes. Néanmoins, la complexité de fonctionnement de cette technologie en est un inconvénient puisqu'elle implique un lourd travail d'analyse [71].

III. 10. 2. 2. 4. Ion Torrent

Fondée en 2007 par Jonathan M. Rothberg rachetée en 2010 par Life Technologies, qui commercialisera en décembre 2010 son premier séquenceur, le PGM (Personal Genome Machine). La technologie repose sur la libération naturelle d'un ion H⁺ après incorporation d'un nucléotide par une polymérase. Ce phénomène entraîne une modification du pH pouvant être détectée par une puce de silicium semi-conductrice composée de plusieurs millions de transistors.

Cette technologie est qualifiée de PostLight car aucun intermédiaire de lumière n'est utilisé contrairement aux méthodes citées précédemment : c'est une modification chimique qui entraîne la création du signal. L'absence de marquage fluorescent et de système de détection optique ou encore l'utilisation de micropuces standards explique le faible coût de cette machine [71].

III. 10. 2. 3. Séquenceurs de 3ème génération

La différence majeure entre la deuxième et la troisième génération de séquenceurs réside dans leur capacité à séquencer directement des molécules d'ADN de façon individuelle sans aucune

amplification préalable. On peut donc également séquencer de l'ARN sans devoir le convertir au préalable en ADNc.

Pacific Biosciences et Oxford Nanopore Technologies sont les deux acteurs majeurs des technologies de troisième génération. D'autres technologies, comme le 10x Genomics peut être considéré comme une technologie de troisième génération [72].

III. 10. 3. Types de génomique

III. 10. 3. 1. Génomique structurale

La génomique structurale s'intéresse à l'organisation et la position des gènes, la taille du génome, la comparaison des génomes de différents organismes, le Séquençage de l'ADN et l'analyse des séquences.

III. 10. 3. 2. Génomique fonctionnelle

La génomique fonctionnelle étudie les fonctions des gènes, l'analyse globale de l'expression génétique et la disruption systématique des gènes (Knock-outs, RNAi)[61].

III. 11. Assemblage du génome [63]

La reconstruction du génome est un défi très important après une analyse réussie de séquençage. Malgré les progrès informatiques qui permettent maintenant d'assembler facilement des séquences longues et peu abondantes, les méthodes informatiques ne sont pas encore adaptées pour traiter à la perfection les données générées par un séquenceur de seconde génération.

Présentement, il existe deux approches algorithmiques pour l'assemblage. La première, basée sur l'alignement des séquences, est plus adaptée au séquençage avec la méthode de Sanger et aux longs fragments. La seconde méthode est basée sur la théorie mathématique des graphes de Bruijn, a un fort potentiel pour l'assemblage de fragments plus courts.

III. 12. Annotation du génome

Une fois la séquence d'un génome construite, il faut l'annoter en associant des éléments à des positions du génome. Ces éléments peuvent être de plusieurs natures, comme des séquences codant pour des gènes ou des ARN fonctionnels, des séquences répétées ou des régions régulatrices. Plusieurs outils sont disponibles pour identifier ces éléments.

Dans la pratique l'annotation d'un génome comporte trois étapes:

Une première étape où sont identifiées les séquences répétées présentes dans le génome, afin de les masquer. En effet ces séquences répétées sont occasionnées par la présence de transposons, éléments génétiques qui ne sont pas assimilés à des gènes, et constituent une sorte de bruit de fond dans l'analyse des génomes.

Une seconde étape localise des séquences codantes potentielles en utilisant les règles du code génétique.

Une troisième étape consiste à comparer (avec des logiciels de comparaison de séquences comme BLAST ou BLAT) la séquence étudiée à d'autres séquences déjà répertoriées comme présentes dans un gène déjà connu. Plus la séquence du gène étudié « ressemble » à celle d'un gène déjà connu, en plus ces deux gènes ont une fonction proche voire identique. De cette manière l'annotation d'un génome permet de lister les gènes présents dans ce génome.

Cependant, il est possible que certaines structures génomiques contenant des régions répétées, des insertions ou des délétions ne soient pas détectables avec cette méthode. La comparaison avec des espèces plus éloignées permet aussi d'identifier des gènes. Toutefois, utiliser uniquement la génomique comparative pour identifier les gènes d'une espèce nouvellement séquencée peut entraîner l'oubli de nombreux gènes.

L'annotation d'un génome ne peut être faite en utilisant qu'un seul outil, car ils ont tous leurs forces et leurs faiblesses. De plus, selon le type de génome étudié, procaryote ou eucaryote par exemple, les outils à utiliser devront tenir compte des paramètres différents : la présence ou l'absence d'introns, le nombre de répétitions, la présence de duplications géniques, de délétions et de pseudogènes[62], [73].

IV. Méthodologie

IV. 1. Sites d'étude

Notre étude s'est portée sur des échantillons provenant du district de Bamako et de la région de Tombouctou.

Le séquençage des échantillons a été fait à l'unité d'épidémiologie moléculaire et de la résistance aux antipaludiques (MEDRU) du Centre de Recherche et de Formation sur le Paludisme (MRTC)

IV. 2. Type d'étude

Nous avons mené une étude retro-prospective sur des échantillons provenant de l'Institut National de Santé Publique (INSP), du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) et du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC).

IV. 3. Période d'étude

Notre étude s'est déroulée de mars 2020 à avril 2021.

IV. 4. Population d'étude

Notre étude concernait tous les individus se présentant dans les laboratoires de diagnostic du COVID-19.

IV. 5. Echantillonnage

Nous avons effectué un échantillonnage par convenance. Les échantillons disponibles pour séquençage étaient retenus. Ensuite nous avons téléchargé les séquences maliennes disponibles sur la base de données GISAID à la date du 12 août 2020.

IV. 6. Critères d'inclusion

Tous les cas positifs de COVID-19 confirmés par la PCR quantitative (qPCR) ont été inclus dans notre étude avec un Cycle threshold compris entre 18-29.

IV. 7. Critères de non inclusion

N'ont pas été inclus dans cette étude les extraits d'ARN total dont la concentration était inférieure à 10ng/ul.

IV. 8. Procédure de l'étude

IV.8. 1. Méthodes de collecte des données

Les échantillons ont été collectés dans les laboratoires (INSP, CICM, UCRC) indiqués pour le diagnostic du COVID-19 au Mali.

IV. 8. 1. 1. Données cliniques

Les données cliniques ont été obtenues des laboratoires respectifs de diagnostic de COVID-19.

IV.8. 1. 2. Données biologiques

IV.8. 1. 2. 1. Techniques de laboratoires

1. Prélèvement

Les échantillons biologiques ont été collectés à travers un prélèvement soit par écouvillonnage nasal (nasopharyngé) ou oropharyngé.

2. Extraction d'ARN et diagnostic moléculaire

L'ARN total a été extrait à l'aide d'un mini kit d'ARN viral Qiamp (Qiagen Cat. 57704) selon les instructions du fabricant.

La réaction en chaîne de la transcriptase inverse (RT-qPCR) en temps réel a été utilisée pour la détection des échantillons positifs. Les tests de RT-qPCR étaient basés sur l'amplification du gène *N* et du gène qui code pour l'ARN polymérase dépendante de l'ARN (*RdRp*) situés sur l'ORF1ab.

3. Préparation de la librairie

Nous avons utilisé le protocole TruSeq d'Illumina pour la préparation de la librairie (banque) qui nécessitait un volume de 10 µl du matériel génomique concentré à 100-200ng d'ARN total.

3. 1. Quantification des échantillons et évaluation de la qualité

Une mesure de la concentration était effectuée sur tous les échantillons avec un fluoromètre Denovix en utilisant le kit Denovix RNA Assay High Sensitivity (Annexe 10. 1).

3. 2. Différentes étapes

Les étapes de la préparation de la librairie sont illustrées à l'Annexe 10. 2

3. 3. Séquençage sur MiSeq

Chargement de la librairie sur la cartouche

Avant de charger la librairie, la cartouche doit au préalable être décongelée environ deux (2) heures à l'avance. Renverser la cartouche 10 fois pour bien homogénéiser les solutions et vérifier qu'il n'y ait pas de bulles au fond des solutions, tapoter la sur la paillasse, nettoyer la partie haute de la cartouche avec du papier « Lens Cleaning Tissues ». Ensuite pincer la cartouche avec des embouts de 1ml et on charge l'échantillon sans toucher le bout de l'embout à la feuille de la cartouche.

Conserver la cartouche à 4°C sinon charger immédiatement

Démarrage de l'analyse :

Nos échantillons ont été séquencés en utilisant l'appareil de séquençage MiSeq d'Illumina. Nous avons utilisé le kit MiSeq v3 (150 cycles) conformément aux instructions du fabricant. Avant chaque séance de séquençage, il faut procéder à :

- Un lavage de maintenance qui se fait avec une solution de Tween20 0.5% ;
- Préparer la fiche d'échantillons en précisant les paramètres suivants : identifiant, la date, la taille de lectures, indexes et le nom du projet ;
- Redémarrer la machine ;
- Appuyer sur séquence et suivre les instructions de l'appareil.

IV. 8. 1. 2. 2. Analyses bio-informatique des séquences

Le centre de recherche est doté d'un serveur d'analyse bio-informatique HPE DL580 GEN9 de stockage interne de 140 Téraoctet. Ce serveur est équipé de quatre processeurs possédant chacun seize (16) coeurs de 2.2 Giga Hertz. Il a une mémoire RAM de 1 téraoctet.

Les données brutes (fichiers FastQ) ont été transférées du séquenceur MiSeq (via un compte BaseSpace) vers le serveur local du DELGEME/MRTC pour l'analyse. Ces fichiers ont été soumis à un contrôle de qualité pour filtrer les ordres de lecture (« reads » en anglais) de mauvaises qualités à l'aide des outils FastQC et Multi-FastQC. Les ordres de lectures ont été alignés au génome de référence de SARS-CoV-2 (Wuhan). Pour l'alignement au génome de référence, nous avons utilisé le logiciel *BWA* (Burrow-Wheeler Aligner). Les séquences consensuelles ont été générés à partir des fichiers d'alignement en utilisant les logiciels

samtools et *bcftools*. L'annotation des fichiers FASTA a été faite à l'aide de l'application en ligne *coronannotator*. Nous avons utilisé *PANGOLIN* pour la classification des lignées de SARS-CoV-2. L'alignement multiple a été fait avec le logiciel *MAFFT* et l'analyse phylogénétique avec le *MEGA X*

V. Résultats

Notre étude englobe des échantillons des trois premières vagues de la pandémie.

1-Resultats globaux

Au total 55 librairies ont été préparées, et nous avons obtenu 29 séquences de bonne qualité. Ensuite nous avons téléchargé vingt-une séquences (21) maliennes déposées sur la base de données de GISAID (Figure 4).

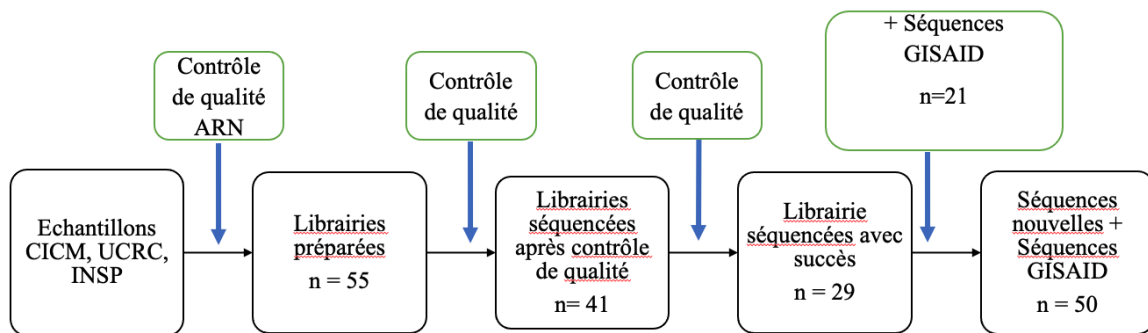


Figure 4: Répartition des échantillons analysés

Le genre masculin était le plus représenté avec 65,5% (Tableau V).

Tableau V: Répartition des échantillons en fonction du sexe

		Sexe			
		Masculin	Féminin	Indéterminé	Total
Genre	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
	19 (65,5%)	4 (13,8%)	6(20,7%)	29 (100%)	

Trente-huit (38%) des patients étaient âgés de plus de 40 ans (Tableau VI).

Tableau VI : Répartition des échantillons en fonction de l'âge

Age	
Echantillons	Effectif (%)
>40	11 (38%)
≤40	9 (31%)
Indéterminé	9 (31%)
Total	29 (100%)

Soixante-cinq pourcent (65,5%) de nos échantillons ont été collectés durant la seconde vague de la pandémie (tableau VII).

Tableau VII : Répartition des échantillons séquencés avec succès en fonction des vagues

Vagues	Effectif (%)
1 ^{ère} (mars-December 2020)	4 (13,80%)
2 ^{ème} (December 2020-Avril 2021)	19 (65,5%)
3 ^{ème} (Avril 2021)	6 (20,7%)
Total	29 (100%)

2-Premier génome de SARS-CoV-2 séquencé localement au Mali

Notre étude de surveillance de SARS-CoV-2 au Mali a commencé avec deux échantillons provenant de la région de Tombouctou. Une ville située à 1000 km de la capitale (Bamako) du Mali.

Due à l'indisponibilité des réactifs pour mesurer la taille des fragments avec l'appareil BioAnalyzer 2100 Agilent, nous avons utilisé un gel d'agarose à 1% pour estimer la taille. La taille de la librairie a été estimée à environ 325 pb sur le gel d'agarose (figure 5A). Après séquençage, la taille moyenne des fragments a été estimée à partir des ordres lectures de séquences à environ 150 pb (figure 5B).

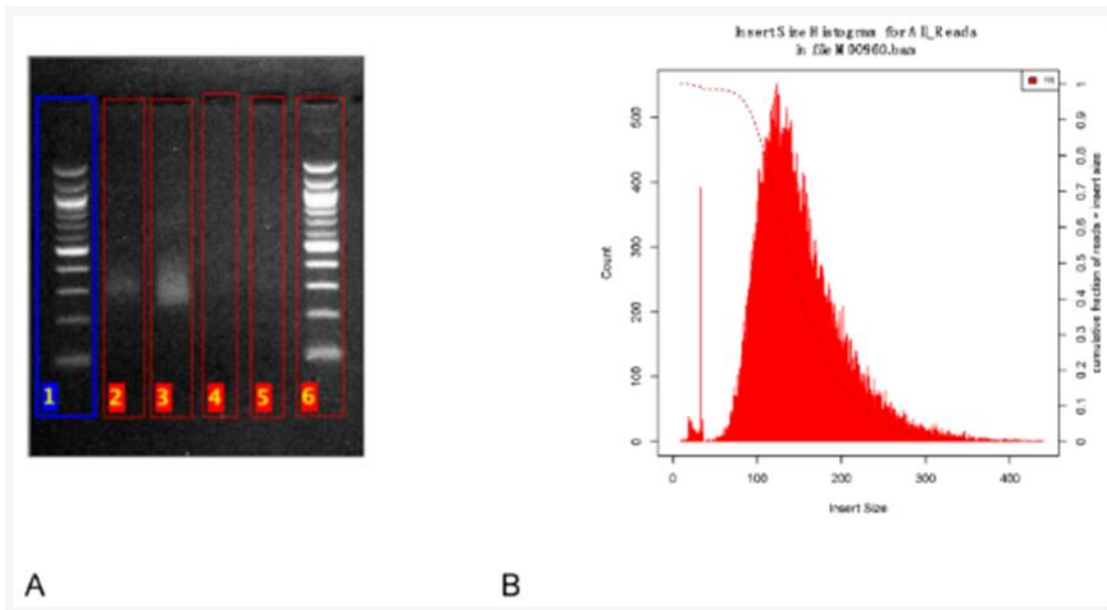


Figure 5: Taille de la librairie sur le gel d'agarose (A) et des fragments après séquençage (B)

Après le séquençage, des données brutes avec 96,22% de lectures ont été générées avec un score de qualité $Q > 30$ (moins d'une erreur toutes les 1 000 pb) (figure 6).

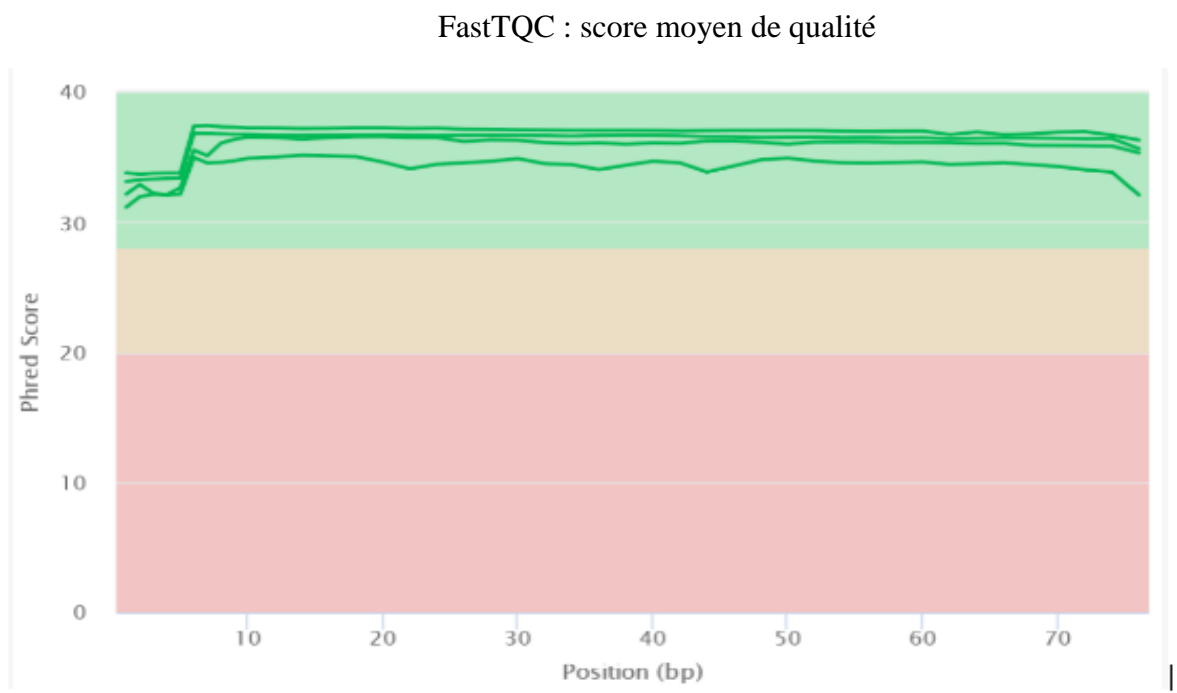


Figure 6 : Scores qualité des données

Après le prétraitement des données, les lectures ont été comparés au génome de référence de SARS-CoV-2 de Wuhan (numéro d'accès : NC_045512). Chaque position du génome a été séquencée avec une profondeur moyenne de 214x (figure 7). Nous avons généré une séquence consensus de 29 903 paires de bases à partir du fichier BAM en utilisant l'outil IGV. L'analyse BLAST des séquences consensus interrogeant la base de données de NCBI a montré une identité de 99,95 % et 99,96 % avec le génome de SARS-CoV-2 couvrant 100 % des séquences respectivement pour l'échantillon 1 et l'échantillon 2.

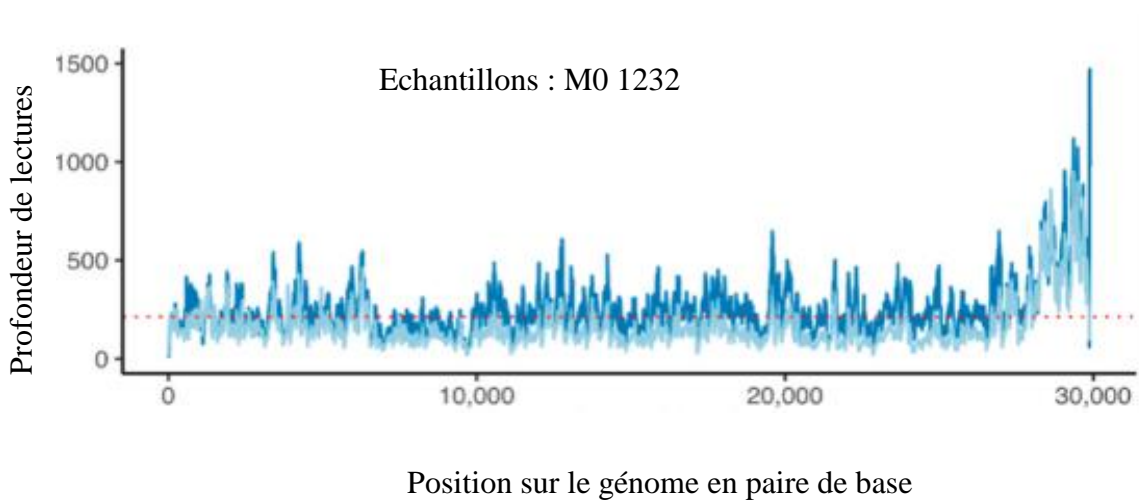


Figure 7 : Profondeur de lectures des séquences

La ligne pointillée rouge indique la couverture de lecture moyenne (214x).

Sur les deux échantillons nous avons observé pour l'échantillon 1 dix-neuf (19) SNP, dont deux (2) étaient dans la région 5' de la région non traduite (UTR), six (6) étaient des mutations synonymes et onze (11) étaient non synonymes (substitutions d'acides aminés). Sur les onze (11) mutations non synonymes, deux étaient localisées sur le gène codant pour la protéine de pointe respectivement aux positions 23403 (acide aminé D614G) et 23587 (acide aminé Q675H) sur le génome (Tableau VIII). L'échantillon 2 contenait quatorze (14) mutations, dont neuf n'étaient pas synonymes. Fait intéressant, la protéine de pointe avait une mutation à la position d'acide aminé 614 où D a été remplacé par N (D614N).

Tableau VIII: Mutations sur les deux premiers génomes séquencés

#CHROM	POS	REF	ALT	Gene	Mutation nt	Mutation aa
NC_045512	41	T	A	ORF1b	c.-225T>A	UTR
NC_045512	241	C	T	ORF1b	c.-25C>T	UTR
NC_045512	1783	T	C	ORF1b	c.1518T>C	p.Cys506Cys
NC_045512	2416	C	T	ORF1b	c.2151C>T	p.Tyr717Tyr
NC_045512	3037	C	T	ORF1b	c.2772C>T	p.Phe924Phe
NC_045512	5100	C	T	ORF1b	c.4835C>T	p.Ser1612Leu
NC_045512	10138	C	T	ORF1b	c.9873C>T	p.Asn3291Asn
NC_045512	11128	G	A	ORF1b	c.10863G>A	p.Met3621Ile
NC_045512	14322	C	T	ORF1b	c.14073C>T	p.Tyr4691Tyr
NC_045512	14408	C	T	ORF1b	c.14159C>T	p.Pro4720Leu
NC_045512	15654	C	T	ORF1b	c.15405C>T	p.Asp5135Asp
NC_045512	23403	A	G	S	c.1841A>G	p.Asp614Gly
NC_045512	23587	G	C	S	c.2025G>C	p.Gln675His
NC_045512	25433	C	T	ORF3a	c.41C>T	p.Thr14Ile
NC_045512	25563	G	T	ORF3a	c.171G>T	p.Gln57His
NC_045512	26038	T	C	ORF3a	c.646T>C	p.Ser216Pro
NC_045512	28482	A	G	N	c.209A>G	p.Gln70Arg
NC_045512	28600	T	C	N	c.327T>C	p.Tyr109Tyr
<u>NC_045512</u>	<u>28833</u>	<u>C</u>	<u>T</u>	<u>N</u>	<u>c.560C>T</u>	<u>p.Ser187Leu</u>

3- Evolution de SARS-CoV-2 au Mali

Après avoir séquencé avec succès les deux premiers échantillons, nous avons continué la surveillance malgré les difficultés d'accès aux réactifs et matériels. Vingt-sept autres échantillons ont été séquencés. Dans cette sous-section, nous présentons les résultats sur l'évolution du virus au Mali.

Sur l'ensemble comparé au génome de référence, nous avons observé un total de six-cent vingt-quatre (624) mutations sur l'ensemble de nos échantillons avec un intervalle de cinq (5) à trente-une (31) mutations, une moyenne de 17,7 mutations/génome soit une mutation toutes les 1638,4 pb sur le génome (Tableau IX).

Sur les six-cent vingt-quatre (624) cas de polymorphismes, les plus dominants étaient des mutations ponctuelles (SNP) (Figure 8).

Tableau IX : Polymorphismes sur le génome de SARS-CoV-2

Mutations	Valeurs
Intervalle	5-31
Moyenne	17,7
Densité des mutations	1638,4 pb
Total	624

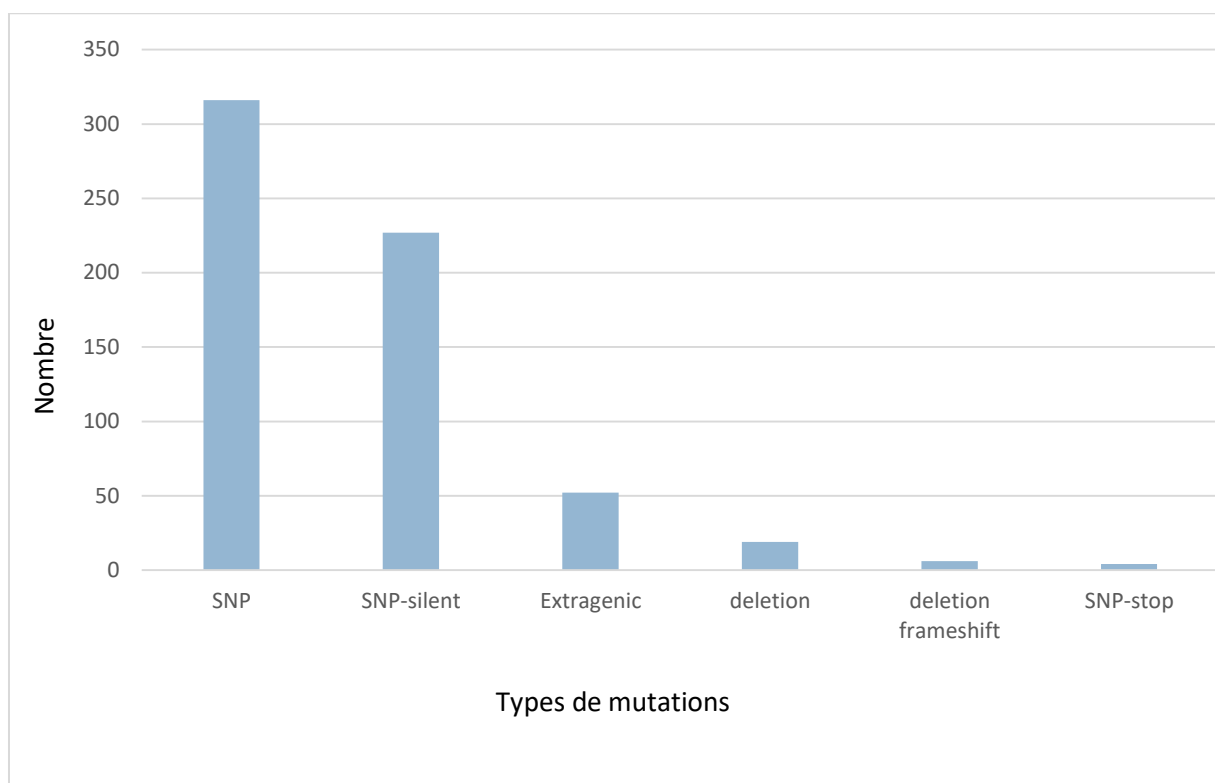


Figure 8: Types de polymorphismes sur le génome

SNP= mutation ponctuelle ; extragenic mutation= mutation extragenique; deletion frameshift=mutation de décalage de cadre, SNP-silent= mutation silencieuse

Les variants sont classés en six groupes en fonction de l'association des mutations sur le génome. Les comutations présentes dans nos échantillons étaient le C241T, A23403G,

C3037T, NSP3 : F106, S : D614G, NSP2 : Y537Y, NSP12b :P314L, ORF3a : S216P, ORF3a : T14L, N : Q70R, N : S187L et NSP12b : Y285Y avec une prédominance de C>T (Figure 9).

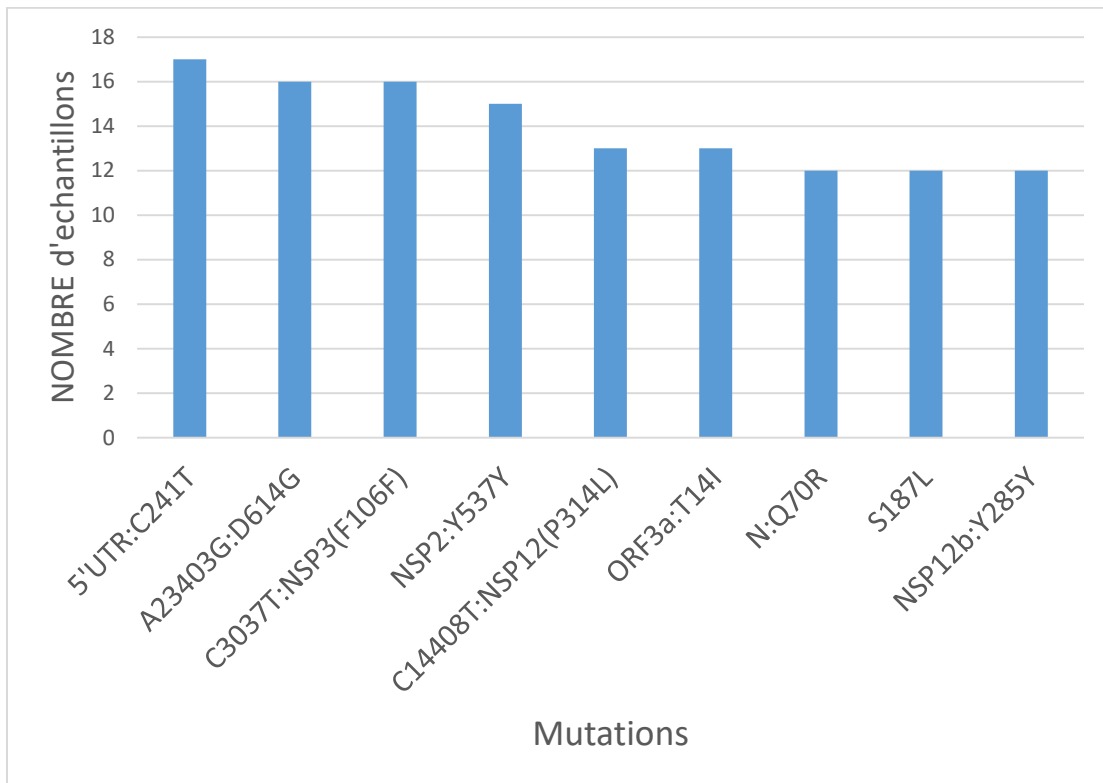


Figure 9: Co-mutations sur le génome de SARS-CoV-2

Parmi les quatre échantillons de la première vague 75% appartenait à la lignée B contre 25% d'A.21. Dans la seconde vague c'est la sous lignée B.1 de B qui dominait avec 52.6%. La troisième vague était dominée par le variant Eta (figure 10).

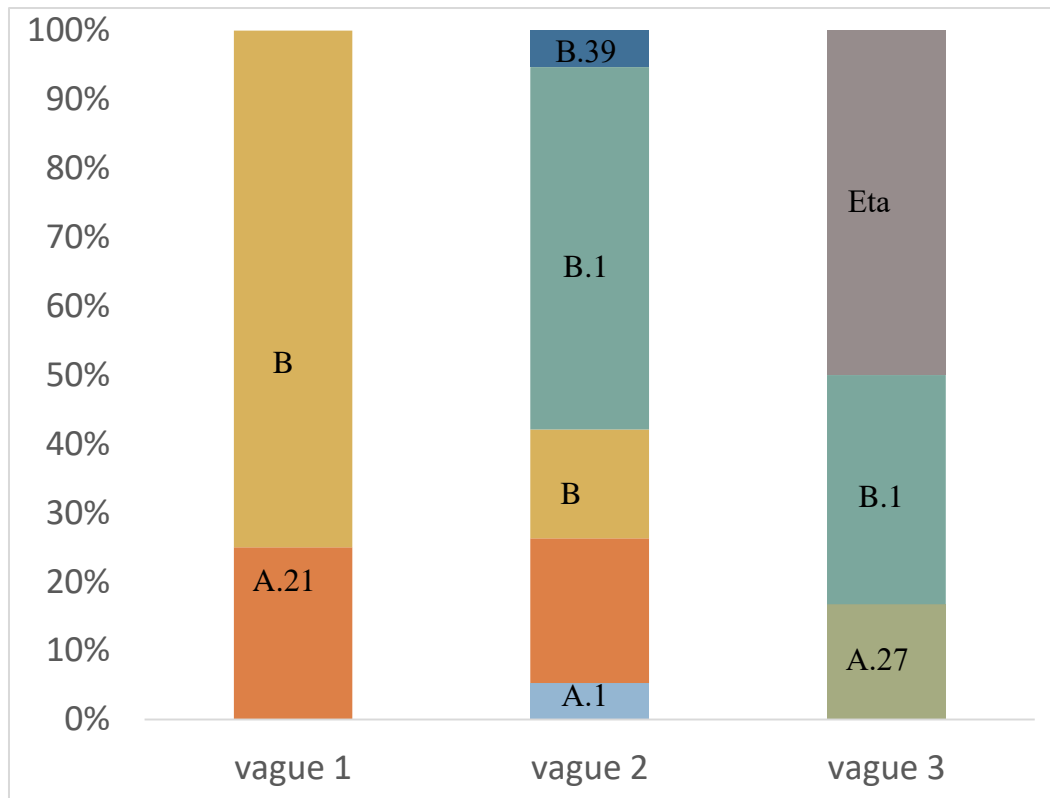


Figure 10: Répartition des variants en fonction des vagues

Le génome de SARS-CoV-2 peut être divisé en trois grandes parties (ORF1a, ORF1b et les protéines structurales adjancées entre elles par les protéines accessoires). Les mutations sur chaque partie essentielle du génome peuvent impacter sur l’infectivité du virus et répercuter sur les stratégies de lutte contre la pandémie (médicaments antiviraux, vaccins, tests de diagnostic et anticorps neutralisants). Nous avons évalué la prévalence des mutations sur certaines protéines indispensables au cycle de réplication.

Parmi les protéines structurales la plus forte prévalence était portée par la protéine spike(16,1%) bien vrai que les autres parties du génome portait la plus forte prévalence (71,4%) (Tableau X).

Tableau X: Mutations sur les protéines structurales

Protéines structurales	Nombre de mutations (%)
Spike	101 (16,1%)
Nucléocapside	64 (10,3%)
Membrane	6 (1%)
Enveloppe	7 (1,2%)
Reste du génome	446 (71,4%)
Total	624 (100%)

Entre les protéines non structurales la NSP3 avait la plus forte prévalence suivie de NSP12 bien vraie que cette prévalence soit minime mais considérables comparée au génome tout entier (72,8%) (Tableau XI).

Tableau XI: Mutations sur les protéines non structurales indispensable à la réplication virale

Protéines non structurales	Nombre de mutations (%)
NSP12	45 (7,2%)
NSP3	70 (11,2%)
NSP7	2 (0,3%)
NSP8	1 (0,2%)
NSP2	52 (8,3%)
Reste du génome	454 (72,8%)
Total	624 (100%)

Sur la protéine accessoire ORF3a, nous avons observé 10,1% de polymorphismes et 3,2% sur ORF8 (Tableau XII).

Tableau XII: Mutations sur les protéines accessoires ORF3a et ORF8

Protéines accessoires	Nombre de mutations (%)
ORF3a	63 (10,1%)
ORF8	20 (3,2%)

4-Les variants de SARS-CoV-2 circulants au Mali

Dans notre étude nous avons détecté sept (7) (A.1, A.21, A.27, B, B.1, Eta, B.39) variants de SARS-CoV-2 circulants au Mali. La figure 11 illustre les variants circulants chez les cas séquencés localement au moment de la rédaction de cette thèse. Le variant B.1 dominait suivi de B chez les cas séquencés localement au Mali. Les deux premiers échantillons (de la région de Tombouctou) appartenaient aux lignées B.1 et A.21 respectivement. Les pourcentages des variants séquencés au Mali étaient de 24% pour la lignée B.41% pour le B.1, 9% pour Eta, 3% pour A.27, 18% pour A.21, 3% pour A.1, et 3% pour B.39.

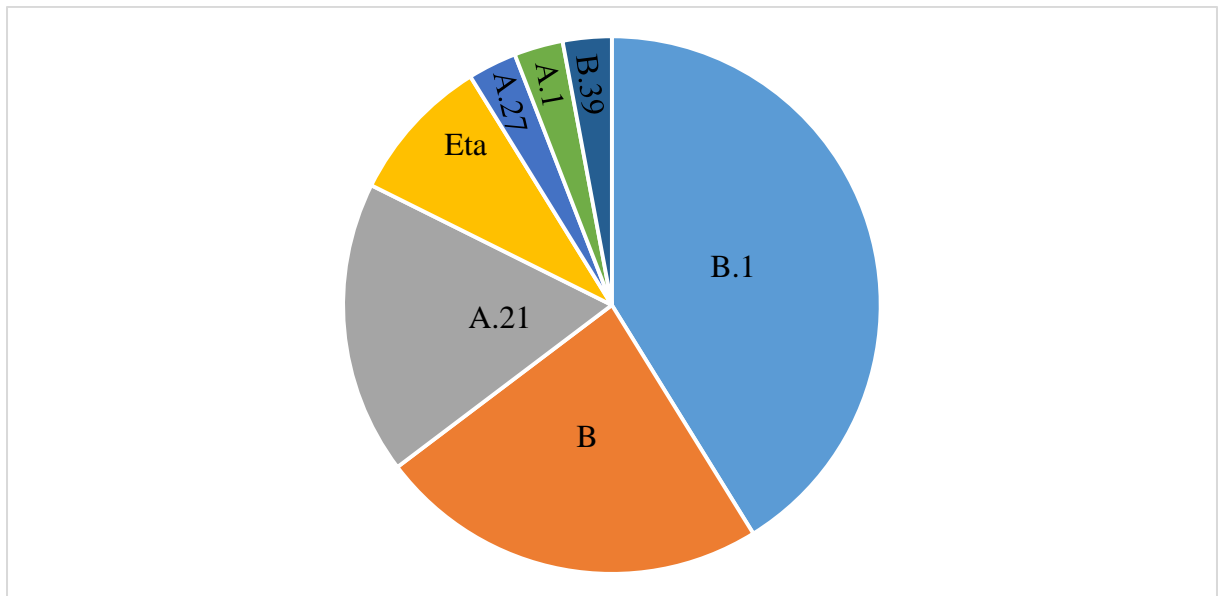


Figure 11: Variants retrouvés chez les échantillons séquencés au Mali

La figure 12 représente l'ensemble des échantillons séquencés (les séquencés au Mali + GISAID + la référence). Dans l'ensemble le variant B.1 était toujours le plus prédominant avec 38%.

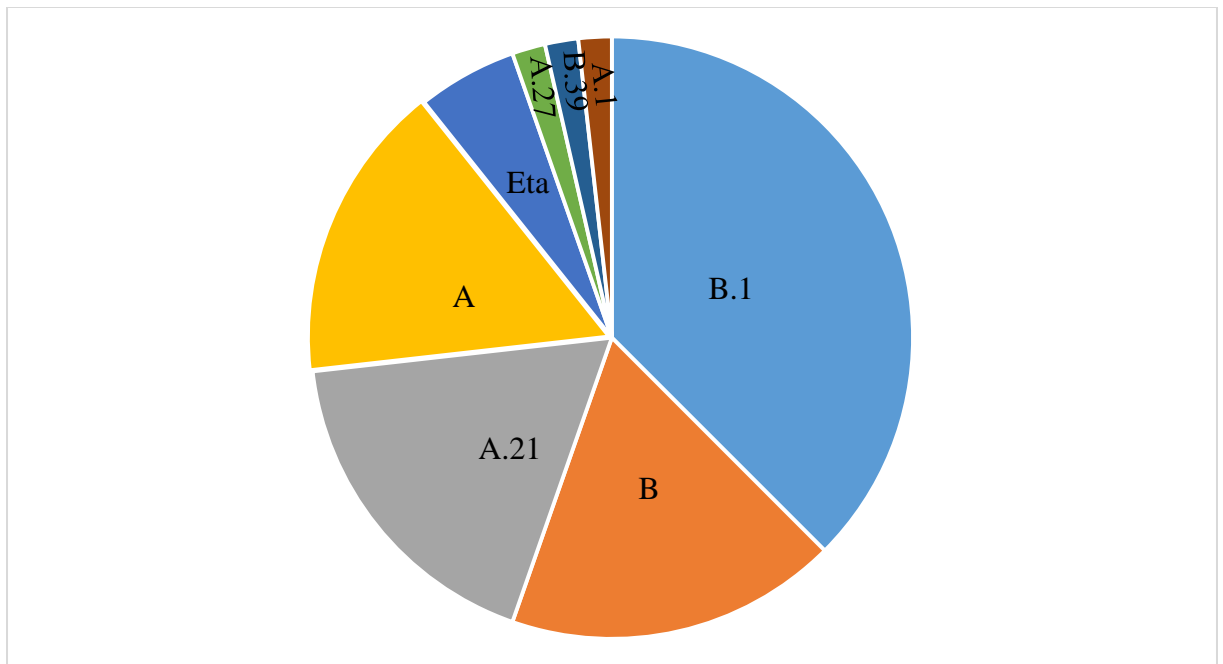


Figure 12 : Pourcentages des variants circulants au Mali

Pourcentage : B.1: 38%, B:18%, Eta:5%, A.21:18%, A.27:2%, A.1:2%, B.39:2%, A:16%.

5-Origine géographique des variants détectés

L'arbre phylogénétique a été généré par la méthode de neighbor-joining. Nos échantillons se regroupent avec ceux séquencés précédemment en Allemagne. La branche du variant Eta qui a évolué à partir du clade B.1 est visible sur l'arbre phylogénétique.

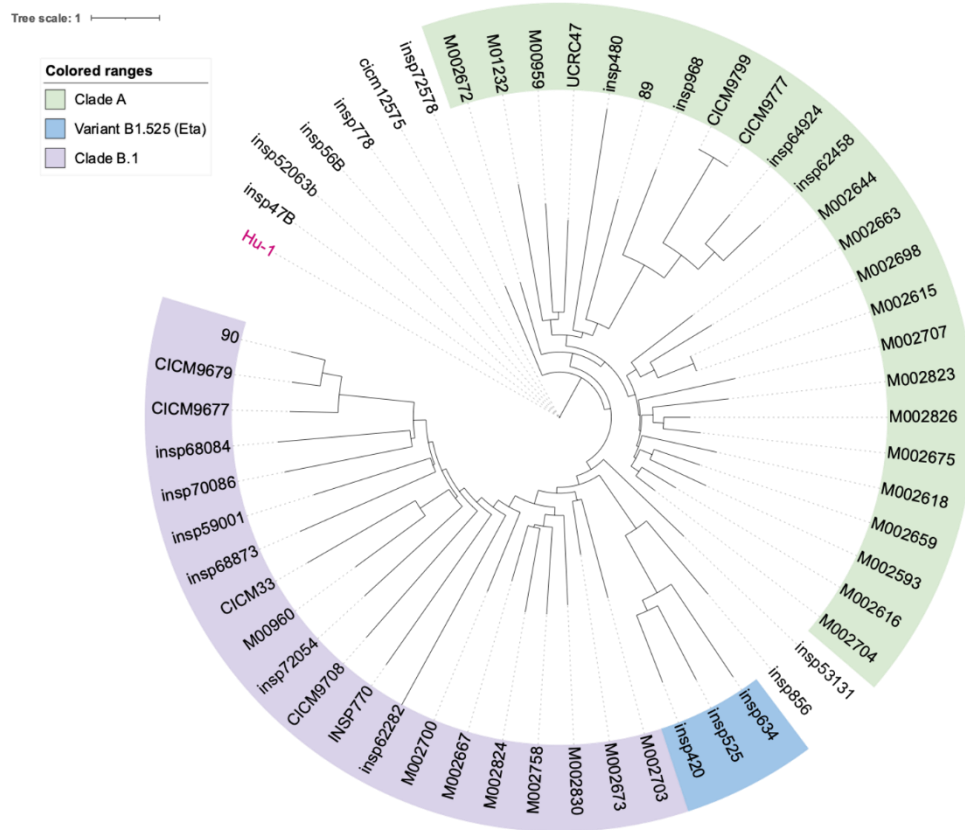


Figure 13: Arbre phylogénétique des échantillons de SARS-CoV-2

A part le variant A.21 tous ces variants ont été introduits au Mali : A.1 (Amérique/Russie) ; A.27 (Danemark/Mayotte) ; B (Hubei/Chine) ; B.1 (Europe), B.1.525 (Royaume Uni/Nigeria) ; B.39 (Afrique du Sud) ; A.21 (Mali/Burkina Faso).

Tous ces variants détectés au Mali appartiennent à la classe des variants sous surveillance ou en évaluation.

Ces résultats sont des preuves de l'introduction multiple de SARS-CoV-2 au Mali.

6-les mutations notables détectées

Certaines mutations sont connues comme étant associées à un changement de caractères chez le virus. Ce qui rend moins efficaces les stratégies de lutte. Ces mutations ont été nommées mutations notables non spécifiques. Nous avons évalué la prévalence de certaines de ces mutations dans nos échantillons. Nous avons également identifié les mutations communes avec les variants préoccupants (Tableau XIII).

Le tableau XIII illustre les prévalences des mutations notables détectées dans notre étude et leurs présences sur la liste des variants classés préoccupants par l’OMS. Ces mutations occupaient 6,2% sur le génome. Le reste du génome était occupé par des mutations à surveillance ou en évaluation (93,8%).

Tableau XIII: Prévalences des mutations notables non spécifiques

Mutations notables non spécifiques	Nombre (%)	Partagées avec les variants préoccupants
D614G	16 (2,5%)	Delta
E484K	3 (0,4%)	Beta, gamma
N501Y	1 (0,2%)	Alpha, gamma
H69/70V	2 (0,3%)	Alpha
L452R	6 (0,9%)	Delta
P681H	1 (0,2%)	Alpha
L18F	1 (0,2%)	Alpha, beta, gamma
H655Y	1 (0,2%)	Alpha, gamma
L84S	8 (1,3%)	
Autres mutations	585 (93,8)	
Total	624 (100%)	

VI. Commentaires et Discussion

La difficulté d'accès aux réactifs durant la pandémie a été un défi pour pouvoir générer les premières séquences. A cause de ces pénuries de réactifs et de matériels nous avons apporté des modifications à certaines étapes du protocole de préparation de la librairie pour générer les premiers génomes de SARS-CoV-2 au Mali.

Malgré les obstacles pour exécuter correctement le protocole, nous avons continué à séquencer avec les moyens qui étaient disponibles après les deux premiers échantillons. Au cours de l'étude nous avons pu avoir accès aux matériels et réactifs manquants. La taille de l'étude a pu être étendue à vingt-neuf (29). Cette étude montre qu'avec la volonté et l'urgence sanitaire un laboratoire peut servir à d'autres fins que sa spécialité. Avant les échantillons étaient envoyés à l'étranger pour séquençage avec confrontation à plusieurs difficultés : dégradation de qualité, retard des résultats...). Nous espérons que cette étude sera une source de motivation pour d'autres pays à ressources limitées.

Une surveillance préliminaire portant seulement sur les échantillons de la première vague de l'épidémiologie génomique de SARS-CoV-2 avait été menée au Mali par Kouriba et al.[11]. Depuis ce temps jusqu'à ce jour de nouveaux cas sont toujours détectés. C'est dans ce contexte de manque de données sur l'épidémiologie de SARS-CoV-2 englobant les échantillons des vagues de la pandémie que nous nous sommes proposer de mener localement cette étude d'épidémiologie de SARS-CoV-2 au Mali afin de suivre l'évolution, identifier les variants circulants, retracer le schéma de propagation géographique du virus afin de s'assurer de l'efficacité des stratégies de lutte employées au Mali.

Les échantillons de chaque vague de la pandémie sont représentés dans notre étude avec 13,8% pour la première vague, 65,5% pour la deuxième vague et 20,7% pour la troisième vague. Dans notre étude le sexe masculin était le plus représenté avec 65,5%. Ces résultats diffèrent de ceux d'une étude menée par l'institut belge de l'égalité des femmes et des hommes. Cette différence pourrait s'expliquer par la petite taille de notre étude[76], [77].

La majorité de nos cas avait un âge supérieur à quarante-ans avec un intervalle d'âge entre 18-79 ans et un âge médian de quarante-un (41) ans. Ces résultats sont comparables à ceux observés par Dhama Kuldeep et al. en Inde montrant la prévalence élevée de la COVID-19 chez les personnes âgées [2].

Comparé à la souche de référence de Wuhan nous avons observé six-cent vingt-quatre (624) polymorphismes chez les échantillons (y compris les deux premiers échantillons) séquencés

localement au Mali durant notre étude, tous étaient dominés par les SNP. Cette prédominance des SNP a été constatée au Mali par Kouriba et al. en 2020, S. Wesley et al. en 2020 en France et par Francine Ntoumi et al. en 2021 au Congo [11], [78], [79].

Les variants sont classés en six groupes en fonction des co-mutations sur le génome[80]. En fonction de nos co-mutations (C241T, A23403G, C3037T, NSP3 : F106, S : D614G, NSP2 : Y537Y, NSP12b :P314L, ORF3a : S216P, ORF3a : T14L, N : Q70R, N : S187L et NSP12b : Y285Y) sur le génome nos échantillons se sont retrouvés entre le groupe 1 et 2 par la présence de ces mutations C3037T, NSP3 : F106T, C14408T, NSP12 : P314L, A23403G, S : D614G. Ces co-mutations ont été observées au Mali par Kouriba et al. en 2020, Fernando Gonzalez-Candelas et al. en 2020, par Francine Ntoumi et al. au Congo en 2021 et par Parnita Majundar et al. en 2021 en Inde [11], [74], [79], [80]. Ces mutations ont été associées à une transmissibilité augmentée, une modification de la conformation de la polymérase ne modifiant pas son activité catalytique mais susceptible d'abroger son interaction avec ses cofacteurs. Cela peut modifier l'interaction entre cette protéine et les médicaments l'ayant comme cible [74], [80]–[82].

Dans notre étude nous avons observé une prévalence de polymorphismes de 28,6% sur les Protéines structurales. Selon une étude menée par l'Institut national d'excellence en santé et services sociaux COVID-19 et par Dhama Khuldeep, les mutations sur ces protéines peuvent impacter sur l'efficacité des stratégies de lutte car elles en sont les cibles de plusieurs stratégies de lutte contre la pandémie [2], [35]. La plupart des anticorps, vaccins et médicaments antiviraux ciblent Les protéines S et N [82]. Les tests de diagnostics sont élaborés en tenant compte de la structure très conservée des protéines M et E [80].

Dans l'ensemble la plus forte prévalence des mutations a été observée sur les protéines non structurales avec en tête la NSP12, NSP3, NSP7 et NSP8. Ces protéines sont indispensables lors de la réplication du virus. Dhama Khuldeep et al. ont montré que les mutations sur ces protéines peuvent impacter sur la transmissibilité, la virulence et l'efficacité des médicaments employés [2].

Dans notre étude nous avons observé une prévalence de polymorphisme non négligeable des protéines accessoires notamment sur les plus grandes ORF3a et ORF8. Helene Banoun et al. ont suggéré que les mutations dans ces régions Orf3a et Orf8 de SRAS-CoV-1 seraient à la base de la réaction inflammatoire secondaire à l'évasion immunitaire [83].

Ces résultats sont la preuve d'une évolution permanente du virus de son introduction de mars 2020 en Avril 2021 et cela a été confirmé par l'analyse phylogénétique.

Sur l'ensemble de nos échantillons (de notre étude et ceux du GISAID) nous avons observé huit (8) variants de SARS-CoV-2 circulant au Mali. Les deux échantillons de Tombouctou appartenaient aux lignées B.1 et A.21. Le variant A (16%) selon Andrew Rambaut et al. est considéré comme la souche étant à l'origine de l'infection de Wuhan[84]. Sur la base de l'analyse avec pangolin le variant A.1 (2%) serait d'origine américaine et de Russie. Le variant A.21 (18%) serait d'origine africaine plus précisément du Mali et du Burkina Faso car les premières séquences sur GISAID provenaient de ces deux pays mais des cas ont été rapportés en France et aux Etats-Unis [85]. Selon European CDC le variant A.27 (2%) a été détecté pour la première fois au Danemark/Mayotte décembre 2020, son impact sur la santé publique est toujours en cour d'évaluation [86]. La lignée B avec ses sous lignées occupaient la plus forte prévalence. La lignée B est le premier haplotype de SARS-CoV-2 (Hubei/Chine)[84] et B.1 sa sous première lignée B.1 découverte en janvier 2020 et originaire d'Europe[75]. Cette sous lignée a été impliquée à l'épidémie de SARS-CoV-2 en Italie et était également la lignée dominante en Afrique plus précisément en Afrique du Sud au début de la pandémie[87], [88]. Notre étude est en accord avec cette observation. La première étude au Mali sur les variants circulants menée par Kouriba et al. a trouvé une prédominance de la lignée A par rapport à B.1. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les échantillons provenaient de la première vague et de la période d'étude (début de la pandémie)[11].

Dans notre étude nous avons obtenu trois cas de variant Eta (B.1.525 : 5%) décrits pour la première fois au Royaume Uni et au Nigeria en décembre 2020 classés d'abord par l'OMS parmi les variants d'intérêts et occupait la plus forte prévalence parmi les échantillons de ce pays en février 2021[51], [89]. Ce variant est actuellement classé parmi les variants sous surveillance. Bien qu'aucun impact du variant Eta soit démontré sur la santé publique néanmoins il possède des mutations qui ont été impliquées à certaines situations inquiétantes comme une infectivité élevée [58].

Nous avons un cas de variant B.39 détecté en Cap Town/Afrique du Sud, Etats-Unis, Royaume-Uni, Australie[90].

La prédominance des échantillons de la première vague par la lignée B apporte une preuve de l'introduction du virus depuis Wuhan puisque cette souche Selon Wesley et al. est considérée

comme sauvage[78], [89]. Pour la lignée B.1 plusieurs études ont trouvé une prévalence élevée de ce variant au cours de la seconde vague telles que Jennifer Giandhari et al. et Madlen Stange et al. [75], [87], [88]. Bien vrai que la lignée B.1.525 soit détectée à la fin de la deuxième vague, sa prévalence a fortement augmentée dans plusieurs pays au cours de la troisième vague[51], [89]. Ces résultats sont les preuves de multiple introduction de SARS-CoV-2 au Mali venant de plusieurs parties du monde.

Dans notre étude nous avons détecté la mutation D614G correspondant au clade G dans la nomenclature GISAID et au clade 20A avec Nextstrain et à la lignée B.1 avec PANGOLIN [74]. Fernando Gonzalez-Candelaset et al. ont remarqué que cette mutation sur la protéine S (D614G) accompagnée par ces comutations (C241T, C3037T et C14408T, NSP12 : P323L) a été associée à un changement de conformation dans la structure de l'ARN polymérase dépendante ne modifiant pas son activité catalytique mais altérant son interaction avec ses corécepteurs et rendant moins efficace les médicaments ayant cette protéine comme cible[11], [74]. Plusieurs études ont trouvé une association entre la mutation D614G et une forte augmentation de la transmissibilité du virus mais pas la gravité. Cette mutation faisait partie des mutations dominantes parmi nos échantillons ce qui est en accord avec plusieurs études dont celle de Wesley et al. montrant la dominance de cette mutation durant la première et la deuxième vague de la pandémie[78]. La majeure partie de nos échantillons provenait de la deuxième vague.

La mutation N501Y était portée notre variant Eta est différente de celle observée dans les variants alpha, beta et gamma. Néanmoins un de nos échantillons non Eta portait cette mutation. Selon la santé publique France et l'OMS, cette mutation augmenterait la contagiosité du virus[51], [75]. Les mutations E484K et L452R portés par le variant Eta avec la mutation E484Q font l'objet d'une surveillance rigoureuse en France jusqu'à l'abandon de la surveillance des variants préoccupants à leur détriment. La raison est le partage de ces mutations avec de nombreux variants[58]. La mutation L452R présente dans Eta située sur le RBD est présente dans plusieurs variants tels le Delta et Kappa et a été associée à une diminution de la sensibilité aux anticorps neutralisants[25], [58]. Quant à la mutation E484K d'Eta est la même que celle présente chez les variants Beta et Gamma. Cette mutation a été associée à une neutralisation réduite des anticorps donc à une diminution de l'efficacité des vaccins[51], [75]. Un de nos échantillons portait la délétion 69H/70V comme dans le variant Alpha. Cette mutation a été décrite pour la première fois au Danemark. Selon Parnita

Majundar et al., Wilfredo F. Garcia-Beltran et al. elle serait associée à une évasion immunitaire donc à une neutralisation réduite des anticorps[80], [91].

Nous avons détecté la mutation P681H présente dans le variant Eta et le variant Alpha. Cette mutation se trouve à proximité du site de clivage des enzymes de type protéase furine qui est un site de certains médicaments antiviraux et étant à la jonction entre la protéine S et la protéase. Nous devons la considérer quant à une possible évasion immunitaire.

Une mutation à la position 28833 (C à T) a été détectée sur le premier échantillon de Tombouctou, qui est localisé dans la cible de l'amorce "Charité_N_R" qui est utilisée pour le diagnostic. Cette mutation peut être à la base des cas de faux négatifs lors des tests de diagnostics.

La mutation L84S est actuellement la troisième mutation dominante après le D614G et le RdRP : P323L. Cette mutation occupait le deuxième rang en termes de dominance dans notre étude. Cette mutation est située sur le gène ORF8 qui est une protéine qui pourrait intervenir dans l'évasion immunitaire et ainsi augmenter la pathogénicité du virus[47], [83].

Nous avons évalué la prévalence des mutations notables non spécifiques dans les variants préoccupants. Au vue de ces résultats nous avons observé que nos échantillons portaient en commun en terme de mutations notables non spécifiques plus de 60% avec les variants Alpha, Beta, Gamma et 25% en commun avec le variant Delta. Ces valeurs sont à considérer car la plupart de ces mutations ont été associées à la neutralisation réduite des anticorps, une transmissibilité augmentée, une efficacité réduite des vaccins, faibles performances des tests de diagnostic et une efficacité réduite des médicaments antiviraux. Une efficacité vaccinale réduite a été rapportée pour le variant Beta par Patricia O Malley et al.. Les variants Alpha, Beta et Gamma ont montré une faible sensibilité aux anticorps monoclonaux par contre sensibles aux anticorps polyclonaux après administration de deux doses de vaccins Moderna et Pfizer [4], [38], [44], [45], [83], [91]–[94]

Dans l'ensemble ces résultats montrent que le virus a été introduit plusieurs fois au Mali et la preuve de son évolution dynamique depuis son introduction le 25mars 2020 jusqu'en avril 2021.

VII. Conclusion

De mars 2020 en avril 2021 nous avons détectés sept (7) variants de SARS-CoV-2 circulants au Mali. Ces variants sont classés par l'OMS parmi les variants à suivre et les variants en cours d'évaluation. Ce pendant nous devons pérenniser la surveillance pour un potentiel changement de caractères ou pour détecter à temps un nouveau variant plus contagieux.

Nous espérons que cette étude sera une source d'inspiration pour les pays africains avec peu de ressources en recherche scientifique que ça soit la COVID-19 ou autre maladie infectieuse.

VIII. Recommandations

Nous formulons les recommandations suivantes :

❖ Aux autorités sanitaires

De prendre des dispositions particulières dans la collection et la conservation des échantillons destinés au séquençage

Faciliter l'accès aux échantillons et aux données sociodémographiques

❖ Au gouvernement

De soutenir les laboratoires universitaires compétents en réactifs, appareils et consommables afin qu'ils participent à l'évaluation épidémiologique.

❖ Aux chercheurs

De continuer la recherche et le suivi épidémiologique sur SARS-CoV-2 pour une meilleure compréhension de la maladie.

IX. Références

- [1] J. Machhi *et al.* “The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections,” *J. Neuroimmune Pharmacol.*, vol. 15, no. 3, pp. 359–386, 2020.
- [2] Dhama Kuldeep. “Update on COVID-19, 10-2020,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 33, no. 4, pp. 1–48, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32580969/>
- [3] Arianne Bonnin. “Caractérisation de la protéine S du coronavirus humain 229E,” pp. 1–169, 2018. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02275786/document>
- [4] V. bonnin *et al.* “COVID-19 : physiopathologie d’une maladie à plusieurs visages,” ScienceDirect, vol. 1–6, no. January, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7250743/>
- [5] Natacha S Ogando *et al.* “SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: Replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology,” *J. Gen. Virol.*, vol. 101, no. 9, pp. 925–940, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32568027/>
- [6] Cherfan Olivier *et al.* “Afrique COVID-19 : Statistiques journalières de la région,” REUTERS. <https://graphics.reuters.com/world-coronavirus-tracker-and-maps/fr/regions/africa/> (consulté le 25 mars 2022)
- [7] OMS. “RAPPORT DE SITUATION COVID-19 AU MALI,” Gouv. la République du Mali/Organisation Mond. la santé, no. 2005, pp. 1–8. https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/mali_sitrep_covid-19_n180_du_02_janvier_2022.pdf (consulté le 25 mars 2022)
- [8] Banque Mondiale. “Recession économique mondiale due à COVID-19,” 2020. <https://www.banquemondiale.org/fr/news/press-release/2020/06/08/covid-19-to-plunge-global-economy-into-worst-recession-since-world-war-ii>
- [9] FMI. “Reprise : des situations divergentes à gérer,” <https://www.imf.org/fr/Publications/WEO/Issues/2021/03/23/world-economic-outlook-april-2021>.
- [10] Nations-Unies Mali. “Analyse rapide des impacts socio-économiques du COVID-19 au Mali,” pp. 1–36, 2020. <https://mali.un.org/fr/50195-analyse-rapide-des-impacts-socio-economiques-du-covid-19-au-mali>

- [11] Bourema Kouriba *et al.* “First phylogenetic analysis of malian sars-cov-2 sequences provides molecular insights into the genomic diversity of the Sahel region,” *Viruses*, vol. 12, no. 11, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33147840/>
- [12] Dr. Bitsha-Kitime Dieudonné KABKIA. “Généralités sur le Coronavirus,” *Le parisien*, pp. 1–8. <https://www.lecames.org/wp-content/uploads/2020/05/Communication-G%C3%A9n%C3%A9ralit%C3%A9s-sur-le-Coronavirus.pdf>
- [13] UNS. “Plan Humanitaire COVID--19 Mali,” *Reli. web*, pp. 1–69, 2020. https://www.humanitarianresponse.info/sites/www.humanitarianresponse.info/files/documents/files/mali_plan_covid-19.pdf
- [14] MSF. “Face à la deuxième vague de Covid-19 au Mali, MSF relance ses activités d’urgence à Bamako,” <https://www.msf.fr/communiqués-presse/face-a-la-deuxieme-vague-de-covid-19-au-mali-msf-relance-ses-activites-d-urgence-a-bamako>.
- [15] Swantatran Kumar *et al.* “Morphology , Genome Organization , Replication , and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2,” *Med. Virol. vol.2, 23-31*, vol. 2, pp. 23-31, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7189391/>
- [16] Markus. Hoffmann *et al.* “SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor,” *Cell*, vol. 181, no. 2, pp. 271-280.e8, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32142651/>
- [17] Kim D *al.* “Aperçus du génome, du transcriptome et de l’épitranscriptome du SRAS-CoV-2,” *bioRxiv 2*, 2020. <https://www.epigentek.com/catalog/insights-into-the-sars-cov-genome-transcriptome-and-epitranscriptome-n-40.html?newsPath=20>
- [18] Imane Jamai Amir *et al.* “Covid-19 : virologie, épidémiologie et diagnostic biologique,” *OptionBio*, vol. 619–620, no. Aout 2020, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7378507/>
- [19] Nicolas A. Wong and Milton H. Saier. The sars-coronavirus infection cycle: A survey of viral membrane proteins, their functional interactions and pathogenesis, vol. 22, no. 3. 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33525632/>
- [20] Muhammad A. Shereen *et al.* “COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses,” *J. Adv. Res.*, vol. 24, pp. 91–98, 2020.

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32257431/>
- [21] Rajanish Giri *et al.* Understanding COVID-19 via comparative analysis of dark proteomes of SARS-CoV-2, human SARS and bat SARS-like coronaviruses, vol. 78, no. 4. Springer International Publishing, 2021.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32712910/>
- [22] Frederic Adnet. “On a percé le secret de l’anosmie !,” Newsletter n°30 COVID-19, pp. 1–6.
https://www.sfm.org/upload/30_vieprofessionnelle/4_outils_pro/6_alertessanitaires/faq_covid/NL30.pdf
- [23] Innocent M. Kashongwe *et al.* “Manifestations cliniques de l’infection à Coronavirus SARS-Cov-2 (COVID-19) Clinical characteristics of coronavirus infection disease (COVID-19),” *Ann. Afr. Med*, vol. 2, no. 6, pp. 3685–3693, 2020.
<https://www.ajol.info/index.php/aamed/article/view/210312>
- [24] Ben Hu *et al.* “Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19,” *Nat. Rev. Microbiol.*, no. December, 2019. <https://www.nature.com/articles/s41579-020-00459-7>
- [25] Dominique Stephan *et al.* “Maladie veineuse thromboembolique et COVID-19,” *la Press. Med. Form.* 10.1016/j.lpmfor.2020.08.005, no. January, 2020.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7419249/#:~:text=La%20survenue%20d'un%20C3%A9pisode,suspect%C3%A9e%20et%20le%20bilan%20biologique.>
- [26] Dr FLORENCE *et al.* “Manifestations du Covid-19,” *Rev. Med. Suisse*, vol. 1–3, 2020.
<https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2021/revue-medicale-suisse-723/ophtalmologie-manifestations-du-covid-19>
- [27] Madiha El Jazouly *et al.* “Supplement Letter to the editors Les manifestations cutanées au cours du COVID-19 : état des lieux,” *PanAfrican Med. J.*, vol. 35, no. Supp 2, pp. 2–5, 2020. <https://www.panafrican-med-journal.com/content/series/35/2/132/pdf/132.pdf>
- [28] Sebastian Hantz. “Diagnostic biologique de l’infection à Sars-CoV-2 : stratégies et interprétation des résultats,” *Elsevier Masson SAS*, vol. 1–10, no. January, 2020.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7604167/>
- [29] Jean Luc Gala *et al.* “Méthodes diagnostiques du COVID-19,” no. 1, pp. 228–235,

2020. <https://www.louvainmedical.be/sites/default/files/content/article/pdf/galajl.pdf>
- [30] WHO. “Test de diagnostic de la COVID-19 dans le contexte des voyages internationaux,” vol. 1–5, pp. 1–5, 2020. Iris. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/338097>,
- [31] N. CHERFI. “Covid-19 et grossesse,” *EL HAKIM*, vol. V, pp. 93–97.
- [32] OMS Afrique. “Prise en charge des cas graves et critiques de COVID-19 avec ventilation non invasive ou mécanique vol. 2, 2020. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/332342>
- [33] Secretariat de l’OMS chargés du Programme de DCI et de la Liste des médicaments essentiels (LME), Introduction. “liste de médicaments prioritaires utilisés durant la pandémie de COVID-19 destinée à la douane,”. http://www.wcoomd.org/-/media/wco/public/fr/pdf/topics/nomenclature/covid_19/prioritization-medicines-list-during-covid_19-_v9_wco_fr.pdf?la=fr
- [34] T. Kiran. Raj et al. “C-Phycocyanine De Spiruline Plantesis Inhibe La Nsp12 Requisite Pour La Réplication Du Sras-Cov-2 : Nouvelle Découverte Dans La Silice,” *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 11, no. 9, p. 10, 2020. <https://abeille-marine.com/resources/download/Phycocyanin-modelized-inhibiting-effects-on-Sars-Cov2-Virus-via-nsp12-docking--traduction.pdf>
- [35] INESSS. COVID-19 et Chloroquine / hydroxychloroquine. https://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/COVID-19/Chloroquine_final.pdf
- [36] Unicef. “Messages clés et actions pour la prévention et le contrôle de la COVID-19 dans les écoles,” Educ. dans les situations d’urgence, p. 16, 2020. https://www.unicef.org/media/65846/file/Key%20Messages%20and%20Actions%20for%20COVID-19%20Prevention%20and%20Control%20in%20Schools_French.pdf
- [37] OMS. “MISE À JOUR DE LA STRATÉGIE COVID - 19,” p. 20, 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/strategy-update-french.pdf?sfvrsn=b1cfe48a_2
- [38] Patricia O’Malley. “COVID-19 Vaccine,” *Clin. Nurse Spec.*, vol. 35, no. 2, pp. 62–64, 2021.
- [39] Sally Robertson. “efficace vaccinique du COVID-19 de Moderna contre des variantes

- apparaissantes,” medRxiv, , pp. 1–6, 2021. <https://www.news-medical.net/news/20210208/25371/French.aspx> P
- [40] FDA. “Allergic Reactions Including Anaphylaxis After Receipt of the First Dose of Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine — United States , December 14 – 23 , 2020,” *MMWR*, vol. 70, no. 2, pp. 46–51, 2021. <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/wr/mm7002e1.htm>
- [41] Australian Government. “Informations sur le vaccin AstraZeneca contre le COVID-19,” *Heal. Information*. <https://www.health.gov.au/sites/default/files/documents/2021/03/covid-19-vaccination-informations-sur-le-vaccin-astrazeneca-contre-le-covid-19-information-on-covid-19-astrazeneca-vaccine.pdf>
- [42] EMA. “Vaxzevria 1: vaccin contre la COVID-19,” *An agency Eur. Union* ©, vol. 1, no. 0, pp. 1–5, 2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-epar-medicine-overview_fr.pdf (consulté le 17 février 2022)
- [43] CHMP. “Annexe I Résumé Des Caractéristiques Du Produit Daratumumab,” pp. 1–35, 2017. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/darzalex-epar-product-information_fr.pdf
- [44] E. Moselle. “Stratégie vaccinale contre la Covid-19 : impact potentiel de la circulation des variants du SARS-CoV-2 sur la stratégie,” pp. 1–33. https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2021-04/strategie_vaccinale_contre_la_covid-19___impact_potentiel_de_la_circulation_des_variants_du_sars-cov-2_sur_la_strategie_synt.pdf
- [45] European Medicine Agency. “Covid-19 Vaccine Moderna,” *20 Enero*, vol. 31, no. 712, pp. 1–3, 2021. [tps://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/covid-19-vaccine-moderna-epar-product-information_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/covid-19-vaccine-moderna-epar-product-information_en.pdf)
- [46] Abanoub Riad et al. “Prevalence of COVID-19 Vaccine Side Effects among Healthcare Workers in the Czech Republic,” *J. Clin. Med.*, vol. 10, no. 7, p. 1428, 2021.
- [47] B. L. Zoppi et E. Henderson. “Clades viral de SARS- CoV - 2,” vol. 2, pp. 1–7, 2019. [https://www.news-medical.net/health/Viral-Clades-of-SARS-CoV-2-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/health/Viral-Clades-of-SARS-CoV-2-(French).aspx),

- [48] European CDC. “mesures de contrôle et de prévention de la diffusion des nouveaux variants du SARS-CoV-2 (VOC 202012/01 et 501Y.V2),”, vol. 6409472916, pp. 1–23, 2009.
file:///C:/Users/USER/Downloads/hcspa20210114_covcondeladifdesnouvarduvir%20(2).pdf
- [49] CDC. “Classifications et définitions des variantes du SRAS-CoV-2,”2021.
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
(consulté le 17 fevrier 2022)
- [50] Talha Burki et al. “Understanding variants of SARS-CoV-2,” *Lancet* (London, England), vol. 397, no. 10273, p. 462, 2021.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33549181/>
- [51] Santé publique France et OMS. “Variants du SARS-CoV-2,” PANGOLin , *Public Health England*, vol. 2, no. 1–15, 2021. <https://www.who.int/fr/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
- [52] PAHO/WHO. “variants of SARS-CoV-2 in the Americas (26 January 2021),”
<http://www.paho.org> • © PAHO/WHO, 2021, no. January, pp. 1–11, 2021.
<https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-sars-cov-2-variants-region-americas-1-december-2021>
- [53] OMS. “Covid-19 : le variant Delta s’est répandu dans 96 pays et l’Alpha dans 172 États (OMS),” *ONU-info 06/2021*.
- [54] Benoit Pilmis et al. “Variants Kappa et Delta du SARS-CoV-2,” *Medecine/Sciences*, vol. 29, no. SPL.1, pp. 25–30, 2013.
https://www.medecinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2013/03/medsci2013291sp25/medsci2013291sp25.html
- [55] OMS. “Classification de l’Omicron (B.1.1.529) : Variant préoccupant du SARS-CoV-2,” [https://www.who.int/fr/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/fr/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern),(consulté le 16 fevrier 2022)
- [56] Wilfredo F. Garcia-Beltran. “mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant,” *CelPress*, no. January, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34995482/>

- [57] Caducee. “Omicron ou B.1.1.529 : le point sur le nouveau variant « préoccupant » du Coronavirus SARS-COV-2,”. <https://www.caducee.net/actualite-medicale/15609/omicron-ou-b-1-1-529-le-point-sur-le-nouveau-variant-preoccupant-du-coronavirus-sars-cov-2.html>(consulté le 17 fevrier 2022)
- [58] Santé publique France. “Analyse de risque liée aux variants émergents de SARS-CoV-2 réalisée conjointement par le CNR des virus des infections respiratoires et Santé publique France,”, pp. 1–12, 2021.
file:///C:/Users/USER/Downloads/analyse_risque_variants_20220126.pdf
- [59] OMS. “Suivi des variants du SARS-CoV-2,”,.
<https://www.who.int/fr/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> (consulté le 17 fevrier 2022)
- [60] M. Pupin. “La génomique,” Infobiogen, pp. 1–6.
- [61] UNIL. “Introduction à la génomique fonctionnelle,” *NCBI*, pp. 1–68.
http://www.unil.ch/dbmv/page26947_en.html 1
- [62] J. VanHelden. “La transmission héréditaire des caractères,” 1901. http://pedagogix-tagc.univ-mrs.fr/courses/BI5U25_biologie_evolutionne/pdf_files/2.1.heredité_dias_6ppf.pdf
- [63] Frederic Raymond. “bio-informatique pour la génomique et le diagnostic des maladies infectieuses,” *Thesis*, pp. 1–258, 2011.
<https://corpus.ulaval.ca/jspui/bitstream/20.500.11794/22524/1/28218.pdf>
- [64] CNRS. “Projet génome humain,”. <http://histoire-cnrs.revues.org/1324?file=1>.
- [65] P. Nyrén et al. “Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay,” *Anal. Biochem.*, vol. 208, no. 1, pp. 171–175, 1993. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8382019/>
- [66] Ecole Doctorale Science de la Vie et Santé ULP. “Polymerase Chain Reaction,” pp. 1–14, 1983. <https://ed414-openlab.unistra.fr/uploads/media/PCR.pdf>
- [67] BIOC. “Génome et séquençage,” pp. 1–52, 2018.
<https://bioc.polytechnique.fr/biocomputing/data/Sequencage.pdf>
- [68] Ahakoud. MOHAMED. “Le sequençage d’acide desoxyribonucléique: principe

- technique, indications medicales et experience du CHU HASSANE II DE FES,” Thesis, pp. 1–160, 2015.
- [69] Frederic Sanguer et al. “Séquençage de l’ADN,” *71*, pp. 1–9, 1977.
- [70] *Elmostafa EL FAHIME et Mustapha ENNAJI*. “L’évolution des techniques de séquençage,” *Biofutur (Puteaux)*, no. 94, pp. 33–37, 1990.
<https://revues.imist.ma/index.php/technolab/article/view/334>
- [71] Stéphane Le Crom. “Le séquençage à haut débit,” 2011.
http://genetique.snv.jussieu.fr/doc2012/120607_SequencageHautDebit.pdf
- [72] Pierre Morisse. “Correction de données de séquençage de troisième génération, HAL, Id : tel-02320413,” 2019. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02320413/document>
- [73] Rapport INRA – CNRS – UEVE, Evry. “La génomique végétale,” *HAL open Sci.*, pp. 1–10, 2019. <https://hal-hceres.archives-ouvertes.fr/hceres-02032200/document>
- [74] Fernando Gonzalez-Candelaset al. “One year into the pandemic: Short-term evolution of SARS-CoV-2 and emergence of new lineages,” *Elsevier*, no. January, pp. 1–22, 2020. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134821001660>
- [75] WHO et GISAIID. “Variants of SARS-CoV-2,” vol. 2, pp. 1–20, 2019.
- [76] ILFH. “La dimension de genre de la crise du covid-19,” pp. 1–8, 2020. https://igvm-iefh.belgium.be/sites/default/files/downloads/nota_over_de_genderdimensie_van_de_covid-19_crisis_fr.pdf
- [77] N. Berrod. “Covid-19 : pourquoi les femmes sont-elles davantage testées positives que les hommes ?,” *Le parisien*, <https://www.leparisien.fr/societe/covid-19-pourquoi-les-femmes-sont-elles-davantage-testees-positives-que-les-hommes-03-10-2021-GRDFPMIO5NHU7OMCIBMIH4YEOQ.php>(consulté le 17 fevrier 2022)
- [78] S. Wesley Long *et al.* “Molecular Architecture of Early Dissemination and Massive Second Wave of the SARS-CoV-2 Virus in a Major Metropolitan,” *ASM, mBio*, vol. 11, no. 6, pp. 1–30, 2020. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.02707-20>
- [79] Francine Ntoumi *et al.* “Genomic surveillance of SARS-CoV-2 in the Republic of Congo,” *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 105, pp. 735–738, 2021.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S120197122100254X>

- [80] Majundar Parinita et al. “SARS-CoV-2 mutations : the biological trackway towards viral fitness,” *Epidemiol. Infect.* 149, e110, 1–8, 2021.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8134885/>
- [81] m Nagy et al. “Different mutations in SARS-CoV-2 associate with severe and mild outcome,” *Int. J. Antimicrob. Agents J. homepage* no. January, 2020.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7755579/>
- [82] Ahmad Abu Turab Naqvi et al. “Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach,” *BBA - Mol. Basis Dis.*, no. January, pp. 1–17, 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32544429/>
- [83] Hélène Banoun_ “volution du SARS-CoV-2 : mise  jour septembre 2020, HAL Id : hal-02930784,” 2020. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02930784>
- [84] Andrew Rambaut *et al.* “A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology” *Nat. Microbiol.*, vol. 5, no. November, 2020.
<https://www.nature.com/articles/s41564-020-0770-5>
- [85] PANgO. “Latest epidemiological lineages of SARS-CoV-2,” 2020. <https://cov-lineages.org/>.
- [86] CDC. “SARS-CoV-2 variant of concern,” 2021.
<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html#:~:text=On%20November%2030%2C%202021%2C%20the,among%20those%20without%20travel%20history.>
- [87] Jennifer Giandhari *et al.* “Early transmission of SARS-CoV-2 in South Africa : An epidemiological and phylogenetic report,” *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 103, pp. 234–241, 2021. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971220323225>
- [88] Madlen Stange *et al.* “SARS-CoV-2 outbreak in a tri-national urban area is dominated by a B . 1 lineage variant linked to a mass gathering event,” *PLOS Pathog.*, pp. 1–20, 2021. <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1009374>
- [89] Egon A. Ozer et al. “High prevalence of SARS-CoV-2 B.1.1.7 (UK variant) and the novel B.1.525 lineage in Oyo State, Nigeria,” ;, vol. 7, pp. 1–21, 2021.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8057251.2/>
- [90] Susan Engelbrecht et al. “Multiple Early Introductions of SARS-CoV-2 to Cape Town,

- South Africa,” *MDPI*, pp. 1–11, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33810168/>
- [91] Wilfredo F. Garcia-Beltran. “Multiple SARS-CoV-2 variants escape neutralization by vaccine-induced humoral immunity Wilfredo,” *Elsevier*, no. mars, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33743213/>
- [92] Hauke S. Hillen. “Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase,” *Nature*, vol. 584, no. 7819, pp. 154–156, 2020. <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2368-8>
- [93] William T. Harvey *et al.* “SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 19, no. 7, pp. 409–424, 2021. <https://www.nature.com/articles/s41579-021-00573-0>
- [94] Markus Hoffmann *et al.* “Camostat mesylate inhibits SARS-CoV-2 activation by TMPRSS2-related proteases and its metabolite GBPA exerts antiviral activity,” *EBioMedicine*, vol. 65, no. Ivm, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7418737/>
- [95] Antoine Dara *et al.* “Sequencing SARS-CoV-2 in a Malaria Research Laboratory in Mali, West Africa: The Road to Sequencing the First SARS-CoV-2 Genome in Mali,” *MDPI*, 2021. <https://www.mdpi.com/2227-9717/9/12/2169>

X. Annexes

10. 1. Denovix RNA assay

Evaluation de la concentration

Réactifs:

Trois tailles de test sont disponibles. Le volume de composants dans chaque kit est suffisant pour 1000, 250 et 50 dosages (taille d'évaluation) respectivement.

Tableau XIV: Denovix RNA assay

Composant	1000	250	EVAL
Denovix RNA assay	1ml	250ul	50ul
quantification dye			
Tampon Denovix RNA assay	250ul	62.5ml	12.5ml
Standard 100ng/ul	ARN, 4x400ul	1x400ul	0.1ml
Standard 0ng/ul	ARN, 2ml	0.5ml	0.5ml

Préparation d'échantillons

1. Laisser toutes les solutions s'équilibrer à température ambiante avant utilisation. Mélanger, puis centrifuger brièvement les flacons avant de les ouvrir pour minimiser la perte de réactif sur le capuchon.
2. Préparer la solution de travail en mélangeant 10 ml de tampon de test avec 50 µL de colorant. Mettre à l'échelle les volumes au besoin pour obtenir un volume suffisant pour aliquoter 190 µL du mélange pour chaque étalon et inconnu.
3. Pour chaque échantillon standard ou inconnu, ajoutez 190 µL de solution de travail dans un tube étiqueté. Ajustez le volume lors de l'ajout de plus ou moins de 10 µL de l'échantillon inconnu.

Remarque: Utilisez des tubes PCR transparents à parois minces de 0,5 ml pour les mesures de

dosage (DeNovix cat # TUBE-PCR-0,5-500 ou équivalent). Étiquetez uniquement le dessus des tubes.

4. Ajouter 10 μL des standards 0 ng / μL , 100 ng / μL et 1 - 20 μL d'échantillons d'ARN inconnus dans les tubes respectifs et bien mélanger. Évitez d'introduire des bulles d'air lors du mélange.
5. Incuber les tubes d'essai à température ambiante pendant 5 minutes. Protéger de la lumière.

Mesures d'échantillons

1. Sélectionnez le test DeNovix ARN sur le fluoromètre Denovix®.
2. Sélectionnez l'option Read Standard.
3. Insérez le tube standard d'ARN de 0 ng / μL , abaissez le couvercle et appuyez sur le bouton Lire le standard.
4. Insérez le tube standard d'ARN de 100 ng / μL , abaissez le couvercle et appuyez sur le bouton Lire le standard
5. Après avoir mesuré les deux standards, procédez à la mesure des échantillons en appuyant sur le bouton Lire les échantillons.

10. 2. Différentes étapes de préparation de la librairie

Dans notre étude nous avons utilisé le protocole TruSeq Stranded Total RNA d'Illumina pour préparer la librairie.

Réactifs: étapes 1-5

- Billes d'élimination d'ARNr (RRB)
- Mélange d'élimination d'ARNr (RRM)
- Tampon de liaison à l'ARNr (RBB)
- Elute, Prime, Fragment High mix (EPH)
- Contrôle de fin de réparation (CTE)
- Mélange réactionnel du premier brin (FSA)
- Mélange réactionnel du second brin (SMM)
- Tampon d'éluion (RSB)

Autres matériels et réactifs indispensables :

- Eau pour PCR (RNase-free water)
- Support magnétique pour 96 puits
- plaque de 96 puits
- 80% ethanol frais
- Superscript IV (Invitrogen)
- RNAClean XP beads (ramener à la température ambiante avant l'utilisation)
- AMPureXP beads (Beckman-Coulter)

10. 2. 1. Étape 1: Déplétion de l'ARN ribosomale (ARNr)

1-Diluer l'ARN avec de l'eau sans RNase à un 10ng/ul soit un volume de 10ul par échantillon concentrer à 100ng ou 200ng ;

2-Ajouter 5 µl de RBB et 5 µl de RRM dans la plaque. Pipetter de haut en bas 10 fois ;

3-Fermer la plaque et mettre dans le thermocycleur et exécuter le programme de dénaturation de l'ARN pré-saisi comme suit :

- Température du couvercle : 100°C
- 68 °C pendant 5 min
- 4°C à l'infini ;

4- Après le temps d'incubation retirer la plaque ou les tubes du thermocycleur et laisser les échantillons sur la paillasse à température ambiante pendant 1 minute ;

5-Melanger le RRB et ajouter 35 µl de billes dans les puits d'une nouvelle plaque ou tube ;

Attention: ne sautez pas cette étape en ajoutant les billes aux échantillons dans l'ancienne plaque. L'ajout de l'échantillon aux billes garantira des performances optimales.

6-Ouvrez la plaque et transférer 20 µl des échantillons de l'ancienne plaque aux puits de la nouvelle plaque correspondant contenant les billes. Pipetter rapidement de haut en bas 10 fois pour bien mélanger ;

7-Incuber à température ambiante pendant 1 minute ;

8-Placer la plaque sur le support magnétique pendant 1 minute : en l'absence de support magnétique approprié nous avons adapté une unité de séparation QuadroMACS (Miltenyi Biotec Ltd., Cat no.130-090-976, Tokyo, Japon) pour toutes les étapes de purification à base

de billes décrites dans le protocole TruSeq (Fig.3). Il faut rappeler que notre étude s'est déroulée dans un centre de recherche sur le paludisme. Le QuadroMACS est un dispositif utilisé dans notre laboratoire pour la séparation des hématies infectées par *Plasmodium*. Nous avons reçu un support magnétique approprié après quelques analyses (deux ou trois). Le reste des échantillons ont été analysés en utilisant ce support.

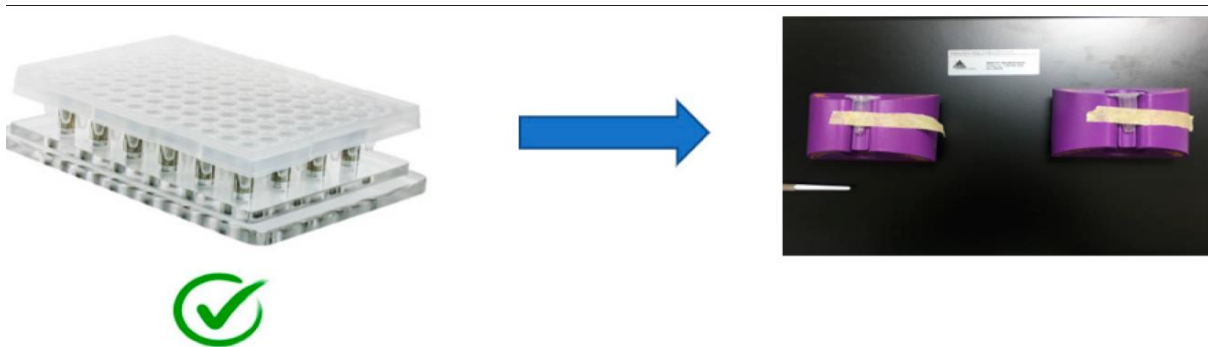


Figure 14: QuadroMACS [95]

9-Transférer le surnageant dans une nouvelle plaque ;

10- Mélanger les billes RNAClean XP pour les remettre en suspension. Ajouter 99 μ l de billes directement aux échantillons d'ARN ribo-appauvri d'en haut. Mélangez doucement en pipettant 10 fois ;

Remarque: Si votre échantillon d'ARN de départ est dégradé, utilisez 193 μ l de billes RNAClean XP ;

11-Centrifuger à 600xg pendant 1min ;

12-Incuber à température ambiante pendant 15 min ;

13-Placer la plaque sur le support magnétique à température ambiante pendant 5 min ;

14-Retirer et jeter le surnageant ;

15-Avec la plaque toujours sur l'aimant, ajouter 200 μ l de l'éthanol 70% (EtOH70%) fraîchement préparé à chaque puits sans déranger les billes ;

16-Incuber pendant 30 secondes, puis jeter le surnageant ;

17-Utiliser une pipette de 20 µl pour éliminer l'éthanol résiduel. Garder la plaque sur l'aimant à température ambiante jusqu'à ce qu'elle soit sèche, généralement 15 minutes. Une fois sèches, les perles apparaîtront mates et craquelées. Retirer la plaque de l'aimant lorsque tous les échantillons sont secs ;

18-Retirer la plaque de l'aimant, ajouter doucement 11 µl de tampon d'éluion dans chaque puits. Bien mélanger en pipetant de haut en bas 10 fois. Assurez-vous de retirer les billes séchées du côté des puits et les remettre en suspension dans le tampon ;

19-Incuber la plaque à température ambiante pendant 2 minutes ;

20-Placer l'échantillon sur l'aimant pendant 2 minutes ;

21-Transférer 8,5 µl du surnageant de chaque puits vers une nouvelle plaque PCR pour continuer avec l'étape 2 ci-dessous ;

-NB : Il y a sensiblement 2,5 µl de surnageant encore dans l'ancienne plaque avec les billes, utilisez-le pour s'assurer de la déplétion de l'ARNr avec le kit RNA high sensitivity. Si l'ARN n'est pas épuisé revenez à l'étape 1 pour recommencer ;

10. 2. 2. Étape 2: Fragmenter l'ARN

Ceci est une étape non-enzymatique et utilise la chaleur et des cations métalliques divalents (magnésium ou zinc) pour fragmenter votre ARN. Si votre ARN de départ a été dégradé, vous pouvez raccourcir la durée d'utilisation du programme Elu2Frag ou ignorer complètement l'étape de fragmentation.

23-Transférer 8,5 µl du surnageant dans la nouvelle plaque PCR ;

24-Ajouter 8,5 µl EPH dans chaque puits. Mélanger en pipetant de haut en bas 10 fois ;

25-Placez les puits dans le thermocycleur et exécutez le programme Elu2Frag comme suit :

- Température du couvercle : 100°C
- 94°C pendant 8min
- 4°C à l'infini ;

26-Retirer la plaque une fois qu'elle atteint 4°C, centrifuger brièvement, puis passer immédiatement aux étapes suivantes ;

10. 2. 3. Étape 3: Synthèse du premier brin de l'ADN

1-Retirer le FSA de -20 ° C et décongeler à température ambiante. Centrifuger ce réactif à 600 x g pendant 5 secondes ;

2-A cette étape on doit ajouter 50 µl de super script II dans le puits de mélange réactionnel. En l'absence de SuperScript II nous avons légèrement modifié le protocole Illumina en le remplaçant par le SuperScript IV (Invitrogen cat. 12594025). Si vous n'utilisez pas tout le puits de mélange, ajoutez du Super Script à un ratio de 1 µl de super script pour chaque 9 µl de réactif First Strand. Par exemple, pour 10 réactions, mélanger 90 µl avec 10 µl de SS II. L'excès de mélange peut être stocké dans le congélateur à -20 ° C ;

3-Ajouter 8 µl de mélange First Strand Super Script à chaque puits contenant l'ARNm :

4-Centrifuger à 600xg pendant 1 min ;

5-Placer la plaque dans un thermocycleur et exécuter le programme «Synthesize 1st Strand» program» :

- Température du couvercle : 100°C
- 25 ° C pendant 10 min,
- 50 ° C pendant 15 min,
- 70 ° C pendant 15 min,
- Maintenir à 4 °C.

Nous avons lancé la réaction avec 50°C qui correspond à la température optimale pour le SuperScript IV au lieu de 42°C (SuperScript II).

10. 2. 4. Étape 4: Synthèse du second brin de l'ADN

Important: lorsque la synthèse du premier brin est terminée, passez immédiatement à la synthèse du deuxième brin

1-Centrifuger le CTE à 600xg pendant 5 secondes ;

2-diluer le CTE 1:50 dans du RSB, par exemple 2 µl CTE+98 RSB ;

3-Ajouter 5 µl de CTE dilué dans chaque puits. Jeter le reste de CTE après utilisation ;

4-Ajouter 5 µl de RSB dans chaque puits ;

5-Centrifuger SMM à 600xg pendant 5 secondes ;

6-Ajouter 20 µl de SMM. Pipetter de haut en bas 10 fois ;

7-Centrifuger la plaque à 600xg pendant 30s ;

8-Placer la plaque dans un thermocycleur et exécuter le programme «2nd Strand» :

Programme : 16 ° C pendant 1 h, avec le couvercle du thermocycleur réglé à 30°C.

10. 2. 5. Étape 5: Purification de l'ADN

1-Lorsque la réaction est terminée, ajouter 90 µl de billes AMPure XP, pipetter de haut en bas 10 fois chaque puits contenant 50 µl d'ADNc double brin.

2-Incuber à température ambiante pendant 15 min.

3-Centrifuger 600xg pendant 1 min

4-Placer la plaque sur l'aimant et laisser reposer 5 min.

5-Retirer et jeter 135 µl par puits, en prenant soin de ne pas déranger les billes.

6-Laver les billes sur l'aimant en ajoutant 200µl de 80% EtOH à chaque puits, sans déranger les les billes et incuber pendant 30 secondes à température ambiante.

7-Retirer et jeter le surnageant, répéter l'étape de lavage et retirer à nouveau le surnageant.

8-Important: utilisez une pipette de 20 µl pour éliminer l'éthanol résiduel du fond du puits

9-Garder la plaque sur l'aimant à température ambiante jusqu'à ce qu'elle soit sèche, pendant 15 minutes. Une fois sèches, les billes apparaîtront mates et craquelées.

10-Retirer la plaque de l'aimant lorsque tous les échantillons sont secs.

11-Ajouter 17,5 µl de RSB dans chaque puits et pipetter de haut en bas 10 fois pour mélanger.

12-Incuber pendant 2 min à température ambiante.

13-Centrifuger à 600xg pendant 1min

Remarque: les billes peuvent être sèches et vous devrez peut être pipetter de haut en bas plus de 10 fois jusqu'à ce que les billes soient entièrement remises en suspension.

14-Placer la plaque sur le support magnétique pendant 5 minutes.

15-Transférer 15 µl du surnageant (contient l'ADNc) dans une nouvelle plaque.

Remarque: il s'agit d'une étape sûre pour s'arrêter. Couvrir la plaque et conserver à -20 ° C jusqu'à l'étape suivante du protocole.

Attention: ne stocker pas l'ADN à ce stade pendant plus d'une semaine. On effectuait généralement le reste du protocole le lendemain.

Étape suivante :

Réactifs

- Mélange réactionnel de l'Adenylation (ATL)
- Tampon d'éluion (RSB)
- Mélange réactionnel de la ligation (LIG)
- Control de l'adenylation (CTA optionnel)
- Control de la ligation (CTL optionnel)
- Indexe des adaptateurs
- Tampon de blocage de la ligation (STL)
- Cocktail d'amorces PCR (PPC)
- Mélange réactionnel pour la PCR (PMM)
- Autres réactifs et matériels indispensables :
- Plaque magnétique pour plateau 96 puits
- Plaque 96 puits
- 80% d'éthanol frais
- Billes AMPureXP (Beckman-Coulter)

10. 2. 6. Étape 6: Adénylation de l'ADNc

1-Centrifuger CTA à 600xg pendant 5 secondes ;

2-diluer CTA : 1 pour 100 dans du RSB par exemple 1 µl CTA+99ul RSB ;

3-Ajouter 2,5 µl de CTA dilué dans chaque puits. Jeter le reste de CTA après utilisation ;

4-Centrifuger ATL 600xg pendant 5 secondes ;

5-Ajouter 12,5 µl de ATL décongelé et 2,5 µl de tampon de RSB dans chaque puits. Pipetter de haut en bas 10 fois ;

6-Réaliser l'adénylation en exécutant le programme thermocycleur 'ATAIL70' suivant :

- Température du couvercle : 100°C
- 37°C pendant 30min
- 70°C pendant 5 min
- 4°C à l'infini

10. 2. 7. Étape 7: Ligaturer les adaptateurs aux extrémités des fragments d'ADNc

1-Centrifuger le CTL à 600xg pendant 5 secondes ;

2-Diluer le CTL 1 pour 100 µl dans du RSB. Par exemple : 1 µl CTL + 99 µl RSB. Jeter le reste de CTL après utilisation ;

3-Enlever le LIG de la conservation (entre -25 à -15°C) ;

4-Ajouter les réactifs suivants dans l'ordre : 2,5 µl de CTL+ 2,5 µl LIG + 2,5 µl RNA adapters ;

5-Pipetter après chaque ajout 10 fois de haut en bas ;

6-Centrifuger à 600xg pendant 1 min ;

Remarque: Retirer le LIG immédiatement avant utilisation et remettez-le à -20 ° C immédiatement après utilisation ;

Important: assurez-vous d'enregistrer quel échantillon a reçu quel numéro d'adaptateur d'index.

7-Sceller la plaque et incuber dans le thermocycleur avec le programme de LIG :

- Température du couvercle : 100°C
- 30°C pendant 10 min
- 4° C à l'infini ;

8-Centrifuger STL 600xg 5 secondes ;

9-Retirer la plaque du thermocycleur et ajouter 5 µl de STL dans chaque puits, bien mélangé en pipettant ;

9-Centrifuger à 600xg pendant 1 min ;

Purification des fragments

1-Ajouter 42 µl de billes AMPure XP à chaque puits, bien mélanger en pipettant (10 fois de haut en bas) ;

2-Incuber à température ambiante pendant 15 min ;

3-Centrifuger à 1800 rpm pendant 1min ;

4-Placer sur le support magnétique pendant 2-5 min à température ambiante ;

5-Avec la plaque sur le support magnétique, retirer et jeter tout le surnageant de chaque échantillon, en prenant soin de ne pas perturber les billes ;

6-Avec la plaque sur le support magnétique, lavé avec 200 µl 80% EtOH pendant 30 secondes, puis éliminer l'éthanol ;

7-Exécutez à nouveau l'étape de lavage ;

8-Utiliser une pipette de 20 µl pour éliminer l'éthanol résiduel. Garder la plaque sur l'aimant à température ambiante jusqu'à ce qu'elle soit sèche, pendant 15 minutes. Une fois sèches, les billes apparaîtront mates et craquelées. Retirez la plaque de l'aimant lorsque tous les échantillons sont secs ;

9-Retirer la plaque du support magnétique et ajouter 52,5 µl de RSB dans chaque puits, et bien mélanger en pipettant ;

10-Incuber à température ambiante pendant 2 min ;

11-Centrifuger à 600xg pendant 1 min ;

12-Placer la plaque sur l'aimant pendant 5 min ;

13-Récupérer 50 µl de chaque puits et transférer dans une nouvelle plaque ;

14-Effectuer un deuxième nettoyage ;

15-Ajouter 50 µl de billes AMPure X mélangées à chaque puits, bien mélangé ;

16-Incuber pendant 15 min à température ambiante ;

17-Centrifuger à 600xg pendant 1min ;

- 18-Placer la plaque sur le support magnétique pendant 5 min ;
- 19-Avec la plaque sur le support magnétique, retirer et jeter tout le surnageant de chaque échantillon ;
- 20-Avec la plaque sur le support magnétique, laver les billes avec 200µl d'EtOH à 80% pendant 30 s, puis éliminer l'éthanol ;
- 21-Avec la plaque sur le support magnétique, laver à nouveau les billes avec 200µl d'EtOH à 80% pendant 30 s, puis éliminer l'éthanol ;
- 22-Utiliser une pipette de 20 µl pour éliminer l'éthanol résiduel ;
- 23-Garder la plaque sur l'aimant à température ambiante jusqu'à ce qu'elle soit sèche, pendant 15min. Une fois sèches, les billes apparaîtront mates et craquelées. Retirer la plaque de l'aimant lorsque tous les échantillons sont secs ;
- 24-Remettre en suspension les billes dans 22,5 µl de re-suspension buffer, bien mélanger en pipettant ;
- 25-Incuber 2 min à température ambiante ;
- 26-Centrifuger à 600xg pendant 1mn ;
- 27-Transférer la plaque sur le support magnétique et incuber pendant 5 min ;
- 28-Récupérer 20 µl de chaque puits et transférer dans une nouvelle plaque ;

10. 2. 8. Étape 8: Amplification/enrichissement de la librairie par PCR

- 1-Placer les plaques sur la glace ;
- 2-Ajouter 5 µl de PPC ;
- 3-Ajouter 25 µl de master mix PCR à chaque puits ;
- 4-Centrifuger à 600xg pendant 1mn ;
- 5-Mettre la plaque dans le thermocycleur et exécuter le programme «PCR».

Programme:

- Température du couvercle : 100°C
- 98°C pendant 10 secondes
- 60°C pendant 30 secondes

- 72°C pendant 30 secondes
- Revenez à l'étape 2 14fois
- 72°C pendant 5min
- 4°C à l'infini ;

Lavage

6-Centrifuger à 600xg pendant 1mn ;

7-Ajouter 50 µl de billes AMPure Xbeads dans chaque puits et bien mélangé en pipettant ;

8-Incuber 15 min à température ambiante ;

9-Centrifuger 600xg pendant 1mn ;

10-Placer la plaque sur l'aimant pendant 5 min ;

11-Retirer et jeter tout le surnageant de chaque puits ;

12-Laver les billes avec 200ul d'EtOH 80%, attendre 30s, retiré le surnageant ;

13-Répétez l'étape de lavage à l'éthanol ;

14-Utilisez une pipette de 20 µl pour éliminer l'éthanol résiduel. Gardez la plaque sur l'aimant à température ambiante jusqu'à ce qu'elle soit sèche, pendant 15 minutes. Une fois sèches, les perles apparaîtront mates et craquelées. Retirez la plaque de l'aimant lorsque tous les échantillons sont secs ;

15-Retirer la plaque du support magnétique ;

16- Ajouter 32,5 µl de RSB et bien mélanger en pipettant, et incuber pendant 2 min à température ambiante ;

17-Centrifuger à 600xg pendant 1mn ;

18-Remettez la plaque sur le support magnétique pendant 5 minutes ;

19-Transferer 30 µl de surnageant de chaque échantillon et le déplacer dans une nouvelle plaque. Il s'agit du produit d'ADNc final.

10. 2. 9. Evaluation de la concentration et de la qualité des fragments

La taille des fragments et leur concentration sont des paramètres indispensables pour la normalisation et le regroupement des échantillons. Au début de l'étude, on manquait de réactifs pour l'appareil Agilent 2100 Bioanalyzer. Nous avons utilisé un gel d'agarose pour

estimer la taille de notre librairie. En bref, 2 µl de la librairie ont été chargés en utilisant le colorant de chargement NEB (Cat: NEB # B7025), qui a été sélectionné car il ne faisait pas d'ombre sur le gel contrairement au colorant bleu de bromophénol. L'image du gel a été visualisée et enregistrée sous forme de fichier JPEG. L'image a ensuite été analysée à l'aide du logiciel ImageJ, qui est un outil d'analyse de gel. Après l'acquisition de notre commande de réactifs nous avons exécuté correctement le programme comme indiqué par le protocole en utilisant l'appareil Bioanalyzer 2100 d'Agilent pour mesurer la taille des librairies. Le fluoromètre Denovix a été utilisé pour déterminer la concentration de la librairie. Les acides nucléiques absorbent à 260 nm, une absorption supérieure à 280 nm affirme la pureté de la préparation. Les échantillons concentrés sont attendus aux alentours de 300 pb.

10. 2. 9. 1. Agilent DNA assay

Tableau XV: Agilent DNA 1000 Kit

DNA Chips	DNA 1000 Reagents (reorder number 5067-1505)
25 DNA Chips	(yellow) DNA 1000 Ladder
1 Electrode Cleaner	(green) DNA 1000 Markers 15/1500 pb (2 vials)
Syringe Kit	(blue) DNA Dye Concentrate 1 (1 vial)
1 Syringe	(red) DNA Gel Matrix (3 vials)
3 Spin Filters	

Tableau XVI : Spécification physiques

Type	Specification
Analysis time	35 minutes
Samples per chip	12
Sample volume	1 ul
Kit stability	4 months
Kit size	12 samples/chip = 300 samples/kit

Équipements :

- Station d'amorçage des puces
- Mélangeur vortex IKA
- Pipettes (10 µL, 100 µL et 1000 µL) avec embouts compatibles
- Tubes de microcentrifugeuse de 0,5 ml pour la préparation des échantillons
- Microcentrifugeuse.
- Configuration de l'équipement de test et du bioanalyseur :
- Avant de commencer le protocole de préparation de la puce, assurez-vous que l'amorçage de la puce station et le bioanalyseur sont installés et prêts à être utilisés.
- Vous devez :
 - Remplacer la seringue au poste d'amorçage de la puce par chaque nouveau kit ADN ;
 - Régler la plaque de base de la station d'amorçage des copeaux ;
 - Ajuster le clip de la seringue à la station d'amorçage de la puce ;
 - Installer le mélangeur vortex ;
 - Enfin, assurez-vous de démarrer le logiciel avant de charger la puce.

1-Remplacement de la seringue

a-Dévissez l'ancienne seringue du couvercle de la puce station d'amorçage.

b-Retirez l'ancienne seringue du clip. Jeter l'ancienne seringue.

c-Retirez le capuchon en plastique de la nouvelle seringue et insérez-la dans le clip.

d-Faites-le glisser dans le trou de l'adaptateur Luer Lock et vissez étroitement à la station d'amorçage de la puce.

2 -Ajustez la plaque de base

a-Ouvrez la station d'amorçage de la puce en tirant sur le loquet ;

b-A l'aide d'un tournevis, ouvrez la vis en dessous de la plaque de base ;

c-Soulevez la plaque de base et remettez-la en position C. Resserrez la vis ;

3-Ajustez le clip de la seringue

a-Relâchez le levier du clip et faites-le glisser à la position la plus basse.

4-Configuration du bio-analyseur

1-Ouvrez le couvercle du bioanalyseur et assurez-vous que la cartouche d'électrode est insérée dans l'instrument. Sinon, ouvrez le loquet et insérez l'électrode cartouche ;

2-Retirez toute puce restante.

Mélangeur de vortex

IKA - Modèle MS3

1-Pour configurer le mélangeur vortex, réglez le bouton de vitesse à 2400 tr / min ;

Démarrage du logiciel 2100 Expert

Pour démarrer le logiciel:

1-Accédez à votre bureau et double-cliquez sur l'icône suivante.

L'écran du logiciel apparaît dans le contexte Instrument. L'icône dans la partie supérieure de l'écran représente l'instrument-PC actuel.

Protocol :

Préparation du gel dye-mix

1-Laisser le concentré de colorant ADN (bleu) et la matrice de gel ADN (rouge) s'équilibrer à température ambiante pendant 30 minutes ;

AVERTISSEMENT Manipulation du DMSO

- Les composants du kit contiennent du DMSO. Parce que le colorant se lie aux acides nucléiques, il devrait être traité comme un mutagène potentiel et utilisé avec les soins appropriés.
- Portez une protection pour les mains et les yeux et suivez les bonnes pratiques de laboratoire lors de la préparation et lors de la manipulation des réactifs et des échantillons.
- Manipulez les solutions avec une prudence particulière car le DMSO est connu pour faciliter l'entrée de molécules organiques dans les tissus.

2-Vortexer le concentré de colorant ADN à coiffe bleue

(Bleu) pendant 10 secondes et tourner vers le bas. Assurez-vous que le DMSO est complètement décongelé.

3-Pipeter 25 μ L de colorant à capuchon bleu concentré (bleu) dans un ADN coiffé de rouge flacon de matrice de gel (rouge). Stocker le colorant concentré à nouveau à 4 ° C dans l'obscurité ;

Boucher le tube, vortexer pendant 10 secondes. Inspectez visuellement le bon mélange de gel et teinture ;

5-Transférez le mélange gel-colorant dans le réceptacle supérieur d'un filtre rotatif.

6-Placez le filtre centrifuge dans une micro-centrifugeuse et faites-le tourner pendant 15 min dans la pièce température à 2240 g \pm 20% (pour la micro-centrifugeuse Eppendorf, cela correspond à 6000 tr / min).

7-Jeter le filtre conformément aux bonnes pratiques de laboratoire. Étiquetez le tube et inclure la date de préparation.

Chargement du mélange gel-colorant

REMARQUE Avant de charger le mélange gel-colorant, assurez-vous que la plaque de base de la station d'amorçage est montée.

1-Laisser le mélange gel-colorant s'équilibrer à température ambiante pendant 30 minutes avant utilisation. Protégez le mélange gel-colorant de la lumière pendant ce temps ;

2-Sortez une nouvelle puce de son sac scellé et placez le puce sur la station d'amorçage de la puce ;

3-Pipeter 9 μ l du mélange gel-colorant au bas du bien marqué ;

4-Réglez la minuterie sur 60 secondes, assurez-vous que le piston est positionné à 1 ml puis fermez la station d'amorçage de la puce. Le verrou du loquet cliquera lorsque la station d'amorçage est correctement fermée en position (C) et le clip réglable est réglé sur la position la plus basse.

REMARQUE : lors du pipetage du mélange gel-colorant, veuillez à ne pas aspirer de particules dans le fond du flacon de mélange gel-colorant. Insérez la pointe de la pipette au fond du puits de puce lors de la distribution. Cela empêche la formation d'une grande bulle d'air sous le mélange gel-colorant. Placer la pipette au bord du puits peut conduire à de mauvais résultats

5-Appuyez sur le piston de la seringue jusqu'à ce qu'il sonne par le clip ;

6-Attendez exactement 60 secondes, puis relâchez le piston avec le mécanisme de libération du clip ;

7-Inspectez visuellement que le piston recule d'au moins jusqu'à la marque de 0,3 ml ;

8-Attendez 5 secondes, puis retirez lentement le piston à la position 1 ml ;

9-Ouvrez la station d'amorçage de la puce ;

10-Pipeter 9 μ l du mélange gel-colorant dans chacun des puits marqué.

Chargement du marqueur

-Pipetter 5 μ L de marqueur ADN à capuchon vert (vert) dans le puits marqué du symbole de l'échelle et dans chacun des 12 puits d'échantillonnage.

Remarque : Protégez le mélange gel-colorant de la lumière. Conservez le mélange gel-colorant à 4 ° C lorsqu'il n'est pas utilisé pendant plus d'une heure ;

Chargement du marqueur et des échantillons

Remarque : ne laissez aucun puits vide, sinon la puce ne fonctionnera pas correctement. Ajouter 5 μ L du marqueur ADN (vert) plus 1 μ L d'eau dés-ionisée dans chaque puits d'échantillon inutilisé.

Chargement de l'échelle et des échantillons

-Pipeter 1 μ l du flacon échelle à bouchon jaune dans le puits marqué de l'échelle ;

-Dans chacun des 12 puits d'échantillon, pipette 1 μ l d'échantillon (puits usagés) ou 1 μ l d'eau désionisée (puits inutilisés) ;

-Réglez la minuterie sur 60 secondes ;

-Placez la puce horizontalement dans l'adaptateur du mélangeur vortex IKA et assurez-vous de ne pas endommager le renflement qui fixe la puce pendant le vortexage ;

-Mélanger pendant 60 secondes à 2400 tr / min ;

Assurez-vous que l'analyse démarre dans les 5 minutes.

Remarque : pour des résultats optimaux, les échantillons doivent avoir un pH de 6 à 9 et ne doivent pas avoir de contenu ionique supérieur à deux fois celui d'un tampon PCR typique.

Réduisez la vitesse de vortex à 2000 tr / min!

10. 2. 9. 2. Denovix DNA assay

Le test DeNovix[®] dsDNA large gamme permet la détection précise d'échantillon d'ADN double brin purifié (ADNdb) avec une plage de détection standard de 2 à 2000 ng de masse totale dans des volumes de 200 µL. Cela équivaut à des concentrations d'échantillons de 0,1 à 2000 ng / µL lors de l'utilisation de 1 à 20 µL de volumes d'échantillon dans un volume de dosage total de 200 µL. La limite de détection supérieure peut être étendue à 4000 ng / µL en ajoutant 1 µL d'un échantillon de 4000 ng / µL à 199 µL de réactif de travail.

Réactifs:

Trois tailles de test sont disponibles. Le volume de composants dans chaque kit est suffisant pour 1000, 250 et 50 dosages (taille d'évaluation) respectivement.

Les composants sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Tableau XVII: Kit Denovix dsDNA Broad Range

Component	1000	250	EVAL
DeNovix dsDNA Broad Range Dye (100x)	2 x 1 ml	0.5 ml	100 ul
DeNovix dsDNA Broad Range Buffer	250 ml	50 ml	10 ml
DeNovix dsDNA Broad Range Enhancer (100x)	2 x 1 ml	0.5 ml	100 ul
200 ng/µL dsDNA Standard (calf thymus)	2 ml	1 ml	0.5 ml
0 ng/µL dsDNA Standard	2 ml	1 ml	0.5 ml

Protocole de test

1. Laisser toutes les solutions s'équilibrer à température ambiante avant utilisation.
2. Mélanger, puis centrifuger brièvement les flacons avant de les ouvrir pour minimiser la perte de réactif sur le capuchon.
3. Préparer la solution de travail en mélangeant 10 ml de tampon de test avec 100 µL du colorant et 100 µL de l'amplificateur.
4. Mettre à l'échelle les volumes au besoin pour obtenir un volume suffisant pour aliquoter 190 µL du mélange par étalon et inconnu à mesurer.
5. Pour chaque échantillon standard ou inconnu, ajoutez 190 µL de solution de travail dans un tube ou un micro-puits étiqueté. Ajustez le volume lors de l'ajout de plus ou moins de 10 µL de l'échantillon inconnu.
6. Ajouter 10 µL des standards 0 ng / µL et 200 ng / µL et 1 à 20 µL d'échantillons d'ADN inconnus dans les tubes respectifs et bien mélanger.
7. Incuber les standards et les échantillons à température ambiante pendant 5 minutes.
8. Générez la courbe standard, puis mesurez les échantillons en utilisant la source d'excitation et les filtres d'émission appropriés.

10. 2. 10. Normalisation, regroupement et dénaturation

Après avoir obtenu la taille avec l'Agilent 2100 et la concentration en nanogramme par microlitre avec le Denovix, l'étape suivante est la normalisation des concentrations pour regrouper les échantillons et ensuite la dénaturation

Les bibliothèques ont été quantifiées et normalisées avec de l'eau ultrapure sans nucléase

Réactifs :

- NaOH
- Laboratory grade water
- HT1
- phix

Nous avons utilisé la formule suivante pour obtenir la concentration en nanomolaire :

$$[\text{nM}] = [\text{ng}/\mu\text{l}] \times 10^6 / 660 \times \text{la taille du fragment}$$

10. 2. 10. 1. Normalisation de la bibliothèque à 4nM

On ramène la concentration de chaque bibliothèque à 4nM pour pouvoir regrouper les échantillons, pour cela on applique la formule de dilution ou de l'équivalence suivante :

$$C1V1=C2V2$$

C1 : concentration initiale

C2 : concentration initiale

V1: volume initial

V2: volume final

10. 2. 10. 2. Regroupement des échantillons

Après la dilution on pipette 5ul de chaque librairie 4nm dans un seul tube, mélanger bien avec la pipette et vortexer.

10. 2. 10. 3. Dénaturation

On dénature avec une solution fraîchement préparé de NaOH 0,2N qui consistait à prendre 960ul de nucléase free water plus 40ul de NaOH 5N.

Protocol:

1-Combinez les volumes suivants d'échantillon d'ADN et de NaOH 0,2 N fraîchement dilué dans un tube de microcentrifugeuse:

- Échantillon d'ADN de 4 nM (5 µl)
- NaOH 0,2 N (5 µl) ;

2-Jeter la dilution restante de NaOH 0,2 N ou mettre de côté pour préparer un contrôle PhiX dans les 12 prochaines heures ;

3-Vortexer brièvement pour mélanger l'échantillon, puis centrifuger à 280 xg pendant 1 minute ;

4-Incuber pendant 5 minutes à température ambiante pour dénaturer l'ADN en un seul brin ;

5-Ajoutez le volume suivant de HT1 décongelé sur glace dans le tube contenant l'ADN dénaturé:

- ADN dénaturé (10 µl)

- HT1 pré-réfrigéré (990 µl)

Il en résulte une librairie dénaturée de 20 pM dans NaOH 1 mM ;

6-Placez l'ADN dénaturé sur de la glace jusqu'à ce que vous soyez prêt à procéder à la dilution finale.

Pour la dilution finale dans la majorité des cas nous avons dilué à 10pM qui consistait à prendre 300ul de 20pM plus 300 HT1 (pour plus de précision se référer à Illumina system denature and dilute librairies guide) ce qui nous donne une solution de 600ul à 10pM. Ensuite on enlève 30ul, on jette et on ajoute 30ul du control positif phix normalisé avec 2ul de phix+3ul de nucléase free water. Ensuite dénaturé et dilué de la même manière que les échantillons.

10. 3. Fiche signalétique

Nom : DAOU

Prénom : Amadou

Nationalité : malienne

Année de soutenance : 2020-2021

Pays : Mali

Lieu de dépôt : bibliothèque de la faculté de pharmacie

Secteur d'intérêt : Virologie, Bioinformatique, Génomique, Santé publique

Titre : Epidémiologie génomique de SARS-CoV-2 au Mali

Introduction

Les techniques de séquençage combinées à la bio-informatique jouent un rôle très important dans la gestion de la pandémie du COVID-19. Ces techniques ont permis de détecter les nouveaux variants et d'assurer la mise en place de meilleures stratégies de lutttes. Le Mali a enregistré son premier cas de COVID-19 en mars 2020. Le système de surveillance doit demeurer au fur et à mesure que la pandémie évolue. Une première étude de surveillance génomique de SARS-CoV-2 avait été menée au Mali renfermant seulement les échantillons

de la première vague. De nouveaux cas de COVID-19 sont toujours enregistrés partout dans le monde avec de nouveaux variants. Cependant, jusqu'à présent, les capacités locales de séquençage de SARS-CoV-2 sont limitées. De ce fait, les informations sur les variants circulants au Mali durant les premières vagues de la pandémie sont manquantes. C'est dans cette optique que nous nous sommes proposés de mener localement une étude d'épidémiologie génomique de SARS-CoV-2 au Mali dans le but de suivre l'évolution, l'origine géographique et les variants circulants au Mali.

Méthodes

Nous avons mené une étude retro-prospective dans trois laboratoires (INSP, CICM, UCRC) de Bamako et le laboratoire de Tombouctou. L'étude portait sur tous les individus se présentant dans ces sites dans le cadre de la COVID-19. Les échantillons ont été collectés par prélèvement nasopharyngé et oropharyngés. L'extraction de l'ARN a été effectuée par le kit Qiagen. Les extraits ayant une concentration en ARN total entre 100 et 200ng dans un volume de 10µl ont été inclus pour la préparation de la librairie suivant un protocole modifié du kit TruSeq d'Illumina). Nous avons été contraints d'apporter des modifications au protocole à cause de la difficulté d'accès aux réactifs et matériels durant la pandémie. Au début de l'étude nous avons utilisé un support magnétique utilisé pour la séparation de *Plasmodium* en culture cellulaire pour toutes les étapes de purification avec les billes. A défaut de réactifs pour l'appareil Bioanalyzer 2100 Agilent nous avons utilisé un gel d'agarose pour mesurer la taille des fragments. Les librairies ont été normalisées et séquencées sur le MiSeq d'Illumina. Les données de séquences ont été analysées sur le serveur de DELGEME à l'aide des outils bioinformatiques.

Résultats

Selon nos critères nous avons sélectionné cinquante-cinq volontaires, quarante-un (41) échantillons lancés pour séquençage sur MiSeq et obtenir vingt-neuf (29) comme séquences de bonne qualité (assemblées par rapport à la référence). Ensuite nous avons téléchargé vingt-une séquences maliennes déposées sur GISAID plus la référence. Au total, nous avons eu une taille de cinquante séquences (50). Sur l'ensemble des séquences obtenues, nous avons observé un total de sept-cent quarante-cinq (745) polymorphismes avec six-cent vingt-quatre (624) polymorphismes chez les échantillons séquencés au Mali durant notre étude, tous étaient dominés par les SNP. Avec les échantillons téléchargés sur GISAID nous avons détecté huit (8) variants ((A, A.1, A.21, A.27, B, B.1, B.1.525, B.39) de SARS-CoV-2

circulant au Mali avec un seul ayant pour origine possible le Mali ou le Burkina-Faso. Les autres variants détectés étaient tous des cas introduits dans notre pays. Le variant Eta (B1.525) est un variant sous surveillance. Nous avons évalué la prévalence des mutations notables non spécifiques dans les variants préoccupants et au vu de ces résultats, nous avons observé que nos échantillons portaient en commun en terme de mutations notables non spécifiques plus de 60% avec les variants Alpha, Beta et Gamma et 25% en commun avec le variant delta.

Conclusion

Dans notre étude nous avons détectés sept (7) variants de SARS-CoV-2 circulants au Mali. Ces variants sont classés par l'OMS parmi les variants à suivre et les variants en cours d'évaluation. Cependant, nous devons pérenniser la surveillance génomique pour détecter à temps de nouveaux variants plus contagieux.

Mots clés : SARS-CoV-2, COVID-19, variants, séquençage, génomique, Mali

Abstract

Title: Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 in Mali

Introduction

Genomic epidemiology plays a very important role in the management of the COVID-19 pandemic. Sequencing genomes has made it possible to detect new variants and ensure the implementation of the better control strategies. Mali recorded its first case of COVID-19 in March 2020. A surveillance system remains crucial as the pandemic evolves. A first genomic surveillance study of SARS-CoV-2 had been carried out on Malian samples only from the first wave. New cases of COVID-19 are still being recorded all over the world with new variants. However, so far local sequencing capabilities of SARS-CoV-2 are limited. As a result, information on the variants circulating in Mali during the first waves of the pandemic is lacking. Therefore, we conducted a genomic epidemiology study of SARS-CoV-2 in Mali with the aim of monitoring the evolution, tracking geographical origins and circulating variants in Mali.

Methods. We conducted a retro-prospective study in three laboratories (INSP, CICM, UCRC) in Bamako and the laboratory in Timbuktu. The study included all individuals presenting to these sites with COVID-19. Samples were collected by nasopharyngeal swab and oropharyngeal. RNA extraction was performed using the Qiagen kit. Extracts with a total RNA concentration between 100 and 200ng in a volume of 10µl were included for the preparation of the library following a modified protocol using the TruSeq kit from Illumina). We made modifications to the protocol because of the difficulty to access to reagents and materials during the pandemic. At the beginning of the study, we used a magnetic device used for the separation of *Plasmodium* from cell culture for all the purification steps using beads. In the absence of reagents for the Agilent Bioanalyzer 2100 instrument, we used an agarose gel to measure our library size. Libraries were normalized and sequenced on the Illumina MiSeq. Sequence data was analyzed on the DELGEME server using bioinformatics tools.

Results. We selected samples from fifty-five individuals, of which forty-one (41) samples were sequenced on a MiSeq instrument. Of the sequenced samples, twenty-nine (29) passed a quality control. In addition to the newly sequenced samples, we downloaded 21 Malian sequences from the GISAID repository. In total, we analyzed sequences (50). Of all the sequences obtained, we observed a total of seven hundred and forty-five (745) polymorphisms with six hundred and twenty-four (624) polymorphisms in the samples sequenced locally in

Mali. Add the sequences of GISAID we detected eight (8) variants ((A, A.1, A.21, A.27, B, B.1, B.1.525, B.39) of SARS-CoV-2 circulating in Mali. The A.21 variant was like a local variant (frequent in Mali and Burkina-Faso). The other variants detected were all cases introduced into our country. The Eta variant (B1.525) is a variant under surveillance. We assessed the prevalence of notable non-specific mutations in the variants of concern. We observed that our samples carried more than 60% in common in terms of notable non-specific mutations with the Alpha, Beta and Gamma variants and 25% in common with the Delta variant.

Conclusion

In our study, we detected seven (7) variants of SARS-CoV-2 circulating in Mali during the first three waves. These variants are classified by the WHO as variants to be monitored and variants under evaluation. However, we must sustain genomic surveillance to detect new variants on time.

Keys words: SARS-CoV-2, COVID-19, variants, sequencing, genomics, Mali.

Serment de Galien

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

Je le jure !