

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

RÉPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple - Un But - Une Foi



U.S.T.T-B



UNIVERSITÉ DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES
TECHNOLOGIES DE BAMAKO (USTTB)

FACULTÉ DE PHARMACIE

THÈSE

Année Universitaire : 2022-2023

Thèse N° :

**DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE LA RAGE HUMAINE
AU CENTRE UNIVERSITAIRE DE RECHERCHE
CLINIQUE (UCRC), BAMAKO, MALI**

Présentée et soutenue publiquement le 26/12/2023 à la Faculté de Pharmacie, Bamako, Mali par :

M. KOUAME SOURALEY EMMANUEL

Pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'État).

JURY

Président : M. Mahamadou DIAKITE, Professeur Titulaire (FAPH)

Directeur : M. Yeya dit Sadio SARRO, Maître de Conférences (FAPH)

Co-Directeur : M. Amadou KONE, Maître de conférences (FST)

Membres : M. Mohamed AG BARAIKA, Maître-Assistant (FAPH)

M. Issa KONATE, Professeur Titulaire (FMOS)

M. Dramane DIALLO, Chercheur (UCRC, USTTB)

**LISTE DES MEMBRES DE L'ADMINISTRATION ET DU CORPS ENSEIGNANT A LA
FACULTÉ DE PHARMACIE ANNEE UNIVERSITAIRE 2022-2023**

➤ **ADMINISTRATION**

Doyen : Boubacar TRAORE, Professeur

Vice-doyen : Sékou BAH, Maître de Conférences

Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur Civil

Agent comptable : Ismaël CISSE, Contrôleur des Finances.

➤ **PROFESSEURS HONORAIRES**

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
3	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
4	Abdoulaye	DABO	Malacologie -Biologie animale
5	Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
6	Mouctar	DIALLO	Parasitologie-mycologie
7	Souleymane	DIALLO N°2	Bactériologie – Virologie
8	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie humaine
9	Ousmane	DOUMBIA	Chimie thérapeutique
10	Boukassoum	HAÏDARA	Législation
11	Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique
12	Alou A.	KEÏTA	Galénique
13	Mamadou	KONE	Physiologie
14	Brehima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
15	Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
16	Saïbou	MAÏCA	Législation
17	Elimane	MARIKO	Pharmacologie
18	Mahamadou	TRAORE	Génétique
19	Sékou Fantamadv	TRAORE	Zoologie
20	Yaya	COULIBALY	Législation

➤ **PROFESSFURS DECEDES**

N°	PRENOMS	NOMS	SPECIALITE
1	Mahamadou	CISSE	Biologie
2	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
3	Moussa	HARAMA	Chimie analytique
4	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
5	Moussa	SANOOGO	Gestion pharmaceutique

➤ **DER: SCIENCES BIOLOGIQUE**

➤ **S ET MÉDICALES**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Professeur	Hématologie
2	Mahamadou	DIAKITE	Professeur	Immunologie-Génétique
3	Alassane	DICKO	Professeur	Santé Publique
4	Abdoulaye	DJIMDE	Professeur	Parasitologie-Mycologie
5	Amagana	DOLO	Professeur	Parasitologie-Mycologie
6	Aldjouma	GUINDO	Professeur	Hématologie. Chef de DER
7	Akory Ag	IKNANE	Professeur	Santé Publique/Nutrition
8	Kassoum	KAYENTAO	Directeur de recherche	Santé publ./ Bio-statistique
9	Ousmane	KOITA	Professeur	Biologie-Moléculaire
10	Issaka	SAGARA	Directeur de recherche	Bio-statistique
11	Boubacar	TRAORE	Professeur	Parasitologie-Mycologie

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Bourèma	KOURIBA	Maître de conférences	Lmmunologie
2	Almoustapha Issiaka	MAÏGA	Maître de recherche	Bactériologie-Virologie
3	Mahamadou S.	SISSOKO	Maître de recherche	Bio-statistique
4	Ousmane	TOURE	Maître de recherche	Santé Publiq/Santé environ.
5	Djibril Mamadou	COULIBALY	Maître de conférences	Biochimie Clinique
6	Djénéba Coumba	DABITAO	Maître de conférences	Biologie-moléculaire

7	Antoine	DARA	Maître de conférences	Biologie-moléculaire
8	Souleymane	DAMA	Maître de conférences	Parasitologie - Mycologie
9	Laurent	DEMBELE	Maître de conférences	Biotechnologie-Microbienne
10	Seydina S. A.	DIAKITE	Maître de conférences	Immunologie
11	Fatou	DIAWARA	Maître de conférences	Epidémiologie
12	Ibrahima	GUINDO	Maître de conférences	Bactériologie Virologie
13	Amadou Birama	NIANGALY	Maître de conférences	Parasitologie – Mycologie
14	Fanta	SANGO	Maître de conférences	Santé publ/Santé commun.
15	Yéya dit Dadio	SARRO	Maître de conférences	Epidémiologie

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Maître-Assistant	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Maître-Assistant	Immunologie
3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Maître-Assistant	Biologie clinique
4	Seydou Sassou	COULIBALY	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
5	Klétigui Casimir	DEMBELE	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
6	Yaya	GOITA	Maître-Assistant	Biochimie Clinique
7	Aminatou	KONE	Maître-Assistant	Biologie moléculaire
8	Birama Apho	LY	Maître-Assistant	Santé publique
9	Dinkorma	OUOLOGUEM	Maître-Assistant	Biologie Cellulaire

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOMS	GRADE	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Assistant	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Assistant	Immunologie
3	Merepen dit Agnès	GUINDO	Assistant	Immunologie
4	Falaye	KEITA	Attaché de Recherche	Santé Publique/Santé Environn.
5	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Assistant	Nutrition
6	Djakaridia	TRAORE	Assitant	Hématologie

➤ **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Rokia	SANOGO	Professeur	Pharmacognosie Chef de DER

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Maitre de Conférences	Pharmacie hospitalière
2	Mahamane	HADARA	Maitre de Conférences	Pharmacognosie

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Bakary Moussa	CISSE	Maitre-Assistant	Galénique
2	Issa	COULIBALY	Maitre-Assistant	Gestion
3	Balla Fatogoma	COULIBALY	Maitre-Assistant	Pharmacie hospitalière
4	Adama	DENOU	Maitre-Assistant	Pharmacognosie
5	Hamma Boubacar	MAÏGA	Maitre-Assistant	Galénique
6	Adiaratou	TOGOLA	Maitre-Assistant	Pharmacognosie

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Assistant	Gestion pharmaceutique
2	Daouda Lassine	DEMBELE	Assistant	Pharmacognosie
3	Sékou	DOUMBIA	Assistant	Pharmacognosie
4	Assitan	KALOGA	Assistant	Législation
5	Ahmed	MAÏGA	Assistant	Législation
6	Aichata Ben Adam	MARIKO	Assistant	Galénique
7	Aboubacar	SANGHO	Assistant	Législation
8	Bourama	TRAORE	Assistant	Législation
9	Sylvestre	TRAORÉ	Assistant	Gestion pharmaceutique
10	Aminata Tiéba	TRAORE	Assistant	Pharmacie hospitalière

11	Mohamed dit Sarmove	TRAORE	Assistant	Pharmacie hospitalière
-----------	---------------------	--------	-----------	------------------------

➤ **DER : SCIENCES DU MEDICAMENT**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Professeur	Pharmacologie
2	Benoit Yaranga	KOUMARE	Professeur	Chimie Analytique
3	Ababacar I.	MAÏGA	Professeur	Toxicologie

1. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Tidiane	DIALLO	Maitre de Conférences	Toxicologie
2	Hamadoun Abba	TOURE	Maitre de Conférences	Bromatologie Chef de DER

2. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Maitre-Assistant	Pharmacie chimique
2	Mody	CISSE	Maitre-Assistant	Chimie thérapeutique
3	Ousmane	DEMBELE	Maitre-Assistant	Chimie thérapeutique
4	Madani	MARIKO	Maitre-Assistant	Chimie Analytique
5	Karim	TRAORE	Maître-Assistant	Pharmacologie

3. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Assistant	Pharmacologie
2	Dalave Bernadette	COULIBALY	Assistant	Chimie analytique
3	Blaise	DACKOUO	Assistant	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOU	Assistant	Pharmacologie
5	Abdourahamane	DIARA	Assistant	Toxicologie
6	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Assistant	Pharmacologie
7	Mohamed El Béchir	NACO	Assistant	Chimie analytique

8	Mahamadou	TANDIA	Assistant	Chimie Analytique
9	Dougoutigui	TANGARA	Assistant	Chimie analytique

➤ **DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

1. PROFESSEUR/DIRECTEUR DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
-	-	-	-	-

2. MAITRE DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Maitre de Conférences	Chimie appliquée
2	Abdoulaye	KANTE	Maitre de Conférences	Anatomie
3	Boubacar	YALCOUYE	Maitre de Conférences	Chimie organique

3. MAITRE ASSISTANT/CHARGE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Mamadou Lamine	DIARRA	Maitre-Assistant	Botanique-Biol. Végét Chef de DER
2	Boureima	KELLY	Maître-Assistant	Physiologie médicale

4. ASSISTANT/ATTACHE DE RECHERCHE

N°	PRENOMS	NOM	Grade	SPECIALITE
1	Seydou Simbo	DIAKITE	Assistant	Chimie organique
2	Modibo	DIALLO	Assistant	Génétique
3	Moussa	KONE	Assistant	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Assistant	Biologie Entomologie

CHARGES DE COURS (VACATAIRES)

N°	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
4	Yacouba M	COULIBALY	Droit commercial
5	Moussa I	DIARRA	Biophysique
6	Satigui	SIDIBÉ	Pharmacie vétérinaire
7	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-embryologie
8	Fana	TANGARA	Mathématiques
9	Djénébou	TRAORE	Sémiologie et Pathologie médicale
10	Mahamadou	TRAORE	Génétique
11	Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

Bamako, le 22 juin 2023



P/Le Doyen PO
Le Secrétaire Principal

Seydou COULIBALY
Administrateur Civil

DEDICACES

À ma mère **Kouame Sita**, qui a toujours veillé sur moi, qui n'a jamais cessé de prier pour moi et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureux, qui a toujours cru en moi, reçoit tout mon amour et ma reconnaissance. Merci Maman, je t'aime !

À mon père **Kouame Yao Alain**, qui m'a appris le sens du travail, le partage, l'honneur, le respect, à qui je dois tout mon parcours, qui m'a donné goût à la santé ; puisse ce travail être une grande satisfaction pour toi papa, ton fils, je t'aime !

À mon frère **Kouame N'Gouan Nathanael**, et à ma sœur **Kouame Amoin Dorcas**, merci pour votre soutien et merci de me rappeler que la famille, c'est le plus important, Merci !!

REMERCIEMENTS

À **Dieu**, Tout Puissant, Créateur du ciel et de la terre, Maître de tout l'univers, pour ta grâce dans ma vie qui se renouvelle chaque jour, pour ton souffle de vie renouvelé en moi chaque jour, pour l'intelligence et la sagesse, pour la santé et la protection et par-dessus tout pour ton grand amour inconditionnel ; que toute la gloire te revienne pour les siècles des siècles. Amen !

À Professeur **Amadou Kone**, qui a accepté de diriger ma thèse, pour m'avoir accueilli au sein de l'unité de la biologie moléculaire, pour avoir participé à ma formation et pour l'expérience que vous m'avez apportée, pour son énergie et son enthousiasme communicatif,

À **Dramane Diallo**, pour chacune de ces heures passées à m'inculquer de nouvelles connaissances, pour la disponibilité dont vous avez constamment fait preuve,

À l'équipe de biologie moléculaire, **Tenin Aminatou Coulibaly, Daouda Keita, Ramatoulaye Diallo**, pour vos conseils précieux durant tout mon travail,

À mes amis du point G, **Fatoumata Toure, Yaguime Kodio Traore, Sanata coulibaly, Armel Gode, Behinan Stephane, Binta Krama, Rokiatou Te Diakité, Philippe Ballou, Mariam A. Koné, Kouassi Ble Solange, Awa Sissoko, Diabate Drissa, Boubacar Cisse**, pour honneur de vous avoir rencontré, pour ce fabuleux voyage plein d'embûches qu'on a gravi avec succès, pour avoir participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail ; le meilleur reste à venir !

A tous mes jeunes du point G, **Bosse Rebecca, Indira Doumbia, Fofana Amadou, Kadidia Samake, Diarrassouba Massita, Yeo Parfait, Yao Sylveste, Ange Axel, Kouame Emmanuel, Michel Ange, Bada Aquilas**, pour tous les services rendus. Je vous souhaite la réussite

À ma communauté, l'**Amicale des Étudiants Ivoiriens (AEI)** au MALI, pour votre fraternité ; Je vous dois ma réussite au Numerus clausus ainsi que les bénéfices qu'elle a engendré dans ma vie ; Un « Merci » serait insuffisant pour vous exprimer ma gratitude,

À l'ensemble de la **14ème promotion** du numerus clausus section pharmacie, pour tous ce cursus universitaire, excellentes carrières à nous !!

Et à **tous ceux** que j'ai maladroitement oublié de citer...

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du jury

Professeur Mahamadou DIAKITE

- ✓ Professeur Titulaire d'Immunologie et de Génétique ;
- ✓ Vice-recteur de l'USTTB ;
- ✓ Directeur Scientifique-Adjoint du Centre Universitaire de Recherche Clinique de l'USTTB ;
- ✓ Responsable du Laboratoire d'Immunogénétique et de Parasitologie au MRTC ;
- ✓ Secrétaire Permanent du Comité d'Ethique de l'USTTB ;

Cher Maître,

Nous vous sommes infiniment reconnaissant d'avoir accepté de diriger ce travail malgré vos nombreuses occupations professionnelles. Nous avons bénéficié de vos enseignements en immunologie qui nous ont motivés dans la recherche. En plus de vos mérites scientifiques, nous gardons de vous l'image d'un homme simple, généreux, humaniste ; disponible et dévoué à ses étudiants. Trouver ici le témoignage sincère de notre profonde reconnaissance et de toute notre gratitude profonde reconnaissance et de notre sincère respect.

À notre Maître et Co-Directeur de thèse
Professeur Amadou KONÉ

- Maître de conférences en Biologie moléculaire et cellulaire de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies (USTTB) de Bamako au Mali ;
- Enseignant-chercheur de Biologie moléculaire et cellulaire à la Faculté des Sciences et Techniques (FST) de Bamako au Mali ;
- Chef d'unité de Biologie moléculaire et cellulaire au Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) à l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB) ;
- Membre certifié en biosécurité et bio sûreté de la Fédération Internationale des Associations de Biosécurité (IFBA) ainsi que de plusieurs associations et organisations dans le domaine de la Biologie et du Génie Génétique ;
- Président de la Commission Nationale d'Organisation de la Fête des Sciences au Mali.

Cher maître,

Permettez-nous, tout d'abord très sincèrement de vous exprimer toute notre reconnaissance en vertu de nous avoir reçu à cœur vaillant au sein de votre brillante unité du laboratoire de Biologie moléculaire de l'UCRC, d'avoir dirigé ce travail malgré vos multiples occupations. Vos qualités scientifiques et humaines font de vous un encadreur modeste et exemplaire. Votre dévouement pour le travail bien fait et l'esprit d'équipe qui vous anime sont des valeurs que nous avons su apprécier en vous et nous aideront à affronter la vie active. Recevez l'expression de notre profonde reconnaissance.

À notre Maître et Directeur de thèse
Professeur Yeya dit Sadio Sarro

- Docteur en Pharmacie ;
- Master en santé publique ;
- Epidémiologiste au Centre de recherche et Lutte contre la Drépanocytose (CRLD) ;
- Chercheur au Centre Universitaire de Recherche clinique (UCRC) ;
- Maître de conférences en Epidémiologie à la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (FMOS).

Cher Maître,

Vous nous faites un très grand honneur en acceptant de juger ce travail ce qui nous offre l'opportunité de vous exprimer notre profond respect et notre très profonde gratitude. Homme de principe, votre simplicité, votre sérénité, votre disponibilité et votre rigueur scientifique font de vous un Maître exemplaire et reconnu de tous. Veuillez agréer, cher Maître, l'expression de notre grande admiration et de notre profonde reconnaissance.

À notre Maître et juge
Professeur Issa KONATE

- Médecin spécialiste en maladies infectieuses et tropicales ;
- Diplômé interuniversitaire d'antibiologie et d'antibiothérapie en Afrique subsaharienne ;
- Professeur Titulaire à la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie ;
- Praticien hospitalier au centre hospitalier universitaire (CHU) du Point G ;
- Secrétaire administratif de la Société malienne des pathologies infectieuses et tropicales (SOMAPIT) ;
- Membre de la Société africaine des pathologies infectieuses (SAPI) ;
- Membre de la cellule assurance qualité de l'USTTB ;
- Membre du groupe de coordination multifactorielle de lutte contre les résistances aux antimicrobiens.

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations. Votre simplicité, votre modestie et votre rigueur dans la recherche scientifique font de vous un homme respecté et admirable. Veuillez accepter cher Maître, nos sentiments d'estime et de profond respect. Je vous prie de recevoir mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail. Veuillez croire en l'expression de ma respectueuse considération.

À notre Maître et juge
Docteur Mohamed AG BARAIKA

- Pharmacien Microbiologiste ;
- Maître-Assistant en Bactériologie -Virologie à la Faculté de Pharmacie ;
- Enseignant-chercheur à l'INSP (Institut National de Santé Publique).

Cher Maître,

Je vous prie de recevoir mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.

Veillez croire en l'expression de ma respectueuse considération.

À notre Maître et juge
Monsieur Dramane Diallo

- Master en Biologie Moléculaire et Immunologie ;
- Doctorant PhD ;
- Chercheur à l'UCRC.

Cher Maître,

C'est un privilège que vous nous accordez en acceptant de juger cette thèse, nous en sommes très honorés. Merci pour vos corrections et suggestions très utiles qui ont permis d'améliorer ce travail. Veuillez trouver ici notre profond respect et nos sincères remerciements.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
AVE	Elution Buffer (tampon d'éluion)
AVL	Viral Lysis Buffer (Tampon de lyse viral)
AW1	Wash Buffer (1) (tampon de lavage 1)
AW2	Wash Buffer (2) (tampon de lavage 2)
BSL3	Bio Safety Levels 3 (Niveau de sécurité 3)
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CIQ	Contrôle Interne de Qualité
Ct	Cycle Threshold (Valeur seuil du cycle)
CVS	Virus du défi standard
DdNTP	didésoxynucléotides terminateurs de chaîne
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Dosage Immuno-enzymatique)
FAO	Organisation des Nation Unies pour l'alimentation et l'agriculture
FAPH	Faculté de Pharmacie
FAT	Immunofluorescence directe
FST	Faculté des Sciences et Techniques
g	Gramme
KBLV	Lyssavirus Kotalahti de la chauve-souris
LCS/LCR	Liquide cérébrospinal/ liquide céphalo-rachidien
LCV	Laboratoire Central Vétérinaire
Ma	Milliampère
mL	Millilitre
NC	Nucléocapside
NGS	Séquençage de nouvelle génération
OIE	Office International des Épizooties
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PPE	Prophylaxie post-exposition
PPrEx	Prophylaxie préexposition
RABV	Rabies Virus (Virus de la Rage)
RFFIT	Test d'inhibition rapide du foyer fluorescent
RIG	Rabies immunoglobulin (Immunoglobulines antirabiques)
RNP	Ribonucléoprotéine
RT	Reverse Transcriptase (Transcriptase inverse)
RT-hnPCR	Hemi-nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne par transcription inverse semi-nichée)
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne par transcription inverse)
RT-qPCR	Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne par transcription inverse en Temps Réel (quantitative))
SMIT	Service des maladies infectieuses et tropicales
SNC	Système Nerveux Central
TBLV	Lyssavirus Taiwanese de la chauve-souris
Tm	Température de dissociation

UCRC	University Clinical Research Center (Centre Universitaire de recherche clinique)
USTTB	Université des Sciences, des Techniques et des Technologiques de Bamako
UV	Ultra-Violet
μL	Microlitre
μM	Micromolaire

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Représentation schématique de la structure du virus de la rage	7
Figure 2: Structure du génome du virus de la rage	7
Figure 3: Analyse phylogénétique des Lyssavirus circulant dans le monde entier	10
Figure 4: Cycle viral du virus de la rage	12
Figure 5: Structure générale du test de flux latéral	15
Figure 6: Etapes du test RFFIT	19
Figure 7: Schéma du génome du Lyssavirus et de la région ciblée par les amorces de la hemi-nested RT-PCR du pan-lyssavirus sur le gène N	16
Figure 8: Kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit.....	30
Figure 9: Kit Bio-Rad iTaq Universal SYBR Green.....	31
Figure 10: Applied Biosystems 7500 Fast	31
Figure 11: Schéma représentant le résultat de la RT-qPCR.....	34
Figure 12: VeritiPro 96-Well Thermal Cycler	35
Figure 13: Diagramme de démarche du choix de nos échantillons.....	39
Figure 14: Diagramme de la répartition des échantillons en fonction du sexe	40
Figure 15: Répartition des patients selon la région administrative du Mali.....	43
Figure 16: Répartition des résultats par RT-qPCR d'août 2022 à novembre 2023.....	49
Figure 17: Répartition des résultats des patients selon la région administrative du Mali	50
Figure 18: Produits de la RT-PCR sur 2 gels d'agarose	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Type des prélèvements nécessaires et techniques mises en œuvre au stade ante-mortem et post-mortem chez l'homme	13
Tableau II: Liste non exhaustive des vaccins antirabiques à usage humain et producteurs dans le monde	21
Tableau III: Liste non exhaustive des immunoglobulines antirabiques à usage humaine et des producteurs dans le monde	22
Tableau IV: Protocoles préexposition recommandés par l'OMS et protocoles alternatifs	23
Tableau V: Régimes prophylactiques post-exposition recommandés par l'OMS et leurs alternatives	24
Tableau VI: programme d'amplification pour la RT- qPCR	33
Tableau VII: Mélange réactionnel pour la RT-PCR	36
Tableau VIII: Programme d'amplification pour la RT-PCR.....	36
Tableau IX : Répartition des patients en tranche d'âge.....	41
Tableau X : Répartition des patients selon le sexe et la tranche d'âge	41
Tableau XI: Répartition des patients selon la profession.....	42
Tableau XII: Répartition des patients selon le prélèvement effectué.....	44
Tableau XIII: Répartition des patients selon le siège de morsure.....	45
Tableau XIV: Répartition des patients selon le motif de diagnostic.....	46
Tableau XV: Répartition des patients selon l'évolution clinique	46
Tableau XVI: Fréquence de la rage chez les patients par la RT-qPCR	47
Tableau XVII: Répartition des résultats par RT-qPCR selon la tranche d'âge des patients ...	47
Tableau XVIII: Répartition des résultats par RT-qPCR selon le sexe des patients	48
Tableau XIX: Répartition des résultats de RT-qPCR selon le type d'échantillon.....	51
Tableau XX : Répartition des résultats de RT-qPCR selon le siège de la morsure	52
Tableau XXI : Répartition des patients selon les motifs d'analyse et les résultats de RT-qPCR	53
Tableau XXII: Répartition des résultats par RT-qPCR selon l'évolution clinique des patients	53

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
2. GENERALITES	5
2.1. Rage.....	5
2.2. Diagnostic biologique du virus de la rage	13
2.3. Traitement	19
2.4. Prevention de la rage humaine	20
3. MATERIEL ET METHODES.....	27
3.1. Cadre et site d'étude	27
3.2. Type et période d'étude.....	27
3.3. Population d'étude.....	27
3.4. Echantillonnage	27
3.5. Collecte des données	28
3.6. Méthodes de laboratoire	28
3.7. Considérations éthiques.....	37
3.8. Analyse des données	37
4. RESULTATS	39
4.1. Résultats globaux	39
4.2. Résultats descriptifs.....	40
4.3. Résultats analytiques	47
5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION	56
5.1. Limites de l'étude.....	56
5.2. Analyses	56
6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	64
6.1. Conclusion.....	64
6.2. Recommandations	65
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	67
FICHE SIGNALETIQUE	72
ANNEXES	75
SERMENT DE GALIEN.....	80

01.

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

La rage humaine est une zoonose virale qui attaque le système nerveux central. Les chiens domestiques sont les principaux responsables de la transmission du virus de la rage aux humains dans près de 99 % des cas. Elle est plus fréquente chez les enfants âgés de 5 à 14 ans. Dès lors que les symptômes cliniques apparaissent, la rage est mortelle dans pratiquement 100 % des cas [1].

Il existe deux formes cliniques de la rage chez l'homme : encéphalique et paralytique. La rage encéphalique (qui représente 80 % des cas) est associée à des épisodes d'agitation ou d'hyperexcitabilité et d'hydrophobie durant lesquels surviennent des contractions spasmodiques des muscles pharyngés lors de la déglutition. La rage paralytique (20 % des cas) se caractérise par une dégénérescence progressive des neurones moteurs inférieurs [2].

Le virus de la rage est transmis lors d'une exposition à la salive d'un animal infecté et par effraction de la barrière cutanée, projection de virus sur des muqueuses, et dans de rares cas, par transplantation d'organe à partir d'un donneur infecté. Après l'exposition au virus, la rage peut être prévenue par la prophylaxie post-exposition (PPE), qui comprend lavage et antisepsie puis l'administration de plusieurs doses de vaccin antirabique, en combinaison avec l'injection d'immunoglobulines antirabiques (RIG) dans les cas les plus graves [3].

On estime à 59 000 par an le nombre de décès humains dus à la rage transmis par les chiens. La majorité des décès se produisent en Afrique et en Asie. L'Asie représente 59,6% du total mondial. En Afrique, on estime à 21 476 le nombre de décès humains dus à la rage transmise par les chiens (36,4% du total mondial) [4]. La vaccination des chiens est essentielle pour limiter ou éliminer la rage humaine. Cette approche est maintenant favorisée par l'association tripartite de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS), de l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Office Internationale des épizooties (OIE) qui envisage l'objectif de l'élimination de la rage humaine transmise par le chien d'ici 2030 [3].

En Afrique de l'Ouest, Au Nigeria, la prévalence de la rage canine a été estimée entre 3 et 28 %, avec de faibles taux de vaccination des chiens de 12 % à 38 %. Au Bénin, 287 décès humains dus à la rage ont été signalés entre 2012 et 2017 [5]. En Côte d'Ivoire, Le nombre de décès dus à la rage a été estimé à 637 décès par an et la mortalité humaine due à la rage a été estimée à 2,61 pour 100 000 [6].

Au Mali, le chien est le principal responsable de la transmission de la rage [7]. D'autres animaux tels que les chats, les bovins, les moutons et les ânes ont également été testés positifs à la rage en utilisant le test de l'immunofluorescence directe (FAT) [7]. Ces dernières années, la rage a provoqué en moyenne 12,6 [IC à 95 % : 8,7–16,5] décès humain par an. Ce nombre de cas est probablement sous déclaré vu le faible niveau de surveillance clinique, et le manque de laboratoire adapté capable de faire le diagnostic de la rage au Mali [7].

Actuellement, d'une part en post-mortem, l'immunofluorescence directe (FAT) représente le gold standard recommandé par l'OMS pour le diagnostic de la rage. Le test est effectué sur des frottis d'impression de tissus cérébraux obtenus en post-mortem. Le tissu cérébral est l'échantillon de référence pour le diagnostic post-mortem de la rage chez l'homme. Cependant, il n'est pas toujours possible de prélever le cerveau en post-mortem pour des raisons du consentement de la famille ou pour des questions d'ordre pratique ou de biosécurité [4].

D'autre part, lorsque le patient est en vie, plusieurs méthodes de laboratoire peuvent être utilisées pour confirmer le diagnostic intra-vitam de rage humaine. Néanmoins, un résultat négatif en intra-vitam n'exclut pas l'infection à la rage. Parmi les techniques en intra-vitam, les techniques de détection moléculaire pour le diagnostic de la rage ont une sensibilité très élevée [4] et sont désormais considérés comme des techniques de routine [8]. Les détections moléculaires peuvent être effectuées à partir des liquides biologiques (salive, liquide cébrospinal, larmes, sérum) et certains tissus (biopsies, incluant des follicules pileux au niveau de la nuque) [8].

A Bamako, le Laboratoire Central Vétérinaire (LCV), possède une expertise dans le diagnostic de la rage animale par l'immunofluorescence directe (FAT) [7]. Chaque pays devrait disposer d'au moins un laboratoire national de référence, capable de procéder au diagnostic de la rage humaine avec les techniques modernes recommandées [4].

Au Mali, peu d'études concernant le diagnostic biologique de la rage humaine ont été effectués. C'est dans cette optique que nous avons entrepris de mettre au Mali, chez l'homme la technique moléculaire de RT-qPCR qui est une technique moderne recommandée.

OBJECTIFS

1. Objectif général

Mettre au point une technique moléculaire pour le diagnostic de la rage humaine chez les cas suspects au Mali.

2. Objectifs spécifiques

- a. Décrire les caractéristiques socio-démographiques et cliniques des cas suspects de rage humaine;
- b. Déterminer la fréquence de détection du virus de la rage provenant des échantillons des cas suspects de rage en utilisant la RT-qPCR;
- c. Confirmer les résultats de la RT-qPCR en utilisant la RT-PCR.

02.

GENERALITES

2. GENERALITES

2.1. Rage

2.1.1 Définitions opérationnelles

- **Le virus de la rage (RABV):** est un virus enveloppé contenant un génome constitué d'acide ribonucléique (ARN) à brin négatif. Il appartient au genre *Lyssavirus* de la famille des *Rhabdoviridae*. C'est un agent neurotrope qui provoque une encéphalite aiguë et progressive. Il est le membre le plus important du genre *Lyssavirus* et est le principal agent étiologique de la rage [9].
- **Un cas suspect de rage humaine:** une personne qui présente un syndrome neurologique aigu dominé par des formes d'hyperactivité ou par un syndrome paralytique. Ces syndromes peuvent inclure l'un des symptômes suivants : aérophobie, hydrophobie, paresthésies ou douleurs localisées, dysphagie, parésies localisées, nausées ou vomissements [4].
- **Un cas probable de rage humaine:** un cas suspect ayant des antécédents avérés de contact avec un animal chez qui la rage est suspectée, probable ou confirmée [4].
- **Un cas confirmé de rage humaine :** un cas suspect ou probable confirmé en laboratoire [4].

2.1.2. Epidémiologie

On estime que la rage tue chaque année plus de 59 000 personnes dans le monde en plus de causer d'énormes pertes d'animaux domestiques malgré l'existence de vaccin spécifique. Elle est répandue sur tous les continents sauf l'antarctique. Principalement, la rage est présente en Afrique, en Asie et en Amérique latine, et environ 40 % des personnes mordues par des animaux suspects de rage sont des enfants de moins de 15 ans [1].

En Afrique, plus de 20 000 personnes meurent chaque année de la rage, mais les données de surveillance sont limitées. Ce chiffre de mortalité est sous-estimé, car la plupart des cas

surviennent dans des zones rurales avec un accès aux soins de santé médiocre et une surveillance limitée [5].

Les épidémies de rage humaine sont notables en Afrique de l'Ouest. En Côte d'Ivoire, 637 décès ont été recensés. Entre juillet 2017 et février 2018, sept des huit cas humains suspects ont été confirmés positifs au Libéria. Sur 144 chiens apparemment sains testés au Ghana, 2 % étaient enragés. Parmi 905 victimes de morsures d'animaux au Sénégal, 88 % ont été infligées par des chiens suspects enragés, mais 5 % des patients n'ont pas reçu de PPE. Au Nigeria, la prévalence de la rage canine a été estimée entre 3 et 28 %, avec de faibles taux de vaccination des chiens de 12 % à 38 %. Au Bénin, 287 décès humains ont été signalés entre 2012 et 2017. Sur 486 animaux suspects au Mali, 93 % étaient enragés. Il n'y a pas de littérature actuelle pour la Guinée, la Gambie et la Guinée Bissau [5].

2.1.3. Structure du virus de la rage

Les *Lyssavirus* sont des virus enveloppés, avec un diamètre de 75 nm et 100-300 nm de long, en forme d'obus ou de balle, contenant un génome constitué ARN simple brin non segmenté, linéaire, de 12 kilo paire de bases, de polarité négative qui code pour cinq protéines structurales dans l'ordre de 3'-N-P-M-G-L-5', notamment : une ARN polymérase ARN-dépendante (ou protéine large, L), une nucléoprotéine (N), une phosphoprotéine (P), une protéine de matrice (M) et une glycoprotéine de surface (G) [10,11].

L'acide ribonucléique (ARN) est encapsidé par la nucléoprotéine N pour former une nucléocapside hélicoïdale dans laquelle chaque protomère N se lie à neuf nucléotides [12].

Le virus de la rage se compose de deux unités fonctionnelles et structurales : une nucléocapside à symétrie hélicoïdale et une enveloppe phospholipidique [4].

L'enveloppe phospholipidique est acquise par bourgeonnement à partir de la membrane cytoplasmique de l'hôte. Elle est recouverte par la glycoprotéine G, et M est situé sous l'enveloppe. N est lié à l'ARN génomique et forme avec P et L la ribonucléoprotéine qui constitue l'unité active de réplication virale [10].

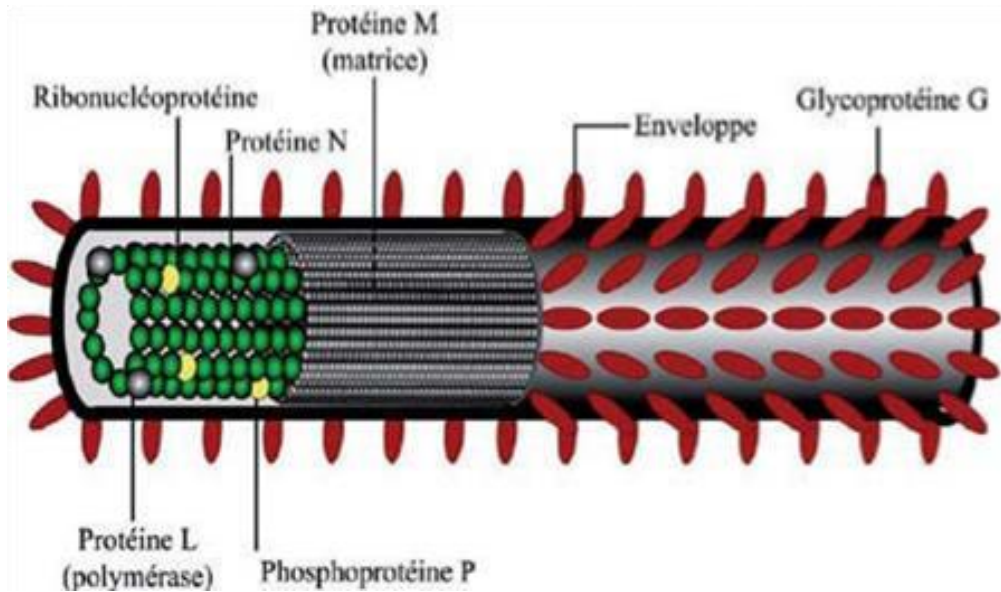


Figure 1: Représentation schématique de la structure du virus de la rage [13]

La protéine G forme des spicules (5–10 nm de long et environ 3 nm de diamètre) comprenant trois ectodomaines glycolysés qui forment des protubérances à travers la membrane du virion et qui servent à l'attachement des virions aux récepteurs de la cellule hôte [4].

La protéine M forme des oligomères qui se lient à l'extérieur de la nucléocapside, donnant sa rigidité structurelle au virion et offrant une plateforme de fixation à la protéine virale G et à la membrane de l'enveloppe [4].

La protéine L possède la plupart des activités d'ARN polymérase. Elle a comme cofacteur, la protéine P [4].

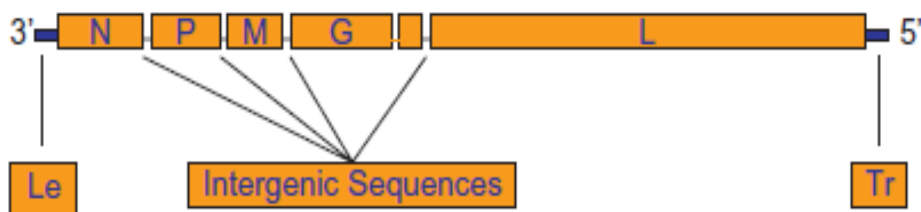


Figure 2: Structure du génome du virus de la rage [14]

2.1.4. Formes cliniques de la rage

Les deux tiers des patients infectés de la rage liée aux chiens présentent la rage furieuse classique (caractérisée par une conscience fluctuante et une modification de l'état mental, des spasmes phobiques ou inspiratoires, et des signes de stimulation autonome). Tandis que le tiers développent une rage paralytique, qui ressemble au syndrome de Guillain-Barré, bien que l'évolution vers le coma, le myoedème, et l'incontinence vésicale différencient clairement ces deux troubles [15,16]

Les patients atteints de la rage liée aux chauves-souris présentent des caractéristiques atypiques, telles que des signes focaux du tronc cérébral, la myoclonie, l'hémichorea et des signes et symptômes du syndrome de Horner. Les crises convulsives et non convulsives et les hallucinations sont fréquentes [15]

Les caractéristiques cliniques de la rage peuvent être divisées en cinq étapes : la période d'incubation, le prodrome, la phase neurologique aiguë, le coma et le décès [15].

2.1.5. Physiopathologie de la rage

Après une exposition, généralement par infiltration de salive contaminée par le virus d'un animal enragé dans une plaie de morsure ou par contact avec une muqueuse, ces virus pénètrent dans les nerfs périphériques, se propagent par le système nerveux périphérique jusqu'à la moelle épinière et montent jusqu'au cerveau. Après cette dissémination dans le système nerveux central (SNC), le virus se propage de manière centrifuge à partir du SNC, le long des nerfs, vers divers organes, dont les glandes salivaires, où il est émis dans la salive et transmis à la victime suivante, généralement par une morsure ou par la contamination de la salive infectée sur une muqueuse [11,17].

La rage est caractérisée par une période d'incubation de 1 à 3 mois mais peut varier de moins d'une semaine à plus d'un an. Sa durée dépend de plusieurs facteurs comme la quantité de virus inoculée, le degré d'innervation du site d'entrée du virus et la proximité de la morsure avec le système nerveux central [18].

Le prodrome dure d'un à dix jours et peuvent inclure de la fièvre, des maux de tête, de l'anxiété et de l'irritabilité. Il a été suggéré que les signes cliniques prodromiques sont liés à la migration

centripète du virus des nerfs périphériques vers les ganglions de la racine dorsale et, enfin, le SNC [19].

Au début de la manifestation de la maladie, des symptômes non spécifiques se manifestent tels que des maux de tête, de l'anxiété, de l'agitation, de la fièvre, et souvent une douleur ou une paresthésie au niveau de la plaie. Au fur et à mesure que le virus se dissémine dans le SNC, la rage aboutit à 2 principales issues : une forme encéphalique (furieuse) ou une forme paralytique (muette) [18].

Les symptômes neuronaux de la maladie sont la salivation excessive, l'excitation, l'agitation, l'agressivité, et un comportement anormal. Le patient a une difficulté à avaler de l'eau et d'autres liquides, il devient aussi très sensible au bruit et craint la lumière. Ces symptômes évoluent généralement vers la paralysie, le coma et la mort [18].

La forme paralytique (30 % des cas humains), se caractérise par une paralysie généralisée. Elle est moins grave que la forme furieuse mais elle est également fatale [18].

2.1.6. Classification du virus de la rage

Les agents étiologiques de la rage sont des virus appartenant au genre *Lyssavirus* au sein de la famille des *Rhabdoviridae*, ordre des *Mononegavirales* [20].

Sur la base des séquences, le genre *Lyssavirus* est divisé en 16 espèces qui sont repartis en trois phylogroupes. Deux nouveaux *Lyssavirus* (*Lyssavirus Kotalahti* de la chauve-souris (KBLV) et *Lyssavirus Taiwanese* de la chauve-souris (TBLV) ont été signalés mais restent à être entièrement caractérisés [21].

Le virus de la rage (RABV), qui est un *Lyssavirus* du phylogroupe 1, est responsable de la grande majorité des cas de rage humaine [4]. Cependant, tous les *Lyssavirus* peuvent infecter tous les espèces mammifères [21].

Il est très probable qu'il y ait une sous-déclaration importante et un manque de reconnaissance des cas humains de rage dus à des *Lyssavirus* non-RABV, en raison de l'absence de typage viral de la plupart des cas humains [2].

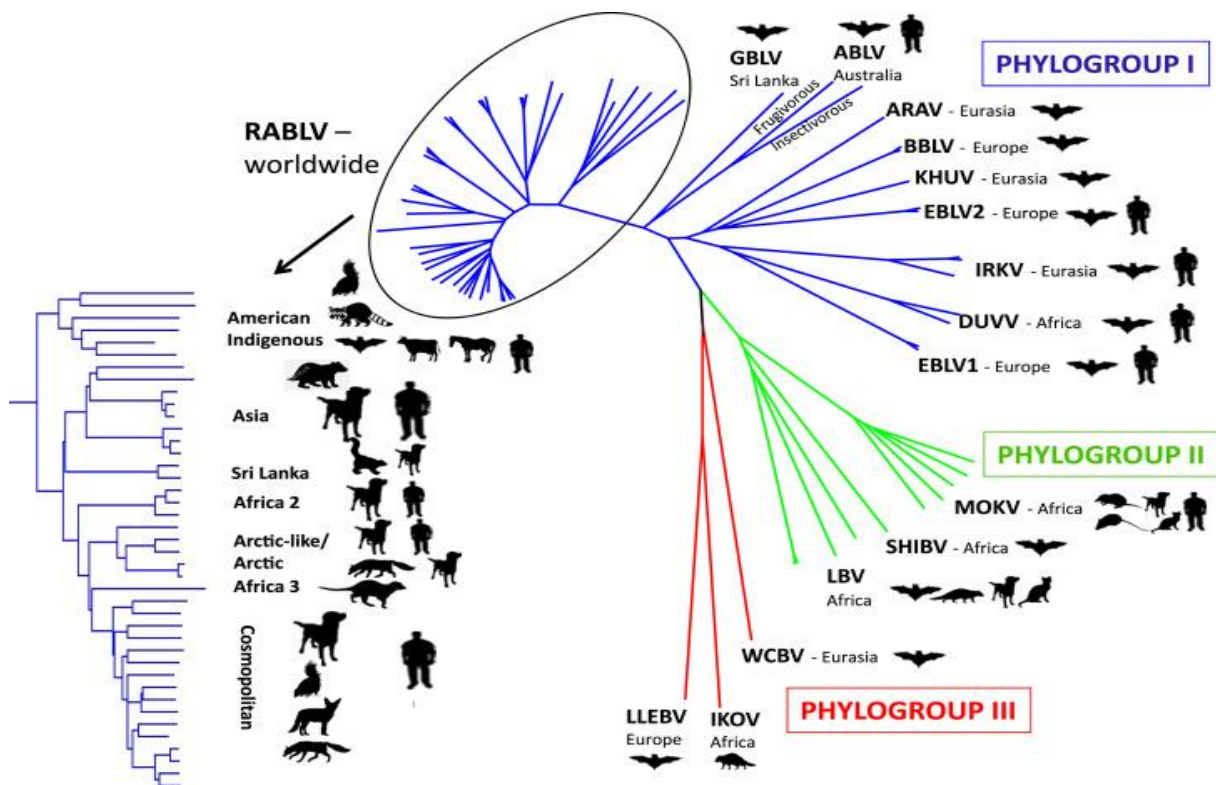


Figure 3: Analyse phylogénétique des *Lyssavirus* circulant dans le monde entier [21]

❖ Espèces réservoirs

On distingue plusieurs types de rage selon les espèces réservoirs [22]:

- La rage domestique, dont le réservoir est le chien (rage canine). Elle est responsable de 99 % des cas humains.
- La rage sylvatique, liée aux animaux sauvages, implique des réservoirs variables selon les zones géographiques.
- La rage des chiroptères (chauves-souris) est due à différentes espèces de *Lyssavirus* suivant la localisation géographique.

Bien que la rage des chauves-souris représente une proportion relativement faible des cas humains dans le monde, elle représente aujourd'hui la majorité des cas de rage humaine en Amériques [23,24].

2.1.7. Cycle de réplication du Virus de la rage

Le cycle de réplication du virus de la rage se déroule dans le cytoplasme de la cellule hôte. Plusieurs phases se déroulent : la liaison au récepteur, l'endocytose suivie de la fusion membranaire et de la libération de la nucléocapside, puis la transcription, la réplication, et enfin l'assemblage du virus et le bourgeonnement des virions de la descendance [10].

Les virus s'attachent aux cellules hôtes par l'intermédiaire de la protéine G et sont internalisés par endocytose. La nucléocapside (NC) est ensuite délivrée dans le cytoplasme par fusion de l'enveloppe virale avec la bicouche lipidique de la vésicule endocytique. Cette fusion est induite par un changement de conformation de la protéine G dépendant du pH [25,26].

Dans la NC, La polymérase virale fonctionnelle, qui est un complexe de L et P utilise le complexe N-ARN comme matrice pour des cycles répétitifs de transcription [25].

Les niveaux d'expression des ARNm des rhabdovirus deviennent progressivement moins abondants vers l'extrémité 5' du génome. Ainsi, la protéine N est la plus abondante, suivie de P, M, G et L. Ce gradient de transcrits est due à la dissociation de la polymérase du RNP(ribonucléoprotéine) lors de la transcription lorsqu'un signal de terminaison est atteint, obligeant la polymérase à se réengager pour initier transcription du gène en aval [27].

Après un cycle de transcription, à un moment donné de l'infection, le complexe complexe de L et P passe à un mode répliatif qui permet de générer un ARN (+). Cet ARN de sens positif est un intermédiaire répliatif qui est entièrement encapsidé par N et qui sert de modèle pour la synthèse de l'ARN naissant de sens négatif [21].

Lorsque de nouvelles ribonucléoprotéines sont formées, elles sont transportées vers les membranes post-synaptiques où les virions naissants sont assemblés et transmis selon un processus qui dépend de la présence de G viral sur la membrane bourgeonnante [21].

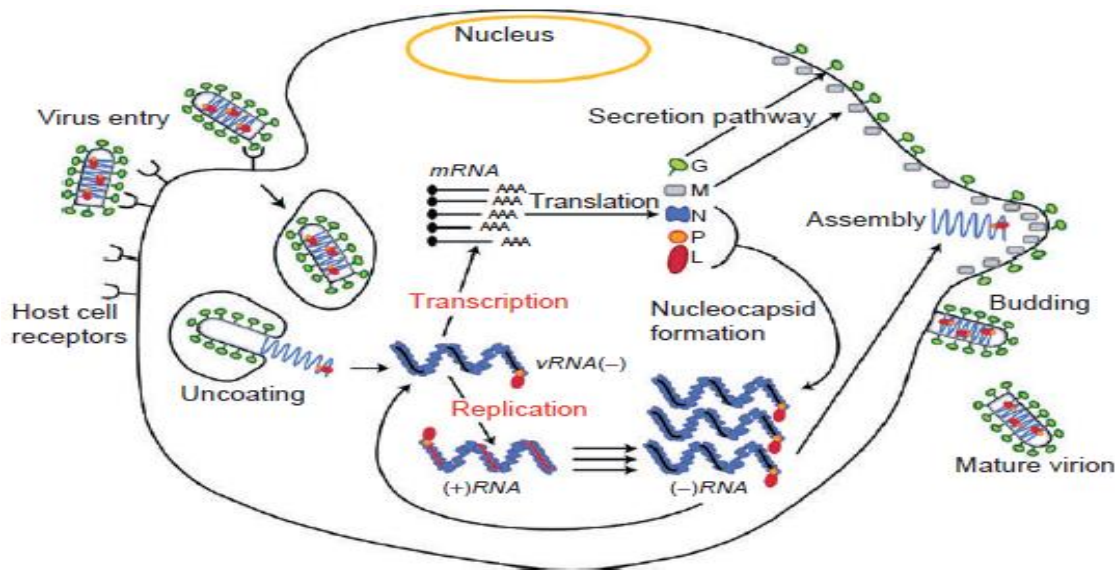


Figure 4: Cycle viral du virus de la rage [10]

2.1.8. Transmission du virus de la rage

Le virus se transmet facilement entre les mammifères, qu'ils soient de la même espèce ou d'espèces différentes. Le chien est le principal hôte responsable de la rage humaine [28].

Le virus de la rage (RABV) pénètre principalement dans l'organisme par morsures d'animaux et le dépôt de salive chargée de RABV dans les tissus sous-cutanés et les muscles. Il existe d'autres types d'exposition sans morsure, notamment la contamination d'une plaie ouverte, d'une égratignure, d'une abrasion ou d'une muqueuse par la salive ou le tissu du système nerveux central (SNC) d'un animal infecté. La manipulation, le dépouillement de carcasses infectées et la consommation de viande crue infectée ont entraîné la transmission du RABV. Il a été signalé des cas de rage par l'inhalation d'aérosols de RABV dans des grottes contenant des millions de chauves-souris ou dans des laboratoires. Aussi, Des rares cas de rage ont résulté de la transplantation (d'humain à humain) de cornées infectées par le RABV. En 2004, des transplantations d'organes et d'un segment d'artère vasculaire au Texas ont été associées à la transmission du RABV et au développement d'une rage fatale chez quatre receveurs [29].

Le fait de toucher une personne atteinte de la rage, le contact avec des fluides ou tissus non infectieux (urine, sang, fèces), la consommation de lait pasteurisé ou de viande cuite ne constituent pas une exposition à la rage [28].

2.2. Diagnostic biologique du virus de la rage

Dû à la localisation intra neuronale du virus de la rage et la faible réponse immunitaire, il n'existe aucun test de diagnostic avant les manifestations cliniques. Au cours des manifestations cliniques chez l'homme, plusieurs tests sont nécessaires. Ces tests sont réalisés à partir d'échantillons de salive, de sérum, de liquide céphalorachidien (LCS) et de biopsies cutanées des follicules pileux de la nuque. La salive peut être testée par isolement du virus ou par RT-PCR. Le sérum et le liquide céphalorachidien sont testés pour la recherche d'anticorps contre le virus de la rage. Les spécimens de biopsie cutanée sont examinés pour détecter l'antigène de la rage dans les nerfs cutanés [18]. À l'autopsie, l'immunofluorescence directe (FAT) est utilisée comme technique de diagnostic standard. La culture tissulaire est aussi utilisée à l'autopsie [18].

Tableau I: Type des prélèvements nécessaires et techniques mises en œuvre au stade ante-mortem et post-mortem chez l'homme [8]

Période	Prélèvements	Sensibilité	Techniques
Ante-mortem	Salive	Forte	RT-hnPCR RT-qPCR
	Biopsie cutanée (Au niveau de la nuque, avec follicules pileux)	Forte	RT-hnPCR RT-qPCR
	Sérum	Faible	RFFIT ELISA
	LCS	Faible	RT-hnPCR RT-qPCR RFFIT ELISA
Post-mortem	Biopsie cérébrale	Forte	FAT RTCIT RT-hnPCR RT-qPCR
	Biopsie cutanée (Au niveau de la nuque, avec follicules pileux)	Forte	RT-hnPCR RT-qPCR

2.2.1. Diagnostic direct du virus de la rage

2.2.1.1. Test d'inoculation à la souris

Un homogénat (salive, tissu ou culture cellulaire) est inoculé par voie intracrânienne sur des souris âgées. Il faudra 3 à 5 semaines pour obtenir des résultats. En effet, la réplication du virus de la rage dans le cerveau prend assez du temps avant que la souris présente des symptômes. Le test de culture cellulaire est préféré afin d'éviter l'utilisation d'animaux [18,30].

2.2.1.2. Technique Rabies Tissue Culture Infection Test (RTCIT)

L'objectif de la culture cellulaire est de détecter in vitro, à l'aide de techniques de culture, la présence du virus de la rage dans les échantillons (tissus, liquides biologiques) au diagnostic post mortem ou ante mortem. En général, elle est utilisée comme méthode de confirmation du FAT pour le diagnostic post mortem sur des échantillons de cerveau. Des cellules de neuroblastome de souris sont utilisées pour augmenter la concentration du virus de la rage. Le test se passe sur des lames à chambres multiples ou des microplaques. Il faudra attendre 4-5 jours (2-3 passages) pour s'assurer de la négativité des résultats [18,30].

2.2.1.3. Technique Fluorescent Antibody Test (FAT)

Le principe de l'immunofluorescence directe (FAT) consiste à détecter à l'examen microscopique, sous lumière ultraviolette, des antigènes viraux à l'aide d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) contre le RABV. Les anticorps sont spécifiques du virus entier ou de la protéine de la nucléocapside de la rage. Le test se fait sur des impressions, des frottis, des cultures cellulaires ou dans le tissu cérébral de souris qui ont été inoculées pour le diagnostic. Le cerveau est le tissu idéal pour le test parce que le virus de la rage se trouve dans les tissus nerveux et non dans le sang. L'anticorps marqué, après incubation avec du tissu suspect de rage, se lie à l'antigène rabique. L'anticorps non lié peut être éliminé par lavage et les zones où l'antigène est présent peuvent être visualisées comme des zones fluorescentes vert pomme à l'aide d'un microscope à fluorescence. Si le virus de la rage est absent, il n'y aura pas de coloration. Le test des anticorps fluorescent est spécifique et sensitive [18,30].

2.2.1.4. Test immuno-chromatographique rapide

Le test de flux latéral est utilisé comme test rapide de la rage. Ce test est basé sur la réaction antigène-anticorps. Un complexe antigène anticorps est formé par le mélange de l'échantillon au tampon. Ce complexe migre ensuite le long de la membrane de cellulose par migration liquide pour être immobilisé par un second antigène. Ce qui aboutit à une ligne sur la zone de test. La ligne de contrôle doit apparaître pour valider le résultat. La lecture est rapide (5 à 10 min après dépôt de l'échantillon) [30].

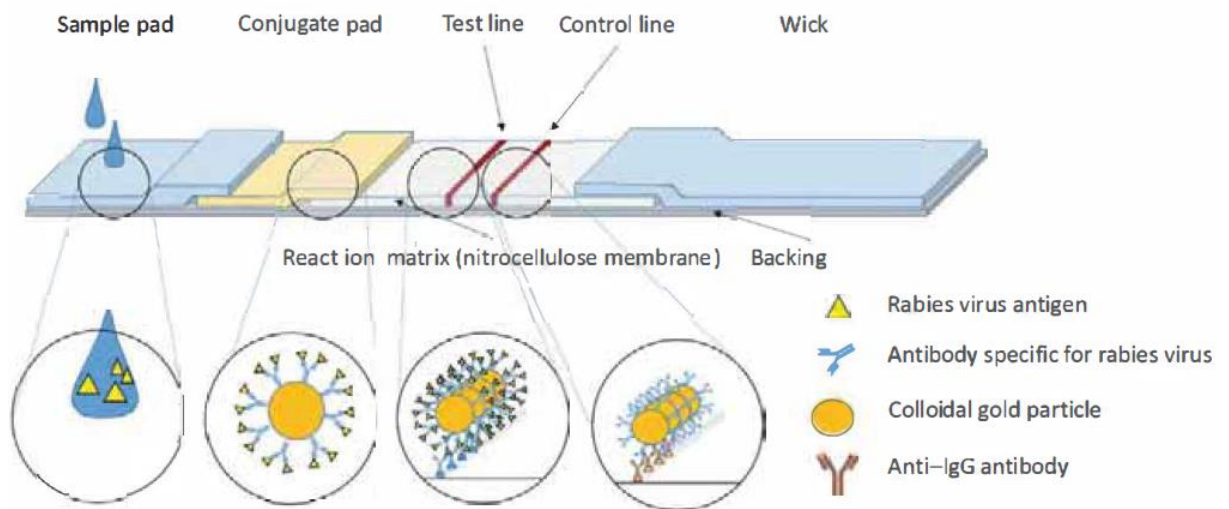


Figure 5: Structure générale du test de flux latéral [30]

2.2.1.5. RT-PCR

La PCR est une technique de laboratoire *in vitro* utilisée pour détecter, entre autres, des séquences d'ADN cibles d'agents infectieux. Elle implique une amplification exponentielle de l'ADN à l'aide d'une ADN polymérase et de courtes séquences d'oligonucléotides appelées "amorces" pour sélectionner la partie du génome à amplifier. En fonction de l'intervalle entre les amorces sens et antisens sélectionnées, des produits (amplicons) de différentes tailles peuvent ensuite être rendus visibles par électrophorèse sur gel d'agarose. L'utilisation de la PCR dans le diagnostic des *Lyssavirus* bénéficie également de l'application en aval du séquençage de Sanger pour la détection et le génotypage des *Lyssavirus*.

Les *Lyssavirus* sont des virus à ARN à brins négatifs. Par conséquent, avant l'amplification par PCR, l'ARN est d'abord transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse

(RT). Cette technique est appelé la RT-PCR. La RT-PCR peut être réalisée en une ou deux étapes. Dans la première approche, l'ensemble de la réaction, de la synthèse de l'ADNc à l'amplification par PCR, se déroule dans un seul tube, tandis que dans la seconde, la réaction de transcription inverse et l'amplification par PCR sont effectuées dans des tubes différents [31].

2.2.1.6. Hemi-nested RT-PCR (RT- hnPCR)

La plupart des tests amplifient des parties des gènes de la nucléoprotéine (N) et de la polymérase (L) des *Lyssavirus*. Comme exemple, la Hemi-nested RT-PCR du *pan-Lyssavirus* cible le gène N. Des amorces universelles JW12 (sens direct), JW6UNI (sens inverse) et JW10UNI (sens inverse) sont utilisées dans la RT-PCR *pan-Lyssavirus*. JW12 et JW6UN détectent une région de 606 paires de bases (pb) du gène N dans une première série de PCR. JW10UNI qui est dans la séquence du produit de la première PCR, est utilisée conjointement avec l'amorce de la première PCR JW12 dans la deuxième PCR.

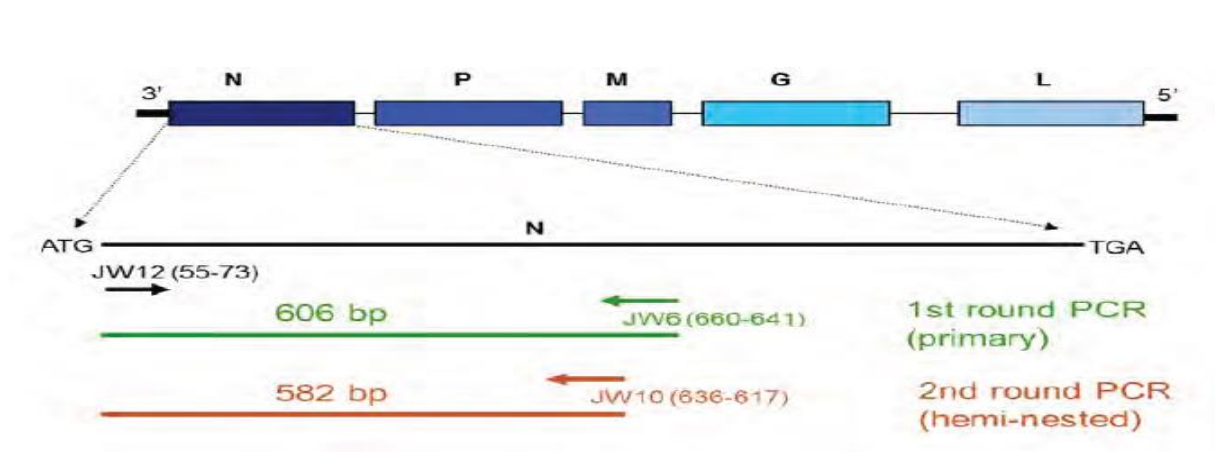


Figure 6: Schéma du génome du *Lyssavirus* et de la région ciblée par les amorces de la hemi-nested RT-PCR du *pan-lyssavirus* sur le gène N

Après amplification, Les produits de la RT-PCR sont analysés par la méthode de l'électrophorèse sur un gel d'agarose. Un résultat positif de la PCR est observé sous la forme d'une bande de la taille de 606 pb (première PCR) et 582 pb (deuxième PCR) [31].

2.2.1.7. RT-qPCR

Contrairement à la RT-PCR conventionnelle, le test en temps réel combine l'amplification et la détection dans un système de tubes fermés, plus besoin d'une confirmation par électrophorèse. Ainsi, les tests de PCR en temps réel sont plus rapides et plus fiables de la présence d'ARN de *Lyssavirus* dans les échantillons suspects. Les thermocycleurs détectent la fluorescence émise par l'amplicon à croissance exponentielle (produit de la PCR). Les amplicons sont détectés par 2 méthodes couramment.

Une consiste à utiliser des fluorochromes d'intercalation de l'ADN (tels que SYBR Green) au mélange réactionnel. Le colorant se lie à l'ADN double brin (ds) pendant la PCR. Les fluorochromes liés émettent une fluorescence qui est détectable par le thermocycleur à chaque cycle, ce qui permet de quantifier les concentrations d'ADN. Comme inconvénient, ces colorants peuvent se lier à des produits de PCR non spécifiques d'où la nécessité d'analyser la courbe de fusion à la fin du programme de PCR.

L'autre consiste à utiliser des sondes d'hydrolyse (TAQMAN). Les sondes sont des oligonucléotides former d'un quencher à l'extrémité 3' et d'un fluorochrome à l'extrémité 5'. Le quencher éteint la fluorescence émise par le fluorophore tant que le fluorophore et le quencher sont à proximité. Lorsque la sonde se lie à sa région cible pendant l'amplification, l'activité exonucléase de la polymérase entraîne dissociation du fluorophore et du quencher, ce qui permet à la fluorescence résultante d'être émise et mesurée [31].

2.2.1.8. Séquençage de Sanger

La méthode est basée sur l'incorporation sélective de didésoxynucléotides terminateurs de chaîne (ddNTP) par l'ADN polymérase pendant la répllication in vitro de l'ADN pour les analyses du génome automatisées à grande échelle, il a récemment été remplacé par les méthodes de séquençage de nouvelle génération (NGS). Cependant, la méthode Sanger reste utilisée pour le typage des virus ou pour les projets génomiques à petite échelle. Grâce à la méthode Sanger des séquences complètes du génome de certains *Lyssavirus* ont été obtenu.

Le séquençage de Sanger repose sur l'utilisation de ddNTP marqués par fluorescence. Chacun des ddNTP terminateurs de chaîne est marqué par un colorant fluorescent différent, qui émet de la lumière à des longueurs d'onde différentes. Avant de pouvoir être séquencé, l'ADN est

dénaturé par la chaleur en brins simples. Ensuite, une amorce est anelée à l'un des brins de la matrice.

Cependant, le séquençage à partir de produits PCR peut être source d'erreurs, en particulier lorsque les produits PCR sont d'abord clonés pour améliorer le rendement ou étudier l'hétérogénéité virale. Le matériel à partir duquel la séquence du génome est dérivée doit être signalé des erreurs ou des biais peuvent être introduits dans les séquences générées au cours des processus de PCR ou de clonage.

Le séquençage de Sanger reste utile aux laboratoires de diagnostic de la rage pour confirmer le matériel positif à la PCR, pour déterminer la source d'une épidémie ou pour comprendre l'évolution moléculaire des virus émergents [31].

2.2.2. Diagnostic indirect du virus de la rage

2.2.2.1. Technique Rapid Focus Fluorescent Inhibition Test (RFFIT)

Le test d'inhibition rapide du foyer fluorescent (RFFIT) permet de démontrer la présence ou l'absence d'anticorps neutralisant le virus de la rage dans le sérum. Le test est réalisé à l'aide de la souche CVS-11 du virus du défi standard (CVS) et de cellules BHK-21 ou de cellules de neuroblastome de souris. Des dilutions en série de sérum sont mélangées à une quantité standard de virus rabique. Les anticorps neutralisant le virus de la rage présents dans le sérum neutralisent le virus. Des cellules de culture tissulaire sont ensuite ajoutées au mélange. Après incubation, Le résultat est coloré avec un conjugué d'isothiocyanate de fluorescéine antirabique et évaluée au microscope pour détecter la présence ou l'absence d'infection par le RABV [18,30].

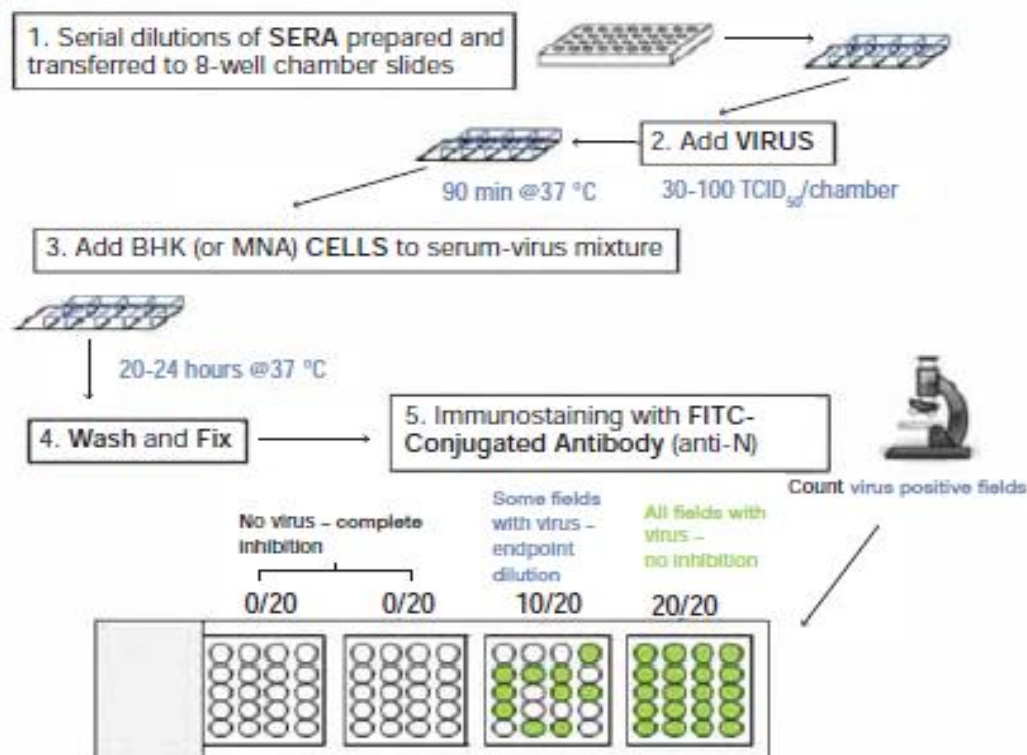


Figure 7: Etapes du test RFFIT [30]

2.2.2.2. Test immuno-enzymatique (ELISA)

Les anticorps 4antirabiques présents dans le sérum sont dosés par une technique immuno-enzymatique (ELISA). Il est utilisé pour le titrage des anticorps rabiques chez les patients ayant reçu une prophylaxie de post-exposition contre la rage ou ayant été vaccinés préventivement [8].

2.3. Traitement

A ce jour, il n'existe pas spécifiquement de traitement curatif efficace contre la rage humaine et les survivants sont rares [2]. La découverte d'un traitement demeure un défi, car les molécules proposées (antiviraux ou anticorps) doivent franchir la barrière hématoencéphalique pour être actives sur le virus qui se trouve dans le système nerveux central [3]. En revanche, les mesures préventives contre la rage sont très efficaces après des expositions reconnues [2].

2.4. Prévention de la rage humaine

2.4.1. Sensibilisation à la maladie de la rage

Elle permet à la communauté de prévenir la rage en cherchant les soins dont elle a besoin. Cela inclut une compréhension de la manière de prévenir la rage chez les animaux, quand suspecter la rage, et que faire en cas de morsure [32].

Comme recommandations pour réduire les décès humains dus à la rage après exposition : Sensibiliser la population à l'importance de laver immédiatement les blessures causées par des morsures d'animaux et de se rendre rapidement dans des établissements médicaux (quelles que soient la taille et la gravité de la blessure) [32].

2.4.2. Vaccination massive des chiens

La vaccination des chiens est essentielle pour prévenir la rage humaine dans les pays où les chiens sont la principale source d'infection. Grace à la vaccination des chiens, des pays développés a éliminé la rage humaine. En effet, les chiens sont responsables de plus de 99% des cas de rage humaine bien que des variétés d'espèces animales soient hôtes de la rage. Cette approche a aussi été mise en place dans de nombreux pays en développement et maintenant favorisée par l'OMS, la FAO et l'OIE qui envisage l'objectif de l'élimination de la rage humaine transmise par le chien d'ici 2030 [3]. Une couverture vaccinale de 70 % des populations canines suffisent pour éliminer ou prévenir les épidémies de rage [4,33].

Malgré cette importance des chiens dans la transmission de la rage, leur couverture vaccinale demeure faible en Afrique. A Bamako, seulement 19% des chiens avaient un certificat de vaccination valide [34].

2.4.3. Vaccins antirabiques à usage humain

Il existe 2 grands types de vaccins contre la rage : vaccins à base de tissus nerveux et les vaccins antirabiques préparés sur cultures cellulaires modernes, concentrés et purifiés, ou préparés sur œufs embryonnés. Cependant, Les vaccins à base de tissus nerveux ne sont plus recommandés

par l'OMS car ils peuvent provoquer des réactions indésirables graves plus fréquemment et sont moins immunogènes que les œufs embryonnés [1].

Selon le type de cellules utilisées pour la multiplication du virus, les œufs embryonnés peuvent être repartis entre vaccins cultivés sur des Cellules diploïdes humaines, Cellules Vero purifiées, Cellules d'embryon de poulet purifiées, Cellules d'œuf de canard embryonné purifiées, Cellules de rein de hamster purifiées [4].

Tableau II: Liste non exhaustive des vaccins antirabiques à usage humain et producteurs dans le monde [4]

Vaccins	Producteurs	Type de Cellules	Formes
Imovax Rage	Sanofi Pasteur	Cellules diploïdes humaines	Vaccins lyophilisés
Rabipur	GSK	Cellules d'embryon de poulet purifiées	Vaccins lyophilisés
Verorab	Sanofi Pasteur	Cellules Vero purifiées	Vaccins lyophilisés
Rabivax	Serum Institute of India	Cellules diploïdes humaines	Vaccins liquides
Lyssavac-N /Vaxirab	Zydus-Cadila	Cellules d'œuf de canard embryonné purifiées	Vaccins lyophilisés

Le même vaccin est destiné à la fois aux personnes après (PPE) ou avant (PPrEx) l'exposition à la rage. La PPrEx est recommandé pour les sous-populations vivant dans des milieux de forte endémie où l'accès à une PPE en temps utile et adéquate est limité, de personnes exposées à un risque professionnel et de voyageurs présentant un risque d'exposition [1]. Les vaccins antirabiques ne doivent pas être administrés dans le muscle fessier, la réponse immunitaire induite étant moins fiable [4]

2.4.4. Immunoglobulines antirabiques à usage humains

L'immunoglobuline antirabique (RIG), est utilisée pour la prophylaxie post exposition. Elle fournit une immunisation passive en neutralisant le virus rabique au niveau de la plaie avant que le système immunitaire ne puisse répondre au vaccin en produisant des anticorps neutralisants. L'immunoglobuline antirabique est dérivée du sang humain ou équin. Dans la pratique, elle est souvent non disponible dans les pays d'endémie en raison de l'insuffisance de la demande et des prévisions d'approvisionnement. On estime qu'à l'échelle mondiale moins

de 2% des patients de catégorie III reçoivent de l'immunoglobuline antirabique [1]. Vu ce nombre insuffisant, plusieurs anticorps monoclonaux humains ont été testés contre la rage. Le premier a récemment été homologué par le Serum Institute of India. Comme il est fabriqué par une technologie recombinante, il sera moins sujet à des problèmes tels que la disponibilité, la sécurité et la pureté [4].

Tableau III: Liste non exhaustive des immunoglobulines antirabiques à usage humaine et des producteurs dans le monde [4]

Immunoglobuline antirabique (RIG)	Type	Producteurs
Rabix-IG	Esquine	Butantan Institute
EquiRab	Esquine	Bharat Serums and Vaccines
PremiRab	Esquine	Premium Serums
Rabigam	Humaine	National Bioproducts
HyperRAB S/D	Humaine	Grifols USA
Rabishield	Anticorps monoclonal humain	Serum Institute of India

Les vaccins peuvent être administrés par voie intradermique ou intramusculaire [4] :

- Administration intradermique :
 - Les deltoïdes,
 - La face latérale des cuisses
- L'administration intramusculaire :
 - Le muscle deltoïde (l'adulte et l'enfant âgé de 2 ans ou plus)
 - La face antéro-latérale de la cuisse (l'enfant de moins de 2 ans)

2.4.4.1. Prophylaxie préexposition (PPrEx)

La prophylaxie préexposition (PPrEx) consiste en une série de vaccins antirabiques administrés avant une exposition potentielle, suivis de rappels en cas de morsure. La PPrEx est coûteuse et n'est recommandée qu'aux personnes présentant un risque constant d'exposition du fait de leur métier (les vétérinaires et le personnel de laboratoire), de voyages ou d'un séjour dans un contexte endémique avec un accès limité à une PPE adéquate en temps utile [4,35]. La PPrEx simplifie les PPE en éliminant le besoin de RIG et en réduisant le nombre de doses de vaccin nécessaires pour l'immunisation post-exposition. Les personnes qui ont déjà été vaccinées

contre la rage n'auront besoin que de deux doses de Rabipur pour la PPE(administrées aux jours 0 et 3) [36].

Tableau IV: Protocoles préexposition recommandés par l’OMS et protocoles alternatifs[4]

Régime de PPrEx	Durée du protocole	Nombre de sites d’injection par session (jours 0, 3, 7, 14, 21–28)
Régime intradermique recommandé par l’OMS		
Deux visites	7 jours	2-0-2-0-0
Régime intramusculaire recommandé par l’OMS		
Deux visites	7 jours	1-0-1-0-0
PrEP dans des circonstances spécifiques		
Visite unique, intradermique	1 jour	2-0-0-0-0
Visite unique, intramusculaire	1 jour	1-0-0-0-0

2.4.4.2. Conduite à tenir en présence d’une morsure de chien

La personne qui est mordue, doit être traitée le plus rapidement possible, même si le chien mordeur ne présente pas de signes initiaux de rage et qu’il n’a pas été en contact avec un chien enragé. L’animal mordeur doit être placé en observation pendant 15 jours sous le contrôle d’un vétérinaire jusqu’à ce que le diagnostic clinique soit établi.

En cas de rage, la personne est isolée et les personnes en contact avec le patient sont vaccinées. Tout animal présentant des signes cliniques de rage est immédiatement euthanasié. Les animaux qui sont mordus ou en contact avec l’animal enragé sont immédiatement abattus, à l’exception d’animal vacciné depuis moins d’un an. La vaccination des populations canines et félines locales est entreprise pour prévenir une épidémie [7].

2.4.4.3. Prophylaxie post-exposition (PPE)

Malgré l’exposition de l’agent infectieux, la manifestation clinique de la maladie peut être prévenue par une vaccination tant que les symptômes cliniques ne se sont pas développés [36].Le principal objectif de la PPE est de neutraliser et de détruire le virus de la rage inoculé dans l’organisme, de sorte que la manifestation clinique de la rage ne se développe pas. La PPE comporte trois étapes [36]:

✓ Le traitement de la plaie

Toutes les plaies et toutes les égratignures par morsure doivent être prises en charge dès que possible après exposition ; il faut entreprendre un lavage et une irrigation soigneux de la plaie avec du savon et de l'eau en abondance pendant 15 minutes environ. Un antiseptique virucide doit être appliqué sur la plaie

Le traitement approprié des plaies et un accès rapide à une PPE de qualité est efficace à presque 100 % pour prévenir les décès dus à la rage chez l'homme [35].

✓ L'administration du vaccin

Chez les adultes, les vaccins doivent toujours être administrés dans la région deltoïdienne du bras. Chez l'enfant en bas âge (< 2 ans), il est recommandé d'utiliser la région antérolatérale de la cuisse [4].

Le vaccin antirabique Rabipur est administré par injection intramusculaire selon les deux protocoles suivants [36]:

- **Le protocole de Essen** : cinq doses (une dose administrée aux jours 0, 3, 7, 14 et 28) ;
- **Le protocole de Zagreb** : quatre doses (deux doses administrées au jour 0 et une dose administrée aux jours 7 et 21).

Les personnes qui ont déjà été vaccinées contre la rage n'auront besoin que de deux doses de Rabipur pour la PPE (administrées aux jours 0 et 3) [36].

Tableau V: Régimes prophylactiques post-exposition recommandés par l'OMS et leurs alternatives[4]

Régime PPE	Durée du protocole	Nombre de sites d'injection par visite en clinique (Jours 0, 3, 7, 14, 21-28)
Régime intradermique recommandé par l'OMS		
1 semaine, deux sites	7 jours	2-2-2-0-0
Régime intramusculaire recommandé par l'OMS		
2 semaines (Protocole de Essen réduit)	14-28 jours	1-1-1-1-0
3 semaines (protocole de Zagreb)	21 jours	2-0-1-0-1
Régimes immunogènes intradermiques alternatifs		
1 mois, deux sites	≤ 28 jours	2-2-2-0-2
1 mois, simplifié quatre sites	≤ 28 jours	4-0-2-0-1
1 semaine, quatre sites	7 jours	4-4-4-0-0

✓ L'administration d'immunoglobulines antirabiques (RIG).

En général, les vaccins lorsqu'ils sont correctement administrés avec de l'immunoglobuline antirabique (RIG), sont pratiquement 100 % efficaces pour prévenir la rage après une exposition et il n'y a pas de contre-indication à la PPE contre la rage. Si une personne est exposée à la rage, la PPE est justifiée indépendamment de la grossesse, de l'enfance, de la vieillesse ou des infections concomitantes [37].

L'OMS recommande une PPE en fonction des catégories d'exposition au virus de la rage [37]. La définition des catégories d'exposition (I-III) et l'utilisation de la procédure de prophylaxie post-exposition (PPE) sont les suivantes [36] :

- **La catégorie I** correspond à une exposition insignifiante ou nulle de l'animal et ne nécessite donc aucune prophylaxie ;
- **La catégorie II** correspond à des égratignures ou abrasions mineures sans saignement et nécessite un vaccin ;
- **La catégorie III** correspond à des morsures ou égratignures transdermiques, à une contamination des muqueuses ou à une exposition à des chauves-souris, qui nécessiterait l'utilisation d'un RIG plus un vaccin.

Les épidémies de rage humaine sont notables en Afrique de l'Ouest, mais la PPE est soit indisponible, soit chère [5].

03.
MATERIEL ET
METHODES

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Cadre et site d'étude

Notre étude a été menée au sein de l'unité de Biologie moléculaire et génomique du laboratoire du Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC). Les différents prélèvements séquentiels provenaient du service des maladies infectieuses et tropicales (SMIT) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) du point G de Bamako.

Elle s'inscrivait dans le cadre d'un projet de surveillance épidémiologique nationale. Elle a consisté à tester les échantillons reçus afin d'y détecter la présence de l'ARN du virus de la rage.

3.2. Type et période d'étude

Il s'agissait d'une étude transversale descriptive et analytique à collecte prospective. La collecte des échantillons a été faite du 1^{er} août 2022 au 30 novembre 2023.

3.3. Population d'étude

Les individus concernés par notre étude étaient à la fois des hommes et des femmes de toutes classes d'âge. Les données ont été recueillies sur des personnes dites « cas suspects » à la rage dont les échantillons ont été acheminés à l'unité de biologie moléculaire de l'UCRC pour le diagnostic moléculaire de la rage.

3.4. Echantillonnage

Les échantillons ont été collectés selon une méthode exhaustive non probabiliste où tous les patients cas suspects de rage au service des maladies infectieuses et tropicales ont été inclus durant la période de l'étude. Les patients éligibles étaient au nombre de 13.

3.4.1. Critères d'inclusion

Ont été inclus dans notre étude toutes les personnes suspectes de la rage humaine au SMIT et dont les échantillons ont été reçus à l'unité de biologie moléculaire de l'UCRC pendant la période d'étude.

3.4.2. Critères de non-inclusion :

- Refus de participation
- Impossibilité d'avoir les prélèvements adéquats.

3.5. Collecte des données

Les données ont été recueillies sur une fiche d'enquête qui comportait de renseignements cliniques (données socio-démographiques des personnes testées) et les résultats biologiques après RT-qPCR et RT-PCR.

Au cours de notre étude, nous avons mesuré les variables suivantes :

- Variables sociodémographiques : âge, sexe, profession, résidence
- Variables cliniques : motif de consultation, site de la morsure, l'espèce de l'animal mordeur
- Variables paracliniques : RT-qPCR rage, RT-PCR rage.

3.6. Méthodes de laboratoire

Nous avons suivi consécutivement les étapes suivantes :

- Prélèvements et transports des échantillons : les prélèvements ont été effectués au SMIT, puis transportés au sein de l'UCRC ;
- Inactivation et extraction du matériel génétique (ARN) ;
- Analyse par RT-qPCR : elle a été faite à partir de l'automate Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR System (AB7500) en utilisant le kit iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit.
- Amplification par RT-PCR : elle a été faite à partir du thermocycleur « VeritiPro™ »
- Electrophorèse des amplicons de RT-PCR sur gel d'agarose : l'électrophorèse a été effectué dans la cuve d'électrophorèse Bio-Rad PowerPack™ Basic.
- La visualisation a été faite par l'appareil Enduro™ GDS Touch II.

3.6.1. Prélèvements

Nous avons reçu des liquides biologiques(tels que la salive, sang, Liquide cérobrospinal (LCS) et tissus (tels que biopsies de la peau au niveau de la nuque) des cas suspects de rage provenant du SMIT. Les échantillons ont été collectées de façon séquentielle, au moins à trois reprises à 3 à 6 heures d'intervalles, du fait de l'excrétion intermittente du virus. Au total, 40 échantillons (23 salives, 9 LCS, 4 sangs, 4 biopsies) ont été réceptionnés par l'unité de biologie moléculaire de l'UCRC.

3.6.2. Détection du virus de la rage par la réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse en temps réel (RT-qPCR)

3.6.2.1. Extraction du matériel génétique (ARN) : protocole du kit QIAamp® Viral RNA Kit.

3.6.2.1.1. Principe

L' extraction de l'ARN viral a pour principe la lyse cellulaire et la purification de l'ARN viral à partir de liquides biologiques et tissus .

3.6.2.1.2. Matériel

- Tubes Eppendorf
- Pipettes et micropipettes
- Embouts et cônes pour pipettes (1000 µL, 200 µL, 10 µL)
- Portoirs de laboratoire (racks) pour tubes et colonnes
- Hottes à flux laminaire
- Plaques pour la PCR et la RT-PCR.
- Centrifugeuses (Eppendorf® centrifuge 5415 D)
- Kit QIAamp Viral RNA kit



Figure 8: Kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit

3.6.2.1.3. Procédure

Elle a été faite selon les recommandations du fabricant. L'extraction a été faite en 4 phases. La 1^{ère} phase consiste à inactiver les échantillons par lyse cellulaire. La 2^{ème} phase consiste à lier le matériel génétique à une colonne à silice. La 3^{ème} étape consiste à nettoyer le matériel génétique lié à la silice par des solutions de lavages. La dernière étape consiste à récupérer le matériel génétique en l'éluant avec une solution tampon. Les détails de la procédure sont décrits dans l'Annexe 1.

3.6.2.2. RT-qPCR

3.6.2.2.1. Principe

Le principe consiste à convertir l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) par la transcriptase inverse. L'ADNc peut être ensuite amplifiée par la qPCR. Les produits PCR (amplicons) obtenus sont détectés par l'ajout d'un colorant fluorescent (SYBR green) ou d'une sonde marquée par fluorescence au mélange réactionnel de la RT-qPCR [31].

3.6.2.2.2. Matériel

- Tubes Eppendorf
- Pipettes et micropipettes
- Embouts et cônes pour pipettes (1000 µL, 200 µL, 10 µL)
- Plaques pour la PCR
- Kit pour la RT-qPCR (kit iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit)



Figure 9: Kit Bio-Rad iTaq Universal SYBR Green

- Machine pour RT-qPCR (Real Time Polymerase Chain Reaction): AB7500 Fast



Figure 10: applied Biosystems 7500 Fast

3.6.2.2.3. Procédure de la RT-qPCR

A. Préparation du mélange réactionnel (master mix) : kit iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit.

Elle s'effectue dans la zone propre (dépourvue d'amplicons) du laboratoire pour éviter tout risque de contamination du mélange réactionnel. Elle s'est faite selon les étapes suivantes :

❖ **Mélange réactionnel (dans la salle de master mix)**

➤ **Mélange réactionnel JW12/N165-146**

Réactifs	Volume par échantillon (µL)
Nuclease-free water	2,35 µL
2× Universal SYBR Green reaction mix (BioRad)	10 µL
JW12 (10 µM) 1,2	1,2 µL
N165-146 (10 µM)	1,2 µL
iTaq RT enzyme mix (BioRad)	0,25 µL
Total	15 µL
ARN (échantillon)	5 µL

➤ **Mélange réactionnel b-actine (comme contrôle interne)**

Réactifs	Volume par échantillon (µL)
Nuclease-free water	2,35 µL
2× Universal SYBR Green reaction mix (BioRad)	10 µL
BatRat F (10 µM)	1,2 µL
BatRat R (10 µM)	1,2 µL
iTaq RT enzyme mix (BioRad)	0,25 µL
Total	15 µL
ARN (échantillon)	5 µL

NB : La chaîne de froid doit être respectée pendant toute la manipulation [38].

B. Préparation de la plaque PCR

Quinze microlitres (15 µL) du mix préparé préalablement est reparti dans chaque puits de la plaque auquel on ajoute 5 µL de l'échantillon d'ARN des patients à l'extérieur de la salle du master mix. On recouvre ensuite la plaque d'une fine couche de plastique protectrice (Optical Adhesive Film) et on l'insère dans la machine AB7500 fast real time pour entamer la RT-qPCR.

NB : Chaque échantillon est testé en duplicate sur la même plaque.

C. Programmation de la machine 7500 real time

Le programme de transcription inverse et d'amplification en une seule étape (one-step) des systèmes JW12/N16 et b-actine est identique. Les deux systèmes peuvent donc être utilisés simultanément sur la même plaque, mais dans des puits séparés.

La programmation de la machine se fait comme décrite dans le tableau suivant :

Tableau VI: programme d'amplification pour la RT- qPCR

Température (°C)	Durée	Données	Cycle	Étape
50	10 minutes		1	RT
95	5 minutes		1	Dénaturation
95	10 secondes		40	Amplification
60	32 secondes	Capture		
95	15 secondes		1	Dissociation
55	1 minute		1	
95	15 secondes	Capture	1/°C	
60	15 secondes		1/°C	

NB : La chaîne de froid doit être respectée pendant toute la manipulation [38].

D. Analyse et interprétation des résultats de la RT-qPCR

Les résultats se présentent sous forme de courbes colorées. Chaque courbe représente un fluorochrome (dye) associé à une cible moléculaire.

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés aux sites ou gènes cibles dont la détection est associée aux fluorochromes suivants :

- ciblant le gène de la nucléoprotéine N (SYBR);
- un gène endogène b-actine ou ACTB (SYBR) servant de contrôle interne pour valider l'étape d'extraction d'ARN

L'analyse des résultats obtenus par la technique JW12/N165-146 est basée sur la valeur du Ct et sur la courbe de dissociation :

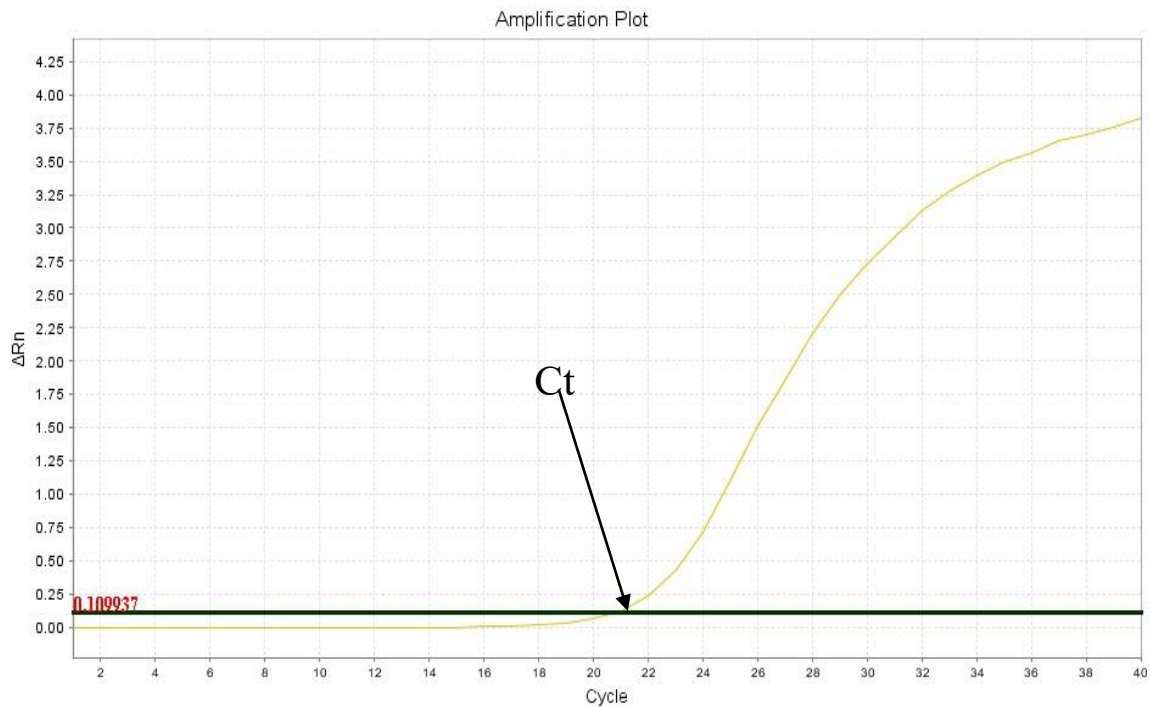


Figure 11: Schéma représentant le résultat de la RT-qPCR

- Échantillon positif si :

Valeur du Ct ≤ 40 (amplification) pour l'échantillon et courbe de dissociation (allure et Température de dissociation (Tm) comparable avec la courbe des contrôles internes de qualités positifs(CIQ).

- Échantillon à refaire (repasse de la technique) si :

Valeur du Ct ≤ 40 (amplification) et courbe de dissociation (allure et Tm) comparable avec la courbe des CIQ positifs.

- Échantillon négatif (pour la technique) si :

Valeur des Ct > 40 (pas d'amplification) pour l'échantillon ou courbe de dissociation (allure et Tm) non comparable avec la courbe des CIQ positifs.

La valeur de la température de dissociation (Tm) culminera autour de 76-78°C pour les amplicons de virus rabiques, et celle de la b-actine est autour de 84-86°C pour les amplicons de ACTB. Mais des variations sont observables en fonction de la nature de l'isolat viral ou de l'espèce virale considérée, ainsi que de sa charge virale [38].

3.6.3. Détection du virus de la rage par la réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse (RT-PCR)

3.6.3.1. RT-PCR

3.6.3.1.1. Principe

Le principe consiste à convertir l'ARN en sa séquence d'ADN complémentaire (ADNc) par la transcriptase inverse. L'ADNc peut être ensuite amplifiée par PCR [31].

3.6.3.1.2. Matériel

- Tubes Eppendorf
- Pipettes et micropipettes
- Embouts et cônes pour pipettes (1000 μ L, 200 μ L, 10 μ L)
- Portoirs de laboratoire (racks) pour tubes et colonnes
- Plaques pour la PCR et la RT-PCR.
- Kit pour la RT-PCR (QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit)
- Machine pour RT-PCR : VeritiPro™



Figure 12: VeritiPro 96-Well Thermal Cycler

3.6.3.1.3. Procédure

Il s'agissait de faire une amplification du matériel génétique viral avec le kit QIAGEN® OneStep RT-PCR, en vue d'effectuer une électrophorèse sur gel d'agarose des amplicons obtenus.

A. Préparation du mélange réactionnel : kit QIAGEN® OneStep RT-PCR

Le tableau ci-dessous résume les composants du mélange réactionnel et les quantités utilisées.

Tableau VII: Mélange réactionnel pour la RT-PCR

	Pour N=1	Pour N=n (avec n>1)
PCR buffer	5 µL	5 x n µL
DNTP	1 µL	1 x n µL
F primer	1 µL	1 x n µL
R primer	1 µL	1 x n µL
5x Q	5 µL	5 x n µL
Enzyme	1 µL	1 x n µL
H2O	6 µL	6 x n µL
ARN	5 µL	5 x n µL

N étant le nombre d'échantillons

B. Préparation de la machine VeritiPro™

Tableau VIII: Programme d'amplification pour la RT-PCR

Température (°C)	Durée	Cycle	Étape
50	30 minutes	1	RT
95	15 minutes	1	Activation
94	30 secondes	40	Dénaturation
55	45 secondes		Hybridation
72	1 minute		Elongation
72	10 minutes	1	Elongation final

C. Analyse et interprétation des résultats de RT-PCR

Après la RT-PCR, l'électrophorèse sur gel d'agarose utilisant le tampon Tris-Acetate-éthylènediaminetétraacétique (TAE) nous a permis de confirmer la présence des produits de RT-PCR (amplicons).

3.6.3.2. Électrophorèse sur gel d'agarose

3.6.3.2.1. Principe

L'électrophorèse sur gel d'agarose a pour principe de séparer les fragments d'ADN sous l'effet d'un champ électrique. Étant donné que les fragments d'ADN sont chargés négativement, lorsqu'ils sont placés dans un champ électrique, les fragments d'ADN migrent vers l'anode chargée positivement. Après séparation, les fragments d'ADN peuvent être visualisés sous lumière UV après coloration avec un colorant approprié [39].

3.6.3.2.2. Matériel

- Tubes Eppendorf
- Pipettes et micropipettes
- Embouts et cônes pour pipettes (10 µL)
- Cuve d'électrophorèse Bio-Rad PowerPack Basic.
- Appareil « Enduro GDS Touch II »
- Colorant GelRed®
- Solution tampon TAE

3.6.3.2.3. Procédure

Les détails du protocole se trouve dans l'**Annexe 2**.

3.7. Considérations éthiques

Notre étude est nichée dans le projet Block Rabies qui a été soumis au comité d'éthique et a fait l'objet d'une approbation. Les renseignements ont été totalement confidentiels et ne s'auraient être divulgués. Les renseignements personnels concernant chaque patient ont été codifiés par un numéro qui ne permettra pas d'identifier le malade lors de la publication des résultats de l'étude. Nous avons pris soins de respecter les bonnes pratiques cliniques (BPC) et de laboratoires (BPL) au niveau de toutes les procédures de laboratoire.

3.8. Analyse des données

Les données collectées ont été saisies et analysées grâce au logiciel R version 4.3.1. Les tableaux de fréquence ont servi à présenter les données qualitatives, et la comparaison des données qualitatives a été faite sur des tableaux croisés avec utilisation du test exact de Fisher (à un seuil de significativité $p \leq 0,05$). La cartographie a été réalisée avec le logiciel R version 4.3.1. Les résultats de notre étude ont été présentés sous forme de tableaux, graphiques et cartes.

04.

RESULTATS

4. RESULTATS

4.1. Résultats globaux

Au cours de la période de notre étude, des échantillons ont été prélevés chez les cas suspects de la rage humaine. Ces échantillons ont été analysés par RT-qPCR et RT-PCR qui ont abouti aux résultats comme suit :

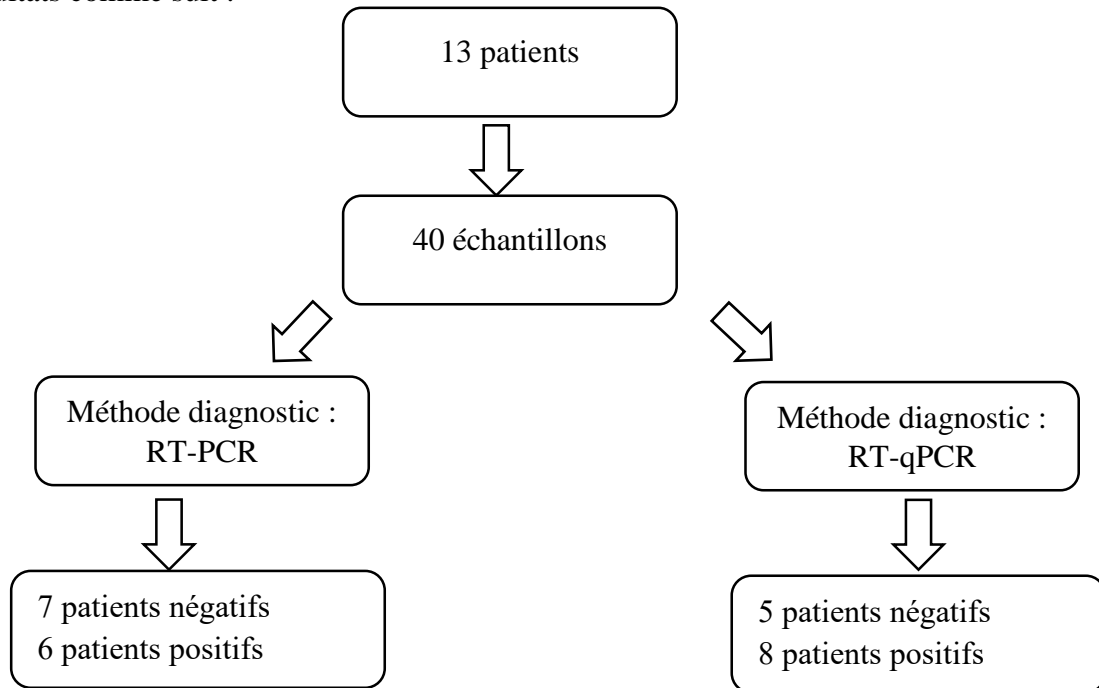


Figure 13: Diagramme de démarche du choix de nos échantillons

Sur 13 patients suspects, un total 40 échantillons de différentes natures ont été prélevés et testés, 19 échantillons se sont révélés positifs présentant des valeurs Ct inférieures à 40 cycles ($Ct < 40$) confirmant la présence du matériel génétique du virus de la rage chez 8 patients sur les 13 cas suspects.

4.2. Résultats descriptifs

4.2.1. Données socio-démographiques

4.2.1.1. Répartition des participants en fonction du sexe

Les données socio-démographiques ont été obtenues. La répartition en fonction du sexe est représentée sur la figure 8.

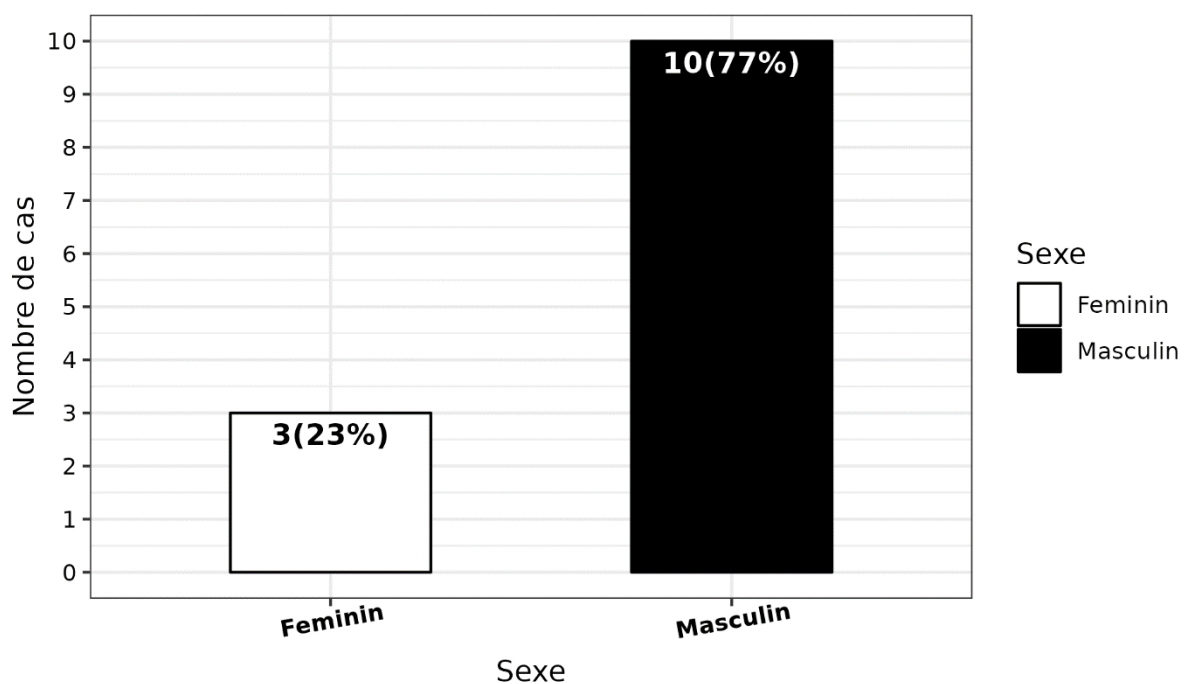


Figure 14: Diagramme de la répartition des échantillons en fonction du sexe

Le sex-ratio est de 3,33.

4.2.1.2. Distribution des patients en tranche d'âge

Les effectifs et les pourcentages des participants comparés en fonction des différentes tranches d'âges qui varient ont été consignés dans le tableau récapitulatif IX.

Tableau IX : Répartition des patients en tranche d'âge

Tranches d'âge (ans)	Effectifs	Pourcentage (%)
5- 15	5	39
16 - 30	4	31
31 – 45	2	15
Non renseigné	2	15
Total	13	100,0

L'âge des patients varient entre 5 et 45 ans. Globalement, les enfants étaient majoritaires dans notre étude avec 39%.

4.2.1.3. Distribution des participants selon le sexe et la tranche d'âge

Les participants à notre étude ont été repartis en fonction du sexe et de l'âge dans des tranches d'âge représenté dans le tableau X ci-dessous.

Tableau X : Répartition des patients selon le sexe et la tranche d'âge

Sexe			
Tranches d'âge (ans)	Féminin	Masculin	Total
5- 15	2	3	5
16 - 30	1	3	4
31 – 45	0	2	2
Non renseignés	0	2	2
Total	3	10	13

L'âge moyen de notre population était de 20,36 ans avec un écart type de 12,28.

4.2.1.4. Répartition des patients selon la profession

Tableau XI: Répartition des patients selon la profession

Profession	Effectifs	Pourcentage (%)
Élève	4	30,77
Apprenti manœuvre	1	7,69
Militaire	1	7,69
Garde	1	7,69
Cultivateur	3	23,08
Non Renseigné	3	23,08
Total	13	100

Les élèves sont les plus fréquents avec une valeur de 30,77%.

4.2.1.5. Répartition des patients selon la région administrative du Mali

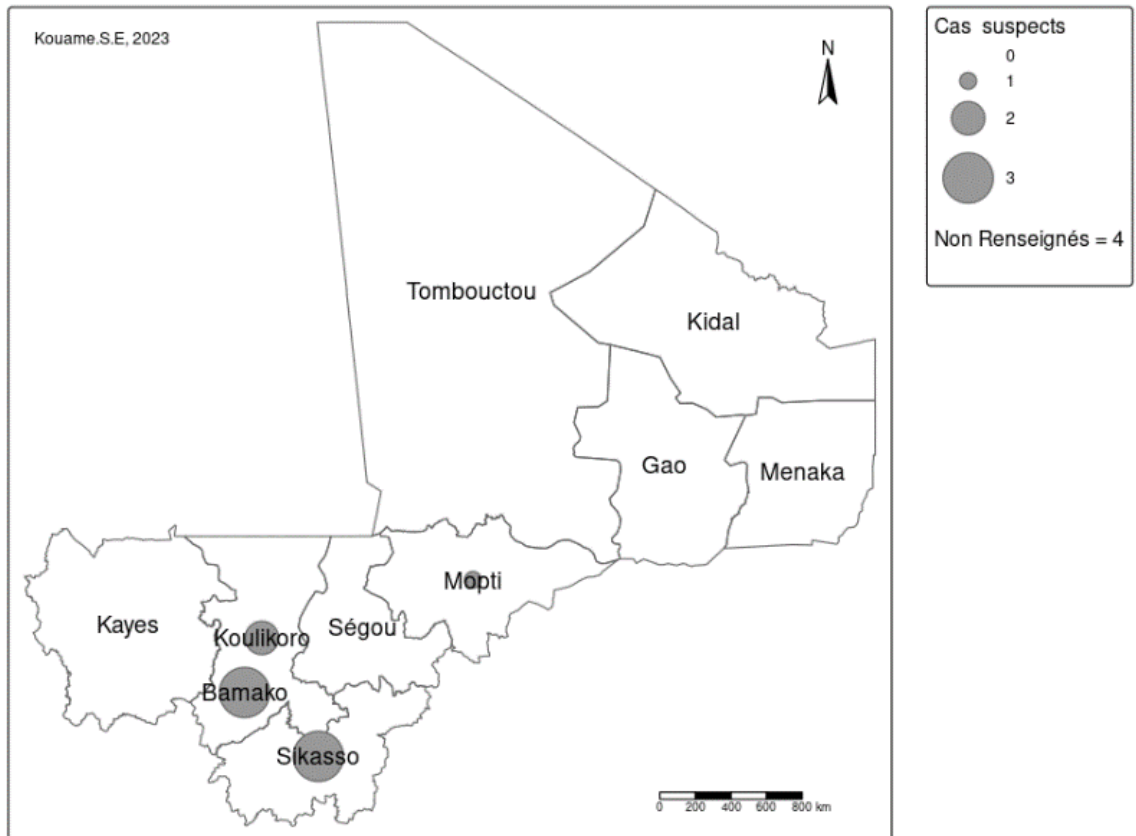


Figure 15: Répartition des patients selon la région administrative du Mali

Sikasso et Bamako ont enregistré 3 cas suspects.

4.2.2. Données cliniques

4.2.1.6. Répartition des patients selon le prélèvement effectué

Différents prélèvements ont été effectués sur les patients notamment le sang, la salive, la biopsie de la peau et le LCS (Tableau XII).

Tableau XII: Répartition des patients selon le prélèvement effectué

Patient code	Sang	Salive	Biopsie de la peau	LCS
P001	NP	3	NP	2
P002	NP	1	1	NP
P003	NP	1	1	2
P004	NP	2	NP	NP
P005	NP	4	NP	1
P006	NP	2	NP	2
P007	NP	1	NP	NP
P008	1	1	NP	NP
P009	1	1	NP	NP
P010	2	2	NP	NP
P011	NP	2	NP	NP
P012	NP	2	1	1
P013	NP	1	1	1
Total	4	23	4	9

NP : Non Prélevé

Il ressort que la salive est le type d'échantillon le plus prélevé notamment avec 57,5%.

4.2.1.7. Répartition des patients selon le siège de morsure

Tableau XIII: Répartition des patients selon le siège de morsure

Patient code	Site de la morsure
P001	NR
P002	NR
P003	NR
P004	Membre inférieur (Fesse droite)
P005	Membre supérieur (Main gauche)
P006	NR
P007	NR
P008	Membre supérieur (Avant-bras gauche)
P009	Tête (Paupière de l'œil droit)
P010	Membre inférieur (Jambe droite)
P011	Membre supérieur (Pouce Droit)
P012	Membre inférieur (Pied gauche)
P013	NR

NR : Non Renseigné

La morsure et griffure de chien se répartissaient préférentiellement au niveau des membres supérieurs (3/10) et inférieurs (3/10) comme le montre le tableau XIII.

4.2.1.8. Motifs de diagnostic

Tableau XIV: Répartition des patients selon le motif de diagnostic

Symptômes	Effectifs	Pourcentage (%)
Agitation	10	76,92
Hypersalivation	8	61,54
Hydrophobie	7	53,85
Aérophobie	4	30,77

L'agitation est le symptôme le plus fréquent parmi les patients de l'étude.

4.2.1.9. Répartition des patients selon l'évolution clinique

Tableau XV: Répartition des patients selon l'évolution clinique

Evolution	Effectifs	Pourcentage (%)
Décédé	7	54
Guéri	3	23
Non renseigné	3	23
Total	13	100

La majorité des patients est décédée avec 54%.

4.3. Résultats analytiques

4.3.1. Fréquence de détection moléculaire du RABV par RT-qPCR

Les tests de RT-qPCR effectués sur les échantillons ont donné les résultats suivant dans le tableau XVI.

Tableau XVI: Fréquence de la rage chez les patients par la RT-qPCR

Résultats	Effectifs	Pourcentage (%)
Négatif	5	38,5
Positif	8	61,5
Total	13	100,0

La fréquence de la rage durant notre période d'étude était de 61,5% (8 cas positif sur 13 cas testés).

4.3.2. Données socio-démographiques

4.3.2.1. Répartition des résultats de RT-qPCR en fonction de la tranche d'âge

Les résultats de RT-qPCR ont été repartis en fonction des tranches d'âge des participants dans le tableau suivant.

Tableau XVII: Répartition des résultats par RT-qPCR selon la tranche d'âge des patients

Tranches d'âge (ans)	RT-qPCR		Total
	Négatif	Positif	
5- 15	2	3	5
16 - 30	1	3	4
31 – 45	1	1	2
Non renseigné	1	1	2
Total	5	8	13

La tranche d'âge ≤ 15 ans et de 16 à 30 ans se sont révélés les plus atteints avec 37,50% de positif. L'âge moyen des cas confirmés était 19,14 ans avec un écart type de 11,15.

4.3.2.2. Répartition de la fréquence de la rage selon le sexe des participants

Les résultats de RT-qPCR ont été repartis en fonction du sexe des participants dans le tableau XVIII.

Tableau XVIII: Répartition des résultats par RT-qPCR selon le sexe des patients

Sexe	RT-Qpcr		Total
	Négatif	Positif	
Masculin	5	5	10
Féminin	0	3	3
Total	5	8	13

P-value =0,231

L'infection par le virus de la rage touchait majoritairement le sexe masculin (positifs) soit 62,50%. Il n'y a pas de lien statistiquement significatif entre le sexe et l'infection par le virus de la rage ($p > 0,05$).

4.3.2.3. Répartition des résultats par RT-qPCR selon les mois de notifications

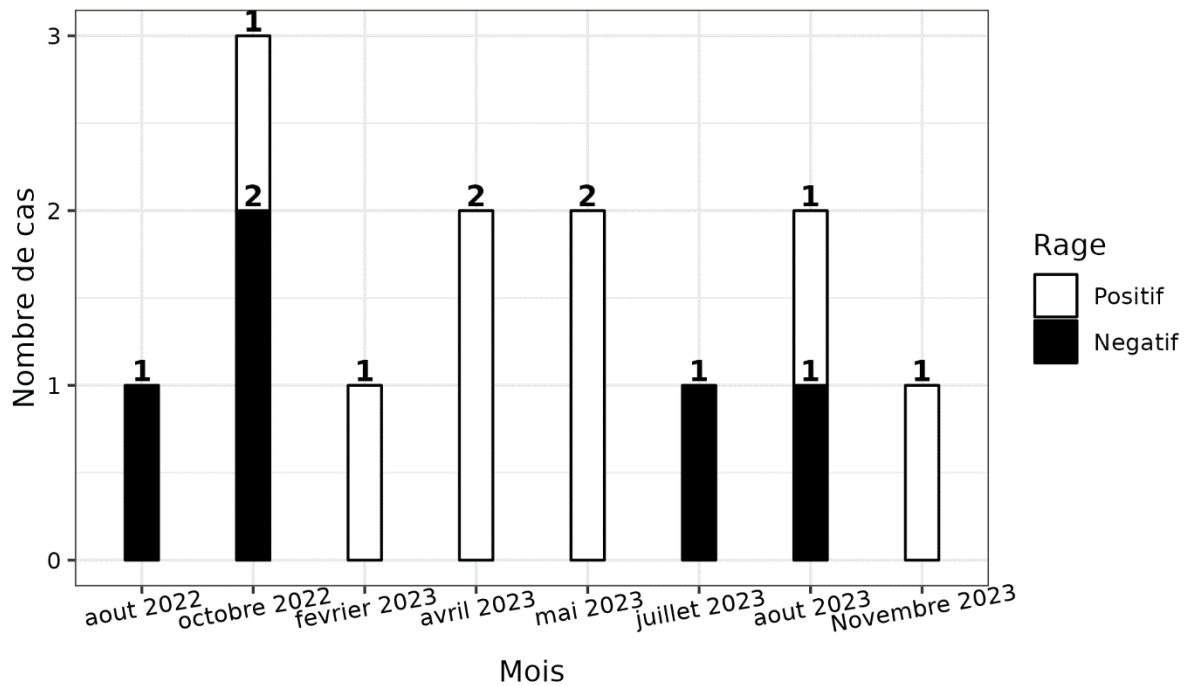


Figure 16: Répartition des résultats par RT-qPCR d'août 2022 à novembre 2023

Les mois d'octobre 2022 et les mois d'avril, mai et aout 2023 ont été les mois avec plusieurs cas positifs enregistrés.

4.3.2.4. Répartition des résultats des patients selon la région administrative du Mali

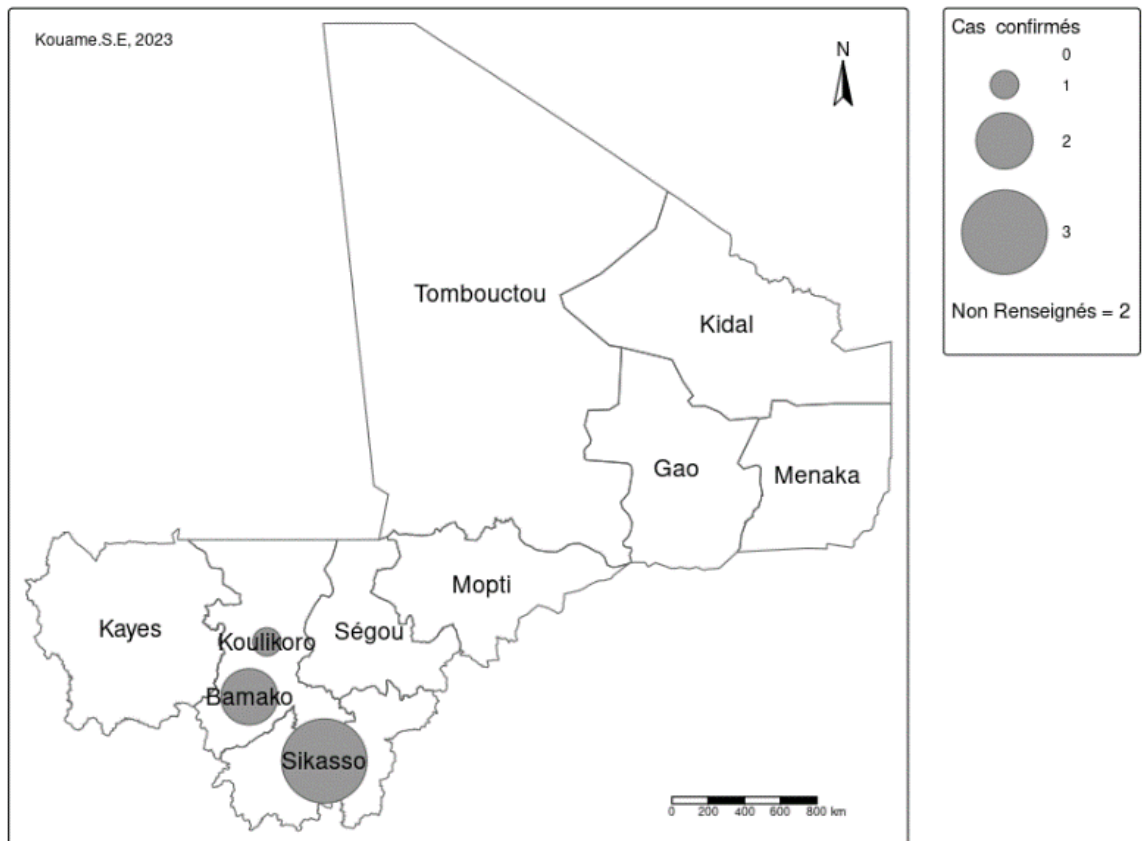


Figure 17: Répartition des résultats des patients selon la région administrative du Mali

4.3.3. Données cliniques

4.3.3.1. Répartition des résultats de RT-qPCR en fonction du type d'échantillon

Tableau XIX: Répartition des résultats de RT-qPCR selon le type d'échantillon

Patient code	RT-qPCR							
	Sang		Salive		Biopsie de la peau		LCS	
	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif	Négatif	Positif
P001	NP	NP	3	0	0	0	2	0
P002	NP	NP	0	1	0	1	NP	NP
P003	NP	NP	1	0	1	0	2	0
P004	NP	NP	0	2	NP	NP	NP	NP
P005	NP	NP	0	4	NP	NP	0	1
P006	NP	NP	0	2	NP	NP	2	0
P007	NP	NP	0	1	NP	NP	NP	NP
P008	0	1	0	1	NP	NP	NP	NP
P009	0	1	0	1	NP	NP	NP	NP
P010	2	0	2	0	NP	NP	NP	NP
P011	NP	NP	2	0	NP	NP	NP	NP
P012	NP	NP	0	2	1	0	1	0
P013	NP	NP	0	1	0	1	1	0
Total	2	2	8	15	2	2	8	1

NP : Non Prélevé

4.3.3.2. Répartition des résultats de RT-qPCR en fonction du site de morsure

Tableau XX : Répartition des résultats de RT-qPCR selon le siège de la morsure

Patient code	Site de la morsure	RT-qPCR
P001	NR	Négatif
P002	NR	Positif
P003	NR	Négatif
P004	Membre inférieur (Fesse droite)	Négatif
P005	Membre supérieur (Main gauche)	Positif
P006	NR	Positif
P007	NR	Positif
P008	Membre supérieur (Avant-bras gauche)	Positif
P009	Tête (Paupière de l'œil droit)	Positif
P010	Membre inférieur (Jambe droite)	Négatif
P011	Membre supérieur (Pouce droit)	Négatif
P012	Membre inférieur (Pied gauche)	Positif
P013	Aucun	Positif

NR= Non Renseigné

4.3.3.3. Motifs de diagnostic

Nous avons répertorié les motifs de demande d'analyse pour la recherche du virus de la rage et comparé avec les résultats de la RT-qPCR

Tableau XXI : Répartition des patients selon les motifs d'analyse et les résultats de RT-qPCR

Symptômes	RT-qPCR	
	Positif	Négatif
Agitation	7	6
Hypersalivation	6	7
Hydrophobie	4	9
Aérophobie	3	10

L'agitation était le motif le plus répandue dans les demandes d'analyses. Aussi les cas positifs par la RT-qPCR présentaient majoritairement l'agitation (76,92%) et l'hypersalivation (61,54%) comme symptôme.

4.3.3.4. Répartition des résultats de RT-qPCR selon l'évolution des patients

Tableau XXII: Répartition des résultats par RT-qPCR selon l'évolution clinique des patients

Evolution	RT-qPCR	
	Négatif	Positif
Décédé	2	7
Guéri	2	0
Non renseigné	1	1
Total	5	8

4.3.3.5. Fréquence de détection par RT-PCR

Après migration électrophorétique, des bandes ont été visualisées à l'UV.

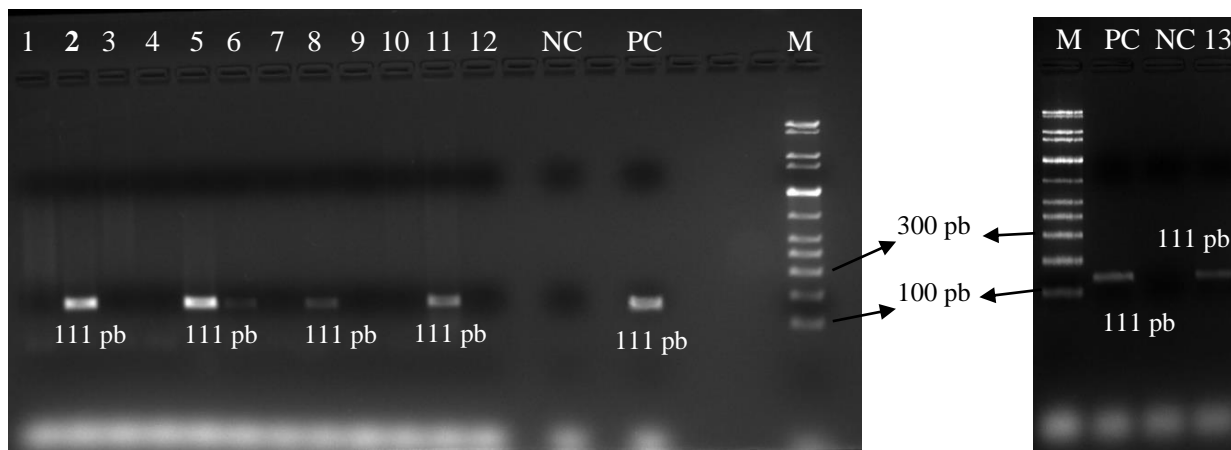


Figure 18: Produits de la RT-PCR sur 2 gels d'agarose

Le couple d'amorce utilisé pour la RT-PCR était JW12/N165-146, et la taille du produit attendu était de 111 paires de bases (pb). Les échantillons 2, 5, 6, 8, 11 et 13 ont été positifs. M = marqueur de taille d'ADN de 100 bp ; puis 1 à 12 = échantillons testés ; NC= contrôle négatif.; PC = contrôle positif.

05.

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Il s'agissait d'une étude transversale descriptive et analytique à collecte prospective. Le principal but était le diagnostic moléculaire de la rage humaine et d'analyser les facteurs associés à Bamako dans la période du 1^{er} août 2022 au 30 novembre 2023. Pour cela nous avons effectué le test de diagnostic moléculaire « RT-qPCR ». Au total, elle a porté sur des échantillons provenant de cas suspects de rage humaine, tous testés au sein du laboratoire de Biologie moléculaire de l'UCRC à Bamako, au Mali.

5.1. Limites de l'étude

Nous ne saurions débutés cette discussion sans parler des limites de cette étude. Nous avons été limités dans l'acquisition des échantillons. En effet, il était compliqué de pouvoir avoir des échantillons suffisants pour confirmer la négativité des résultats chez certains patients. De plus certains échantillons de salive étaient conservés dans des conservateurs. Les échantillons de biopsie cutanée n'étaient pas disponibles chez la majorité des patients Le non-prélèvement d'échantillons en post-mortem pour des patients testés négatifs en ante-mortem.

Aussi, la réticence de la famille des patients à donner leur consentement pour le prélèvement vu la succession des prélèvements. Une fiche de renseignement spécifiques pour le diagnostic de la rage humaine n'était pas disponible. Du coup, les fiches de demande de diagnostic n'étaient pas renseignées complètement (absence de certaines informations de certains patients comme l'âge, la résidence, le site de la morsure, le motif de diagnostic).

5.2. Analyses

5.2.1. Cas suspects de rage humaine

5.2.1.1. Données Socio-démographiques

Durant notre période d'étude, nous avons recensé 13 cas suspects de rage humaine (figure 9). Cette valeur est supérieure à celle des 5 cas observés par Dembélé et al au cours de l'année 2013 au service des maladies infectieuses (SMIT) du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) du Point G [40]. Aussi , elle est égale au 13 cas de rage humaine observé par Diaby entre 2014

et 2017 [41]. Cette valeur est supérieure aux 7 cas de suspicions de rage humaine rapporté par Ndioubnane, du 1^{er} janvier 2018 au 31 décembre 2020, tous hospitalisés au SMIT [42]. Ces divergences pourraient s'expliquer par la durée d'étude. En effet, notre étude a été réalisée sur 1 an 4 mois tandis que celle de Ndioubnane s'est déroulée sur 2 ans et celle de Dembélé et al sur 1 an.

Dans notre étude, les enfants de 5-15 ans ont été les plus fréquents avec une valeur de 39% (tableau IX) et l'âge moyen a été de 20,36 ans (5-43) (tableau X). Aussi, 2 patients dépassaient la trentaine. Nos résultats sont similaires à ceux de Ndioubnane, les patients de la tranche d'âge 05-20 ans avec une valeur de 71% et la moyenne d'âge était de 14,14 ans [42]. Ces résultats nous montrent que les enfants sont les plus exposés à la rage. En effet, les enfants, du fait de leur petite taille et de leur contact fréquent avec les chiens domestiques comme errants [21], ont un risque plus élevé d'être exposés au virus de la rage.

Nous avons enregistré une prédominance masculine de 77% des cas et un sexe-ratio de 3,33 (figure 10). Nos résultats sont similaires à ceux de Dembélé et al qui avaient trouvé 3 patients de sexe masculin et 2 de sexe féminin [40]. Aussi, Nos résultats sont contraires à ceux de Ndioubnane et Diaby où le sexe féminin n'était pas présent. Néanmoins, ces études nous témoignent de la prédominance du sexe masculin [41,42].

Les élèves et les cultivateurs ont été les plus atteints avec respectivement une fréquence de 30,77% et 23,08% (tableau XI). Diaby avait trouvé des élèves et des cultivateurs qui représentaient respectivement 53,8 % et 38,5 % [41]. Dans l'étude de Ndioubnane, la majeure partie des patients étaient des élèves soit 72% [42]. Tandis que Dembélé et al avaient 40% des patients qui étaient des cultivateurs [40].

Trois cas suspects (23%) provenaient de Sikasso et aussi 3 cas suspects provenaient de Bamako (23%) (figure 11). Les résultats sont contraires à d'autres études. Dans l'étude de Ndioubnane, les cas provenaient de la région de Koulikoro (86%) et de Bamako (14%) [42]. Dans l'étude de Diaby dont 38,5 % des cas résidaient à Bamako et le reste en dehors de Bamako [41].

5.2.1.2. Données Cliniques

Dans notre étude, l'agitation a été le principal motif de consultation présent chez 10 /13 patients soit 76,92%. L'hydrophobie était de 53,85%, l'hypersalivation était de 61,54%, l'aérophobie était manifestée chez 30,77% des patients (tableau XIV). L'hydrophobie était présentée chez

61.5% des patients dans l'étude de Diaby. Ndioubnane trouvaient 71% des cas qui présentaient une hydrophobie, l'agitation dans les 100% des admission suivis d'hypersialorrhée et de grognement [41,42]. L'hydrophobie a été observé chez tous les patients de Dembélé et al [40]. En l'absence de symptômes typiques ou d'exposition documentée, le diagnostic de la rage sur la seule base clinique est difficile et souvent peu fiable [4].

Dans notre étude, le chien a été le vecteur de transmission du virus chez 12 patients. Les morsures ou griffures de chiens se situaient équitablement au niveau des membres supérieurs (3/13) et des membres inférieurs (3/13) ([tableau XIII](#)). D'autres études au Mali, nous rapportent que les membres supérieurs sont les plus atteints par les morsures de chiens. Les membres supérieurs étaient les plus atteints par la morsure de chien avec 61,5 % dans l'étude de Diaby [41]. La morsure de chien était située au niveau des membres supérieurs chez 57% des victimes dans l'étude de Ndioubnane [42]. Les membres supérieurs étaient les plus impliqués (4/5) par la morsure de chien dans l'étude de Dembélé et al [40].

5.2.2. Cas confirmés de rage humaine

5.2.2.1. Fréquence de détection moléculaire du virus de la rage par la RT-qPCR

Les liquides biologiques (tels que salive, LCS, larmes, sérum) et certains tissus (tels que biopsies, incluant des follicules pileux au niveau de la nuque) peuvent être utilisés pour le diagnostic intra vitam de la rage [4]. La meilleure sensibilité diagnostique sera fournie par trois échantillons de salive, prélevés à intervalle de 3 à 6 h et par les biopsies de peau au niveau de la nuque [4].

Après analyse RT-qPCR, 8 cas de rage ont été confirmés parmi les 13 cas suspects soit une fréquence de détection moléculaire de 61,5% de positif au RABV ([tableau XVI](#)).

Une étude effectuée au Cameroun a montré un faible taux de détection moléculaire du RABV chez des cas suspects de la rage humaine. Au total, 10 des 21 cas humains étudiés ont été testés positifs par RT-qPCR [43]. Ce taux est inférieur au nôtre malgré la grande période de leur étude qui est de 2014 à 2018. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les échantillons prélevés étaient constitués que de salive et biopsie cutanée.

Parmi les 40 échantillons prélevés chez les 13 cas suspects de la rage, l'ARN du virus de la rage a été détecté sur 15/23 échantillons de salive, 2/4 échantillons de sang, 2/4 échantillons de

biopsie de peau et 1/9 échantillons de LCS (tableau XIX). Il est à noter que nous avons pu détecter l'ARN du virus de la rage sur une variété d'échantillons biologiques reçus. Dans la littérature, d'autres études ont aussi montré l'utilisation la PCR en temps réel sur différents types d'échantillons.

Behnoush et al ont utilisé la PCR en temps réel en utilisant comme sonde SYBR green sur des échantillons provenant de 9 cas suspects de rage humaine en Iran. Les échantillons de salive ante mortem de 2 patients décédés se sont révélés positifs par PCR en temps réel SYBR Green. Les résultats de cette étude suggèrent que la technique de PCR en temps réel SYBR Green sur un échantillon de salive peut être utilisée pour un diagnostic rapide de la rage afin d'éviter l'infection d'autres personnes telles que le personnel médical traitant ou les membres de la famille du patient [44].

Aussi, dans une étude menée par Reeta et al, la PCR en temps réel TaqMan a permis la détection de l'ARN du virus de la rage dans 5/11 (45,4 %) échantillons de LCR, 6/10 (60 %) biopsies cutanées de la nuque et 6/7 (85,7 %) échantillons de salive reçus pour le diagnostic ante mortem . La PCR en temps réel en utilisant la sonde TaqMan a permis à elle seule de diagnostiquer la rage ante mortem dans 11/13 (84,6 %) patients [45].

Denise et al ont validé un test RT-PCR en temps réel *pan-Lyssavirus* basé sur le SYBR green qui détecte toutes les espèces de *Lyssavirus*. Le test a été validé sur le tissu cérébral post mortem et les échantillons ante mortem (biopsies cutanées, la salive, le LCR). De plus le test a été adopté par de nombreux laboratoires de diagnostic dont la qualité est assurée, ce qui permet un diagnostic robuste, rapide et sensible des cas de rage. Comme principal avantage du test, étant basé sur le SYBR green, son coût relatif par rapport à un test basé sur une sonde. Un autre avantage est que le test n'utilise que deux amorces, ce qui réduit le risque d'échec de la détection en raison d'une divergence de séquence [46].

Martin et al ont validé deux tests RT-PCR en temps réel qui ont été mis au point pour la détection à grande échelle des souches africaines de RABV. Les ensembles d'amorces et de sondes TaqMan ciblaient des régions conservées des gènes de la nucléoprotéine (N) et de la polymérase (L). La détection efficace et la sensibilité élevée de ces tests sur les isolats africains ont montré qu'ils peuvent être appliqués avec succès dans la recherche générale et utilisés dans le processus de diagnostic et la surveillance des épizooties en Afrique en utilisant une stratégie de double vérification [47].

Laurent et al ont développé une méthode combinée de RT-qPCR pour la détection de *pan-Lyssavirus*. Une méthode RT-qPCR était basé sur une sonde TaqMan pour détecter l'espèce RABV et une seconde RT-qPCR utilisaient le SYBR Green pour détecter d'autres espèces de *Lyssavirus* (pan-lyssa RTqPCR). Elle a permis de détecter les 41 cas humains de rage testés et de confirmer la sensibilité et l'intérêt des échantillons de biopsie cutanée (91,5 %) et de salive (54 %) pour le diagnostic intra-vitam de la rage humaine [48].

5.2.2.2. Données socio-démographiques

Les enfants d'âge ≤ 15 ans et la tranche d'âge de 16 à 30 ans se sont révélés les plus atteints avec 37,50% de positif ([tableau XVII](#)). L'âge moyen parmi les cas confirmés étaient 19,14 ans (5-40) ([tableau XVII](#)). Ce résultat est contraire à d'autres tests qui ont été effectués dans d'autres pays. En Iran, une étude avait enregistré 2 patients positifs âgé de 80 ans et 50 ans testés positives par la PCR en temps réel SYBR Green [44]. Au Qatar, un homme de 33 ans avait été testé positif par la PCR en temps réel sur la salive [49]. Au Maroc, l'âge moyen était de 42,4 ans chez des patients testés positives par l'immunofluorescence directe dans la salive, sécrétions pharyngées, les urines et le LCR [50]. Dans une autre étude au Maroc, L'âge moyen était de 43,74 ans chez des patients testés positives par l' immunofluorescence directe et par PCR dans les liquides biologiques [51].

L'infection à la rage prédominait dans le sexe masculin (5 positifs) que féminin (3 positifs) ([tableau XVIII](#)). Cela est conforme à la littérature qui stipule la prédominance masculine parmi les cas confirmés de la rage. En Inde, parmi 18 cas confirmés en post-mortem, 14 étaient des hommes et 4 des femmes [45]. Au Maroc, Le sexe masculin a aussi prédominé (12 Hommes /4 Femmes) [50]. Dans une autre étude au Maroc, le sexe masculin était majoritaire avec un sexe ratio 2,64 (37 Hommes, 14 Femmes) [51].

Le pic de cas de rage a été observé au mois d'octobre 2022 et les mois d'avril et mai 2023 ([figure 12](#)).

3 cas confirmés provenaient de Sikasso et 2 de Bamako ([figure 13](#)).

5.2.2.3. Données cliniques

Parmi les 8 cas confirmés par la RT-qPCR, 7 patients présentaient l'agitation, 6 présentaient l'hypersalivation, 4 présentaient l'hydrophobie et 3 patients présentaient l'aérophobie (tableau XXI). Ces données confirment les observations faites dans d'autres études sur la difficulté de diagnostic de la rage en absence de l'hydrophobie et de l'aérophobie [52,53]. L'étude au Sénégal recommandait la recherche du virus de la rage devant toute encéphalite d'origine indéterminée même en l'absence d'aérophobie et d'hydrophobie [53].

Dans notre étude, 2 patients confirmés par RT-qPCR ont été mordus au niveau des membres supérieurs et 1 au niveau du membre inférieur (tableau XX). Dans l'étude d'Iran, 1 patient confirmé avait été mordu au niveau de la tête par une mangouste et l'autre patient confirmé avait été mordu au niveau de la tête, visage et main par un renard [44]. Au Qatar, un patient avait été mordu à l'oreille droite par un animal inconnu [49]. Au Maroc, les morsures de chiens siégeaient au niveau des membres supérieurs dans 9 cas, le membre inférieur dans 7 cas [50]. Dans une autre étude au Maroc, La morsure touchait préférentiellement les membres supérieurs (72,54 %) [51]. Le chien était l'animal en cause dans la majorité des cas (88,23 %) et le chat dans 6 cas [51].

5.2.2.4. Fréquence de détection du virus de la rage par la RT-PCR

Un pool a été réalisé à partir des échantillons provenant de chaque patient. Ces différents pools ont été soumis à la RT-PCR. Après électrophorèse des amplicons et visualisation à l'UV, 6 pools d'échantillons ont été positifs soit un total de 6/13 patients contrairement à la RT-qPCR qui avait donné 8/13 patients (figure 14). Ce résultat pourrait s'expliquer par la dégradation du matériel génétique ou la présence de faux positifs lors de la RT-PCR. En effet, la RT-PCR n'a pas été effectuée directement après extraction de l'ARN. La RT-PCR a été effectuée sur l'ARN conservé dans un réfrigérateur de -80°C jusqu'à la survenue du 12^{ème} cas suspects de rage humaine .

Le couple d'amorce JW12/N165-146 utilisé pour la RT-qPCR nous a aussi servi pour effectuer la RT-PCR. Des bandes de 111 paires de bases ont été visualisées à l'UV après électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. Ces données sont retrouvées dans la littérature. En effet, la taille

attendue avec le couple d'amorce JW12/N165-146 doit être de 111 paires de bases [54]. Dans une étude menée en Chine pour la recherche de *Lyssavirus*. Des échantillons provenant de chauve-souris ont donné des produits d'amplicons de 111 paires de bases après RT-PCR avec les amorces JW12/N165-146 [55].

5.3. Cas non confirmés de la rage humaine

Malgré la négativité du test PCR chez 5 patients, 2 patients ayant un résultat négatif ont succombé par suite de la morsure d'un chien ([tableau XXII](#)). Cela pourrait s'expliquer par le type de prélèvement, l'excrétion intermittente du virus, l'intervalle d'heure entre les prélèvements [8]. En effet, nous n'avons pas disposé d'autre prélèvements en dehors de ceux prélevés le jour de l'admission des patients à l'hôpital pour confirmer la négativité à la rage. D'autres prélèvements devaient être réalisés 5-7 jours après la première série de prélèvements afin d'être analysés, ainsi que des prélèvements en post-mortem au cas où les résultats demeuraient négatifs [8]. Aussi, La biopsie de la peau n'était pas parmi les échantillons (salives et sangs) prélevés chez les patients. Un cas similaire à Doha qui avait présenté une négativité des tests PCR dans le LCR et la biopsie de la nuque n'ont pas exclu le diagnostic de rage [49]. Deux tests PCR en temps réel différents pour le RABV sur des échantillons de salive se sont révélés positifs [49].

06.

**CONCLUSION
ET
RECOMMANDATIONS**

6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

6.1. Conclusion

Cette étude, nous a permis de démontrer la performance de la RT-qPCR avec un taux de positivité de 8/13 cas suspects de rage humaine. Cependant, la RT-PCR a confirmé que 6 cas positifs. Ces résultats suggèrent par conséquent une nécessité de développer les techniques moléculaires au Mali pour un diagnostic précoce de la rage humaine.

6.2. Recommandations

Au terme de notre étude et au regard de nos résultats, nous pouvons formuler les recommandations suivantes :

Aux autorités sanitaires

- Encourager la formation des agents de santé sur le diagnostic de la rage
- Renforcer et pérenniser l'information, l'éducation et la communication du public sur les moyens de prévention contre la rage
- Elaborer des campagnes de sensibilisation des enfants pour apprendre les attitudes à adopter aux animaux errants.
- Intensifier les programmes de vaccinations des chiens

Aux chercheurs

- Effectuer une surveillance de la rage humaine au Mali
- Effectuer le séquençage et la métagénomique pour connaître les *Lyssavirus* circulant au Mali et connaître l'agent pathogène responsable de décès des cas non confirmés

Aux personnels sanitaires

- Faire une demande systématique d'examen biologique devant tout cas d'encéphalite d'origine inconnu.
- Meilleure collaboration entre les vétérinaires, agents de santé et biologistes

A la population générale

- Vacciner tous les animaux domestiques
- Se faire vacciner si on est une personne à risque
- Se rendre au centre de santé le plus proche en cas de morsure ou griffure d'animal
- Ne pas négligé une morsure ou griffure d'animal même si guérison de la plaie après traitement
- Respecter les mesures de prévention édictées par les autorités sanitaires en cas de morsure de chiens.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] World Health Organization (WHO). Rabies vaccines: WHO position paper – April 2018 – Vaccins antirabiques: Note de synthèse de l’OMS – avril 2018. *Weekly Epidemiological Record* 2018;93:201–19.
- [2] Jackson AC. Rabies: a medical perspective. *Rev Sci Tech* 2018;37:569–80.
- [3] Bourhy H, de Melo GD, Tarantola A. Nouveaux aspects de la lutte contre la rage. *Bull Acad Natl Med* 2020;204:1000–9.
- [4] World Health Organization (WHO). WHO Expert Consultation on rabies, third report. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2018;1012:1–88.
- [5] Rupprecht CE, Mani RS, Mshelbwala PP, Recuenco SE, Ward MP. Rabies in the Tropics. *Curr Trop Med Rep* 2022;9:28.
- [6] Kallo V, Keita Z, Boka M, Tetchi M, Dagnogo K, Ouattara M, et al. Rabies burden in Côte d’Ivoire. *Acta Trop* 2022;226:106249.
- [7] Traoré A, Keita Z, Léchenne M, Mauti S, Hattendorf J, Zinsstag J. Rabies surveillance-response in Mali in the past 18 years and requirements for the future. *Acta Trop* 2020;210:105526.
- [8] Bourhy H, Dacheux L, Parize P. Modalités relatives à une demande de diagnostic de la rage humaine. 2023, p.4.
- [9] Rohde RE, Rupprecht CE. Update on lyssaviruses and rabies: will past progress play as prologue in the near term towards future elimination? *Fac Rev* 2020;9.
- [10] Albertini AAV, Ruigrok RWH, Blondel D. Rabies Virus Transcription and Replication. *Adv Virus Res* 2011;79:1–22.
- [11] Jackson AC, Wunner WH. Rabies Scientific Basis of the Disease and Its Management. Elsevier; 2007, p.680.
- [12] Iseni F, Barge A, Baudin F, Blondel D, Ruigrok RWH. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *Journal of General Virology* 1998;79:2909–19.
- [13] Dacheux L, Bourhy H. Le diagnostic de la rage. *Revue Francophone Des Laboratoires* 2011;2011:33–40.
- [14] Wunner WH, Conzelmann KK. Rabies virus. Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management1. Wunner WH, Conzelmann KK. Rabies virus. In: Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management. Academic Press; 2013. p. 17–60., Academic Press; 2013, p. 17–60.
- [15] Hemachudha T, Laothamatas J, Rupprecht CE. Human rabies: A disease of complex neuropathogenetic mechanisms and diagnostic challenges. *Lancet Neurology* 2002;1:101–9.

- [16] Hemachudha T, Wacharapluesadee S, Mitrabhakdi E, Wilde H, Morimoto K, Lewis RA. Pathophysiology of human paralytic rabies. *J Neurovirol* 2005;11:93–100.
- [17] Jackson AC. Rabies Scientific Basis of the Disease and Its Management, Elsevier; 2013, p. 704.
- [18] Garg SR. Rabies Manifestations and Diagnosis. Rabies in Man and Animals, Springer, New Delhi; 2014, p. 37–49.
- [19] Dacheux L, Delmas O, Bourhy H. Human Rabies Encephalitis Prevention and Treatment: Progress Since Pasteurs Discovery. *Infect Disord Drug Targets* 2012;11:251–99.
- [20] Amarasinghe GK, Bào Y, Basler CF, Bavari S, Beer M, Bejerman N, et al. TAXONOMY OF THE ORDER MONONEGAVIRALES: UPDATE 2017. *Arch Virol* 2017;162:2493.
- [21] Banyard AC, Fooks AR. Rabies and Other Lyssaviruses (Rhabdoviridae). *Encyclopedia of Virology: Volume 1-5, Fourth Edition* 2021;1–5:738–46.
- [22] Ribadeau DF, Dacheux L, Bourhy H. La rage. *Médecine/Sciences* 2013;29:47–55.
- [23] Vigilato MAN, Cosivi O, Knöbl T, Clavijo A, Silva HMT. Rabies update for Latin America and the Caribbean. *Emerg Infect Dis* 2013;19:678–9.
- [24] Vigilato MAN, Clavijo A, Knobl T, Silva HMT, Cosivi O, Schneider MC, et al. Progress towards eliminating canine rabies: policies and perspectives from Latin America and the Caribbean. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013;368.
- [25] Ivanov I, Yabukarski F, Ruigrok RWH, Jamin M. Structural insights into the rhabdovirus transcription/replication complex. *Virus Res* 2011;162:126–37.
- [26] Le Blanc I, Luyet PP, Pons V, Ferguson C, Emans N, Petiot A, et al. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol* 2005;7:653–64.
- [27] Finke S, Cox JH, Conzelmann K-K. Differential Transcription Attenuation of Rabies Virus Genes by Intergenic Regions: Generation of Recombinant Viruses Overexpressing the Polymerase Gene. *J Virol* 2000;74:7261.
- [28] Garg SR. Causation of Disease. Rabies in Man and Animals, Springer, New Delhi; 2014, p. 7–14.
- [29] Jackson AC. Human disease. Rabies Scientific Basis of the Disease and its Management, Elsevier; 2020, p. 277–302.
- [30] World Health Organization (WHO). Laboratory techniques in rabies. Fifth edition. Volume 1. Laboratory Techniques in Rabies 2019;1:304.

- [31] Rupprecht CE, Fooks AR, Abela-Ridder B, Laboratory techniques in rabies, volume 2. vol. 2. 2019;2:214.
- [32] Hampson K, Dobson A, Kaare M, Dushoff J, Magoto M, Sindoya E, et al. Rabies Exposures, Post-Exposure Prophylaxis and Deaths in a Region of Endemic Canine Rabies. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2.
- [33] Coleman PG, Dye C. Immunization coverage required to prevent outbreaks of dog rabies. *Vaccine* 1996;14:185–6.
- [34] Keita Z, Gerber F, Lechenne M, Thiero O, Hattendorf J, Zinsstag J, et al. Burden of rabies in Mali. *Acta Trop* 2020;210.
- [35] Wilde H. Failures of post-exposure rabies prophylaxis. *Vaccine* 2007;25:7605–9.
- [36] Giesen A, Gniel D, Malerczyk C. 30 Years of rabies vaccination with Rabipur: a summary of clinical data and global experience. *Expert Rev Vaccines* 2015;14:351–67.
- [37] Hanlon CA, Childs JE. *Epidemiology. Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management* 2013:61–121.
- [38] Dacheux L. Diagnostic Moléculaire de la Rage Humaine BlockRabies_2 Version C. Institut Pasteur - CNR Rage, 2023:2-19.
- [39] Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J Vis Exp* 2012:3923.
- [40] Dembélé J, Konaté I, Cissoko Y, Fofana A, Soumaré M, Mfupa Y, et al. Rage Humaine au Centre Hospitalier et Universitaire du Point G de Bamako : à Propos de Cinq Observations. *HEALTH SCIENCES AND DISEASE* 2020;21:63–6.
- [41] Diaby F. Cas de rages dans le service des maladies infectieuses du CHU du Point G. Thèse de Médecine. Mali. Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB);18M31; 2018.
- [42] Ndioubnane IEM. Aspects épidémio-cliniques et thérapeutiques de la rage au service des maladies infectieuses et tropicales. Thèse de Médecine. Mali. Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB);21M147; 2021.
- [43] Sowe Wobessi JN, Dibongue E, Tejiokem MC, Njouom R, Sadeuh-Mba SA. Detection and molecular characterization of rabies virus isolates from humans in Cameroon. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2023;105:115834.
- [44] Khashei B, Masoumeh, Baferani A, Bashar R, Gholami A, Jahanbakhsh F, et al. Ante-mortem Diagnosis of Human Rabies Cases Using SYBR Green Real-Time PCR. *JournalaimComB Khashei, MA Baferani, R Bashar, A Gholami, F Jahanbakhsh, MR Shirzadi, M FazeliArchives of Iranian Medicine, 2018•journalaimCom* 2018;21:473–7.

- [45] Mani RS, Madhusudana SN, Mahadevan A, Reddy V, Belludi AY, ajaman, Shankar SK. Utility of real-time Taqman PCR for antemortem and postmortem diagnosis of human rabies. *J Med Virol* 2014;86:1804–12.
- [46] Marston DA, Jennings DL, Maclaren NC, Dorey RD, Fooks AR, Banyard AC, et al. Pan-lyssavirus Real Time RT-PCR for Rabies Diagnosis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 2019;2019:e59709.
- [47] Faye M, Dacheux L, Weidmann M, Diop SA, Loucoubar C, Bourhy H, et al. Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for broad detection of rabies virus. *J Virol Methods* 2017;243:120–30.
- [48] Dacheux L, Larrous F, Lavenir R, Lepelletier A, Faouzi A, Troupin C, et al. Dual Combined Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for the Diagnosis of Lyssavirus Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0004812.
- [49] Goravey W, Husain A, Ali GA, Al Maslamani MA, Ziglam H. Antemortem diagnosis of human rabies: A case report. *Clin Case Rep* 2021;9:711–3.
- [50] Badaoui L, Dabo G, Sodqi M, Marih L, Chakib A, Marhoum El filali K. C-04: La rage humaine : états des lieux. *Med Mal Infect* 2014;44:32.
- [51] Salimi W, Aheri A, Badi H. La rage humaine à propos de 51 cas. *Médecine et Maladies Infectieuses Formation* 2022;1:S139–40.
- [52] Contou D, Brun BC. Un cas de rage humaine au retour du Mali. *Pratique Neurologique - FMC* 2015;6:34–7.
- [53] Diop S, Dia N, Fortes-DL, Trop NM-M, 2011 undefined. La rage humaine, un diagnostic parfois difficile. *JleCom* n.d.
- [54] Hanlon CA, Nadin-Davis SA. Laboratory Diagnosis of Rabies. *Rabies*, Elsevier; 2013, p. 409–59.
- [55] Hsu WC, Hsu CL, Tu YC, Chang JC, Tsai KR, Lee F, et al. Standard Operating Procedure for Lyssavirus Surveillance of the Bat Population in Taiwan. *Journal of Visualized Experiments* 2019.

RESUME/ABSTRACT

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : Kouame

Ville de soutenance : Bamako

Prénom : Souraley Emmanuel

Secteur d'intérêt : Biologie et Santé

Nationalité : Ivoirienne

Publique

Courriel : kouamesouraley@gmail.com

Section : Pharmacie

Année universitaire : 2022-2023

Tel : (+223) 73 91 35 17

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie (FMOS) et de la Faculté de Pharmacie (FAPH), Bamako, Mali.

Titre de la thèse : Diagnostic moléculaire de la rage humaine au centre universitaire de recherche clinique (UCRC), Bamako, Mali

RESUME

La rage humaine est une zoonose virale qui attaque le système nerveux central. Dès lors que les symptômes cliniques apparaissent, la rage est mortelle dans pratiquement 100% des cas. Notre objectif était de mettre au point une technique moléculaire pour le diagnostic de rage humaine chez les cas suspects au Mali. L'étude s'est déroulée au Centre Universitaire de Recherche Clinique (UCRC) du 1^{er} aout 2022 au 31 novembre 2023. Il s'agissait d'une étude transversale descriptive et analytique à collecte prospective. L'échantillonnage a eu lieu au Service de Maladies Infectieuses et Tropicales-SMIT/CHU-Point G. Les cas cliniquement suspects ont été inclus. Les échantillons de salive, de sang, du liquide cérébro-spinal et de biopsies ont été prélevés et acheminés au laboratoire UCRC. Après extraction d'ARN, la RT-qPCR a été effectué avec le kit SYBR-Green sur l'instrument AB7500 Fast. Un total de 13 cas a été inclus pendant la période de l'étude. Parmi eux, le sexe masculin était majoritaire avec 77%. L'âge moyen était de 20,36 ans (les <15 ans représentaient 39% ; [16-30 ans] =31% ; [31-45 ans] =15% et 15% de données manquants). L'agitation était observée chez 76,92%, suivi de l'hypersalivation 61,54% , l'hydrophobie 53,85% et l'aérophobie chez 30,77% des cas suspects. Cette étude, nous a permis de démontrer la performance de la RT-qPCR avec un taux de positivité de 8/13 cas suspects de rage humaine. Cependant, la RT-PCR a confirmé que 6 cas positifs. Ces résultats suggèrent par conséquent une nécessité de développer les techniques moléculaires au Mali pour un diagnostic précoce de la rage humaine.

Mots clés : Virus, Rage, RT-qPCR, RT-PCR, Mali.

IDENTIFICATION SHEET

Last Name: Kouame

City of defense: Bamako

First Name: Souraley Emmanuel

Sector of Interest: Biology and

Nationality: Ivoirian

Public Health

E-mail: kouamesouraley@gmail.com

Section: Pharmacy Academic

Academic Year: 2022-2023

Phone: (+223) 73 91 35 17

Place of Deposit: Library of the Faculty of Medicine and Odontostomatology (FMOS) and the Faculty of Pharmacy (FAPH), Bamako, Mali.

Thesis Title: Molecular diagnosis of human rabies at the University Clinical Research Centre (UCRC), Bamako, Mali

SUMMARY

Human rabies is a viral zoonosis that attacks the central nervous system. As soon as clinical symptoms appear, rabies is fatal in almost 100% of cases. Our aim was to develop a molecular technique for diagnosing human rabies in suspected cases in Mali. The study took place at the University Clinical Research Centre (UCRC) from 1 August 2022 to 31 November 2023. It was a descriptive and analytical cross-sectional study with prospective collection. Sampling took place at the Department of Infectious and Tropical Diseases-SMIT/CHU-Point G. Clinically suspected cases were included. Samples of saliva, blood, cerebrospinal fluid and biopsies were collected and sent to the UCRC laboratory. After RNA extraction, RT-qPCR was performed using the SYBR-Green kit on the AB7500 Fast instrument. A total of 13 cases were included during the study period. Of these, 77% were male. The mean age was 20.36 years (<15 years accounted for 39%; [16-30 years] =31%; [31-45 years] =15% and 15% missing data). Agitation was observed in 76.92%, followed by hypersalivation in 61.54%, hydrophobia in 53.85% and aerophobia in 30.77% of suspected cases. This study enabled us to demonstrate the performance of RT-qPCR with a positivity rate of 8/13 suspected cases of human rabies. However, RT-PCR confirmed only 6 positive cases. These results therefore suggest the need to develop molecular techniques in Mali for the early diagnosis of human rabies.

Keywords: Virus, Rabies, RT-qPCR, RT-PCR, Mali.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1: Procédure d'extraction de l'ARN avec le kit QIAamp Viral RNA Mini Kit

- Transférer 140 µL de l'échantillon dans un microtube Eppendorf® de centrifugation stérile de 1.5 mL ;
- Ajouter 560 µL du tampon de lyse viral (AVL) dans chaque tube contenant 140 µL de notre échantillon ;
- Mélanger bien avec un agitateur ;
- Laisser incuber à température ambiante pendant 10 minutes ;
- Ajouter 560 µL de l'éthanol absolue et mélanger à l'aide d'un agitateur ;
- Transférer le contenu du tube Eppendorf® dans des colonnes contenant des particules de silice et centrifuger à 8000 rotations pour 1 minute et jeter la colonne de rechange ;
- Ajouter 600 µL du tampon de lavage 1 (AW1) dans la colonne et centrifuger pendant 1 minute, et répéter la même action que précédemment et jeter la colonne de rechange pour utiliser une nouvelle colonne ;
- Ajouter 600 µL du tampon de lavage 2 (AW2) et centrifuger à 14.000 rotations pendant 3 minutes puis jeter la colonne de rechange pour utiliser une nouvelle colonne ;
- Centrifuger à vide pour enlever toute trace d'éthanol dans le tube ;
- Placer la colonne dans un tube Eppendorf® stérile de 1.5 mL et y ajouter 65 µL du tampon d'éluion (AVE) et laisser incuber à température ambiante pour 3 minute ;
- Faire centrifuger à 8000 rotations pendant 3 minute pour faire l'éluion de l'échantillon ;
- Conserver l'ARN purifiée à -80°C (pour une meilleure conservation) jusqu'à utilisation.

Annexe 2: Procédure de l'électrophorèse sur gel d'agarose

❖ Préparation du tampon d'électrophorèse TAE concentrée 1 fois à partir d'une solution mère concentrée 50 fois :

Le concentré de tampon doit être dilué à une concentration de travail prête à l'emploi avant d'être utilisé.

Pour préparer **1000 mL** de TAE prête à l'emploi (**concentrée une fois**) :

- Prélever **20 mL** de solution mère concentrée cinquante fois
- Ajouter **980 mL** d'eau distillée
- Mélanger

❖ Coulée d'un gel d'agarose standard à 2% :

- Peser 2 g d'agarose
- Mélanger la poudre d'agarose avec **100 ml de TAE** prête à l'emploi dans une fiole micro-ondable.
- Passer au four à **1 à 3 minutes** jusqu'à ce que l'agarose soit **complètement dissout** (ne pas trop faire bouillir la solution, car une partie du tampon s'évaporerait et modifierait ainsi le pourcentage final d'agarose dans le gel).
- Verser l'agarose dans un plateau à gel avec le peigne à puits en place.
- Placer le gel nouvellement versé à 4 °C pendant 10 à 15 minutes ou le laisser reposer à température ambiante pendant 20 à 30 minutes, jusqu'à ce qu'il soit complètement solidifié.

❖ Chargement des échantillons et réalisation d'un gel d'agarose :

- Une fois solidifié, placer le gel d'agarose dans la boîte à gel (unité d'électrophorèse).
- Remplir la boîte de gel avec le TAE prête à l'emploi jusqu'à ce que le gel soit recouvert.
- Ajouter 5 µL de GelRed® et 2,5 µL de colorant de chargement au verso du papier paraffiné.
- Ajouter 5 µL de votre échantillon
- Mélanger

- Charger le mélange dans une voie du gel.
- Répéter les étapes **4 à 6** pour chaque échantillon
- Répéter les étapes **4 et 5** pour l'échelle de poids moléculaire.
- Charger avec précaution l'ensemble du mélange en une seule fois dans une voie du gel.
- Faire fonctionner le gel à 140-160 volts, 400 milliampères pendant 15-30 minutes.

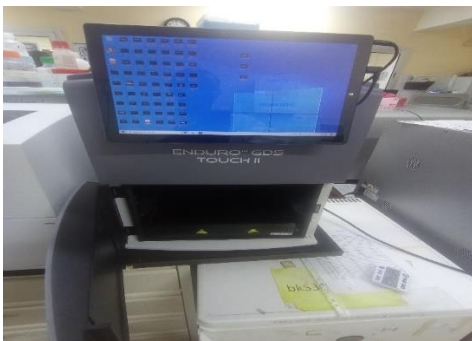
❖ Visualisation à l'ultraviolet (UV)

Après électrophorèse, le gel d'agarose est placé à l'intérieur de l'appareil Enduro™ GDS Touch II qui contient un transilluminateur ultraviolet (UV 200 à 400 nm) intégré à l'intérieur du système. L'appareil Enduro™ GDS Touch II dispose d'une interface pour la capture d'image de gel à l'UV qui nous permettra de visualiser les bandes présentes sur le gel. La taille du produit attendu est de 111 paires de bases (pb).

Annexe 3 : Cuve à électrophorèse et générateur



Annexe 4 : Enduro GDS Touch II



Annexe 5 : Amorces utilisées dans la RT-qPCR

Système JW12-N165-146 (N SYBR Green RT-qPCR pan-lyssa)	Séquences
JW12	5'-ATGTAACACCYCTACAATG-3'
N165-146	5'-GCAGGGTAYTTRTACTCATA-3'
Système b-actine (ACTB) (ACTB SYBR Green RT-qPCR)	Séquences
BatRat F	5'-CGATGAAGATCAAGATCATTG-3'
BatRat R	5'-AAGCATTGCGGTGGAC-3'

Annexe 6 : Fiche de collecte de données

Fiche de collecte des données des cas suspects de rage humaine

Information

Nom et Prénom

Sexe :

Age:

Profession:

Situation Matrimonial:

Résidence:

Type d'échantillons:

.....

Heure du prélèvement:

.....

Site de la morsure :

Symptômes:




.....

Résultats

Résultat RT-qPCR:

Résultat RT-PCR:

Annexe 7 : Attestation de communication

 U.S.T.T-B Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB)	 4 ^{ème} Journée Scientifique DER DE BIOLOGIE FST/USTTB	 Faculté des Sciences Techniques (FST)
ATTESTATION DE COMMUNICATION		
Je Soussigné, Professeur Alhousseini BRETAUDEAU, Président de la Commission Scientifique, atteste que		
Souraley Emmanuel KOUAME		
a pris part à la 4 ^{ème} Journée Scientifique du DER de Biologie de la FST-USTTB tenue le 25 novembre 2023 à Bamako (Mali) et y a présenté la/les communication(s) numéro(s) JSDB4-CO-121 .		
Thème « Sciences Biologiques et Développement Durable »		
En foi de quoi la présente attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.		
 Pr Alhousseini BRETAUDEAU Président de la Commission Scientifique	 Pr Issiaka TOGOLA Chef de DER de Biologie FST-USTTB	<i>Fait à Bamako, le 25 Novembre 2023</i>  Pr Bernard A. SODIO Doyen de la FST-USTTB

SERMENT DE GALIEN



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

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;

- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

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

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

Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères et consœurs si j'y manque. »

Je le jure!