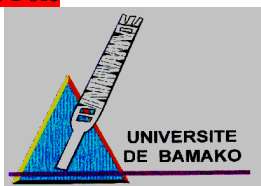


MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
MALI
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Une Foie

REPUBLIQUE DU

Un Peuple – Un But



UNIVERSITE DE BAMAKO

Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie (FMPOS)

Année Universitaire **2009 – 2010**

N° de Thèse...../P

TITRE

**Surveillance sentinelle des grippes humaines
pandémique et saisonnière à Bamako en
2010**

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le...../
devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie

par

Mr Oumarou Amadou TRAORE

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

JURY

Président : Pr Flabou BOUGOUDOGO

Membres : Dr Almoustapha MAIGA

Co- directeur : Dr Boubou TAMBOURA

Directeur : Pr Souleymane DIALLO

DEDICACE :

Je dédie cette thèse :

A mon père : Amadou .A. TRAORE :

Cher papa tu resteras pour moi le meilleur des pères. Tes conseils et tes soucis permanents du travail bien fait ont forgé cet homme que je suis devenu. Je n'oublierai jamais tes conseils. Ce modeste travail est l'occasion pour moi de te signifier ma gratitude et de te remercier pour tous les sacrifices que tu as fait pour ta famille. Encore merci pour tout et que le Bon Dieu Puisse te Garder le plus longtemps possible près de nous.

A ma mère : Fanta CISSE

Chère maman les mots m'ont toujours manqué pour te signifier mon amour, ma reconnaissance. Tu resteras pour moi une mère exemplaire, une mère très courageuse et très sociable. Tu as donné le meilleur de toi même pour la réussite de tes enfants. Ce travail est le fruit de tant d'année de dur labeur ; puisse-t-il, non seulement t'apporter réconfort et fierté mais aussi le témoin de mon profond amour. Que Le Tout Puissant Puisse te Garder le plus longtemps possible au près de nous.

A feu Haoua CISSE repose en paix chère tante

A la troisième promotion du numerus clausus (promotion du professeur Moussa ARAMA).

MENTION SPÉCIALE :

A mon cher pays le Mali.

A tout le corps professoral de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie (FMPOS), pour la bonne formation que j'ai reçue de vous.

A tous mes enseignants des écoles fondamentales et secondaires, pour la bonne formation que j'ai reçue d'eux.

Au Dr Boubou TAMBOURA :

Cher Docteur merci de nous avoir accepté dans votre service à bras ouverts et de tout l'effort que vous avez fourni pour le bon déroulement de ce travail. J'admire en vous la cordialité, la disponibilité, mais aussi et surtout la compétence. Nous n'oublierons jamais la formation que nous avons reçue de vous. Merci infiniment. Que Le Tout Puissant vous Prête une longue vie au service de tous.

Au Dr Alliou TOURE :

Votre simplicité, votre gentillesse et votre sens du partage et du travail bien fait, font de vous un homme exemplaire. Ce travail est le fruit de votre soutien et de vos multiples conseils. Qu'Allah vous Préserve et vous Prête longue vie au service de tous.

Au Dr Mariam SAMAKE :

Pour votre soutien, votre franche collaboration, votre disponibilité et votre rigueur dans le travail bien fait, trouvez ici cher Docteur mes sincères remerciements. Que Le Tout Puissant vous Garde le plus longtemps possible auprès de nous.

Au Dr Awa TRAORE :

Chère Docteur je ne saurai assez vous remercier pour votre collaboration et votre partage durant ce travail. Merci pour tout et que Le Tout Puissant vous Gardez le plus longtemps possible parmi nous.

REMERCIEMENTS :

A Allah Le Tout Puissant, Le Clément, L'Omnipotent, Le Miséricordieux qui m'a donné la force, le moyen et le courage de réaliser ce modeste travail.
Louange à **Allah**, l'Unique et que la bénédiction, le salut et la paix soient sur l'Ultime prophète **Mohamed "ARASSOUROULA"** ; Amen.

Mes sincères remerciements vont à l'endroit du :

Ministère de la Santé du Mali ;

Tous les personnels du service pédiatrie CHU Gabriel Touré, ASACOB, Chérifla.

Directeur Général du CVD Baltimore (University of Maryland, School of Medicine) USA: Pr. Mike M. LEVINE;

Directeur Général du CNAM, Coordinateur du CVD-Mali : Pr. Samba O. SOW ;

Center for Disease Control (CDC – Atlanta)

Tout le personnel du **CNAM / CVD-Mali** ;

Mes oncles : Feu Modibo A TRAORE, Feu Allaye A TRAORE, Ali O CISSE, Adama CISSE ; chers tontons, je ne saurais assez vous remercier pour tout ce que vous avez pu faire pour moi.

Mes frères aînés : Moussa, et Allaye TRAORE. Vos encouragements, vos conseils ont été ma motivation durant toutes ces années. C'est l'occasion pour moi de vous remercier très sincèrement.

Mes sœurs : Haoua, Gogo, Teido, et Fatoumata TRAORE Merci pour vos soutiens et conseils.

Mes cousins : particulièrement Amadou CISSE, Oumar CISSE, Allaye TRAORE dit Dourci merci pour vos encouragements.

Mes camarades de classe particulièrement : Mamady MOUGARE, Mamoudou GUINDO, Papi, Bob, Diall, Amadou, Yara, Tékété, Kaou, Abel, Cis, Mapi, Ama, Dolo, Sangaré, Vincent, Ema ce travail est le votre.

Tout le personnel de l'officine ANTA : Dr Sossé, Moussa, Cissoko, Mme Tamboura Hadja, Djénè, Bocar. Merci pour vos soutiens.

Tout le personnel et étudiants stagiaires du **CVD-Mali** particulièrement ceux du laboratoire (Microbiologie et Immunologie) : **Dr Chaca .T. DIALLO, Dr Dramane MALLE, Dr Abdoulaye SANGARE, Dr Aziz, Dr Timbiné, Sidi DIALLO, Ousmane DIAKITE, Moustapha SOUMARE, Mme COULIBALY Fatoumata CAMARA, Mme TELLY Mama SIDIBE, Kadiatou KEITA.** Merci pour la collaboration et l'amitié.

Tous mes amis (es) : **Ali Baba, Moussa, Bantjini, Sylla, Solo, Ali, Alpha, Big, Toure, Madou, Tamboura, Marka.** Merci pour l'amitié.

Tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail et dont les noms ne sont pas cités, qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

À NOTRE MAÎTRE ET JUGE

Professeur Flabou BOUGOUDOGO ;

Maître de conférences agrégé en Bactériologie et Virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie (FMPOS);

**Directeur général de l'Institut National de Recherche en Santé Publique ;
Responsable des cours de bactériologie et virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie (FMPOS).**

Homme aux qualités scientifiques importantes, nous avons été séduits par la simplicité, la clarté et la rigueur de vos enseignements ; en plus de vos connaissances scientifiques, votre sens social de la vie mérite le respect.

Nous vous exprimons cher Maître, toute notre reconnaissance.

À NOTRE MAÎTRE ET JUGE

Professeur Souunkalo DAO ;

**Maître de Conférences à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et
d'Odonto-Stomatologie (FMPOS) ;**

Président de la Société Malienne de Pathologie infectieuse (SOMAPiT) ;

**Membre de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue française
(SPILF)**

**Investigateur Clinique au Centre de Recherche et de la Formation sur la
tuberculose /VIH.**

Cher maître, nous avons été touchés par la spontanéité avec laquelle vous avez
accepté d'être membre de ce jury malgré vos multiples occupations.

Votre dynamisme, votre sens du travail bien fait, vos qualités humaines ont
forcés notre admiration.

Recevez ici cher maître, nos plus hautes considérations.

À NOTRE MAÎTRE ET JUGE

Dr Almoustapha MAIGA

Docteur en pharmacie.

**Docteur en virologie de l'école de doctorale Complexité du Vivant (CdV)
de l'université Pierre et Marie Curie UMPC « Paris6 ».**

**Chercheur au laboratoire de virologie à l'hôpital de la Pitié – Salpêtrière à
Paris.**

**Responsable de l'unité épidémiologique sur la résistance aux
antirétroviraux au SEREFO.**

**Pharmacien, Biologiste au laboratoire du centre de recherche et de lutte
contre la drépanocytose « CRLD »**

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.

A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR DE THESE

Docteur Boubou TAMBOURA :

Pharmacien Chercheur, Microbiologiste ;

Chef de service du laboratoire de recherche du CVD-Mali.

Cher Maître, nous ne cesserons jamais de vous remercier pour la confiance que vous avez placée en nous pour effectuer ce travail. Les mots nous manquent pour exprimer combien cela fut un plaisir de travailler avec vous. Homme de principe votre simplicité, votre sérénité, votre disponibilité et votre rigueur scientifique font de vous un maître exemplaire ;

Cher Maître, trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude et de notre sincère reconnaissance.

À NOTRE MAÎTRE ET DIRECTEUR DE THÈSE

Professeur Souleymane DIALLO ;

Pharmacien biologiste, Colonel des Forces Armées du Mali.

**Chef du département technique labo-pharmacie du CHU Gabriel TOURÉ ;
Maître assistant en bactériologie et virologie à la Faculté de Médecine, de
Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (FMPOS).**

Cher Maître, nous vous sommes infiniment reconnaissant d'avoir accepté de diriger cette thèse;

Vous nous avez toujours montré un grand intérêt pour tout ce qui touche notre formation.

Homme de principe, votre rigueur scientifique fait de vous un maître exemplaire et reconnu de tous ;

Veillez agréer cher Maître l'expression de notre grande admiration et de notre profonde reconnaissance.

SIGLES ET ABREVIATIONS :

ARN : Acide Ribonucléique

ASACOBAB : Association de Santé Communautaire de Banconi

CDC: Center for Disease Control and prevention

CNAM : Centre National d'Appui à la lutte contre la Maladie

CVD : Center for Vaccine Development
(Centre pour le Développement des Vaccins)

HA : Hémagglutinine

HGT : Hôpital Gabriel Touré

HSC : Humain Sample Control
(Échantillon de contrôle humain)

H5VC : H5 Virus Control

NA : Neuraminidase

NTC : Negative Template Control.

PBS : Phosphate Buffer Saline

pH : Potentiel d'Hydrogénation

Protéine M : Protéine membranaire

RT – PCR : Réaction de Polymérisation en chaine en temps réel

SIVC : Seasonal Influenza Virus Control

VTM : Viral Transport Medium

Plan :

Introduction

Généralités

Méthodologie

Présentation des résultats

Commentaires et discussions

Conclusion et recommandations

Références bibliographiques

TABLE DES MATIERES:

Introduction.....	1
Objectifs.....	3
1. Généralités.....	4
1.1. Rappel sur les virus influenza.....	4
1.2. Classification du virus de la grippe.....	4
1.3. Morphologie, composition chimique.....	5
1.3.1. L'enveloppe.....	5
1.3.2. Le matériel génétique : ARN.....	5
1.3.3. Les protéines.....	5
1.3.3.1. L'Hémagglutinine (HA).....	5
1.3.3.2. La Neuraminidase (NA).....	6
1.4. Pouvoir pathogène... ..	8
1.4.1. Pouvoir pathogène spontané	8
1.4.1.1 chez l'homme	8
1.4.1.2 chez les animaux	9
1.4.1.2.1. Les oiseaux.....	9
1.4.1.2.2. Le porc.....	9
1.4.1.2.3. Autres mammifères.....	9
1.4.2. Pouvoir pathogène expérimental	10
1.5. Multiplication du virus.....	10
1.5.1 Attachement du virus à la cellule cible.....	10
1.5.2. Entrée du virus dans la cellule, par endocytose.....	10
1.5.3. Diminution du pH de vésicule d'endocytose.....	11
1.5.4. Fusion, libération du contenu du virus dans la cellule.....	11
1.5.5. Entrée de l'ARN viral dans le noyau de la cellule	12
1.5.6. Fabrication de nouveaux brins d'ARN.....	13
1.5.7. Production de protéines du virus.....	13
1.5.8. Sortie de nouveaux exemplaires d'ARN viral du noyau.....	14
1.5.9. Migration des constituants du virus vers la membrane de la cellule.....	14
1.5.10. Assemblage des constituants du virus	14
1.5.11. Production de nouvelles particules virales par bourgeonnement.....	15
1.5.12. Libération des particules virales	15
1.6. Diagnostic virologique.....	16
1.6.1. Diagnostique direct	16
1.6.1.1. Prélèvement	16

1.6.1.2. Diagnostic	16
1.6.1. 3. Isolement.....	16
1.6.2. Diagnostic indirect.....	17
1.6.2.1. Déviation du complément.....	17
1.6.2.2. Inhibition de l'hémagglutination.....	17
1.7. Virus influenza A.....	17
1.7.1. Historique.....	17
1.7.2. Epidémiologie du virus influenza A	20
1.7.3. Transmission du virus influenza A	21
1.8. Prévention et traitement de la grippe humaine.....	22
1.8.1. Prévention	22
1.8.1.1 Mesures d'hygiène	22
1.8.1.2. Prophylaxie : vaccination et antiviraux	23
1.8.2. Traitement	24
1.8.2.1 Traitement symptomatique.....	24
1.8.2.2 Traitement curatif.....	25
2. Méthodologie.....	26
2.1 .Cadre d'étude	26
2.1.1. Type d'étude.....	26
2.1.2. Période d'étude.....	26
2.1.3. Site de prélèvement	26
2.1.4. Population d'étude.....	26
2.1.5. Critères d'inclusion.....	26
2.1.6. Critères de non inclusion	27
2.1.7. Echantillonnage	27
2.1.8. Prélèvement.....	27
2.2. Présentation du Centre pour le Développement des Vaccins (CVD) du Mali et ses activités	27
2..2.1. Le laboratoire de recherche.....	28
2.2.2 Matériels et réactifs et appareillage	29
2.2.2.1 Matériels	29
2.2.2.2. Réactifs.....	29
2.2.2.3. Appareillage.....	30
2.3. Identification du virus influenza.....	30
2.3.1 Collecte et réception des échantillons.....	30
2.31.2. Partage et stockage des échantillons.....	31
2.3.1.3. Préparation, partage et stockage des réactifs.....	31

2.3.1.3.1. Les amorces et probes.....	31
2.3.1.4. Préparation, extraction et conservation des contrôles	32
2.3.1.4.1. Préparation de l'échantillon humain de contrôle négatif (HSC).....	32
2.3.1.4.2 Préparation du contrôle positif (SIVC)	32
2.3.1.4.3. Préparation du H5VC	33
2.3.2. Etapes de la réaction RT-PCR proprement dite	34
2.3.2.1. Préparation générale	34
2.3.2.1.1. Préparation des équipements	34
2.3.2.1.2. Préparation des réactifs.....	34
2.3.2.1.3. Les précautions à prendre.....	34
2.3.2.2. Extraction de l'ARN des échantillons.....	35
2.3.2.3. Préparation du mélange mixte et de la plaque.....	36
2.3.2.4. Addition de l'Acide nucléique (ARN)	38
2.3.2.5. Addition des contrôles.....	39
2.3.2.6. Description de la procédure de préparation du template pour Applied Biosystem 7500 Fast DX System	40
2.3.2.7. Interprétation et report des résultats.....	43
3. Saisie, analyse des données et Aspect éthique.....	44
3.1. Saisie et analyse des données	44
3.2. Aspect éthique.....	44
4. Résultats.....	45
4.1. Résultats socio – démographique	45
4.2. Résultats analytiques	48
5. Commentaires et Discussions.....	53
5.1. Evaluation du laboratoire	53
5.2. Du point de vue de la méthodologie	53
5.3. Du point de vue des résultats.....	54
6. Conclusions.....	55
7. Recommandations.....	56
8. Références bibliographiques.....	57
9. Résumé	60
10. Annexes	62

Tableaux :

Tableau 1 : Tableau de la préparation du mélange mixte.....	37
Tableau 2 : Schéma mettant en évidence la plaque.....	38
Tableau 3 : Répartition de la population.....	45
Tableau 4 : Répartition de la population en fonction de Site de prélèvement.....	46
Tableau 5 : Répartition de la population en fonction de la saisonnalité.....	47
Tableau 6 : Fréquence Grippe porcine et saisonnière dans la population.....	48
Tableau 7 : Fréquence Grippe porcine dans la population.....	49
Tableau 8 : Fréquence Grippe saisonnière dans la population.....	50
Tableau 9 : Fréquence Grippe porcine et saisonnière en fonction des saisons.....	51
Tableau 10: Fréquence Grippe en fonction du site de prélèvement.....	52

Figures et Graphiques :

Figure 1 : schémas des trois types de virus Influenza.....	4
Figure 2 : Schéma du virus Influenza	7
Figure 3 : Schéma de l'attachement du virus Influenza à la cellule cible.....	10
Figure 4 : Schéma de l'entrée du virus dans la cellule (endocytose).....	11
Figure 5 : Schéma de libération du contenu du virus dans la cellule.....	12
Figure 6 : Schéma d'entrée de l'ARN viral dans le noyau de la cellule.....	12
Figure 7 : Schéma de fabrication des nouveaux brins d'ARN.....	13
Figure 8 : Schéma de la production de protéines des virus.....	14
Figure 9 : Schéma d'assemblage des constituants du virus.....	14
Figure 10 : Schéma du bourgeonnement.....	15
Figure 11 : Schéma de libération des nouveaux virions.....	16
Figure 12 : photo des prélèvements.....	27
Figure 13 : photo de la plaque.....	39
Graphique 1 : Représentation graphique de la population.....	45
Graphique 2 : Représentation graphique de la population selon le site de prélèvement.....	46
Graphique 3 : Représentation graphique de la population selon la saisonnalité.....	47
Graphique 4 : Représentation graphique des cas de grippe confirmés dans la population.....	48
Graphique 5 : Représentation graphique de la grippe porcine dans la population.....	49
Graphique 6 : Représentation graphique de la grippe saisonnière dans la population.....	50
Graphique 7 : Représentation graphique des cas de grippe confirmés selon la saisonnalité.....	51
Graphique 8 : Représentation graphique des cas de grippe confirmés selon le site de prélèvement.....	52

Introduction :

Le virus de la grippe est un virus à ARN enveloppé à capside symétrique complexe appartenant à la famille des Orthomyxoviridae ; cette famille comprend un genre, Influenza virus, et 3 types, A, B, C.

La grippe est une infection respiratoire aiguë évoluant sous forme d'épidémies, parfois mondiales. Le premier isolement de virus grippal humain a été effectué en 1933. [1]

Les femmes enceintes et les nourrissons ont un risque accru de développer une maladie grave, complexe et parfois mortelle de la grippe. Que la grossesse est un facteur de risque pour les maladies graves et mortelles de grippe a été bien établie au cours des pandémies de 1918 « grippe porcine » et 1957 « grippe asiatique ». Le risque accru pour les femmes enceintes de développer la grippe sévère au cours des épidémies saisonnières a également été documenté. En conséquence, la vaccination contre l'influenza est recommandée aux femmes enceintes. De même le risque élevé associé à la grippe qui survient en dehors des pandémies pour les nourrissons est maintenant bien établi. La quasi-totalité de ces données épidémiologiques démontrant un risque accru pour les femmes enceintes et les jeunes nourrissons de développer une maladie compliquée et mortelle de grippe découle d'étude dans les pays industrialisés, dans les zones tempérés et sub-tropicales. En revanche, il y a un manque de données épidémiologiques dans les pays tropicaux en développement qui apporte un éclairage sur l'incidence de la grippe confirmée en laboratoire. En grande partie, cela est due au fait qu'il y a seulement un nombre limité de laboratoire dans les pays en développement qui ont l'expertise et l'équipement nécessaire pour mener des tests sur le virus de la grippe. Compte tenu de la récente propagation parmi les humains d'un nouveau virus « porcin » de l'influenza (H1N1) dans l'hémisphère nord il est attendu que cette souche pourrait se répandre dans les régions tempérées de l'hémisphère sud et les

tropiques, notamment en Afrique sub-saharien. Si cela se produit, il est possible que le virus puisse dérivé antigéniquement, ou augmenté sa capacité à provoquer des maladies graves au cours des mois à venir. Par conséquent, le suivi du virus de la grippe porcine et la caractérisation des isolats est indispensable avant le retour du temps frais automne et en hiver dans l'hémisphère nord. Un suivi semblable des virus au cours de la prochaine saison froide dans l'hémisphère nord fournira de la même façon de précieux renseignement aux autorités de santé publique dans l'hémisphère sud. Pour détecter la présence du virus H1N1 de la grippe porcine de 2009 et autres virus grippaux au Mali, le Centre pour le Développement des Vaccins, Mali (CVD-Mali), un département au sein du ministère de la santé du Mali, se propose d'effectuer une surveillance de routine de la grippe en liaison avec les centres de contrôle de la maladie des établissements de soin de santé sentinelle à Bamako, capitale du Mali. Comme les femmes enceintes, les nourrissons les enfants ont un risque accru pour la morbidité et la mortalité de la grippe, la surveillance proposée sera menée dans ces populations. [2]

Objectifs :

1. Objectif général :

Mettre en évidence la présence du virus A/H1N1 pandémique et autres virus grippaux humains au Mali.

2. Objectifs spécifiques

Déterminer la prévalence des cas de grippe porcine confirmés chez les enfants de 0-35mois et les femmes enceintes.

Déterminer la prévalence des cas des grippes saisonnière chez les enfants de 0-35 mois et chez les femmes enceintes.

Déterminer la saisonnalité des grippes porcine et saisonnière au Mali.

Déterminer les cas de grippe en fonction des sites de prélèvement.

1. Généralités :

1.1. Rappel sur les virus influenza

Le virus de la grippe appartient à la famille des orthomyxoviridae, c'est un virus enveloppé à capsid symétrique complexe et responsable des infections à influenza dans les maladies respiratoires aiguës et qui sont très contagieuses.

Les virus de type A sont plus virulents que les virus de type B et C (ce dernier n'est retrouvé que chez l'Homme, chez qui il ne provoque que des cas isolés).[1]

1.2. Classification du virus de la grippe :

Les virus de la grippe appartiennent à trois genres différents : les genres Influenzavirus A, B, C de la famille des Orthomyxoviridae.

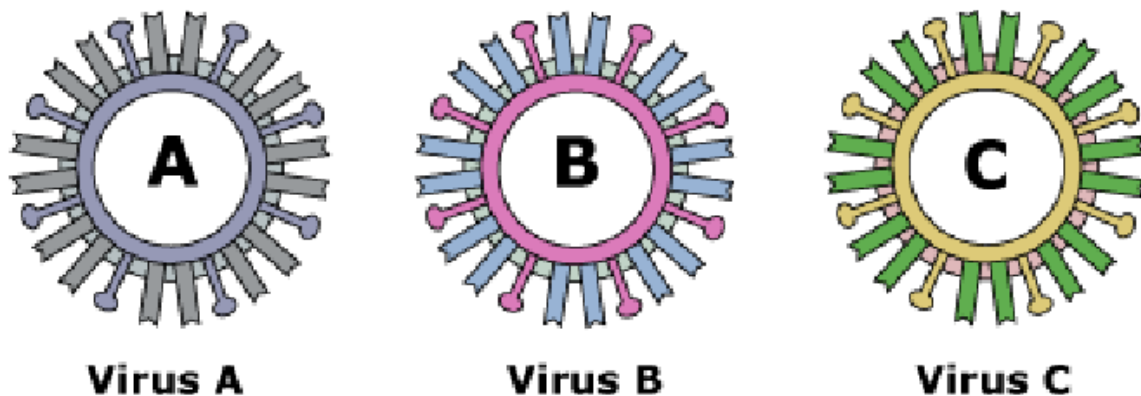


Figure 1 : schémas des trois types de virus Influenza

Selon la nature des protéines du virus, celle-ci sera classée dans le type A, le type B, ou le type C.

Les virus de type A (eux seuls) sont subdivisés en plusieurs sous-types.

Ces sous-types dépendent de la nature des protéines de l'Hémagglutinine (HA) et de la Neuraminidase (NA), qui sont situées sur l'enveloppe du virus.

A ce jour, 15 protéines HA différentes (H1 à H15) et 9 protéines NA différentes (N1 à N9) ont été identifiées.

L'association d'une protéine HA donnée avec une protéine NA donnée forme un sous-type particulier. Exemple : H1N1 ou H3N2.

Pour un même type ou sous-type de virus, il existe différentes souches, c'est-à-dire différents variants.

1.3. Morphologie, composition chimique :

Il s'agit de particules rondes de 80 à 120 nm de diamètre ; parfois ces particules sont filamenteuses (virus grippal de type A). On distingue :

1.3.1. L'enveloppe :

C'est une enveloppe glucido-lipido-protidique provenant de la membrane cytoplasmique de la cellule d'où est sorti le virus.

1.3.2. Le matériel génétique :

C'est un ARN monocaténaire segmenté, 8 segments pour les types A et B, et 7 segments pour le type C.

Chaque segment d'ARN correspond à un gène, qui code pour une ou deux protéines données.

Les gènes du virus sont indépendants physiquement les uns des autres, puisqu'ils sont situés sur des segments différents. C'est un point très important pour la variabilité des virus grippaux.

L'ARN des virus de la grippe est dit de « polarité négative » c'est-à-dire que le brin d'ARN présent dans la particule virale correspond à un « négatif », et qu'il faudra construire le brin complémentaire, le « positif », pour lire l'information génétique.

1.3.3. Les protéines :

Deux protéines sont particulièrement importantes chez le virus de la grippe : l'Hémagglutinine (HA) et la Neuraminidase (NA). Elles sont enchâssées dans l'enveloppe de la particule virale.

1.3.3.1. L'Hémagglutinine (HA) :

C'est un trimère de deux glycoprotéines, il s'agit d'une protéine de l'enveloppe du virus : une partie est située vers l'extérieur de la particule virale, une partie

ench

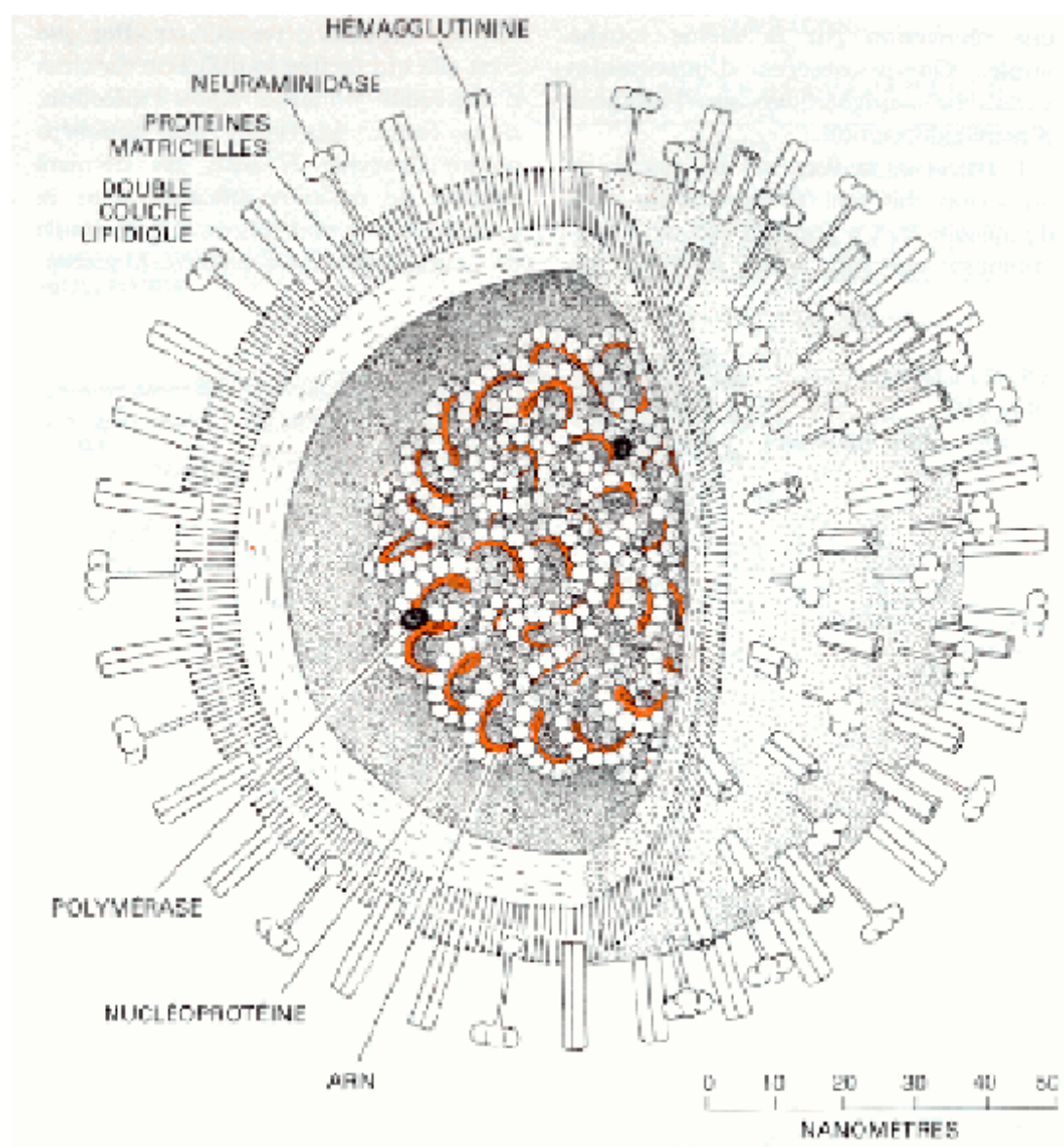
âssée dans l'enveloppe, et une partie situé vers l'intérieur.

L'Hémagglutinine est formée de deux sous-unités :

- > La sous-unité HA1 qui a pour rôle d'attacher la particule virale à la cellule cible, et lui permettre d'entrer à l'intérieur.
- > La sous-unité HA2 joue un rôle dans les étapes ultérieures permettant la libération du contenu du virus dans la cellule.

1.3.3.2. La Neuraminidase (NA) :

C'est un tétramère d'une seule protéine glycosylée. Tout comme l'Hémagglutinine, la Neuraminidase est également enchâssée dans l'enveloppe de la particule virale. Son rôle est de rompre la liaison entre les molécules d'Hémagglutinine et les molécules d'acide sialique.



Source : <http://Science-citoyen.u-strasbg.fr/dossiers/grippe/index.html>-juin 2005 (date de consultation : 20 Juin 2010).

Figure 2: Schéma du virus Influenza

1.4. Pouvoir pathogène :

1.4.1. Pouvoir pathogène spontané :

1.4.1.1 chez l'homme :

La forme typique de la grippe est caractérisée par une incubation de 1 à 2 jours.

Un début brutal avec frissons, fièvre, courbatures, rachialgies, asthénie ;

l'atteinte de l'appareil respiratoire peut être initialement discrète et même le demeurer. La courbe thermique est souvent diphasique. La guérison est rapide, seule persiste parfois l'asthénie.

➤ les formes graves et mortelles relèvent essentiellement de deux pathogénies :

- celles dues au virus seul dont les symptômes broncho-pulmonaires, généraux et nerveux, apparaissent peu après le début de l'infection et peuvent entraîner rapidement la mort.

Les formes uniquement nerveuses semblent très rares

- celles dites compliquées de surinfections par des bactéries pyogènes, survenant plusieurs jours après le début de l'infection virale et dues en particulier, à *Haemophilus influenza* (considéré à tort en 1889 - 1890 comme l'agent exclusif de la grippe), à des bactéries du genre *Streptococcus* ou *Staphylococcus* et à *Diplococcus pneumoniae* .

Des formes frustes, abortives ou même inapparentes, décelées seulement par les réactions sérologiques spécifiques, plus rarement par isolement du virus, et sont observées pendant et entre les épidémies.

L'homme représente quasiment le seul réservoir des virus de types B et C (les virus C étant les moins virulents jusqu'alors). Il est également infecté par certains sous-types des virus A : on retrouve les Hémagglutinines H1, H2 et H3 (et ponctuellement H5 et H9), et les Neuraminidases N1 et N2.

1.4.1.2 chez les animaux :

De nombreux animaux peuvent être infectés par des virus influenza qui leur sont propres en ce qui concerne le type A :

1.4.1.2.1. Les oiseaux :

En particulier, c'est chez les oiseaux sauvages (notamment les canards migrateurs) et les oiseaux domestiques que l'on retrouve le plus grand nombre de sous-types du virus de grippe A. En effet, on retrouve les 15 HA (H1 à H15) et les 9 NA (N1 à N9) parmi les virus circulant chez les oiseaux.

Les virus grippaux ont été retrouvés chez les oiseaux dans presque toutes les régions du Monde (Asie, Océanie, Europe, Amérique du Nord). La migration de nombreuses espèces favorise cette large étendue.

1.4.1.2.2. Le porc :

Les porcs sont sensibles aux virus grippaux de type A. On retrouve en particulier des sous-types avec les Hémagglutinines H1 et H3, et les Neuraminidases N1 et N2 (d'autres circulent mais sont moins répandues).

La grippe chez le porc est importante pour plusieurs raisons :

- Il peut transmettre des virus grippaux à l'Homme
- Il peut être à la fois infecté par des virus aviaires et par des virus humains.
- En cas de co-infection d'un même porc par deux virus d'origines différentes, il peut se produire un réassortiment entre les deux virus aboutissant à l'apparition d'un nouveau virus hybride, qui pourrait ensuite être transmis à l'Homme.

1.4.1.2.3. Autres mammifères :

D'autres espèces de mammifères peuvent être infectées par les virus grippaux, en particulier les équidés (cheval, âne), des espèces marines comme les baleines et dauphins.

On ne connaît pas d'infection à virus influenza de type B ou C chez les animaux.

1.4.2. Pouvoir pathogène expérimental :

Le virus influenza inoculé au Furet par voie nasale, provoque une maladie identique à celle de l'homme. On peut aussi adapter les virus influenza humains à la souris par diverses voies. [3]

1.5. Multiplication du virus :

Le virion se propage dans toutes les régions de l'appareil respiratoire où il pourra entrer dans les cellules hôtes afin de se multiplier.

Le cycle de multiplication du virus de la grippe peut être divisé en plusieurs étapes successives :

1.5.1 Attachement du virus à la cellule cible :

Cet attachement se fait par une liaison, de type « clé-serrure », entre la sous unité HA1 de l'hémagglutinine (sur la particule virale) et l'acide sialique (sur la membrane de la cellule cible)

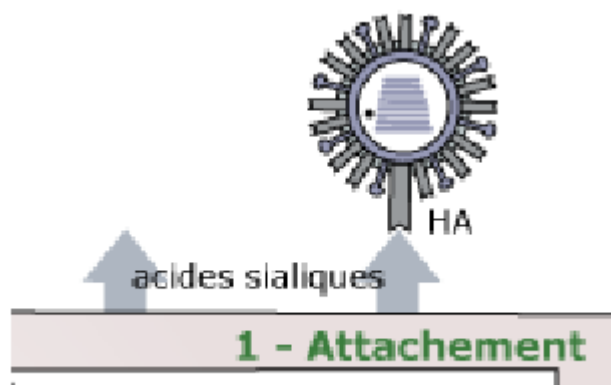


Figure 3 : Schéma de l'attachement du virus Influenza à la cellule cible

1.5.2. Entrée du virus dans la cellule, par endocytose :

Une fois la particule virale attachée à la membrane de la cellule cible, elle entre dans la cellule par un phénomène appelé « endocytose ».

La membrane de la cellule se creuse vers l'intérieur, formant une sphère qui se referme progressivement. Cela forme une vésicule, dite « vésicule d'endocytose », qui se détache du reste de la membrane et se retrouve à l'intérieur dans le cytoplasme de la cellule.

La particule virale, qui était attachée à la membrane de la cellule, est à l'intérieur de la vésicule d'endocytose.

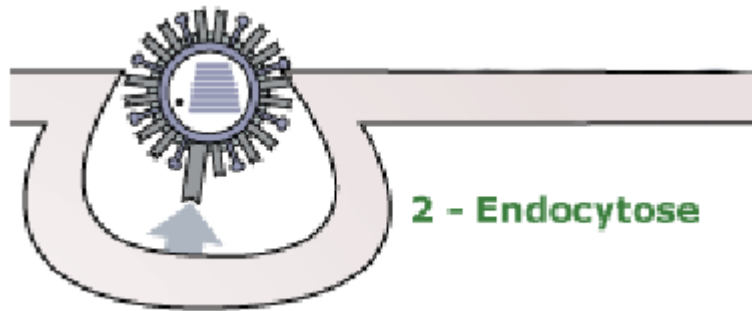


Figure 4 : Schéma de l'entrée du virus dans la cellule (endocytose)

1.5.3. Diminution du pH de la vésicule d'endocytose :

Certains mécanismes à l'intérieur de la cellule provoquent la diminution du pH au sein de la vésicule d'endocytose. Lorsque le pH est suffisamment acide (autour de 5.0 ou 5.1), cela déclenche les étapes suivantes.

1.5.4. Fusion, libération du contenu du virus dans la cellule :

L'enveloppe du virus fusionne avec la membrane de la vésicule d'endocytose. Plusieurs mécanismes sont alors activés, et aboutissent à la libération du contenu du virus dans la cellule.

Ces étapes font intervenir des protéines du virus (sous-unités HA2 de l'HA, protéines M2, protéines M1)

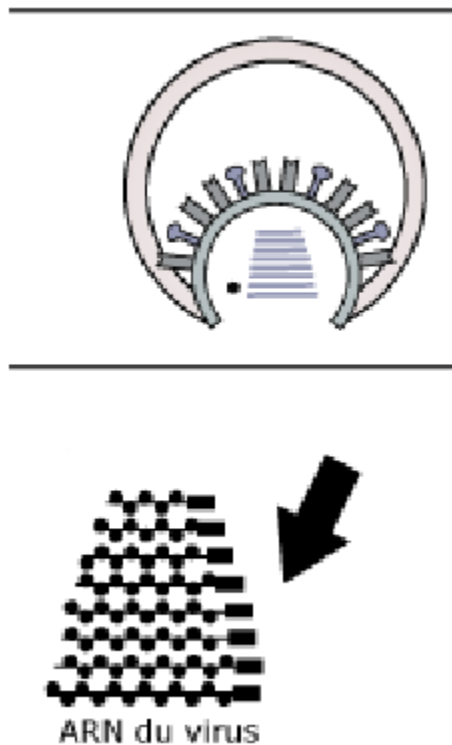


Figure 5 : Schéma de libération du contenu du virus dans la cellule

1.5.5. Entrée de l'ARN viral dans le noyau de la cellule :

L'ARN du virus (associé aux protéines NP sous forme de nucléocapsides), est libre dans le cytoplasme. Il migre jusqu'au noyau de la cellule.

L'ARN viral va alors entrer dans le noyau, grâce aux protéines NP.

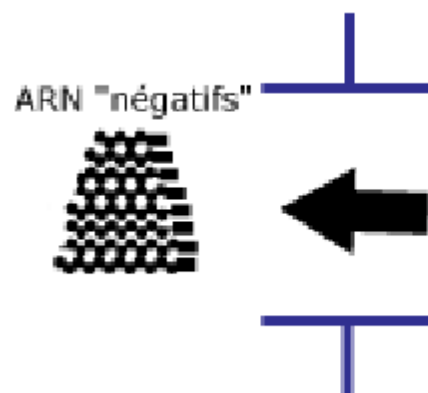


Figure 6 : Schéma d'entrée de l'ARN viral dans le noyau de la cellule

1.5.6. Fabrication de nouveaux brins d'ARN :

L'ARN du virus se trouve à présent dans le noyau de la cellule.

Il va être copié grâce au complexe formé par les protéines PB2, PB1 et PA

On obtient ainsi :

De nouveaux exemplaires des segments d'ARN (qui iront dans les nouvelles particules virales).

Et des brins d'ARN dits « ARN messagers » qui sortent dans le cytoplasme. Ils vont servir d'information génétique pour la fabrication des protéines du virus.

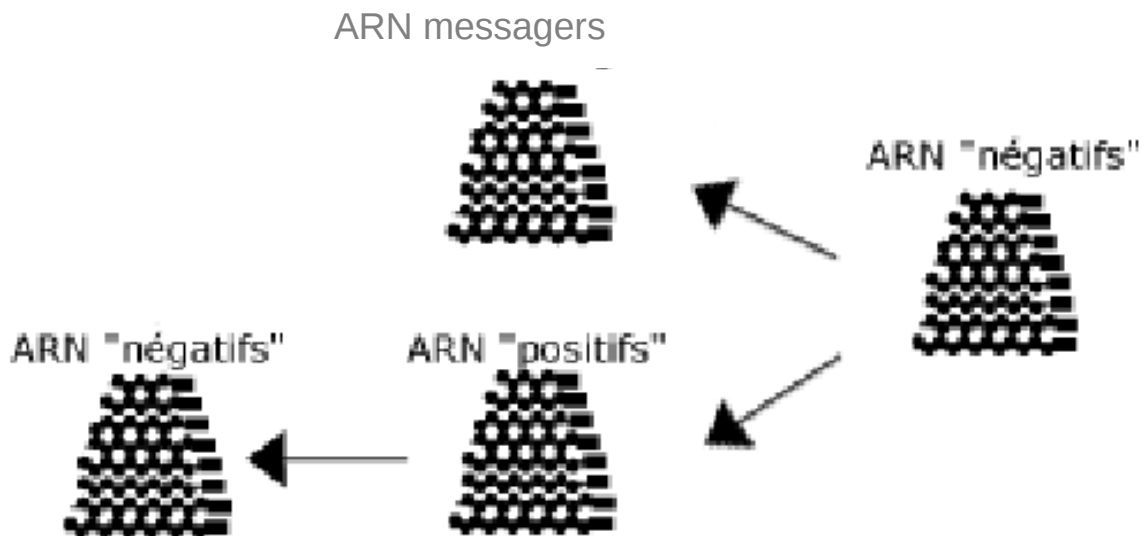


Figure 7 : Schéma de fabrication des nouveaux brins d'ARN.

1.5.7. Production de protéines du virus :

L'information génétique du virus nécessaire à la fabrication de nouvelles protéines est à présent dans le cytoplasme de la cellule.

Toute la machinerie cellulaire nécessaire à la production de protéines est détournée pour fabriquer les protéines du virus en de très nombreux exemplaires.

Cette étape se déroule dans le cytoplasme. Plusieurs processus de fabrication, puis de « maturation » des protéines ont lieu (ajout des glucides pour les

glycoprotéines, clivage de certaines protéines en deux sous-unités)

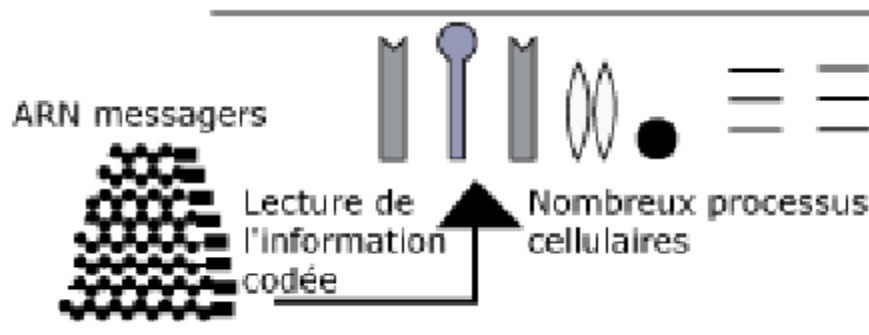


Figure 8 : Schéma de la production de protéines des virus

1.5.8. Sortie de nouveaux exemplaires d'ARN viral du noyau :

De nombreux exemplaires d'ARN du virus ont été produits. Ils sortent du noyau de la cellule pour aller dans le cytoplasme. Les protéines NP interviennent lors de cette étape.

1.5.9. Migration des constituants du virus vers la membrane de la cellule :

Les protéines et les segments d'ARN nouvellement formés migrent jusqu'à la membrane de la cellule.

Certaines protéines se retrouvent directement enchâssées dans la membrane de la cellule (celles qui par la suite seront enchâssées dans l'enveloppe du virus).

D'autres se retrouvent juste sous la membrane de la cellule, ainsi que l'ARN viral sous forme de nucléocapsides.

1.5.10. Assemblage des constituants du virus :

Ces éléments sont répartis pour former des pré-virus (qui contiennent exactement tous les éléments du virus).

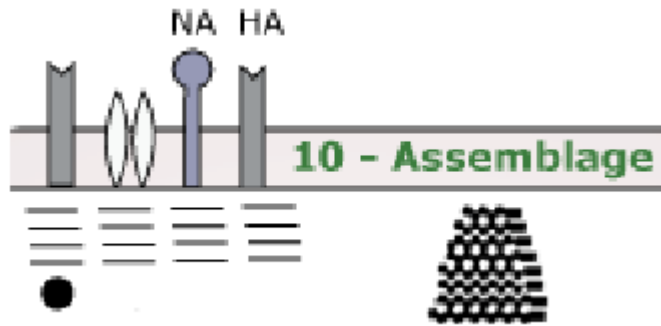


Figure 9 : Schéma d'assemblage des constituants du virus.

1.5.11. Production de nouvelles particules virales, par bourgeonnement :

Tous les éléments de la particule virale se trouvent sous la membrane de la cellule, ou enchâssés dans cette membrane. Celle-ci va alors bourgeonner, c'est-à-dire former une excroissance vers l'extérieur qui se referme sur elle-même pour donner une vésicule.

On obtient l'enveloppe du virus formée de protéines et doublée d'une partie de membrane de la cellule, avec à l'intérieur tous les autres constituants du virus.

Une nouvelle particule virale est formée.



Figure 10 : Schéma du bourgeonnement

1.5.12. Libération des particules virales :

Les nouvelles particules virales restent attachées à la membrane de la cellule qui les a produites, à cause de la liaison entre l'hémagglutinine du virus et l'acide sialique de la cellule.

Les protéines Neuraminidase cassent cette liaison, permettant ainsi aux nouveaux virus de se détacher et d'aller infecter de nouvelles cellules cibles. [4]

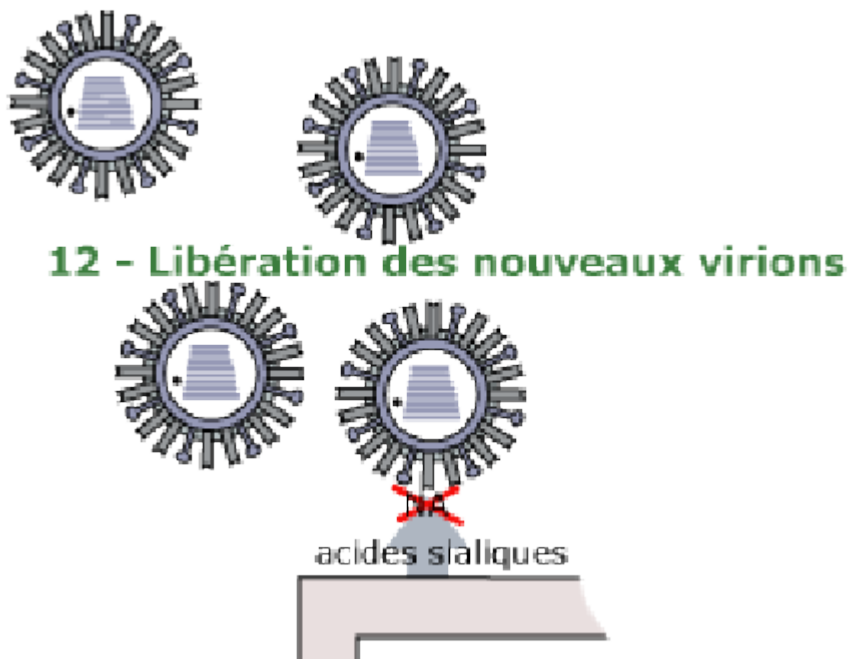


Figure 11 : Schéma de libération des nouveaux virions.

1.6. Diagnostic virologique :

1.6.1. Diagnostic direct :

1.6.1.1. Prélèvement :

Il s'agit des prélèvements rhinopharyngés et/ou d'expectoration bronchique qui doivent être recueillis dans les deux premiers jours de l'évolution clinique.

1.6.1.2. Diagnostic :

Les cellules du prélèvement sont étalées sur une lame de verre, éventuellement après traitement par un mucolytique, et la présence d'antigène viral est révélée en immunofluorescence indirecte.

1.6.1.3. Isolement :

Il peut être réalisé sur œuf de poule embryonné par inoculation intra-amniotique et intra-allantoïque. Les œufs sont incubés pendant trois jours à 36°C ; les liquides amniotiques et allantoïques sont recueillis et testés pour une éventuelle activité hémagglutinante vis-à-vis de globules rouges de cobaye. Si l'hémagglutinine est positive on pratique une inhibition de l'hémagglutination à l'aide d'antisérums spécifiques de sous-types.

Certains utilisent des cellules de rein de chien trypsinées ;

La présence d'un virus influenza dans la culture peut être testée par hémadsorption de globules rouges de cobaye et l'identification pratiquée par inhibition de l'hémadsorption.

1.6.2. Diagnostic indirect :

Deux sérums sont testés ; l'un au début de l'évolution des signes cliniques et l'autre une dizaine de jours plus tard.

1.6.2.1. Déviation du complément :

Elle met en évidence des anticorps spécifiques de type A ou B.

Ces anticorps apparaissent rapidement, atteignent leur titre maximum environ 15 jours après le début de la maladie puis disparaissent en quelque mois. On cherchera à mettre en évidence une séroconversion, une augmentation significative du titre des anticorps voire un titre significatif.

1.6.2.2. Inhibition de l'hémagglutination :

Les anticorps correspondants sont spécifiques de sous-types et de variants. L'hémagglutination sera réalisée avec le ou les variant(s) les plus récemment

impliqué(s) ; le sérum étudié devra au préalable être débarrassé des inhibiteurs non spécifiques. On cherchera à mettre en évidence une augmentation significative du titre d'anticorps. (1)

1.7. Virus influenza A:

1.7.1. Historique :

Les symptômes de la grippe sont décrits par Hippocrate il y'a plus de 2400ans.

- La première pandémie de la grippe assez bien décrite de 1580 aurait éclatée en Asie d'où elle se serait propagée en Afrique et Europe.
- 1918- 1919 « la grippe espagnole H1N1 » très contagieuse et très virulente à touché tous les pays du monde, fait un milliard de malade, et est responsable de 50 à 100 millions de morts dans le monde.

Elle se déclare dans un monde usé par la guerre, elle est considérée comme l'épisode le plus meurtrier de l'histoire jamais causé par une maladie.

- 1957- 1958 « la grippe asiatique H2N2 » moins sévère a été responsable de 4 millions de morts dans le monde.

Le monde était mieux préparé, le virus était moins virulent que celui de 1918.

- 1968- 1969 « la grippe de Hong-Kong H3N2 » responsable de 2 millions de morts dans le monde dont 18000 en France, a été classé modérément grave.
- la première vague de H5N1 « 1997 »

En 1997, H5N1 subit une première mutation, il dévient brutale et hautement pathogène.

On le retrouve dans les volailles d'élevage et les marchés d'animaux vivants.

De manière concomitante les premiers cas humains apparaissent : 18 sont décrits en Hong-Kong et 6 sont fatales, ils présentent d'emblée des pneumopathies virales rapidement mortels.

Vietnam en janvier 2004

En 2005 propagation en Asie.

La pandémie de la grippe doit être considérée comme un risque sanitaire majeur.

- La grippe A(H1N1) de 2009-2010 « grippe nord-Américaine ou grippe Mexicaine ou grippe nouvelle »

La grippe A (H1N1) de 2009-2010 est une maladie respiratoire aiguë contagieuse provoquée par un virus de la grippe A de sous-types H1N1 différent des sous types A, H1N1 de la grippe saisonnière. Ce virus est réapparu en 2009 sous une nouvelle forme génétique transmissible d'homme à homme.

L'épidémie grippale résultante a touché l'ensemble de la planète dès les mois qui ont suivi et a été qualifiée de pandémie par l'OMS en juin 2009. Ce nouveau virus grippal, contenant des gènes de plusieurs virus connu d'origine porcine, aviaire et humaine est un virus réassorti.

Le virus se propage par la toux, les éternuements, les postillons dans un périmètre de deux mètres (avec une incertitude concernant les climatisations collectives), ou en touchant une surface contaminée (il reste vivant de 8 à 48 heures à l'air libre, selon la nature de la surface sur laquelle il repose). Les symptômes qui peuvent durer jusqu'à une semaine, sont similaires de la grippe saisonnière et peuvent inclure fièvre, éternuement, mal de gorge, toux, maux de tête et douleurs musculaires et articulaires. En général, le traitement est symptomatique analogue à celui pratiqué face aux autres syndromes grippaux et essentiellement à base du paracétamol. Pour les cas les plus sévères, des médicaments antiviraux inhibiteurs de la neuraminidase tels que l'oseltamivir ou le zanamivir, sont prescrits. Un vaccin étant disponible, les campagnes de prévention privilégiant la vaccination pour l'ensemble de la population dans la plus part des pays.

Au niveau mondial, environ 6000 décès étaient enregistrés à la mi-novembre avec un taux de complication sévère de l'ordre 2 à 3 pour mille analogue à ce qui est observé avec les grippes saisonnières. Dans la plupart des cas, les malades n'ont présenté que des symptômes bénins et leurs guérisons ont été rapide et complète, néanmoins à la différence des épidémies de la grippe

saisonnière, les femmes enceintes et les personnes souffrant d'obésité présentent une sur-mortalité.

C'est à l'institut Pasteur de Paris que Dujarrie de la Rivière avait apporté en 1918, la preuve de l'existence d'un « virus filtrant » à l'origine de la grippe.

Le premier virus grippal humain (type A) fut isolé en 1933, en Grande Bretagne, après injection du produit de prélèvement au furet.

Dès 1931, Good Pasture avait réussi à cultiver des virus dans l'œuf de poule embryonné. Cette technique permit à Smith et Francis de préparer aux USA les premiers vaccins inactivés dont l'efficacité était douteuse. Mais c'est Jonas Salk qui, encouragé par les autorités militaires américaines, prépara le premier vaccin efficace à grande échelle en purifiant et en inactivant le liquide allantoïque ensemencé. Ce vaccin fut utilisé pour vacciner le corps expéditionnaire américain en Europe en 1944-1945.

Dès 1947, le laboratoire de la grippe récemment créé à l'institut Pasteur de Paris, prépara un vaccin par la même technique. Jusqu'en 1968, la vaccination contre la grippe resta assez confidentielle. Certes, en 1958, le virus de la pandémie H2N2 (grippe asiatique) remplaça dans le vaccin le premier virus A/H1N1, et des améliorations furent apportées dans sa purification. Mais l'époque contemporaine de la vaccination ne débute qu'après la pandémie de 1968. Aux USA, le vaccin H2N2 s'était avéré inefficace contre le nouveau virus H3N2. Heureusement qu'il n'apparaît en Europe qu'en 1969, laissant ainsi le temps de préparer un vaccin adapté. L'OMS prend alors conscience qu'il faut renforcer les réseaux de surveillance.

Mais en attendant de nouveaux vaccins, le principe de fabrication est toujours le même depuis 1937, utilisant l'œuf embryonné, il fait ses preuves. [5]

1.7.2. Epidémiologie du virus influenza A :

Les virus influenza A ont été isolés chez un grand nombre d'espèces aviaires et chez les mammifères.

-les oiseaux sauvages sont considérés comme le réservoir naturel des virus influenza A, ils hébergent des virus porteurs de tous les types d'hémagglutinine (HA) et de neuraminidase (NA) connus, même si l'on n'a pu isoler toutes les combinaisons possibles de sous types.

La plupart de ces virus apparaissent adaptés à leurs hôtes naturels et sont rarement responsables d'infections dans les populations aviaires sauvages, ils peuvent par contre disséminer à grande échelle dans l'environnement par élimination fécale.

On suppose qu'en raison de leur large distribution, les virus influenza A quittent de façon ponctuelle cet état d'équilibre et vont coloniser d'autres espèces de vertébrés, l'hypothèse selon laquelle les virus grippaux adaptés et circulants chez le cheval, le porc, et l'homme prévalent actuellement. [6]

-il en est différemment des mammifères, pour lesquels on ne connaît qu'un nombre limité de sous-types viraux. Seulement 3 sous-types de l'HA (H1, H2, H3) et 2 sous-types de NA (N1 et N2) ont été identifiés à ce jour chez l'homme. Les combinaisons A(H1N1) et A(H3N2) sont actuellement responsables des épidémies saisonnières annuelles dans la majorité des régions du globe. Les mammifères sont en fait des hôtes accidentels au même titre que les oiseaux d'élevage. En raison de sa capacité à héberger et permettre la réplication des virus influenza d'origine humaine et d'origine aviaire ; le porc a été impliquée comme hôte intermédiaire servant de « creuset » à l'émergence de nouvelles souches virales à potentiel pandémique. [7]

A ce titre le porc jouerait un rôle particulier dans le franchissement de la barrière de l'espèce.

1.7.3. Transmission du virus influenza A :

La transmission du virus est essentiellement interhumaine et direct (par voie orale, via aérosols d'origine salivaire ou respiratoire, produit notamment lorsqu'on tousse, éternue, ou respire)

Son extrême contagiosité est liée au fait qu'un inoculum minime est suffisant pour provoquer une infection chez un sujet réceptif.

On notera qu'éviter l'infection est difficile dans la vie en société : il faudrait fuir les bus, les écoles, la foule, tout contact avec ses semblables. On peut être infecté de manière indirecte par des objets contaminés, par les mains, dans les centres de soins. [8]

La transmission des virus grippaux aviaires aux mammifères : habituellement, les virus grippaux aviaires n'infectent pas l'homme cependant, le 20^{ème} siècle a connu trois pandémies de grippe, toutes dues à des virus grippaux émergents d'origine aviaire. Les souches virales responsables des pandémies de 1957 et 1968 sont apparues en Asie du sud-est, à l'occasion d'un réassortiment entre des gènes d'origines aviaires et ceux de la souche humaine circulante, responsable des épidémies saisonnières, il en serait différemment pour les souches responsables de la grippe espagnole de 1918. Les études ont suggéré la transmission directe d'un virus aviaire avec l'adaptation chez l'homme ou d'autres mammifères (le porc par exemple qui peut héberger des virus humains et des virus aviaires et servir d'hôtes intermédiaires) [7]

Depuis 1997, on a régulièrement mis en évidence des cas de contamination humaine directe ou indirecte [9]

On a clairement établi le passage direct à l'homme du virus A (H5N1) totalement d'origine aviaire.

1.8. Prévention et traitement de la grippe humaine :

1.8.1. Prévention :

1.8.1.1 Mesures d'hygiène :

Comme pour beaucoup de maladies infectieuses, l'hygiène est la première forme de prévention de la contagion en période épidémique ;

- Se laver les mains soigneusement et plusieurs fois par jour, au savon ou avec une solution hydro alcoolique désinfectante pour les mains, surtout

après tout contact physique direct avec une personne potentiellement infectée ou s'occupant d'un malade, ou avec des surfaces potentiellement contaminées par le virus.

- Se protéger et protéger les autres des projections (buccales ou nasales) ; en toussant ou en éternuant dans un mouchoir jetable (à jeter dans une poubelle fermée aussitôt avant de se laver ou se désinfecter les mains) ; ou en touchant ou en éternuant dans le creux du bras (plutôt que dans les mains) si l'on ne dispose pas de mouchoirs. Les projections d'un malade peuvent être réduites par le port d'un masque de type chirurgical en présence de tiers. Les masques de type FFP2 protégeront les professionnels de santé de l'inhalation du virus. En pratique, il ne semble pas que l'emploi de masques autre que chirurgicaux aboutisse à une contamination moindre, faisant suspecter un rôle réduit de microgouttelettes expectorées. [10]
- Rester chez soi si l'on est malade, et éviter tout contact inutile avec les personnes non malades.
- Eviter toute atmosphère confinée. Aérer régulièrement les pièces.
- Si une personne saine cohabite avec une personne malade, il est fortement conseillé à la personne saine de désinfecter tout objet ayant pu être contaminé par la personne malade.

Il est préférable que la personne saine reste également en quarantaine, si toutes fois elle est dans l'obligation d'avoir un contact avec le malade, il est impératif de garder le masque et de penser à se laver rigoureusement les mains avant et après ce contact.

1.8.1.2. Prophylaxie : vaccination et antiviraux :

La quarantaine est un moyen efficace, mais difficile à mettre en œuvre.

La vaccination anti-grippale est considérée comme la meilleure prophylaxie.

Outre l'hygiène, la vaccination dans les pays où elle est accessible semble être la meilleure parade, avec des taux de protection par les vaccins de l'ordre de 60%

(jusqu'à 90% pour la grippe saisonnière). Elle en diminue significativement le nombre d'hospitalisation ainsi que la mortalité. [11] Cependant, l'explication de ces effets bénéfiques n'est pas claire puisque la mortalité diminue également en période non épidémique, ce qui laisse supposer que les personnes vaccinées sont peut-être simplement en meilleure santé. [12] Toutefois des évaluations quasi exhaustives sur près de 40 ans de vaccination antigrippale incitent à considérer ces taux avec prudence. [13]

Le vaccin le plus commun est une suspension de particules virales inactivées et purifiées qui offre une protection contre 3 souches virales. Dans la majorité des cas, il comporte des particules de 2 sous-types de virus influenza A et d'un sous-type de virus influenza B. [14]

Le vaccin peut être administré de manière sous-cutanée ou intramusculaire.

L'utilisation de l'Oseltamivir en prophylaxie antivirale est indiquée seulement dans le cas où le sujet est déjà contaminé ou risque fortement de l'être. Elle permet la réduction de 80% du nombre de cas de grippe chez les sujets contacts traités précocement, dans les premières 48 heures après contagion.

La prophylaxie post-exposition par l'Oseltamivir est recommandée pour les sujets dont l'âge est supérieur à 13 ans, à risque de complications grippales graves et/ou non protégés par la vaccination, car non vaccinés, ou à cause d'une vaccination dont la souche injectée est inadaptée, ou parce que la vaccination est trop récente, ou à cause d'une immunodépression notable.

1.8.2. Traitement :

1.8.2.1. Traitement symptomatique :

L'augmentation de la température centrale (fièvre) est un mécanisme physiologique immunitaire antiviral qui perturbe la biochimie des réplifications virales. Il n'y a pas de preuves scientifiques du bénéfice (en terme de morbi-mortalité) des traitements symptomatiques des infections virales aiguës bénignes saisonnières de l'adulte sain en général et de l'infection grippale, en particulier.

- Repos (l'arrêt de travail permet de limiter la contagion et les risques de propagation de l'infection)
- Antipyrétique. Le paracétamol est utilisé en première intention car il entraîne peu d'effets secondaires. L'aspirine est contre indiquée chez les jeunes enfants, car son administration lors d'une grippe peut entraîner un syndrome de Reye (c'est une maladie rare affectant surtout les enfants et les adolescents atteints d'une maladie virale comme la varicelle ou la grippe), rare mais potentiellement mortel.
- Antalgique
- Antitussif
- Hydratation, en fonction de la fièvre
- La vitamine C peut être indiquée contre l'asthénie passagère due au syndrome grippale.

1.8.2.2 .Traitement curatif :

Il existe des médicaments antiviraux

- l'amantadine (Mantadix) et la rimantadine, qui ont une efficacité de l'ordre de 80% si administrés à titre préventif ;
- l'oseltamivir (Tamiflu) et le zanamivir (Relenza) sont des inhibiteurs de la neuraminidase. Ces traitements, pris précocement, peuvent diminuer l'importance des symptômes et la durée de l'affection et sont également capables de prévenir l'infection.

Mais ils sont coûteux et doivent être pris dans les 48 heures après l'apparition des symptômes.

Les antibiotiques ne sont prescrits qu'en cas de surinfection bactérienne (notamment l'amoxicilline).

2. Méthodologie :

2.1 .Cadre d'étude :

2.1.1. Type d'étude :

Notre étude est prospective basée sur la surveillance de la grippe chez les enfants âgés de 0 à 35mois se présentant en urgence à l'HGT et les femmes enceintes qui se présentent aux centres de santé de Banconi (ASACOBAB et Cherifla)

2.1.2. Période d'étude :

L'étude s'est déroulée pendant une période allant de Novembre 2009 à Juillet 2010

2.1.3. Site de prélèvement :

Trois sites ont été retenus il s'agit de l'hôpital Gabriel Touré, l'ASACOBAB, et le centre de santé Chérifla pour les raisons suivantes :

Situé dans la commune 3 du district de Bamako, l'Hôpital Gabriel Touré (HGT) est le principal hôpital pédiatrique au Mali et reçoit la grande majorité des enfants malades.

ASACOBAB, un centre de santé publique, située à Banconi, qui est l'un des quartiers les plus peuplés de Bamako.

Chérifla un autre centre de santé située aussi à Banconi.

Le climat au Mali est de type soudanais avec trois saisons (saison froide, saison sèche, saison pluvieuse).

2.1.4. Population d'étude :

Les participants étaient composés d'enfants de 0 à 35 mois de sexe féminin et masculin se présentant à l'hôpital Gabriel Touré et les femmes enceintes se présentant aux centres de santé de Banconi (ASACOBAB et Cherifla)

2.1.5. Critères d'inclusion :

Sont inclus dans l'étude :

Enfants âgés de 0 à 35 mois se présentant à l'hôpital Gabriel Touré avec des symptômes grippaux et les femmes enceintes se présentant aux centres de santé de Banconi et Chérifla présentant également des symptômes grippaux comme décrit le protocole

2.1.6. Critères de non inclusion :

Ne sont pas inclus dans l'étude :

- Enfant ne répondant pas aux critères d'inclusions.
- Enfant dont les parents refusent l'assentiment.
- Femme non enceinte.

2.1.7. Echantillonnage :

L'étude a concerné 739 patients composés des enfants de 0-35mois et des femmes enceintes répondant aux critères d'inclusion.

2.1.8. Prélèvement :

Le mode de prélèvement effectué au cours de notre étude a été l'écouvillonnage naso et oro-pharyngé. Le prélèvement était fait au niveau des différents sites par

des médecins et infirmiers puis acheminer au laboratoire.



Figure 12 : photo des prélèvements

2.2. Présentation du Centre pour le Développement des Vaccins (CVD) du Mali et ses activités :

Le centre est situé à Djicoroni Para dans l'enceinte du Centre National d'Appui à la lutte contre la Maladie (CNAM) de Bamako (Ex Institut Marchoux) sous la tutelle du Ministère de la Santé.

Il a été créé en 2002 dans le cadre de la coopération entre le Ministère de la Santé du Mali et le Centre pour le Développement des Vaccins de l'Université de Maryland à Baltimore aux Etats-Unis.

Il a comme objectif la surveillance des maladies à potentiel épidémique et endémique.

Le centre est composé actuellement de deux blocs :

- Un bloc administratif composé de :
 - le laboratoire recherche
 - les bureaux administratifs organisés comme suite:

Un secrétariat principal,

Un bureau du coordinateur,

Un bureau du gestionnaire,
Un bureau des comptables,
Deux bureaux des médecins,
Une salle de conférence,
Une unité informatique
Deux toilettes (homme et femme)

➤ Une unité clinique composée de :

Cinq boxes de consultation

Trois bureaux

Une salle d'attente

2..2.1. Le laboratoire de recherche :

Mis en activité le 17 décembre 2005 est composé de :

Un laboratoire de microbiologie

Un laboratoire d'immunologie

Un laboratoire Influenza

Un bureau du microbiologiste

Un bureau d'immunologiste

Un bureau des pharmaciens

Un bureau des techniciens et étudiants stagiaires

Un magasin

Une chambre noire (lecture sous ultra violet)

Une salle de préparation des milieux de culture

Une chambre froide

Une salle de stérilisation

Une toilette.

Les personnels sont :

Un pharmacien microbiologiste,

Six pharmaciens généralistes,

Un médecin généraliste,

Quatre étudiants stagiaires,

Un technicien supérieur,

Deux techniciens de laboratoire,

2.2.2 Matériels et réactifs et appareillage :

2.2.2.1 Matériels :

- Des fiches techniques à remplir à la réception des échantillons.
- Un Registre d'accueil et de report des résultats.
- Des fiches de report des résultats.
- Un Registre de conservation des échantillons et l'ARN après extraction.
- Rnase/Dnase 1,5ml polypropylene microcentrifuge tubes (tube stérile en polypropylène de 1,5ml).
- Embouts stériles avec filtres.
- Pipettes de 1 – 10µl ; de 10 – 200µl ; et de 100 – 1000µl
- Accumulateurs.
- Equipement de protection du personnel.

2.2.2.2. Réactifs :

- Kit d'ARN viral QIAmp
- Kit de détection (Amorces et Probe).
- Kit de contrôle positif (SIVC et H5VC).
- Kit de Cellules Humaines de contrôle négatif.
- Rrt-PCR enzyme du mélange mixte.
- L'Eau Ultra Pure.
- Ethanol pur.

2.2.2.3. Appareillage :

- Congélateurs de -80°C et -20°C,
- Réfrigérateurs de 2 - 4°C,
- Microcentrifugeuses,

- Mini centrifugeuses,
- Vortex,
- Trois Hottes,
- Un ordinateur connecté à un thermocycleur (Applied Biosystems TM ABI 7500 système de PCR à temps réel)

2.3. Identification du virus influenza:

2.3.1 Collecte et réception des échantillons :

Les échantillons sont collectés depuis les sites de prélèvement par les cliniciens puis transportés au le laboratoire dans des conditions bien définies.

Une fois au laboratoire le technicien du laboratoire reçoit les échantillons et vérifie les conditions d'acceptabilités qui sont :

- Les échantillons doivent être placés dans un milieu de transport viral (VTM) comprenant les 2 écouvillons.
- Les échantillons doivent être bien identifiés conformément à la fiche.
- La température doit être comprise entre 2 et 8°C.
- Les conteneurs doivent être bien fermés.
- Le temps mis entre le prélèvement et la réception dans le délai imparti (72Heures).

2.31.2. Partage et stockage des échantillons :

Après réception et acceptation, les échantillons sont partagés en trois aliquotes, un pour CDC, un pour les archives du CVD-Mali et le troisième pour le test.

Si les échantillons ne sont pas testés dans les 72 heures ils doivent être conservés à une température inférieure ou égale -80°C.

2.3.1.3. Préparation, partage et stockage des réactifs :

2.3.1.3.1. Les amorces et probes

Les amorces et probes nous parviennent à l'état lyophilisé.

Une fois reçus les amorces et les probes sont réhydratés

- **Réhydratation :**

Enlever les amorces et probes de 2-8°C.

-Resuspendre dans 500µl de Tris, pH (7,4-8,2) ou l'eau ultra les amorces ou probes.

-Laisser dissoudre (réhydrater) pendant 15 minutes à la température du laboratoire.

Après réhydratation vortexer quelques secondes afin d'avoir une solution homogène.

➤ **Aliquotage :**

Etiqueter un nouveau cryotube, stérile pour chaque amorce et probe avec les informations suivantes :

- Nom de l'amorce ou probe
- Numéro de lot du Kit
- Date de préparation
- Date d'expiration

Faire des aliquotes de 60µl pour chaque amorce et probe dans des tubes respectifs et stocker à -20°C.

➤ **Stockage :**

Après réhydratation,

Les aliquotes d'amorces sont stockés à -20°C ou à une température plus basse jusqu'à la date d'expiration ou jusqu'il soit nécessaire de faire un contrôle de qualité.

Les aliquotes de probes sont conservés à -20°C ou à une température plus basse.

Une fois un aliquote de probe utilisé, il doit être conservé entre 2-8°C à l'abri de la lumière pour tout au plus 3 mois.

2.3.1.4. Préparation, extraction et conservation des contrôles :

2.3.1.4.1. Préparation de l'échantillon humain de contrôle négatif (HSC) :

➤ **Réactifs :**

C'est une suspension dans le PBS de concentration 0,01 M d'une culture de cellule humaine non infectieuse.

Le volume est de 0,5µl par tube.

➤ **Stockage :**

HSC est conservé à -20°C après réception. Ne pas diluer.

➤ **Procédure :**

HSC doit être extrait et testé pour chaque lot d'échantillons à tester.

Ne pas diluer l'ARN à tester.

2.3.1.4.2 Préparation du contrôle positif (SIVC) :

➤ **Réactifs :**

Le SIVC (Seasonal Influenza Virus Control) est une suspension dans le PBS de concentration 0,01M du virus influenza inactivé non infectieux.

Trois différents virus de la grippe (A/H1, A/H3 et influenza B et une culture de la cellule humaine) composent le SIVC.

➤ **Stockage :**

Une fois reçu le SIVC est stocké à -20°C. Ne pas diluer

➤ **Procédure :**

L'ARN du SIVC doit être obligatoirement extrait. Le volume final de l'ARN obtenu doit être égal au volume de départ de SIVC pris.

Diluer l'ARN obtenu à 1/10 avec de l'eau ultra pure.

Etiqueter un nouveau cryotube stérile pour chaque aliquote avec les informations suivantes :

Le nom de l'ARN de control, la dilution (1/10)

Le numéro de lot du kit

Date de préparation

Date d'expiration.

Partager l'ARN diluer au 1/10 (60µl) dans des cryotubes à usage unique et stocker à -20°C ou en dessous tout au plus 6 mois.

Utiliser un aliquote pour chaque réaction, jeter après usage. Ne pas réutiliser l'ARN résiduel.

2.3.1.4.3. Préparation du H5VC :

➤ **Réactifs :**

C'est une substance non infectieuse positive se présentant dans un tube de 500µl en suspension dans du PBS de concentration 0,01M.

➤ **Stockage :**

Stocker à une température de -20°C après réception. Ne pas diluer.

➤ **Procédure :**

H5VC doit être extrait avant l'utilisation. Le volume final est égal au volume de départ.

Diluer à 1/10 avec l'eau ultra pure.

Etiqueter des cryovials stériles pour chaque aliquote avec les informations suivantes :

Nom de H5VC et 1/10 de dilution.

Numéro de kit.

Date de préparation

Date d'expiration.

Dispenser l'ARN extrait en aliquote et stocker pendant 6 mois à -20°C.

2.3.2. Etapes de la réaction RT-PCR proprement dite :

2.3.2.1. Préparation générale :

2.3.2.1.1. Préparation des équipements :

Nettoyer et décontaminer toutes les surfaces de travail, pipettes, centrifugeuses, et d'autres équipements à utiliser. La décontamination des matériels se fait avec l'eau de javel 5%, de l'éthanol 70% ou RNASE pour minimiser le risque de contamination de l'acide nucléique.

2.3.2.1.2. Préparation des réactifs :

Tous les réactifs doivent être conservés dans un accumulateur ou glace durant la préparation.

Réactifs, Amorces et Probes :

- Décongeler les aliquotes d'amorces et probes. Ne jamais recongeler le probe une fois dégivré.
- Les vortexer pendant 15 secondes.
- Les centrifuger brièvement.
- Les placer dans de la glace ou accumulateur lors de la préparation du mélange mixte.

Réactifs de buffer et enzyme :

- Invitrogen 2XPCR mélange mixte et super script III RT/platinum Taq enzyme sont placés dans l'accumulateur entre 4-8°C.
- Décongeler complètement.
- Mixer 10 fois.
- Centrifuger brièvement amorces et probes.

2.3.2.1.3. Les précautions à prendre :

Des précautions appropriées sont nécessaires du fait de la sensibilité de la réaction RT-PCR et dans le souci d'éviter des contaminations.

Les précautions suivantes sont recommandées :

- Réserver différentes salles pour la technique et la conservation.
- Travailler exclusivement sous la hotte.
- Chaque salle de travail doit avoir ces propres blouses.
- Eviter de circuler avec une même blouse d'une salle à l'autre.
- Maintenir séparés les équipements (pipettes, microcentrifugeuses) et les consommables (tubes microcentrifuge, Embouts) pour la technique et la conservation de l'ARN extrait.
- Porter une blouse propre et des gants sans poudre lors de la technique.
- Changer les gants si une contamination est suspectée.
- Garder les réactifs et les tubes de réactions bien fermés ou bien couverts.

- La surface de travail, pipettes, et centrifugeuses doivent être propres et décontaminées avec des produits comme DNaZap ou RNa AWAY dans le souci de minimiser le risque de contamination de l'acide nucléique.
- Les réactifs, mélange mixte et ARN doivent être maintenus dans un accumulateur durant la préparation pour assurer la stabilité.
- Vérifier toujours la date d'expiration avant l'usage. Ne pas utiliser un réactif périmé.
- Protéger les probes de la lumière.
- Les aliquotes d'amorces et probes et le Taq du mélange mixte doivent être maintenus dans un accumulateur et cela durant le temps de la préparation et d'usage.

2.3.2.2. Extraction de l'ARN des échantillons :

Procédure :

- L'extraction se passe dans une salle réservée pour l'extraction des échantillons.
- Identifier les tubes conformément aux échantillons.
- Ajouter à 560µl de Buffer AVL (contenant ou pas de l'ARN carrier), 60µl du prélèvement ; mixer pendant 15secondes. Après mixage, centrifuger.
NB : partager d'abord du buffer (560µl) dans différents tubes stériles et identifiés.
- Incuber à la température du laboratoire (15-25°C) pendant 10 minutes.
- Ajouter 560µl de l'éthanol (96-100%) et vortex pendant 15 secondes, après mixage, centrifuger.

- Pipeter 630µl et transférer dans un tube filtre Qiagen de 2ml et centrifuger à 6000 tours (rcf) pendant une minute. Replacer le filtre dans un autre tube Qiagen et jeter le filtrat.
- Pipeter le reste et le transférer dans le filtre, fermer et centrifuger comme précédemment et remplacer le filtre dans un autre tube.
- Ajouter dans le filtre 500µl de wash Buffer1 (AW1) fermer et centrifuger à 6000tours rcf pendant 1 minute. Replacer le filtre dans un autre tube Qiagen et jeter le filtrat.
- Ajouter dans le filtre 500µl de wash Buffer2 (AW2) et centrifuger à 20000 tours pendant 3 minutes et après transférer le filtre dans un tube eppendorf stérile de 1,5ml.
- L'élution de l'ARN : Ajouter 60µl buffer AVE (élution buffer). Incuber pendant une minute à la température du laboratoire.
- Centrifuger à 6000 tours rcf pendant une minute.
- Conserver l'ARN entre -40°C et -70°C.

2.3.2.3. Préparation du mélange mixte et de la plaque :

Salle de préparation du mélange mixte :

- Etiqueter les tubes eppendorfs stériles de 1,5ml pour chaque réaction de mélange mixte. (Exemple : Influenza A ; Influenza B ; H1 ; H3 et/ou H5a, H5b).
- Déterminer le nombre de réaction (N) qui doit être préparé.
- Calculer le volume de chaque réactif à ajouter suivant la préparation du Template, comme l'indique le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Tableau de la préparation du mélange mixte

	Invitrogen	
	1x (uL)	N
Water	5	N. 5
Buffer	12,5	N. 12,5
Fprim (40mM)	0,5	N. 0,5
Rprim (40mM)	0,5	N. 0,5
Probe (10mM)	0,5	N. 0,5

Enzyme	1	N. 1
Total	20	N. 20

- Préparer un mélange mixte pour chaque type ou sous type (Exemple : Inf A ; Inf B ; H1 ; H3) dans un type eppendorf étiqueté, stérile en calculant d'abord le volume correspondant pour chaque réactif qui doit être ajouté et pour chaque amorce et probe à utiliser pour le mélange mixte correspondant : Utiliser le tableau ci-dessus pour déterminer le volume recommandé pour une réaction correspondant à une plaque (18 échantillons et les contrôles).
- Dans la salle de préparation du mélange mixte dispenser les réactifs dans les tubes étiquetés de 1.5ml, après addition de l'eau ultra-pure, mixer le mélange en pipetant en plusieurs reprises dans le tube.

NB : Ne pas vortexer.

- Centrifuger pendant 5 secondes pour récupérer les gouttelettes en suspension sur la paroi du tube et placer le tube dans un accumulateur.
- Placer la plaque de 96 puits dans un accumulateur.
- Partager 20µl de chaque mélange mixte dans chaque puits de la plaque comme indiqué par la figure ci-dessous

Tableau 2 : Schéma mettant en évidence la plaque.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
FLU A	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	HSC	SIVC
	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	HSC	SIVC
FLU B	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	HSC	SIVC
RP		S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18		
		S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18		
		S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18		

- Dispenser 5ul du contrôle négatif (NTC) dans la première colonne de la plaque, couvrir la colonne contenant le contrôle négatif et identifier.

2.3.2.4. Addition de l'Acide nucléique :(ARN)

- Vortexer l'ARN et centrifuger pendant 5 secondes.
- Après centrifugation placer l'ARN dans un accumulateur.
- Les échantillons doivent être ajoutés dans les colonnes de la plaque comme indiquées par la figure ci-dessus.
- Pipeter 5µl de l'ARN et ajouter à la colonne correspondante comme mentionné sur la figure. (Exemple : S1). Garder les autres échantillons bien fermés durant l'addition, changer d'embout après chaque addition.
- Couvrir soigneusement la colonne dans laquelle l'échantillon est ajouté pour éviter les contaminations.
- Couvrir entièrement la plaque et passer dans la salle du contrôle positif pour l'addition du contrôle positif.

2.3.2.5. Addition des contrôles :

- Ajouter 5µl du HSC déjà extrait avec les échantillons spécifiquement dans la colonne 11. Couvrir la colonne après addition de l'ARN du HSC.
- Pipeter 5µl de l'ARN du SIVC et/ou H5VC et ajouter dans le puit approprié de la plaque comme indiqué par la figure. Dans le cas des sous typages du type A toujours dans la colonne 12 au niveau de E et F le contrôle à ajouter est le SIPC qui est le contrôle de la grippe porcine. Couvrir la plaque et transporter dans la salle d'amplification
- Centrifuger la plaque dans un mini centrifugeuse afin de faire disparaître les gouttelettes et les bulles d'airs, maintenir la plaque dans l'accumulateur avant de le mettre dans la machine.

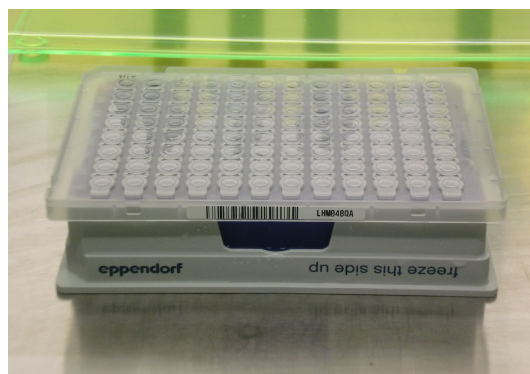
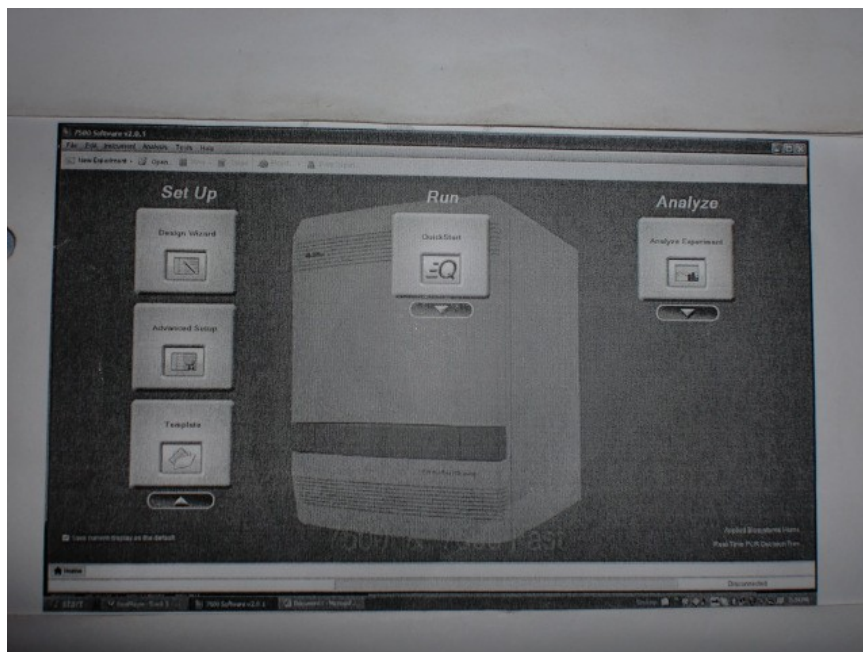


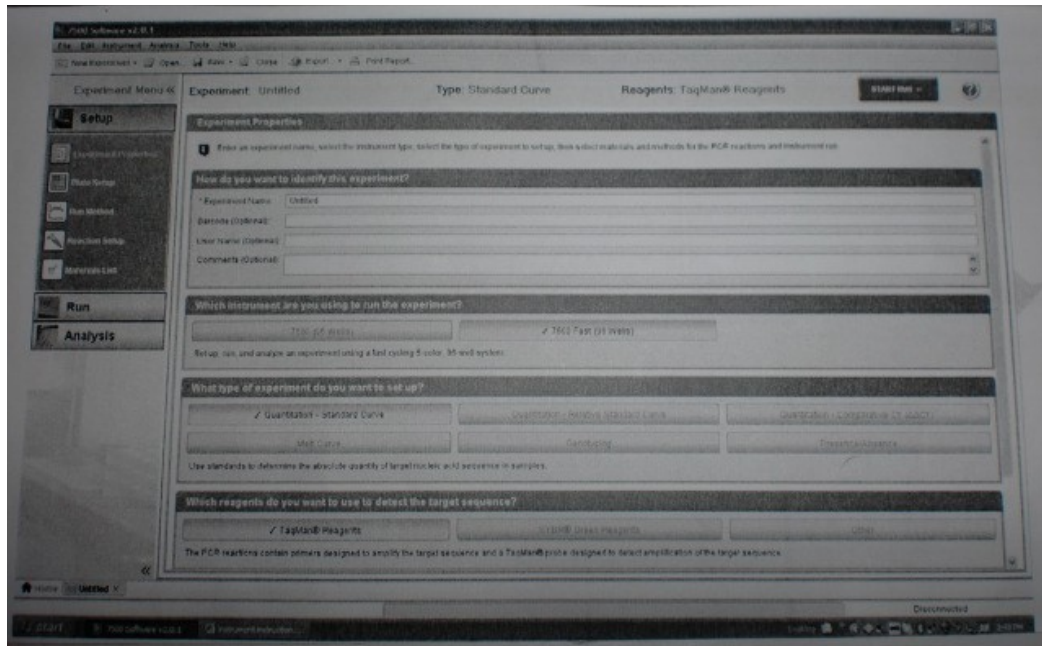
Figure 13 : photo de la plaque.

2.3.2.6. Description de la procédure de préparation du template pour Applied Biosystem 7500 Fast DX System :

- Commencer en faisant une double clique sur Applied Biosystem Fast et l'image en dessous va apparaître choisir icon Advenced Set up.

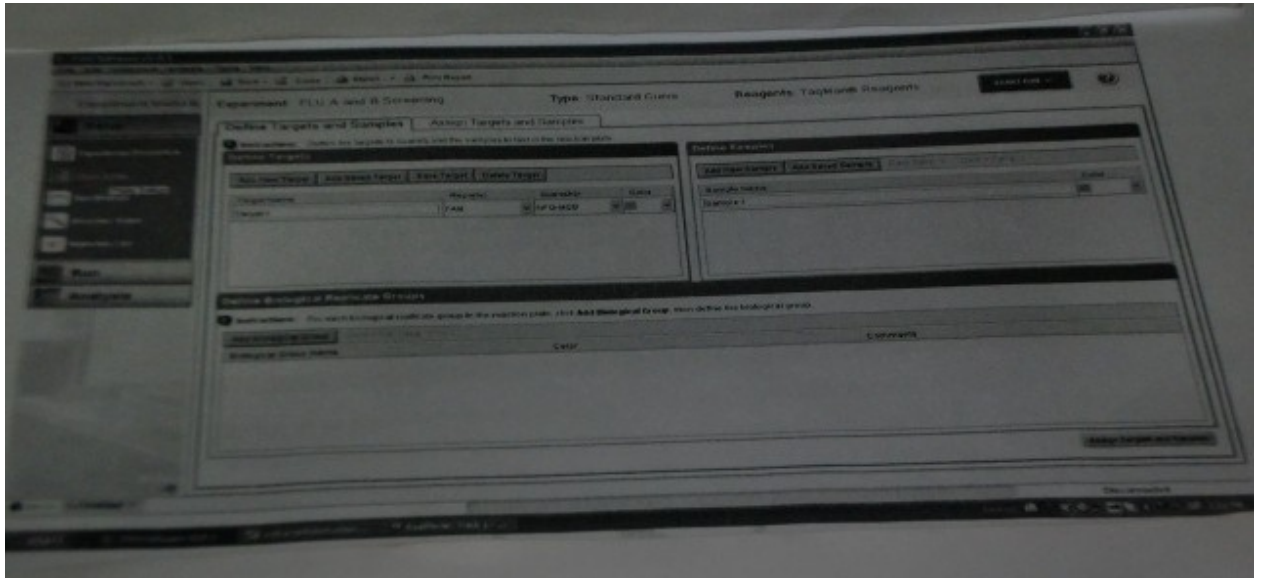


- Une nouvelle fenêtre va apparaître.



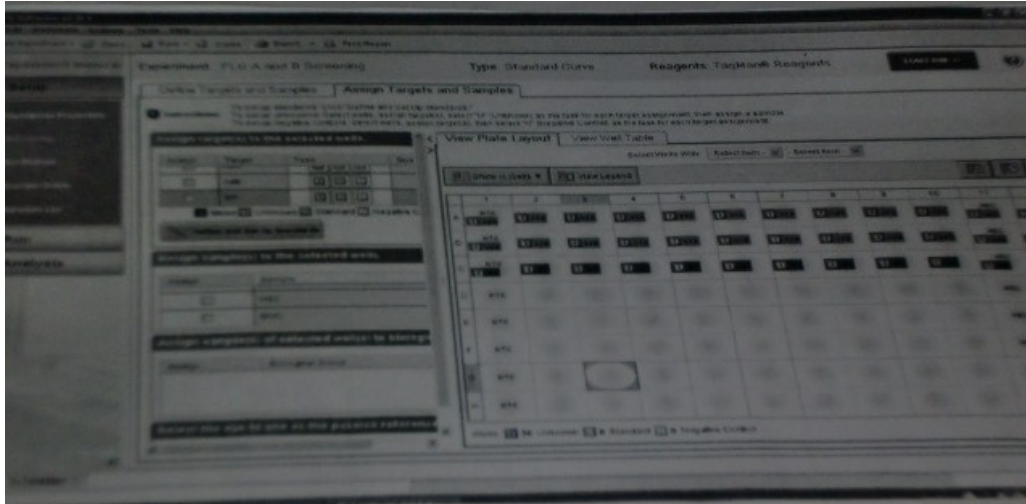
- Saisir dans le cadran User name le nom de l'utilisateur (le nom du technicien).
- Choisir 7500 Fast (96 Wells).
- Choisir Quantitation – Standard Curve.
- Choisir réactifs Taqman
- Choisir Standard (2 heures pour finir un essai)

- A gauche de la fenêtre en haut choisir Plate Set up et la fenêtre d'en bas va apparaître.



- Dans le cadran Define Target faites entrer les noms des types de grippe.
Exemple : Flu A et FLU B
 - Choisir une couleur pour chaque type.
- NB : Choisir encore Target si tu veux ajouter d'autres.
- Dans Define Samples de la fenêtre ci - dessus faire rentrer les noms des échantillons a tester.

- Choisir Assign Target et la fenêtre en dessous va apparaître



- Dans la fenêtre View plate Layout Tape, cliquer dans la ligne A et choisir tous les puits de la ligne.
- Dans Assign Target, dans Select Well Tape cocher Inf A correspondant à la ligne A et faire pareil pour la ligne B et C respectivement Inf B et RP.
- Dans le tableau View Plate Layout cliquer dans la colonne 1 pour choisir tous les puits de cette colonne.
- Dans Assign Sample to the Select Well, cocher l'échantillon correspondant.

Exemple : colonne 1 : NTC

- Répéter la même chose dans les autres colonnes pour l'ensemble des échantillons.
- Dans Select Dye to Use as the passive reference Box choisir None
- Sauver le template sur le disque dur avec des références.
- Une fois la plaque préparée conformément au Template, allumer la machine Applied Biosystem ouvrir le template sauvegarder, et introduire la

plaque dans la machine et lancer la réaction suivre la machine avant l'apparition du temps de réaction estimé (102 minutes).

2.3.2.7. Interprétation et report des résultats :

- Une fois la réaction terminée passer à l'interprétation en cliquant sur Analyse Setting et décocher treshold automatique.

(Treshold : c'est la ligne de référence qui est utilisée par le technicien pour déterminer la positivité d'un échantillon)

Un échantillon positif a un cycle d'amplification inférieur ou égal à 37,4 elle se traduit par une courbe en croissance exponentielle.

- Choisir les différents serogroupes exemple : Inf A et procéder a l'interprétation en déplaçant le treshold jusqu'à la phase de croissance exponentielle de la courbe et projeter sur l'axe des abscisses pour déterminer le nombre de cycle ; faire ainsi pour l'ensemble des serogroupes et vérifier chaque échantillon

NB : SIVC doit être positif à Inf A, Inf B et RP

Le HSC doit être négatif à Inf A et Inf B.

Le HSC et l'ensemble des échantillons doivent avoir un cycle amplification inférieur ou égal à 37,4 à RP.

Une fois l'interprétation terminée les résultats sont imprimés dans un tableau comportant l'ensemble des échantillons, les contrôles et leurs valeurs de cycle d'amplification.

Le graphique aussi est imprimé.

Une fois les résultats imprimés, ils sont portés dans un registre et les fiches de report des résultats.

3. Saisie, analyse des données et Aspect éthique.

3.1. Saisie et analyse des données :

Les données ont été saisies, traitées et analysées sur SPSS (version 12.0) pour Windows.

Word 2003 a été utilisé pour le traitement de texte.

Epi 6. info a été utilisé pour le calcul de χ^2

3.2. Aspect éthique.

- La bibliographie des auteurs cités dans le texte a été respectée.
- L'anonymat des patients a été également respecté (pas de nom, ni de prénom, ni adresse) les patients peuvent retrouver leurs résultats sans retrouver leurs noms.

4. Résultats :

Notre étude a porté sur 739 participants. Sur les 739 participants prélevés 32 ont été positifs au virus A/H1N1 2009 soit 4,3% de l'échantillon, et 27 ont été positifs au virus Influenza B soit 3,6% de l'échantillon.

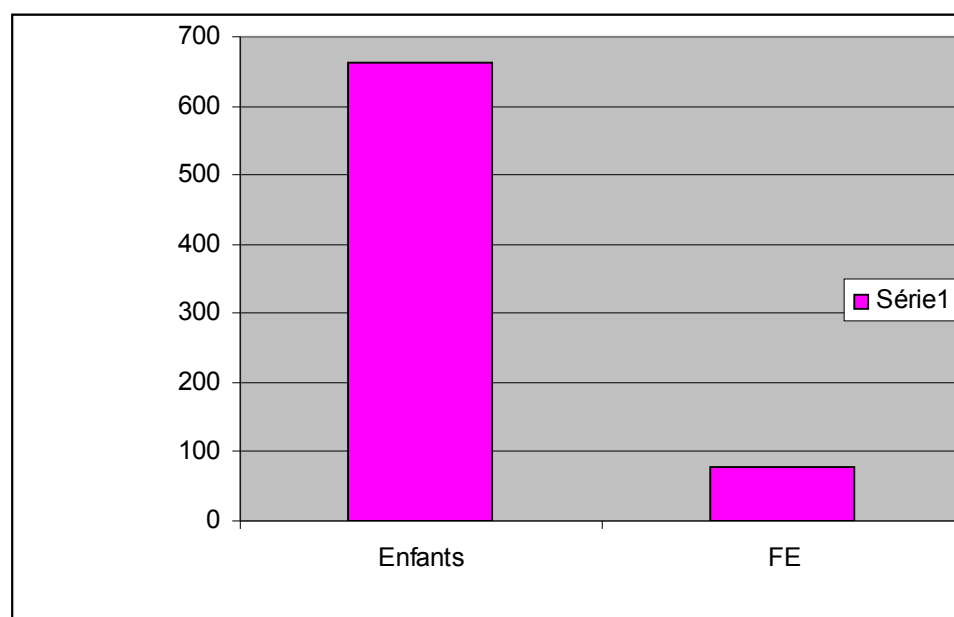
Nous avons fait une évaluation des caractéristiques socio -démographiques et analytiques.

4.1. Résultats socio – démographique :

Tableau 3 : Répartition de la population.

Population	Fréquence	Pourcentage
Enfants de 0 – 35mois	662	89,6%
Femmes enceintes	77	10,4%
Total	739	100

La population 0 – 35 mois a été la plus représentative avec 89,6%

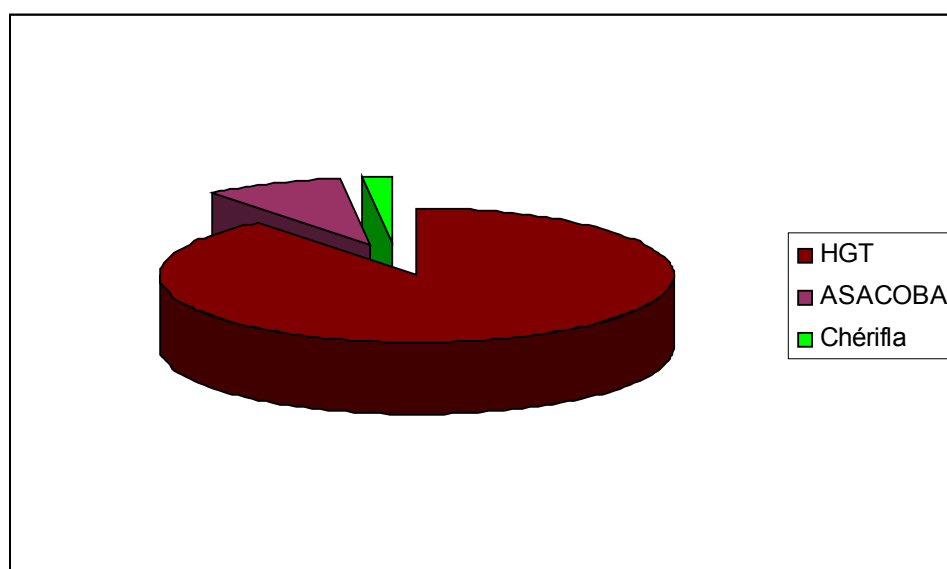


Graphique 1 : Représentation graphique de la population.

Tableau 4 : Répartition de la population en fonction de Site de prélèvement

Provenance	Fréquence	Pourcentage
CHU GT	662	89,6
ASACOBAB (Banconi)	63	8,5
Chérifla (Banconi)	14	1,9
Total	739	100

L'hôpital Gabriel Touré a eu le plus de prélèvements avec 89,6%



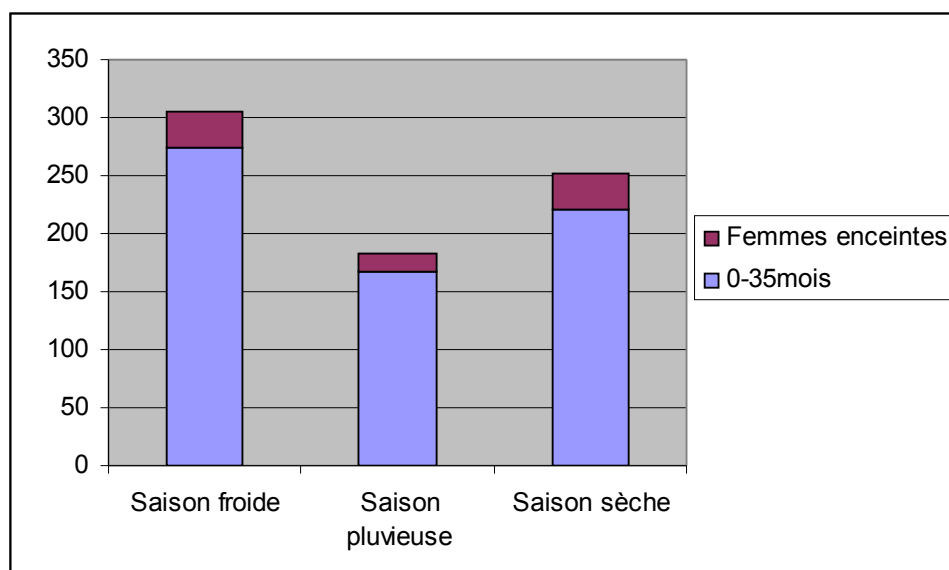
Graphique 2 : Représentation graphique de la population selon le site de prélèvement.

T

Tableau 5 : Répartition de la population en fonction de la saisonnalité.

Saison	Population d'étude		Total	pourcentage
	0-35mois	Femmes enceintes		
Saison froide	274	31	305	41,3
Saison pluvieuse	167	16	183	24,8
Saison sèche	221	30	251	33,9
Total	662	77	739	100

41,3% de nos prélèvements ont été faits en saison froide.



Graphique 3 : Représentation graphique de la population selon la saisonnalité.

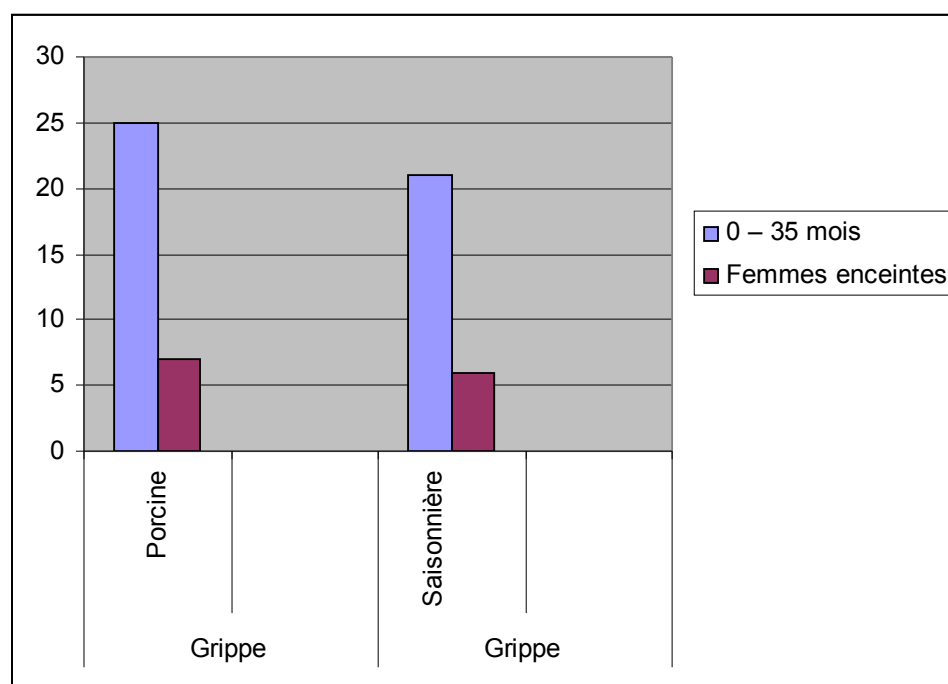
4.2. Résultats analytiques :

Tableau 6 : Distribution de la grippe dans la population

Population d'étude	Résultats				Total	%
	A/H1N1 2009		Virus			
		%	Influenza B	%		
0 – 35 mois	25	78,13	21	77,78	46	77,97
Femmes enceintes	7	21,87	6	22,22	13	22,03

Total	32	100	27	100	59	100
-------	----	-----	----	-----	----	-----

77,97% des cas de grippe confirmés sont des enfants de 0 – 35 mois.



Graphique 4 : Représentation graphique des cas de grippe confirmés dans la population.

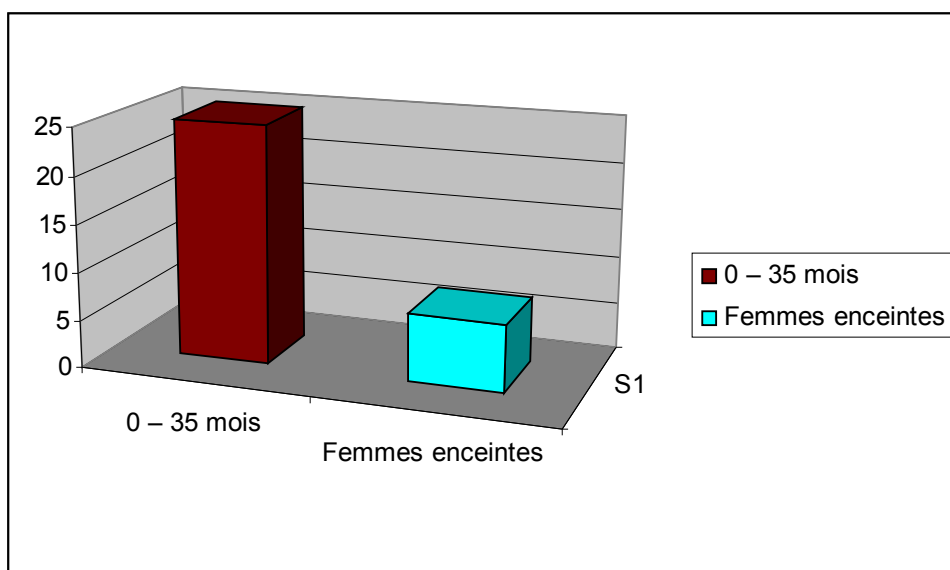
Tableau 7 : Fréquence du virus A/H1N1 2009 dans la population

Population	Résultats				Total	%
	Positifs	%	Négatifs	%		
0 – 35 mois	25	3,38	637	86,20	662	89,58
Femmes enceintes	7	0,95	70	9,47	77	10,42
Total	32	4,33	707	95,67	739	100

$$\text{Chi}^2 = 2,1686$$

$$P = 0.039 < 0,05$$

Les enfants sont les plus touchés.



Graphique 5 : Représentation graphique de la grippe porcine dans la population.

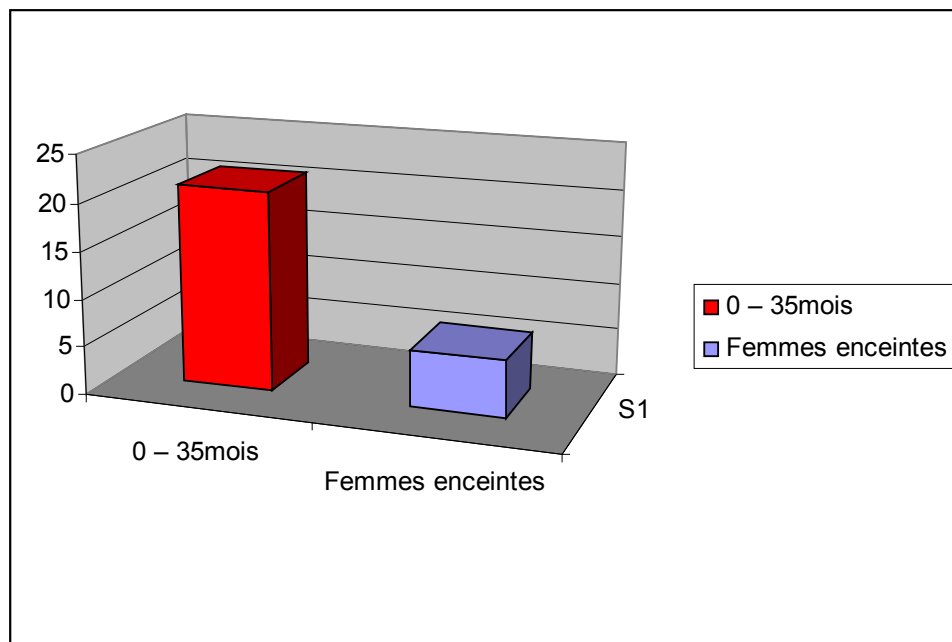
Tableau 8 : Fréquence du virus Influenza B dans la population

Population	Résultats				Total	%
	Positifs	%	Négatifs	%		
0 – 35mois	21	2,84	641	86,74	662	89,58
Femmes enceintes	6	0,81	71	9,61	77	10,42
Total	27	3,65	712	96,35	739	100

$$\text{Chi}^2 = 2.0449$$

$$P = 0,05$$

Les enfants sont les plus touchés.

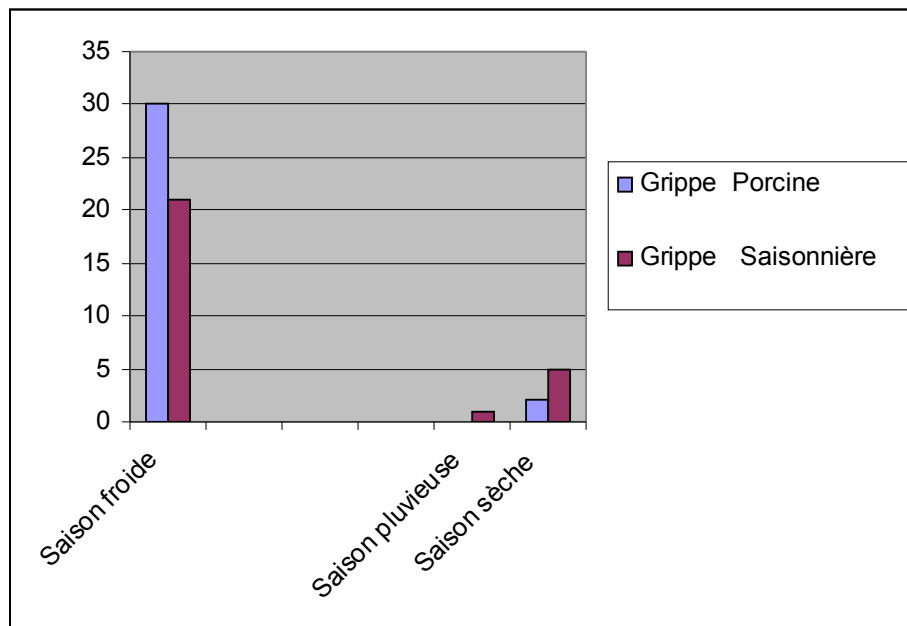


Graphique 6 : Représentation graphique de la grippe saisonnière dans la population.

Tableau 9 : Fréquence de la grippe en fonction des saisons

Saisons	Résultats				Total	%
	Virus A/H1N1		Virus Influenza B			
	2009	%	%			
Saison froide	30	93,75	21	77,78	51	86,45
Saison pluvieuse	0	0	1	3,70	1	1,69
Saison sèche	2	6,25	5	18,52	7	11,86
Total	32	100	27	100	59	100

86,45% des cas de grippe confirmés ont été obtenus pendant la saison froide.

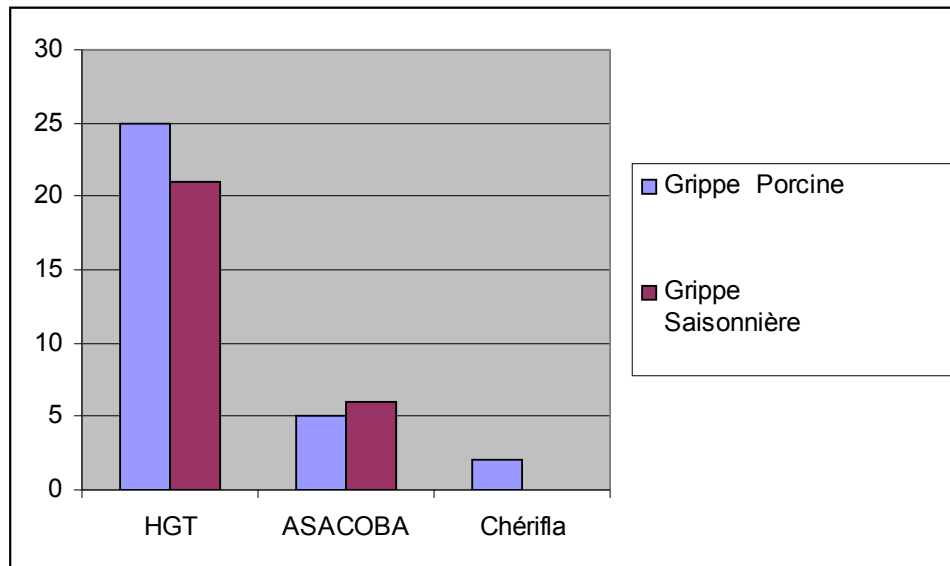


Graphique 7 : Représentation graphique des cas de grippe confirmés selon la saisonnalité.

Tableau 10: Fréquence de la grippe en fonction du site de prélèvement

Sites de prélèvement	Résultats				Total %	
	Virus A/H1N1 2009		Virus Influenza B			
		%		%		
HGT	25	78,13	21	77,78	46	77,97
ASACOB	5	15,62	6	22,22	11	18,64
Chérifla	2	6,25	0	0	2	3,39
Total	32	100	27	100	59	100

77,97 % des cas de grippe confirmés sont des prélèvements de HGT.



Graphique 8 : Représentation graphique des cas de grippe confirmés selon le site de prélèvement.

5. Commentaires et Discussions :

5.1. Evaluation du laboratoire :

Notre étude s'intègre dans le cadre des travaux du CVD – Mali qui possède un laboratoire équipé des appareils, matériels et réactifs permettant de réaliser la réaction en chaîne polymérase en temps réel et des scientifiques maliens de laboratoire formés par le personnel de CVD – Maryland dans l'utilisation du rRT – PCR pour la détection des virus grippaux.

5.2. Du point de vue de la méthodologie :

Notre étude vise à surveiller l'incidence de l'infection de la grippe chez les enfants de 0 – 35 mois admis en urgence au service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel Touré et les femmes enceintes se présentant à l'ASACOB et au centre de santé Chérifla. L'étude a concerné 739 cas souffrants des syndromes

grippaux. Le mode de prélèvement a été l'écouvillonnage du nez et de la gorge. Après prélèvements effectués par des cliniciens bien formés, les échantillons étaient transportés vers le laboratoire dans les 72 heures qui suivent les prélèvements.

La méthode du travail suit les instructions du CDC (center for disease control and prevention) avec les étapes suivantes :

- Réception et vérification des conditions d'acceptabilités.
- Partage et stockage des échantillons.
- Préparation, partage et stockage des réactifs.
- Préparation, extraction et conservation des contrôles.
- Extraction de l'ARN.
- Préparation du mélange mixte.
- Préparation de la plaque.
- Amplification.
- Analyse, interprétation et report des résultats.

Les travaux ont été effectués dans le laboratoire d'Influenza du CVD – Mali, dans les conditions scientifiques rigoureuses.

5.3. Du point de vue des résultats.

Notre étude a porté sur 739 participants dont 662 enfants de 0 – 35 mois et 77 femmes enceintes.

La majorité des prélèvements reçus sont de l'Hôpital Gabriel TOURE soit environ 90% des prélèvements. Plus de syndromes grippaux ont été observés pendant la saison fraîche ce qui a permis d'inclure plus de patients durant cette saison, soit 41% des prélèvements. En outre cette saison a connu plus de cas de grippes confirmés soit environ 94% des cas de grippe porcine 2009 et environ 78% des cas de grippe saisonnière

La population infantile de notre étude a fait plus de grippe porcine 2009 et saisonnière que les femmes enceintes soient respectivement 25 cas et 21 cas.

Une étude similaire réalisée au Canada par le centre de l'immunisation et des maladies infectieuses de l'Agence de la Santé Publique du Canada (ASPC) sur 168 cas, les résultats ont confirmé la vulnérabilité des enfants de 0-35 mois avec environ 30% de cas de grippe porcine 2009 observés dans cette population contre seulement 7% chez les femmes enceintes. Ceci peut s'expliquer par l'état immunitaire précaire du jeune enfant.

En France une étude réalisée dans la région de PACA sur 4551 suspect montre aussi que l'incidence de la grippe était supérieure chez l'enfant que chez l'adulte avec 4,3% chez l'enfant contre 1,1% chez l'adulte.

Le manque de résultats comparatifs en Afrique s'explique du fait que la grippe porcine de 2009 est récente et peu de résultats n'ont été publiés à ce jour.

6. Conclusions :

Notre étude est réalisée au Centre National Influenza basé au CVD – Mali sur une période allant de Novembre 2009 à Juillet 2010 et a porté sur 739 patients dont 662 sont des enfants de 0 – 35mois et 77 femmes enceintes.

Nous avons fait une étude prospective basée sur la surveillance sentinelle de la grippe dont l'objectif est la mise en évidence du virus A/H1N1 pandémique et autres virus grippaux au Mali.

Le mode de prélèvement a été l'écouvillonnage naso et oro - pharyngé.

Ce centre a permis de palier aux problèmes de données épidémiologique qui jusque là n'existaient pas dans nos pays en voie développement par manque de

laboratoires qui ont l'expertise et l'équipement nécessaire pour mener des recherches sur le virus Influenza.

Notre étude nous montre que la grippe porcine de 2009 et les grippes saisonnières sont rencontrées dans les pays tropicaux comme le Mali, les enfants et les femmes enceintes constituent une couche vulnérable.

7. Recommandations :

Nos recommandations sont les suivantes :

➤ Aux autorités sanitaires :

Investir dans la recherche biomédicale et notamment dans le domaine de la virologie, en formant les agents sanitaires dans différentes spécialités de recherche en santé.

Entreprendre une surveillance élargie de la grippe au Mali tout en décentralisant les laboratoires de diagnostic d'Influenza permettant une prise en charge rapide

des patients, et rendre disponible les vaccins pour prévenir les cas d'épidémie de grippe porcine 2009 et les autres grippes saisonnières.

➤ **A la population :**

Aller vers l'information auprès des agents socio – sanitaires ou la presse lui permettant de comprendre le mode de prévention et de transmission de la grippe.

8. Références bibliographiques :

- (1) H. J. A Fleury. 2002. Virologie humaine. Masson 4^e édition : p 74 – 75
- (2) Surveillance de la grippe chez les enfants et les femmes enceintes se présentant aux centres de santé de Bamako. Investigateurs : centre pour le développement des vaccins – Mali, Bamako, Mali et le centre pour le développement des vaccins, Université de Maryland, Ecole de médecine, Baltimore, et Département de la grippe, centres pour le contrôle de la maladie (CDC), Atlanta, GA.

- (3) François Freymuth. Orthomyxoviridea : le virus Influenza chapitre 29
In : Mammette. A. Virologie Medical . 2002 collection azay presse
universitaire de Lyon.
- (4) <http://Science-citoyen.u-strasbg.fr/dossiers/grippe/index.html>-juin
2005 (date de consultation :20 Juin 2010).
- (5) Pierre Saliou. Courte histoire de vaccin grippal.
http://www.gsk.fr/gsk/votre_sante/grippe/virus.html (date de consultatin:
8 novembre 2010)
- (6) Perdue ML, Suarez DL, Van RK and Pensaert M. 2000. Structural
features of the avian Influenza virus hemagglutinin that influence
virulence. Amsterdam P 77 – 86.
- (7) Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G and Faning
TG. 1997. Initial genetic characterisation of the 1918 “Spanish” Influenza
virus. Washington D.C; P 1793 – 96.
- (8) Nicolas Le Scournec, Erwan Garon, Grégory Béchard. 2001 le virus
Influenza. Lycée Victor Hugo – Hennebont. P 5 – 6.
- (9) Banks J, Speidel ES, Moore E, Plowright L, Piccirillo A, Capua I,
Cordioli P, Fioretti A, Alexander D J. 2001. Changes in the
haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence
highly pathogenic H7N1 avian Influenza virus in Italy. Archives of
virology. P 963 – 73
- (10) Loeb M, Dafoe N, Mahony J. 2009. Surigical mask vs N95
respirator for preventing Influenza among health care workers. JAMA
2009. P 1865 – 71.
- (11) Nichol KL, Nordin JD, Nelson DB. 2007. Effectiveness of
Influenza vaccine in the community – Dwelling Eldery. New Eng J Med.
P 357 – 60.

- (12) Eurich DT, Marie TJ, Johnstone J, Majumder SR. 2008. Mortality reduction with Influenza vaccine in patient with pneumonia outside “FLU” season pleiotropic benefits or residual confounding? American journal of respiratory and critical care Medicine 2008. P 527 – 33.

- (13) Huraux J – M. 2003. Traité de virologie médicale. Estem P 439.

- (14) F Horwood. Pneumococcal and future prospects. Dans Thorax, Vol 57 Suppl 2 P 112 – 30.

- (15) [http:// www. Phac – aspc.gc. ca/publicat/ccdr –rmt/09vol35/acs – dcc-6/index – fra-php](http://www.Phac-aspc.gc.ca/publicat/ccdr-rmt/09vol35/acs-dcc-6/index-fra-php). (date de consultation : 25 Novembre 2010)

- (16) Publication de l’OMS : vaccins grippaux Relevé épidémiologique hebdomadaire de l’OMS août 2005, vol. 80, 33.

- (17) W Smith, History of influenza epidemics and discovery of influenza virus, In : Nippon Rinsho, vol. 55 n°10, Oct 1997.

- (18) D Suarez, The effect of various disinfectants on detection of avian influenza virus by real time RT – PCR, In Avian Dis, vol.47, n°3 Supl, 2003.

- (19) Russell CJ and Webster RG (2005). The genesis of a pandemic influenza virus. Cell 123.

- (20) Thorneley M (2004). Avian influenza ravages Thai tigers. Aust Vet J 82

- (21) Zambon MC (2001). The pathogenesis of influenza in humans. Reviews in medical virology 11.

- (22) Capua I and Alexander DJ (2002). Avian influenza and human health. Acta tropica 83

FICHE SIGNALÉTIQUE :

Nom : TRAORE

Prénom : Oumarou Amadou

Tel : (00223) 75 00 51 53

E-mail : toumar10@yahoo.fr

Titre de la thèse : Surveillance sentinelle des grippes humaines pandémique et saisonnière à Bamako en 2010

Année Universitaire : 2009 – 2010

Ville de soutenance : Bamako

Pays : Mali

Lieu de dépôt : Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie

Secteur d'intérêt : Bactériologie, virologie, santé publique.

9. Résumé :

Le virus influenza est un virus à ARN enveloppé à capside symétrique complexe appartenant à la famille des orthomyxoviridae. Cette famille comprend 3 types A, B, et C.

Les types A sont plus virulent que les types B et C. Ce virus est responsable de la grippe.

Le risque accru pour les femmes enceintes de développer une maladie grave et mortelles de la grippe a été bien établie au cours des pandémies de 1918 et 1957.

De même le risque élevé associé à la grippe qui survient en dehors des pandémies pour les nourrissons est aussi bien établi.

L'étude a porté sur 739 participants dont 662 enfants de 0 – 35 mois et 77 femmes enceintes. Elle a été réalisée dans le laboratoire Influenza du CVD – Mali. Les sites de prélèvements étaient HGT, ASACOBAMA et Cherifla.

Sur les 739 participants 46 cas de grippe ont été révélés. La population infantile de notre étude était la plus touchée avec 25 cas. 94% des cas de grippe porcine et 78% des cas de grippe saisonnière ont été obtenus pendant la saison fraîche.

Notre étude nous montre que la grippe porcine de 2009 et les grippes saisonnières sont rencontrées dans les pays tropicaux comme le Mali, les enfants et les femmes enceintes constituent une couche vulnérable.

