UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE L'ENVIRONNEMENT (ED-SEV)

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ANIMALE

Année : 2016-2017 **N° d'ordre : 201728**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : **Génétique des Populations**

Présentée par : **M. Martin FAYE**

Titre: **Epidémiologie moléculaire des encéphalites virales aiguës au Sénégal**

Soutenue le **26/07/2017** devant le jury composé de :

Président du jury : Pr. Karamoko DIARRA (Professeur titulaire FST/UCAD)

Rapporteurs : Pr. Sylvie A. DIOP NYAFOUNA (Maître de conférences agrégé UFR Sciences de la Santé/Université de Thiès)

Dr. Malick FALL (Chargé d'enseignement, FST/UCAD)

Dr. Ibrahima DIA (Directeur de recherche, IPD)

Examinateurs: Dr. Gora DIOP (Maître Assistant, FST/UCAD)

Dr. Ousmane FAYE (Chargé de recherche, IPD)

Directeur de thèse : Pr. Pape Mbacké SEMBENE (Professeur titulaire FST/UCAD)

"I have no special talent.

I am only passionately

curious."

Albert Einstein, 1901

Liste des publications

1. Ousmane Faye*, Catherine B Pratt*, **Martin Faye***, Gamou Fall, Joseph A Chitty, Moussa M Diagne, Michael R Wiley, Adesola F Yinka-Ogunleye, Sola Aruna, Ebitimitula N Etebu, Neni Aworabhi, Dimie Ogoina; Wari Numbere, Nwando Mba, Gustavo Palacios, Amadou A Sall & Chikwe Ihekweazu. **Genomic characterization of human Monkeypox virus circulating in Nigeria, September 2017.** The Lancet Infectious Diseases. Dec 2017; id: 17-01724.
2. Fall G*, Di Paola N*, **Faye M,** Dia M, Freire CCdM, Loucoubar C, et al. (2017). **Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus.** PLoS Negl Trop Dis11 (11): e0006078. 10.1371/journal.pntd.0006078.
3. **Faye M,** Dacheux L, Weidmann M, Diop SA, Loucoubar C, Bourhy H, SALL AA & Faye O. **Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for broad detection of rabies virus**. *Journal of virology methods,* 2016. 10.1016/j.jviromet.2016.12.019.
4. Moussa M. Diagne, **Martin Faye**, Oumar Faye, Abdourahmane Sow, Fanny Balique, Mbacké Sembène, Laurent Granjon, Pascal Handschumacher, Ousmane Faye, Mawlouth Diallo & Amadou Alpha SALL. **Emergence of Wesselsbron virus among black rat and humans in Eastern Senegal in 2013**. *One Health,* 2017. doi: 10.1016/j.onehlt.2017.02.001.
5. Fall G, **Faye M**, Weidmann M, Kaiser M, Dupressoir A, Ndiaye EH, Ba Y, Diallo M, Faye O, Sall AA. **Real-Time RT-PCR Assays for Detection and Genotyping of West Nile Virus Lineages Circulating in Africa**.*Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016 Dec; 16(12):781-789.
6. Diop SA, Ciss VM, **Faye M**, Kagbanon E, Dacheux L, Faye O, Bourhy H, Seydi M. **NEURO-01-Aspects épidémiologiques, cliniques, paracliniques et évolutifs des méningo-encéphalites aigues infectieuses à liquide clair chez des adultes non infectés par le VIH**. *Med Mal Infect.* 2016 Jun;46(4 Suppl 1):85. doi: 10.1016/S0399-077X(16)30465-6.

REMERCIEMENTS

Ce présent travail a été réalisé à l'unité des arbovirus et virus de fièvres hémorragiques, localisée au sein du pôle de virologie de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD). Le pôle de virologie est sur 4 sites sur le campus de l'IPD : i) bâtiment principal avec le laboratoire de virologie moléculaire au rez-de-chaussée et au premier étage avec un accès au laboratoire P3, le laboratoire des entérovirus et le laboratoire des virus respiratoires ii) bâtiment de recherche où la moitié d'un étage est dédiée au laboratoire pour le diagnostic, l'isolement et l'identification de virus iii) bâtiment animalerie dédié à l'isolement viral sur souriceaux et qui comporte un espace de laboratoire iiii) le bâtiment central de l'IPD où se trouve le laboratoire de surveillance des entérovirus dans l'environnement. Les activités du pôle de virologie s'inscrivent autour des quatre missions principales de l'Institut Pasteur : Recherche, Santé publique, Enseignement/formation et Expertise. La recherche est organisée autour de 4 thématiques concernant les arbovirus et virus des fièvres hémorragiques (AVFH), la rage et les encéphalites virales, les virus entériques et les virus respiratoires. Cependant, Le groupe Rage et encéphalites virales (REV) héberge un centre de référence de la rage et travaille en étroite collaboration avec le centre de traitement de la rage de l'IPD, le Ministère de la Santé, le ministère de l'élevage etc. Il s'intéresse aux étiologies virales, potentiellement impliqués dans les encéphalites aigues chez l'Homme qui constituent un réel problème de santé publique, puisqu'associées à un fort taux de morbidité et de mortalité. L'état actuel des connaissances sur ces affections reste encore déficitaire sur le continent. Les projets de recherche menés au sein du groupe visent à apporter une meilleure compréhension sur l'épidémiologie des encéphalites virales en Afrique de l'Ouest en général, et au Sénégal en particulier. Une des ambitions du groupe REV est l'amélioration continue de son plateau technique. Ainsi des nouveaux outils, basés sur une approche moléculaire sont constamment mis au point. Tout cela passe inéluctablement par l'identification et la caractérisation moléculaire des étiologies majeures et par une meilleure compréhension de leur biologie et de l'évidence de leur potentiel infectieux pour l'Homme.

Au terme de ce travail, je rends grâce à Dieu le père Tout puissant et lui donne tout honneur et toute gloire.

Je dédie ce travail à mes parents et les remercie pour l'éducation reçue. Que Dieu vous garde et qu'il vous comble de ses bienfaits. Je remercie mes frères et sœurs, ma femme ainsi que ma belle famille.

J'adresse mes remerciements les plus cordiales à mes encadreurs, particulièrement au Pr. Pape Mbacké SEMBENE pour son accompagnement et son soutien tout au long de cette thése. J'adresse également mes remerciements les plus sincères au Dr Ousmane FAYE pour son implication, sa disponibilté et les nombreuses connaissances acquises auprès de lui. Votre engagement pour un travail bien fait suscite en moi l'admiration et le respect.

Je remercie l'ensemble des membres du jury, notamment au Pr. Karamoko DIARRA, au Pr. Sylvie A. DIOP NYAFOUNA, au Dr. Ibrahima DIA, au Dr. Malick FALL, et au Dr. Gora DIOP, de l'honneur qu'ils me font d'avoir bien voulus prendre de leur temps si précieux pour juger ce modeste travail.

Je présente mes remerciements au Dr. Amadou A. SALL, administrateur général de l'Institut Pasteur de Dakar qui m'a accueilli au sein de la structure. Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude et mes remerciements. C'est un grand honneur de travailler à vos cotés et de profiter de votre rigueur scientifique, de la valeur de vos connaissances et de toutes vos qualités humaines et professionnelles.

Je remercie également, le Dr. Oumar FAYE et le Dr. Gamou FALL pour leur disponibilité et leurs suggestions contribuant à la bonne réalisation des expériences menées au cours de cette thése ainsi que dans leur interprétation.

Je présente mes remerciements à tout le personnel scientifique et technique du pôle de virologie de l'IPD pour leur aide et leur soutien.

C'est une joie énorme qui m'habite quand je veux exprimer ma gratitude envers mes camarades étudiants, notamment Mlle F. BA, Dr MM. DIAGNE, Mme NS. BOB et Mselle MHD. NDIONE pour les bons moments partagés durant ce stage. Vous avez été une famille.

Je remercie également monsieur Mame Birame NDIAYE bibliothécaire à l'Institut Pasteur de Dakar.

Merci à tous

LISTE DES ABRÉVIATIONS

SNC : système nerveux central

HSV : virus de l'herpès simplex

VZV : virus de la varicelle ou zona

EBV : virus Epstein Barr

CMV : cytomégalovirus

HHV-6 : 6ème herpèsvirus humain

HHV-8 : 8ème herpèsvirus humain

WN: West Nile

DEN : virus de la dengue

VFVR : virus de la fièvre de la vallée du Rift

FHCC : fièvre hémorragique de Crimée-Congo

EV : entérovirus

IPA : Institut Pasteur d'Algérie

UV : ultraviolets

SK : sarcome de *Kaposi*

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

CNR : centre national de référence

IPD : Institut Pasteur de Dakar

OMS-REH : organisation mondiale de la santé-rapport épidémiologique hebdomadaire

OMS : organisation mondiale de la santé

arbovirus : *arthropod-borne virus*

IPB : Institut Pasteur de Bangui

MSAS : ministère de la santé et de l'action sociale du Sénégal

CRORA : centre collaborateur OMS de référence et de recherche sur les arbovirus et virus de fièvres hémorragiques

LCR : liquide céphalo-rachidien

EEG : électro-encéphalographie

IRM : imagerie à résonnance magnétique

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

IgM: immunoglobulines de type M

MALDI-TOF: *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*

NGS : *next-generation sequencing*

DEVINE : «Détection de nouveaux virus impliqués dans les encéphalites chez l'homme en Afrique centrale et de l'Ouest»

IF : immunofluorescence directe

OIE : organisation mondiale de la santé animale

ANSD: agence nationale de la statistique et de la démographie

RGPHAE : recensement général de la population et de l'habitat, de l'agriculture et de l'élevage

ED-SEV : Ecole doctorale sciences de la vie, de la santé et de l'environnement

RT-PCR : transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne

TDR : test de détection rapide

RT : transcription inverse

kb : kilobases

dNTP : désoxyribonucléotides triphosphate

BET : bromure d'éthidium

Thyb : température d'hybridation des amorces

NC: extrémité non-codante

EISMV : Ecole Inter-états des Sciences et Médicine Vétérinaires de Dakar

SEN: Sénégal

CI: Côte d'Ivoire

CHU : centre hospitalier universitaire

CHNU: centre hospitalier national universitaire

BIC: *Bayesian Information Criterion*

SH-like: *Shimodaira-Hasegawa*

FAM : *fluorescein amidite*
BBQ: *blackberry quencher*
nt: nucléotides
IPP : Institut Pasteur à Paris

LOD: limite de détection

ROC: *«Receiver Operating Characteristic»*

AUC : aire sous la courbe ROC

CV : coefficient de variation

Cq : *quantitative cycle*

CAI : indice d'adaptation des codons

TMV : virus de la mosaïque du tabac

DEZV : virus *Dézidougou*

pb : paires de bases

MOZ : Mozambique

CAM : Cameroun

RCA : République Centrafricaine

Et : écart-type

Nég: négatif

GTR +G : *generalized time-reversible* avec catégories gamma

AFS: Afrique du Sud

RACE : *Rapid Amplification cDNA Ends*

DI_{50}/mL : dose infectieuse à laquelle 50% des souriceaux sont morts par millilitre

CNR-IPP: centre national de référence pour la rage, Institut Pasteur, Paris, France
Cosmo: lignée cosmopolitaine

ND: non-déterminée

Id : identification

BBLV : *Bokeloh bat lysssavirus*

DUVV : virus Duvenhage

EBLV : *European Lagos bat virus*

RNC: région non-codante

aa: acide aminé

ITV: *Israélo-turkey virus*

CS: séquences conservées

ImCS: séquence conservée imparfaite

GARD: *Genetic Algorithms for Recombination Detection*

HK: *Kishino-Hasegawa*

dN : taux de sites non-synonymes

dS : taux de sites synonymes

FUBAR: *fast unconstrained Bayesian approximation*

Branch-site REL: *branch-site random effects likelihood*

MCMC: *Markov Chain Monte Carlo*

GMRF: Gaussian Markov Random Field

ESS : taille de la population effective

MCC : maximum de crédibilité des clades

GTR+I : *generalized time-reversible* avec une catégorie gamma discrète et une proportion de sites invariables

CRP : protéine C réactive

iPSC: cellules pluripotentes humaines

BMEC : cellules microvasculaires endothéliales du cerveau

NSC : cellules souches neurales primitives

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Description des principaux virus responsables d'encéphalites en Afrique.

Tableau 2 : Description des différents tests effectués au laboratoire.

Tableau 3: Résultats des tests de première ligne effectués au laboratoire

Tableau 4: Description des amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire du virus de la rage

Tableau 5: Description des isolats du virus de la rage utilisés dans cette étude

Tableau 6: Informations sur les oligonucléotides utilisés dans cette étude

Tableau 7: Description et résultats des isolats utilisés dans l'évaluation de la spécificité des nouvelles RT-qPCR développées

Tableau 8a: Résultats de l'évaluation du spectre de détection des nouvelles RT-qPCR développées sur des isolats africains

Tableau 8b: Résultats de l'évaluation du spectre de détection des nouvelles RT-qPCR développées sur des isolats non-africains

Tableau 9: Détermination des performances diagnostiques et résultats de l'analyse de la répétabilité

Tableau 10: Description des isolats utilisés et résultats de l'essai de concordance inter-laboratoire

Tableau 11: Limites de détection des nouvelles RT-qPCR développées en comparaison avec une RT-PCR conventionnelle semi-nichée

Tableau 12: Evaluation de la sensibilité clinique sur des échantillons intra-vitam humains

Tableau 13: Description des isolats du virus Bagaza utilisés dans cette étude

Tableau 14: Description des amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire du virus Bagaza

Tableau 15: Comparaison des régions du génome entres les isolats du virus Bagaza

Tableau 16: Localisation des principaux motifs d'acides aminés hautement conservés chez les flavivirus au niveau des protéines E, NS1, NS3 et NS5

Tableau 17: Identification des épisodes de sélection positive ou diversification sur les gènes du virus Bagaza

Tableau S1 : Description des isolats africains du virus de la rage utilisés pour l'analyse *in silico* des nouveaux tests développés.

Tableau S2 : Résultats de la spécificité analytique des nouveaux tests développés sur des prélèvements *post-mortem* négatifs au virus de la rage.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Infection latente des herpèsvirus humains dans l'organisme.

Figure 2 : Structure du génome du virus de la rage.

Figure 3 : Carte de l'Afrique de l'Ouest montrant la position géographique du Sénégal.

Figure 4 : Schéma du principe de l'ELISA Sandwich indirecte pour la détection des anticorps dans le sérum.

Figure 5 : Schéma du principe de la séroneutralisation pour la détection d'anticorps neutralisants spécifiques.

Figure 6 : Distribution des patients inclus dans l'étude par zone et distribution des classes d'âge en fonction de la zone.

Figure 7 : Présentation des symptômes et signes cliniques chez les patients recrutés.

Figure 8 : Répartition des causes identifiées et les cas de co-infection.

Figure 9 : Distribution des causes d'encéphalites identifiées en fonction des classes d'âge.

Figure 10: Distribution trimestrielle cumulée des causes d'encéphalite identifiées dans les trois centres hospitaliers partenaires, Dakar, Sénégal, novembre 2011- décembre 2013.

Figure 11 : Analyse des distances génétiques au niveau nucléotidique et au niveau des acides aminés entre les polyprotéines des isolats du virus de la rage caractérisés dans cette étude.

Figure 12: Arbre phylogénétique basé sur les polyprotéines complètes des isolats du virus de la rage circulant au Sénégal de 2001 à 2015.

Figure 13: Courbes standards obtenues pour les systèmes de RT-qPCR RABV-protéine-N et RABV-protéine-L.

Figure 14: Large spectre de détection du virus de la rage par les nouveaux outils moléculaires développés dans cette étude.

Figure 15: Courbes ROC des systèmes de RT-qPCR développés pour la detection du virus de la rage.

Figure 16: Graphique de Bland-Altman des différences entre les systèmes de RT-qPCR RABV-protéine-N et RABV-protéine-N en fonction des valeurs moyennes de Cq des deux tests.

Figure 17: Analyse des distances génétiques au niveau nucléotidique et au niveau des acides aminés entre les polyprotéines des isolats du virus Bagaza caractérisés dans cette étude et en comparaison avec les séquences précédemment disponibles.

Figure 18: Détermination des sites informatifs sur les polyprotéines des isolats du virus Bagaza.

Figure 19: Prédiction des sites d'acides aminés N-glycosylés sur le génome des isolats du virus Bagaza.

Figure 20: Structures d'ARN consensus identifiées à partir des séquences de la région 3'non-codante du virus Bagaza utilisées dans cette étude.

Figure 21: Structures secondaires consensus des régions 5' (A) et 3' (B) non-codantes du virus Bagaza.

Figure 22: Arbre phylogénétique basé sur les séquences complètes d'isolats du virus Bagaza circulant au Sénégal et en Côte d'ivoire de 1988 à 2014.

Figure 23: Identification des événements de recombinaison sur le génome du virus Bagaza.

Figure 24: Arbres phylogénétiques montrant la discordance entre la région recombinante (A) et les fragments non-recombinants (B) identifiés sur le génome du virus Bagaza par sept méthodes différentes mise en œuvre dans le programme RDP4.

Figure 25: Arbre phylogénétique tracé avec la méthode Bayésienne du maximum de crédibilité des clades (MCC) en utilisant les séquences concaténées des protéines C, E, NS1, NS2A, NS3, NS4B et NS5 des isolats du virus Bagaza virus.

Figure 26: Evidence d'une adaptation du virus Bagaza au génome humain en comparaison avec d'autres flavivirus connus, transmis à l'Homme par des moustiques.

Figure A1 : Alignement multiple *in silico* des amorces et sonde du système RABV-protéine-N (CNR-rage à l'IPD) avec 44 séquences partielles de la nucléoprotéine d'isolats du virus de la rage appartenant à la lignée Africa 1 et au clade Africa 2.

Figure A2 : Alignement multiple *in silico* des amorces et sonde du système RABV-protéine-L (CNR-rage à l'IPD) avec 44 séquences partielles de la nucléoprotéine d'isolats du virus de la rage appartenant à la lignée Africa 1 et au clade Africa 2.

TABLES DES MATIERES

LISTE DES ABRÉVIATIONS 1

LISTE DES TABLEAUX 6

LISTE DES FIGURES 7

INTRODUCTION GÉNÉRALE 15

PREMIÈRE PARTIE : REVUE DES CONNAISSANCES SUR LES ENCÉPHALITES VIRALES AIGUËS 17

1. PHYSIOPATHOLOGIE DES ENCÉPHALITES VIRALES 17

2. LES PRINCIPAUX AGENTS VIRAUX RESPONSABLES D'ENCÉPHALITES EN AFRIQUE 18

2. 1. Les herpèsvirus 21

2. 1. 1. Les virus de l'herpès simplex 22

2. 1. 2. Le virus de la varicelle ou zona 23

2. 1. 3. Le cytomégalovirus 23

2. 1. 4. Les 6e et 7e herpèsvirus humains 24

2. 1. 5. Le virus Epstein-Barr 25

2. 1. 6. Le 8e herpèsvirus humain 26

2. 2. Les entérovirus 27

2. 3. Le virus de la grippe 29

2. 4. Le virus de la rougeole 30

2. 5. Le virus de la rubéole 31

2. 6. Les arbovirus 32

2. 6. 1. Le virus de la dengue 32

2. 6. 2. Le virus West Nile 34

2. 6. 3. Le virus Zika 35

2. 6. 4. Le virus de la fièvre de la vallée du Rift 36

2. 6. 5. Le virus Chikungunya 37

2. 6. 6. Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo 38

2. 7. Le virus de la rage 40

3. MOYENS DE DIAGNOSTIC DES ENCÉPHALITES VIRALES 41

4. DÉFICIT DE CONNAISSANCES ET D'OUTILS DE DIAGNOSTIC DES ENCÉPHALITES VIRALES EN AFRIQUE 43

DEUXIÈME PARTIE : LES ENCÉPHALITES VIRALES AU SENEGAL 45

1. PROBLÈMATIQUE DE L'ÉTUDE 45

2. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE 47

2. 1. Objectif principal 47

2. 2. Objectifs spécifiques 47

CHAPITRE 1 : APPROCHE GLOBALE SUR LES ENCÉPHALITES VIRALES AIGUËS AU SENEGAL 48

INTRODUCTION 48

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES 48

1. 1. Le pays d'étude 48

1. 2. Les critères d'inclusion ou d'exclusion 50

1. 3. Approbation éthique 50

1. 4. Types de prélèvements 50

1. 5. Analyses au laboratoire 51

1. 6. Techniques utilisées 53

1. 6. 1. Extraction des acides nucléiques 53

1. 6. 2. RT-PCR temps réel 53

1. 6. 3. ELISA 54

1. 6. 4. Séroneutralisation 55

1. 7. Analyses statistiques 55

2. RÉSULTATS 56

2. 1. Caractéristiques des patients recrutés dans cette étude 56

2. 2. Premiers signes cliniques et symptômes neurologiques 57

2. 3. Analyses biologiques au laboratoire 58

2. 4. Présentation des étiologies identifiées 59

2. 5. Les cas de co-infections et les cas de décès 60

2. 6. Distribution des causes en fonction de l'habitat, du sexe et de l'âge 61

2. 7. Distribution trimestrielle cumulée des agents pathogènes identifiés 62

3. DISCUSSION 64

CONCLUSION 68

CHAPITRE 2 : APPROCHE CIBLÉE SUR LES ENCÉPHALITES VIRALES AIGUËS AU SENEGAL 69

INTRODUCTION 69

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES 70

1. 1. Choix des couples d'amorces 70

1. 2. Les isolats du virus de la rage utilisés 71

1. 3. RT-PCR classique et séquençage 73

1. 4. Analyse phylogénétique 73

1. 5. Développement d'outils moléculaires de diagnostic pour la rage 74

1. 5. 1. Choix des amorces et sondes 74

1. 5. 2. Echantillons utilisés dans cette étude 74

1. 5. 3. Protocole de RT-qPCR utilisé 75

1. 5. 4. Evaluation de la spécificité analytique 75

1. 5. 5. Evaluation de la sensibilité analytique 76

1. 5. 6. Détermination de la spécificité et de la sensibilité diagnostiques 76

1. 5. 7. Répétabilité et concordance inter-laboratoire 77

1. 5. 8. Comparaison avec une RT-PCR conventionnelle semi-nichée 78

1. 5. 9. Evaluation de la sensibilité clinique 78

2. RÉSULTATS 79

2. 1. Caractéristiques génétiques des isolats du virus de la rage 79

2. 2. Analyse phylogénétique des isolats du virus de la rage caractérisés dans cette étude 81

2. 3. Développement d'outils de diagnostic moléculaire pour la rage 83

2. 3. 1. Analyse des amorces et sondes 83

2. 3. 2. La spécificité analytique 85

2. 3. 3. La sensibilité analytique 87

2. 3. 4. Spectre de détection des systèmes de RT-qPCR développés 88

2. 3. 5. La spécificité et la sensibilité diagnostiques 91

2. 3. 6. Répétabilité et concordance inter-laboratoire 94

2. 3. 7. Comparaison avec une RT-PCR conventionnelle semi-nichée 96

2. 3. 8. La sensibilité clinique 98

3. DISCUSSION 99

CONCLUSION 103

CHAPITRE 3 : APPROCHE « FUTURE » SUR LES ENCÉPHALITES VIRALES AIGUËS AU SENEGAL 104

INTRODUCTION 104

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES 105

1. 1. Caractérisation moléculaire des isolats du virus Bagaza 105

1. 2. Caractéristiques génétiques du virus Bagaza 106

1. 3. Analyse des événements de recombinaison 108

1. 4. Evaluation des pressions de sélection 108

1. 5. Analyses phylogénétiques et phylodynamiques 109

1. 6. Indice d'adaptation des codons de la région codante du virus Bagaza 110

2. RÉSULTATS 111

2. 1. Caractéristiques génétiques des isolats du virus Bagaza 111

2. 2. Distances génétiques entre les isolats du virus Bagaza 112

2. 3. Les motifs conservés et les sites informatifs sur le génome 115

2. 4. Prédiction de sites d'acides aminés N-glycosylés 119

2. 5. Structures secondaires au niveau des régions 5' et 3' non-codantes 120

2. 6. Analyse phylogénétique des séquences du virus Bagaza 124

2. 7. Identification des évènements de recombinaison 126

2. 8. Détermination des épisodes de sélection positive 129

2. 9. Analyse phylodynamique 131

3. DISCUSSION 135

CONCLUSION 141

CONCLUSION GÉNÉRALE 142

RÉFÉRENCES 145

WÉBOGRAPHIE 169

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Malgré les défis imposés par la maladie à virus Ebola, notamment en terme de couverture de la vaccination systématique, de gestion des épidémies et de prise en charge des patients en cas d'affection grave, le continent africain a encore un pas important à franchir dans la prise en charge des encéphalites humaines aigues qui représentent un sérieux problème de santé publique. Les encéphalites sont en générale associées à une mortalité et une morbidité élevées ou à des dommages sévères permanents (Granerod *et al*., 2010; Clarke *et al.,* 2006).

Dans un contexte mondial où le nombre d'épidémies est élevé et sans cesse croissant, la vaste majorité des cas d'encéphalites aiguës reste toujours inexpliquée (Bitnun & Richardson., 2015). Bien qu'une encéphalite puisse affecter tous les âges et tous les sexes, certaines études ont montré une légère prédominance chez le sexe mâle (Kumar *et al.,* 2015; Kakkar *et al.,* 2013). Ce syndrome peut être associé à une large gamme de pathogènes de type parasitaire, bactérien ou viral. Cependant, les virus sont impliqués dans la plupart des cas diagnostiqués, principalement associés à des agents viraux émergents ou ré-émergents (Glaser *et al.,* 2006).

Ainsi, les encéphalites virales sont responsables d'un tableau clinique grave qui requiert l'hospitalisation. Elles sont caractérisées par une association de deux de ces trois signes cliniques principaux; à savoir une fièvre supérieure à 38°C, des céphalées et/ou un niveau de conscience altéré. Une encéphalite virale aiguë correspond à une inflammation, sans suppuration, du parenchyme cérébral associée à un dysfonctionnement cérébral détecté cliniquement (Solomon *et al.,* 2007; Kennedy., 2005). Bien qu'il n'existe pas de traitement définitif et effectif dans la majorité des cas, l'identification rapide d'un agent spécifique est d'une importante fondamentale puisqu'elle peut conditionner le pronostic et la prévention afin d'éviter une éventuelle transmission et la mise en place de mesures de santé publique.

Toutefois, très peu d'études visent à connaître de manière systématique les agents viraux responsables et la plupart de ces études a été jusqu'à maintenant effectuée dans des pays développés (Flores-Gonzalez *et al.,* 2015; Huppatz *et al.*, 2009). En outre, malgré l'utilisation des techniques modernes de diagnostic (Debiaisi *et al.,* 2004), l'identification spécifique de

l'étiologie responsable de l'encéphalite demeure souvent difficile (Mailles *et al.,* 2009). Par conséquent, plus de connaissances sur ces cas d'encéphalites virales et des outils de diagnostic efficaces sont nécessaires, principalement pour les pays africains.

Ainsi, cette étude a été menée dans le but de mieux comprendre l'épidémiologie des encéphalites virales aiguës au Sénégal. Pour cela, nous avons d'abord utilisé une approche globale pour déterminer de manière spécifique les étiologies virales impliquées chez des patients avec un âge supérieur ou égal à quinze ans (≥ 15 ans), hospitalisés pour un tableau clinique d'encéphalite virale aiguë, au niveau de quelques services hospitaliers. L'identification de l'agent viral spécifique souligne la nécessité d'outils de diagnostic fiables. Ainsi, dans le cadre d'une approche ciblée, la caractérisation moléculaire de souches du virus de la rage circulant au Sénégal a été réalisée d'une part, afin de mieux comprendre sa phylogénie récente et de développer des outils efficaces pour sa détection. D'autre part, en raison du nombre sans cesse croissant de nouveaux virus impliqués dans ces cas d'encéphalites, nous avons réalisé la caractérisation moléculaire de souches du flavivirus Bagaza dans le but de mieux comprendre son épidémiologie moléculaire au Sénégal, voir l'évolution du virus Bagaza en utilisant une approche phylogénétique et analyser l'évidence de l'adaptation humaine de ce virus qui pourrait être une cause probable d'encéphalite dans le futur.

PREMIÈRE PARTIE : REVUE DES CONNAISSANCES SUR LES ENCÉPHALITES VIRALES AIGUËS

Le terme «encéphalite » (originaire du grec enkephalos + -itis, qui signifie inflammation du cerveau) est utilisé pour décrire toute affection restreinte du cerveau épargnant les méninges. Cependant, la majorité des infections virales du système nerveux central (SNC) est associée aux méninges, causant ainsi des méningites ou des méningoencéphalites plutôt qu'une vraie encéphalite. Plus d'une centaine d'agents viraux a été impliquée dans ces cas de maladies graves mais un traitement spécifique n'est disponible que pour un petit nombre d'entre eux. En effet, une encéphalite virale est caractérisée par la présence d'un processus inflammatoire aigu du parenchyme du SNC associé à une évidence clinique de disfonctionnement cérébral. Une primo-infection affecte principalement les enfants, les jeunes adultes ou les personnes âgées avec une distribution qui dépend de l'agent viral spécifique, du statut immunitaire du patient et des facteurs génétiques et environnementales (Gendelman & Persidsky., 2005; Kennedy., 2005).

1. PHYSIOPATHOLOGIE DES ENCÉPHALITES VIRALES

Même si la plupart des infections virales peuvent entraîner une encéphalite, il faut reconnaître que celle-ci est une complication relativement rare au regard de l'incidence des infections virales dans la population globale. Toutefois, deux principaux mécanismes viraux causant des lésions d'encéphalite ont été identifiés. D'une part, les virus peuvent accéder au SNC par voie hématogène ou neuronale et infecter le tissu cérébral. On parle alors d'encéphalite par agression virale directe. La voie hématogène est la plus commune. Après une réplication au niveau du site d'entrée (tube digestif, voies respiratoires, peau lors d'une infection par un arbovirus), le virus se multiplie au niveau du système réticulo-endothélial puis atteint le SNC et éventuellement les autres organes. La voie neuronale concerne principalement les virus de l'herpès simplex (HSV) et le virus rabique. Les lésions de la substance grise dues au virus

s'accompagnent généralement d'une inflammation réactionnelle contribuant à la destruction du tissu cérébral (Agut, 2016).

D'autre part, le virus peut ne pas infecter le tissu cérébral. Ces encéphalites aiguës sont dites post-infectieuses et surviennent généralement vers la fin de la virémie lors d'une infection documentée ou non, ou après une vaccination. Les encéphalites post-infectieuses sont souvent précédées d'infections des voies respiratoires ou gastro-intestinales. Ces encéphalites touchant la substance blanche sont regroupées sous le terme de leuco-encéphalites ou leuco-encéphalomyélites. Elles sont généralement associées à une importante infiltration péri-vasculaire lymphocytaire, une inflammation des astrocytes, une réaction des cellules de la microglie et des lésions de démyélinisation. En effet, lors d'un mécanisme appelé «mimétisme moléculaire», l'association entre un composant du virus et un composant de la myéline (MBP ou protéine basique de la myéline) induit une réponse immunitaire inappropriée de l'hôte infecté contre son tissu cérébral (Stahl & Mailles, 2010). Cependant, aucune trace de présence virale ne s'observe dans le tissu cérébral, même en utilisant les méthodes histologiques (inclusions cellulaires, antigènes viraux) ou les techniques virologiques les plus sensibles (culture cellulaire, biologie moléculaire) (Agut, 2016).

2. LES PRINCIPAUX AGENTS VIRAUX RESPONSABLES D'ENCÉPHALITES EN AFRIQUE

Dans le monde, plus d'une centaine de virus peuvent être impliqués dans les cas d'encéphalite, avec des différences énormes en terme d'incidence ou en fonction du mode de transmission, de la distribution géographique, de l'âge, de la sévérité, de la saisonnalité et des facteurs de risque (Grouille *et al.,* 2016). En effet, certains virus peuvent infecter préférentiellement les personnes immunodéprimées ou non, ou être d'origine zoonotique, avec une transmission directe ou vectorielle. En outre, certains de ces agents viraux ont une distribution mondiale ou localisée ou possèdent un potentiel épidémique ou sporadique. Les agents viraux reconnus comme les plus importantes causes d'encéphalite dans le monde sont les herpèsvirus et les arbovirus (**Tableau 1**). En outre, l'incidence globale des encéphalites

varie en fonction de la zone d'étude et de la population d'étude. En Afrique de l'Ouest, l'incidence des encéphalites virales est faible avec moins de 1 sur 100.000 patients par an comparée à d'autres régions du monde où l'incidence varie entre 3,5 et 7,4 sur 100.000 patients par an. Cette différence serait probablement associée à des limites en terme de diagnostic (Nwosu *et al.,* 2001; Granerod & Crowcroft, 2007).

Tableau 1: Description des principaux virus responsables d'encéphalites en Afrique

Virus	Distribution	Transmission	Vecteur	Moyens de Prévention	Traitement
Herpesviridae					
virus de l'herpès simplex (HSV)	mondiale	interhumaine		aucun	acyclovir
virus de la varicelle ou zona (VZV)	mondiale	interhumaine		vaccination	acyclovir
virus Epstein Barr (EBV)	mondiale	interhumaine		aucun	ganciclovir; foscavir
cytomégalovirus (CMV)	mondiale	interhumaine		aucun	ganciclovir; foscavir
6ème herpèsvirus humain (HHV-6)	mondiale	interhumaine		aucun	ganciclovir; foscavir
8ème herpèsvirus humain (HHV-8)	mondiale	interhumaine		aucun	ganciclovir; foscavir
arbovirus					
virus West Nile (WN)	mondiale	vectorielles	plusieurs espèces de moustiques (principalement du genre *Culex*)	produits anti-moustiques mesures anti-vectorielles	aucun
virus de la dengue (DEN)	mondiale	vectorielles	plusieurs espèces de moustiques (principalement du genre *Aedes*)	produits anti-moustiques mesures anti-vectorielles	aucun
virus Zika	Afrique, Amérique, Asie, Pacifique	vectorielles	plusieurs espèces de moustiques (principalement du genre *Aedes*)	produits anti-moustiques mesures anti-vectorielles	aucun
virus Chikungunya	mondiale	vectorielles	plusieurs espèces de moustiques (principalement du genre *Aedes*)	produits anti-moustiques mesures anti-vectorielles	aucun
virus de la fièvre de la vallée du Rift (VFVR)	Afrique, Yémen, îles Comores, Arabie Saoudite, Chine	vectorielles par les aérosols	plusieurs espèces de moustiques (principalement les *Culex* et *Aedes*)	produits anti-moustiques mesures anti-vectorielles	aucun
virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (FHCC)	mondiale	vectorielles	plusieurs espèces de tiques (principalement de la famille des Ixodidea)	mesures anti-vectorielles	aucun
virus de la rage	Mondiale sauf en Europe de l'Ouest, au Japon et d'autres îles	morsures, griffures ou léchage de mammifères carnivores, morsures de chauves-souris possible transplantation mais rare		éviter les contacts avec les animaux inconnus, vaccination préventive, prophylaxie post-exposition en cas de morsures ou griffures suivant les recommandations de l'OMS	aucun
virus de la rougeole	mondiale	interhumaine		vaccination	aucun
virus de la rubéole	mondiale	interhumaine		vaccination	aucun
entérovirus (EV)	mondiale	interhumaine			aucun
virus de la grippe	mondiale	interhumaine	aérosols	vaccination	oseltamivir, zanamivir

2. 1. Les herpèsvirus

Membres de la famille des *Herpesviridae,* les herpèsvirus sont des virus à ADN (acide désoxyribonucléique) enveloppés, avec une capside icosaédrique. Le mot «herpès» vient du grec *«herpein»* qui signifie ramper comme un serpent. Les huit herpèsvirus strictement humains sont répartis en 3 sous-familles : les *Alphaherpesvirinae* (les herpèsvirus simplex de types 1 et 2 (HSV-1 et HSV-2) et le virus de la varicelle et du zona (VZV)), les *Betaherpesvirinae* (cytomégalovirus (CMV) et les 6e et 7e herpèsvirus humain (HHV-6 et HHV-7)) et les *Gamaherpesvirinae* (virus Epstein-Barr (EBV) et le 8e herpèsvirus humain (HHV-8)). Ainsi, après une primo-infection ces virus herpétiques se maintiennent dans l'organisme par « une infection latente » et se mettent à l'abri du système immunitaire et des antiviraux. Ils restent ainsi dans l'organisme pour pallier à leur fragilité dans le milieu extérieur. La réactivation de l'infection latente peut conduire à une réinfection endogène, pouvant aller d'une forme souvent asymptomatique à des complications neurologiques ou systémiques graves (**Figure 1**).

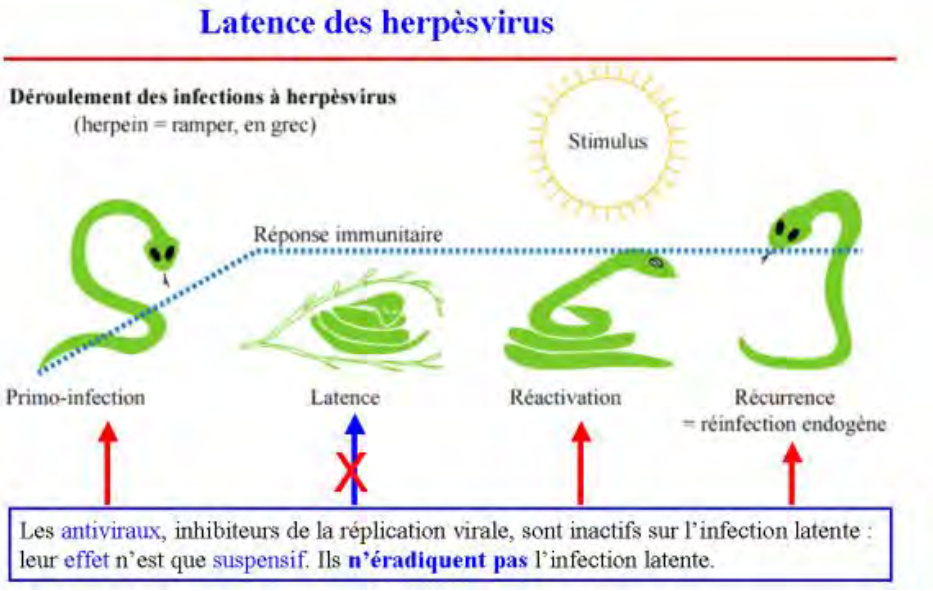


Figure 1: Infection latente des herpèsvirus humains dans l'organisme

(Source: cours de virologie Université Pierre et Marie Curie, 2006-2007)

2. 1. 1. Les virus de l'herpès simplex

L'herpès simplex a été identifié dans plusieurs études comme la plus fréquente cause d'hospitalisation chez des patients atteints d'encéphalite, avec une incidence annuelle entre 1/250.000 et 1/500.000 (Honnorat *et al.,* 2013; Vora *et al.,* 2014). L'encéphalite à herpès simplex est due à une infection du SNC par les virus de l'herpès simplex HSV-1 ou le HSV-2. C'est une affection rare pouvant être due à une infection primaire ou récurrente par un HSV, possible chez des patients immunodéprimés. La transmission interhumaine est directe. Le HSV-1 est de loin la plus fréquente cause d'encéphalite infectieuse dans le monde. Il est majoritairement retrouvé chez l'adulte et l'adolescent, constituant près de 90% des cas d'encéphalite à HSV (Whithley, 2006). Après une primo-infection, le HSV-1 reste latent dans le bulbe olfactif et le ganglion de Gasser (Zhang *et al.,* 2007). Une récurrence d'herpès labial est caractéristique de la réactivation endogène de l'infection dans les vésicules mais le virus très neurotrope n'est pas retrouvé dans la peau et les muqueuses. Toutefois, le HSV-2 est associé de façon récurrente à des lésions génitales chez l'adulte et se transmet par voie sexuelle ou congénitale. Chez le nouveau-né, il peut causer des complications allant d'une maladie systémique grave à des encéphalites acquises par voie congénitale avec un taux de mortalité d'environ 50% (Corey & Wald, 2009). Les HSV sont les plus communes causes d'encéphalite identifiées à travers le monde. Entre 2004 et 2014, près de 69% de cas d'encéphalite à HSV ont été décrits en Turquie (Sili *et al.,* 2014). En 2015, six patients atteints d'une encéphalite à HSV-2 ont été également décrits en Gréce (Zis *et al.,* 2016). Des cas isolés ont été également reportés en 2013 en Angleterre (Dodd *et al.,* 2015) et en 2015 dans d'autres pays comme l'Inde, la France, et la Suisse (Kaeley *et al.,* 2016; Fernandez-Gerlinger *et al.,* 2015; Jaques *et al.,* 2016). En Algérie, un taux d'environ 2% de cas d'infection à HSV a été décrit au cours de l'année 2015 (rapport IPA, 2015). Au Sénégal, il n'existe pas de surveillance active des infections à HSV. Cependant, dans le cadre d'une investigation menée à l'institut Pasteur de Dakar (IPD) sur des sérums collectés en 2014, des traces d'une infection à HSV avaient été identifiées chez 1% des échantillons testés (CNR-rougeole IPD, 2016).

2. 1. 2. Le virus de la varicelle ou zona

Le virus de la varicelle et du zona (VZV) est responsable d'une inflammation aiguë et douloureuse des ganglions nerveux avec des éruptions cutanées formant une ceinture autour du corps. Le VZV peut se transmettre par aérosol, par voie directe ou lors de l'accouchement (Nichols *et al.,* 2011; Ahn *et al.,* 2016). Cette maladie dure généralement entre 7 et 10 jours et s'observe le plus souvent chez les enfants. Cependant, le VZV latent peut se réactiver et causer des éruptions vésiculaires, en particulier chez les personnes âgées et les individus immunodéprimés. En effet, comme les autres herpèsvirus, après une primo-infection, le VZV reste latent dans les neurones des ganglions sensoriels. Il peut être responsable d'un large spectre de complications neurologiques dont une névralgie post-herpétique, une myélite, une vasculopathie focale ou une encéphalite. L'exposition aux rayons solaires ultraviolets (UV) pourrait faciliter la réactivation (Murata *et al.,* 2010; Korostil & Regan*.,* 2016). L'incidence de l'encéphalite à VZV varie de 1,3 à 4,8 cas par 100.000 personnes par an (Hope-Simon, 1965) et peut parfois atteindre des proportions plus importantes que les HSV. Les taux d'hospitalisation varient entre 2 et 25 cas par 100.000 personnes par an, avec des proportions plus importantes chez les personnes âgées. Cependant, cette incidence a considérablement diminuée dans certains pays après l'introduction de la vaccination contre la varicelle chez les enfants de moins de vingt-quatre mois (Kawai *et al.,* 2014; Gabutti *et al.,* 2016). Peu de données existent sur l'épidémiologie du VZV en Afrique (Hussey *et al.,* 2016). Au Sénégal, une épidémie de VZV a été enregistrée en juin 2016 avec un taux d'infection de 51,1% (BEH-MSAS, CNR-rougeole IPD, 2016).

2. 1. 3. Le cytomégalovirus

Le cytomégalovirus (CMV) est l'un des principaux agents viraux responsables d'infections congénitales dans les pays développés, conduisant à des troubles neurologiques chez l'enfant. En effet, durant le premier trimestre de la grossesse, le CMV a un potentiel tératogène et peut causer des malformations du cerveau chez le nouveau-né. Sa prévalence globale varie entre

0,2% et 2,5% chez tous les nouveau-nés (González-Sánchez *et al.,* 2015; Xue *et al.,* 2015). Cependant, chez les adultes, la majorité des encéphalites à CMV a été observée chez des personnes immunodéprimées, comme celles atteintes du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) (Katchanov *et al.,* 2014). En effet, l'infection à CMV a une prévalence élevée partout dans le monde et les taux d'infection augmentent avec l'âge et la séropositivité qui est estimée entre 40 à 100% chez les individus âgés de plus de cinq ans (Lopo *et al.,* 2011). Les infections à CMV sont fréquemment associées à un risque élevé de mortalité et de morbidité, surtout après une transplantation d'organes (Simon *et al.,* 2016). La primo-infection est en générale asymptomatique ou cause un syndrome grippal. Les épisodes de réactivation sont rapidement contrôlées par la réponse immunitaire de l'hôte (Parry *et al.,* 2016). Néanmoins, une encéphalite est observée dans moins de 1% des infections à CMV (Granerod et Crowcroft*.,* 2007). En Afrique, le CMV a une forte prévalence (Bates & Brantsaeter., 2016). Au Sénégal, il n'existe aucune surveillance des infections à CMV, mais un faible taux d'infection de 1,37% a été enregistré en 2015 dans le cadre d'une investigation effectuée sur des sérums prélevés en 2014 par l'Institut Pasteur de Dakar (CNR-rougeole IPD, 2015).

2. 1. 4. Les 6e et 7e herpèsvirus humains

Le 6e herpèsvirus humain (HHV-6) est un agent viral ubiquitaire impliqué dans un nombre élevé de cas d'encéphalites virales, y compris des encéphalites aiguës. La primo-infection à HHV-6 survient en général lors de la petite enfance et se manifeste par une maladie fébrile ou des éruptions cutanées bénignes, avec une séroprévalence supérieure à 95% après l'âge de deux ans. Bien que la primo-infection soit asymptomatique, il peut causer de rares complications dont l'exanthème. Comme les autres herpèsvirus, le HHV-6 peut rester latent après une primo-infection dans le cerveau, les reins, les glandes salivaires ou les cellules telles que les lymphocytes T, les cellules germinales de la moelle osseuse ou les cellules de la microglie (Bhanushali *et al.,* 2013). Cependant, la réactivation du HHV-6 chez des patients immunodéprimés, comme ceux atteints du VIH ou ayant subis une transplantation d'organes ou de cellules souches hématopoïétiques, peut conduire à des manifestations allant d'une forme systémique sévère, caractérisée par des crises et des changements de personnalité, à des

complications neurologiques parfois fatales (Ogata, 2016). L'encéphalite à HHV-6 peut atteindre de fortes incidences, comprises entre 11,6% et 21,4%, chez les patients ayant subis une transplantation (Ogata, 2015). Ainsi, les transplantations de cellules de la moelle osseuse, de cellules souches du sang périphérique ou de cellules sanguines du cordon ombilical représentent des facteurs de risque. En outre, le HHV-6 est le seul herpèsvirus humain capable d'une intégration chromosomique dans les télomères. Cette intégration chromosomique de l'ADN viral s'observe dans environ 2% de la population humaine (Kaufer & Flamand., 2014; Bhanushali *et al.,* 2013). Si cette intégration se passe dans les cellules de lignée germinale, le HHV-6 intégré de façon chromosomique peut affecter la progéniture par transmission directe et se retrouver ainsi dans toutes les cellules nucléées de leur organisme (Hill *et al.,* 2016). De même, le 7e herpèsvirus humain (HHV-7) présente un profil d'expression et un tropisme similaires à ceux du HHV-6. En effet, le HHV-7 peut réactiver le HHV-6 latent et peut participer au tableau clinique sévère associé à l'infection à HHV-6. Toutefois, le potentiel pathogénique du HHV-7 reste incertain (Staheli *et al.,* 2016). Contrairement au CMV, les autres *Béta-herpèsvirus* présentent une faible prévalence en Afrique sub-saharienne (Tembo *et al.,* 2015), y compris au Sénégal où un taux d'infection inférieur à 1% a été observé lors d'une étude menée par l'Institut Pasteur de Dakar en 2014 (CNR-rougeole IPD, 2015).

2. 1. 5. Le virus Epstein-Barr

Le virus Epstein-Barr (EBV) infecte plus de 95% de la population mondiale et cause des mononucléoses infectieuses bénignes avec des symptômes classiques comme une fatigue, une pharyngite et une lymphadénopathie. L'EBVa été le premier virus identifié dans une tumeur humaine; c'est-à-dire le lymphome de *Burkitt* (Houldcroft & Kellam., 2015). Il a également été associé au lymphome de *Hodgkin,* au carcinome nasopharyngé et à quelques cancers gastriques (Peng *et al.,* 2016). En effet, l'infection à EBV est associée à des lymphomes du SNC pouvant être accompagnées de complications neurologiques (Weinberg *et al.,* 2002; Hussain RS. & Hussain NA., 2013). Ces formes graves ne s'observent que chez 1 à 18% des patients atteints d'une mononucléose infectieuse et peuvent s'accompagner de manifestations telles que des crises, une ataxie, une encéphalite, un syndrome de Guillain-Barré et une

dépression (Jenson, 2011). Comme pour le HSV-1, la transmission de l'EBV est directe à travers la salive et il affecte majoritairement les jeunes adultes. Cependant, l'allaitement est une voie potentielle de transmission du EBV chez les enfants (Daud *et al.,* 2015). Après une primo-infection, l'EBV reste en état de latence dans les cellules épithéliales. Bien que les complications neurologiques apparaissent le plus souvent durant l'infection aiguë, la réactivation de l'EBV latent peut être grave chez des patients immunodéprimés (Cohen, 2000). L'EBVest responsable de 2% à 5% des cas d'encéphalites et de méningites virales et les patients souffrant d'une encéphalite à EBV peuvent présenter un tableau clinique allant d'une fièvre à un stade de coma (Akkoc *et al.,* 2016). L'infection à EBV peut entraîner une large gamme de maladies chez les patients recevant une greffe allo-génique de cellules souches hématopoïétiques, avec une incidence pouvant varier entre 3,3% et 15,6% (Xuan *et al.,* 2013). La séropositivité du donneur en anticorps IgG anti-EBV représente un facteur de risque pour une réactivation du EBV latent qui est associée en général à une encéphalite (Jaskula *et al.,* 2010). Au Sénégal, une étude réalisée en 2014 à l'Institut Pasteur de Dakar a montré un taux de 5,76% d'infections à EBV (CNR-rougeole IPD, 2015).

2. 1. 6. Le 8e herpèsvirus humain

Comme l'EBV, le 8e herpèsvirus humain (HHV-8) est un agent ubiquitaire responsable de maladies multifactorielles comme le lymphome primaire des séreuses, la maladie multicentrique de *Castleman* et le sarcome de *Kaposi* (SK). En effet, il est responsable de toutes les formes du SK qui est le cancer le plus fréquemment associé à l'infection au VIH en Afrique (Courville *et al.,* 2014). Le sarcome de *Kaposi* affecte plus les hommes que les femmes et existe sous quatre formes : une forme classique retrouvée en Europe de l'Est et sur les contours de la méditerranée, affectant des hommes âgés de 50 à 70 ans ; une forme endémique touchant des sujets plus jeunes en Afrique subsaharienne ; une forme iatrogénique associée aux patients recevant un traitement immunosuppresseur, suite à une transplantation d'organes ; et une forme épidémique liée au VIH (Begré *et al.,* 2016 ; Njiki *et al.,* 2015). Comme l'EBV, le HHV-8 a un potentiel oncogène et est associé à des troubles lymphoprolifératifs, surtout chez les jeunes adultes infectés par le VIH chez qui il peut entraîner des infections neurologiques (Jha *et al.,* 2015). Le HHV-8 possède une distribution

mondiale, avec une forte prévalence en Afrique et au Moyen-Orient, une prévalence moyenne en Méditerranée et une faible prévalence aux Etats-Unis et au Nord de l'Europe. Cependant, son mécanisme d'action et son mode de transmission restent inconnus. L'importance du type de transmission varie également selon la région. Aux Etats-Unis et au Nord de l'Europe, la transmission sexuelle entre les homosexuels est la principale voie de transmission. Par contre, dans les zones à forte prévalence, la transmission à travers la salive durant l'enfance est dominante. En outre, l'homosexualité masculine, l'absence de partenaire stable, les rapports bisexuels non protégés chez les prostituées et la toxicomanie représentent des facteurs de risque (Zhang *et al.,* 2014). Peu de données existent sur le HHV-8 au Sénégal où le sarcome de *Kaposi* est rare, même dans la population de sujets porteurs du VIH. Cependant, une étude épidémiologique réalisé en 2001 a décrit une séroprévalence de 14,3% pour le HHV-8 chez les femmes enceintes (Gaye-Diallo *et al.,* 2001). Cette séroprévalence est relativement faible par rapport aux résultats de pays africains tels que le Cameroun (51%), l'Ouganda (30 à 50%) et la Zambie (60%) qui ont en commun la particularité de se trouver en zone d'endémie du sarcome de *Kaposi* (BESTETTI *et al.,* 1998). Mais elle est aussi de loin inférieure à la prévalence observée en Gambie où le HHV-8 affecte environ 79% des femmes enceintes. (ARYOSHI *et al.,* 1998).

2. 2. Les entérovirus

Les entérovirus (EV) sont responsables d'infections graves associées à une mortalité et une morbidité élevées (Rhoades *et al.,* 2011). Membre de la famille des *Picornaviridae*, le genre *Enterovirus* regroupe principalement les poliovirus, coxsackievirus, les échovirus, les rhinovirus et les entérovirus 68 et 71. Les entérovirus sont des virus non enveloppés, à ARN (acide ribonucléique) simple brin de polarité positive, avec une capside icosaédrique. Les entérovirus regroupent plus de 250 sérotypes associés à des manifestations cliniques allant d'une forme asymptomatique dans 90% des cas, à une paralysie flasque aiguë, des infections cardio-pulmonaires, des méningites ou des encéphalites (Faleye *et al.,* 2016a). L'homme est le seul réservoir des entérovirus et les enfants sont les plus touchés (De Graaf *et al.,* 2016). Leurs modes de transmission sont multiples et impliquent principalement l'infection par voie

féco-orale, par aérosol, à travers les mains et les objets contaminés par des sécrétions respiratoires (rhinovirus) ou enfin à travers une conjonctivite (EV-71). La réplication primaire se produit dans les tissus épithéliaux et lymphoïdes des amygdales et dans les plaques de Peyer. Ensuite, les entérovirus migrent vers les organes cibles comme la peau, les muscles, le foie, et le cerveau (Akhmadishina *et al.,* 2015). Malgré l'éradication de la poliomyélite dans les pays développés, les entérovirus non-poliovirus (ENP) sont responsables de plusieurs épidémies connues à travers le monde, avec parfois des complications neurologiques (Chou *et al.,* 2015). En effet, les ENP sont des causes majeures d'encéphalites et l'EV-71 est l'entérovirus non-polio le plus neuro-pathogène chez l'Homme. Les encéphalites à ENP nécessitent une hospitalisation et la sévérité dépend du sérotype (Fowlkes *et al.,* 2008). En outre, les patients atteints d'encéphalite ont un risque élevé de présenter des troubles déficitaires de l'hyperactivité (Chou *et al.,* 2015). Malgré des infections généralement plus courantes en été et au début de l'automne dans l'ancien monde, les ENP montrent souvent des modèles d'incidence saisonnière aussi bien en climat tempéré qu'en climat tropical (Pons-Salort *et al.,* 2015). L'échovirus 21 et l'échovirus 19 ont été respectivement les causes d'encéphalite prédominantes lors des épidémies en 2010 et en 2011 en Inde (Kumar *et al.,* 2012 ; Singh *et al.,* 2013). En 2011, il y a eu une épidémie d'encéphalites à entérovirus en Chine et l'échovirus 30 a été l'agent viral prédominant (Zhang *et al.,* 2013). Cependant, l'EV-71 est actuellement l'entérovirus causant le grand nombre de maladies neurologiques sévères dans le monde. Il a été responsable d'une épidémie en Australie entre décembre 2012 et mai 2013, causant près de cent dix-neuf cas nécessitant une hospitalisation et des soins intensifs (Zander *et al.,* 2014). Lors de l'investigation d'une épidémie de Pied-Main-Bouche en 2015 au Cap-Vert, un taux d'infection de 81% associé à l'échovirus 4 a été enregistré (CNR-poliovirus IPD, 2015). Au Sénégal, dans le cadre des investigations menées par l'Institut Pasteur de Dakar, les ENP ont été trouvés au cours des dernières années avec des taux de 38,2% , 18,2% et 13,5% d'infections humaines, respectivement en 2012, 2013 et 2014 (rapports IPD, 2012, 2013 et 2014). Un taux d'infection de 15% a été également trouvé au Sénégal dans le cadre d'une investigation de la circulation et de la diversité génétique de l'EV-71 en Afrique de l'Ouest entre les années 2013 et 2014 (Fernandez-Garcia *et al.,* 2016). En 2015, une augmentation considérable du taux d'infection a été observée lors d'une investigation avec 68% de cas d'infection à ENP tandis qu'un taux d'infection de 35,7% a été observé en 2016 (CNR-poliovirus IPD, 2016).

2. 3. Le virus de la grippe

Appartenant à la famille des *Orthomyxoviridae,* les virus de la grippe sont constitués d'un ARN simple brin, de polarité négative, codant pour onze protéines. Classée sur la base des différences au niveau de leur nucléoprotéine (NP) et de leur protéine matrice (M), la famille des *Orthomyxoviridae* est composée de quatre genres de virus grippaux (les types A, B, C et D). Le type A peut infecter l'Homme, les oiseaux, les porcs et d'autres hôtes animaux, tandis que les types B et C ne sont retrouvés que chez l'Homme. D'après les estimations de l'organisation mondiale de la santé (OMS), les virus grippaux (types A et B) sont responsables d'épidémies saisonnières et infectent entre 5% à 10% de la population mondiale par an, causant près de 250000 à 500000 décès par an. Ainsi, la grippe continue à être un problème majeur de santé publique (Vemula *et al.,* 2016). Bien que la grippe soit principalement une infection respiratoire, l'infection aiguë chez l'Homme peut causer, dans certains cas, une encéphalite. L'encéphalite due au virus de la grippe se manifeste principalement par des complications neurologiques pouvant aller des maux de tête à un coma ou la mort (Goenka *et al.,* 2014). Environ, les trois-quarts des cas touchent les enfants. Cependant, la grippe associée à des complications neurologiques est rare et affecte particulièrement les personnes immunodéprimées (Torisu & Hara*,* 2015). Les cas d'encéphalites associés au virus de la grippe sont fréquents au Japon et la maladie est beaucoup plus sévère chez les enfants de moins de dix ans. En effet, de nombreux cas ont été décrits durant la pandémie à grippe A/H1N1 en 2009. Entre les années 2012 et 2013, trois cas d'encéphalite associés au virus de la grippe ont été également enregistrés en France (Dicky *et al.,* 2015). En Afrique, une forte circulation du virus de la grippe a été enregistrée en 2015 en Algérie avec un taux de 34% (rapport IPA, 2015). En 2015, la grippe H1N1 a été également responsable d'une épidémie au Kenya (OMS-REH, juin 2016). Durant la pandémie de 2009, une étude menée entre la Mauritanie, le Cap-Vert, la Guinée et le Sénégal avait montré une prévalence de 28,9% entre ces quatre pays (Dia *et al.,* 2013). Au Sénégal, il existe une surveillance active qui a permis d'observer une saisonnalité dans la circulation du virus de la grippe. Il a été responsable de 21% d'infections entre 2014 et 2016 dans le cadre de la surveillance nationale. Une analyse de la dynamique de circulation du virus de la grippe a montré deux périodes de forte circulation en 2015, respectivement une prédominance de la grippe pandémique A/H1N1 dans le premier semestre suivie puis celle de la grippe B. En

2016 une circulation du virus de la grippe a été également observée du mois d'août au mois d'octobre, marquée par la prédominance de la grippe A H3N2 avec un taux d'infection de 14,5% (BEH-MSAS, CNR-grippe IPD, 2016).

2. 4. Le virus de la rougeole

Malgré de nombreuses campagnes de vaccination réalisées par l'OMS pour son éradication, la rougeole reste l'une des maladies humaines les plus contagieuses causant près de 120000 décès par an (Rota *et al.,* 2016). Elle est causée par un virus appartenant à la famille des *Paramyxoviridae* et au genre *Morbillivirus.* Comme tous les membres de la même famille, le virus de la rougeole est enveloppé et possède un génome simple brin de polarité négative. Le virus de la rougeole infecte l'Homme à travers les gouttelettes en suspension libérées du nez et/ou de la bouche d'une personne infectée ou par la transplantation d'organes. Après une amplification massive dans les organes lymphoïdes associée à un profond potentiel immunodépressif, le virus se dissémine dans les différents organes en utilisant le système sanguin. Ainsi l'infection peut causer des signes gastro-intestinaux, dermatologiques et respiratoires (Ludlow *et al.,* 2015). Il n'existe pas de traitement spécifique pour la rougeole et la plupart des personnes peuvent se rétablir au bout de deux ou trois semaines. Toutefois, en plus de son tropisme lympho-épithélial, le virus de la rougeole peut atteindre le SNC et causer des complications neurologiques parfois fatales telles qu'une cécité et une encéphalite (Al-Qayoudhi *et al.,* 2016). Le virus de la rougeole peut causer une encéphalite primaire, une encéphalomyélite aiguë post-infectieuse ou une encéphalite accompagnée de symptômes dermatologiques (Plattet *et al.,* 2016). Les enfants malnutris ou immunodéprimés âgés de moins d'un an, les jeunes adultes non-vaccinés et les femmes enceintes sont plus à risque pour développer des douleurs respiratoires sévères pouvant conduire à la mort. De janvier 2008 à mai 2012, des épidémies de rougeole ont été successivement enregistrés dans différents pays d'Europe tels que la France, l'Italie, l'Irlande, l'Allemagne et la Grèce. Plusieurs cas d'encéphalites ont été enregistrés durant cette période touchant plus les enfants de moins d'une année et les jeunes adultes non vaccinés (Filia *et al.,* 2011). En Afrique, un taux de 18% d'infection au virus de la rougeole a été enregistré en 2015 en Algérie (rapport IPA, 2015). Au Sénégal, un système de surveillance de la rougeole a été établi depuis 2002 par le

ministère de la santé et de l'action sociale du Sénégal (MSAS) et l'IPD. Une étude menée sur les données de cette surveillance de 2004 à 2013 a permis de signaler une forte circulation du virus de la rougeole entre 2008 et 2010 avec des taux d'infection annuels de 48,5% (Dia *et al.,* 2015). Entre 2015 et 2016, des taux d'infection annuels respectifs de 6,34% 14,7% ont été enregistrés (BEH-MSAS, CNR-rougeole IPD, 2016)

2. 5. Le virus de la rubéole

Appartenant à la famille des *Togaviridae*, le virus de la rubéole est le seul membre du genre *Rubivirus*. C'est un virus enveloppé et son génome est un ARN de polarité positive. Il est l'agent infectieux responsable de la rubéole. Il existe un vaccin préventif rougeole-rubéole et la protection est à long terme. En général la rubéole est considérée comme une maladie infantile fébrile et les complications sont rares. Cependant, elle peut également infecter les jeunes adultes non vaccinés. Elle se transmet par contact avec les sécrétions naso-pharyngées et les gouttelettes en suspension ou par contact direct. Avec une période d'incubation variable entre douze et vingt-deux jours, la rubéole se manifeste par une maladie fébrile non spécifique caractérisée par des éruptions maculo-papuleuses non-confluentes, une adénopathie, des maux de tête, des maux de gorge, une toux, une conjonctivite, et de façon plus courante, par une arthralgie et une arthrite. Toutefois, lorsque le virus de la rubéole infecte la femme enceinte lors de ses premiers mois de grossesse, le fœtus peut développer des malformations congénitales graves, plus connues sous le nom de syndrome de rubéole congénitale. En outre, le virus de la rubéole peut causer de rares complications plus sévères comme un syndrome de Guillain-Barré, une encéphalopathie ou une méningite (Chan *et al.,* 2015). En effet, l'infection du SNC est plus courante dans le cas de la rougeole, mais rare dans le cas de la rubéole. L'encéphalite à rubéole a une incidence variable entre 1/6000 et 1/24000 cas de rubéole et se manifeste par de la fièvre, des céphalées, des troubles de conscience, un gonflement des ganglions lymphatiques du cou, une détérioration mentale et motrice progressive. Elle affecte plus les enfants non vaccinés âgés entre 5 et 14 ans et peut parfois être une rare complication d'une mauvaise réponse à la vaccination (Gualberto *et al.,* 2013 ; Ben Achour *et al.,* 2013). En outre, la sévérité de l'encéphalite à rubéole est très variable et

peut atteindre un taux global de 20% de mortalité (Figueiredo *et al.,* 2011). Comme pour la rougeole, les enfants immunodéprimés, les jeunes adultes non-vaccinés et les femmes enceintes présentent également un risque d'infection plus élevé. En Tunisie, neuf cas d'encéphalite ont été enregistrés durant l'épidémie de rubéole en 2011 (Ben Achour *et al.,* 2013). Il existe également une surveillance active de la rubéole au Sénégal établie entre le MSAS et l'IPD et dans ce cadre, un taux annuel de 28,84% de cas d'infection au virus de la rubéole a été enregistré en 2014 (rapport annuel IPD, 2014). En outre, des taux d'infection annuels de 22,3% et 1,4% ont été enregistrés respectivement en 2015 et 2016 (BEH-MSAS, CNR-rougeole, 2016).

2. 6. Les arbovirus

Généralement transmis à l'Homme par piqûre de moustiques, tiques, mouches ou moucherons, les arbovirus (ou ***ar****thropod-****bo****rne-****virus***) ont une distribution mondiale. Bien que la majorité des infections humaines soit asymptomatique, les infections à arbovirus se manifestent le plus souvent par une maladie fébrile systémique et, dans de rares cas, par des symptômes neurologiques causés par une méningite, une encéphalite ou une paralysie flasque aiguë. Les arbovirus neurotropes appartiennent principalement à quatre familles que sont les *Flaviviridae,* les *Bunyaviridae*, les *Togaviridae* et les *Reoviridae.* Cependant, les différences en termes de vecteurs, d'hôtes animaux et de tropisme tissulaire peuvent contribuer à des variations dans la distribution géographique, l'incidence de la maladie et les manifestations cliniques.

2. 6. 1. Le virus de la dengue

Le virus de la dengue (DEN) est un virus enveloppé, à ARN simple brin, de polarité positive. Il appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*. L'ARN viral d'environ 11 kilobases (kb) code pour une polyprotéine encadrée par deux régions non-codantes (5' et

3’ non-codantes). La polyprotéine virale est constituée de trois protéines structurales (la capside (C), la membrane (prM évoluant en M) et l’enveloppe (E)) et de sept protéines non-structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5). Le virus se maintient naturellement en milieu sauvage dans un cycle de transmission entre les singes et les moustiques arboricoles principalement du genre *Aedes.* Le complexe antigénique de la dengue est composé de quatre sérotypes distincts (DEN-1 à 4). L’infection humaine est accidentelle et l’exposition aux moustiques infectés se passe généralement lors de l’introduction de l’Homme en milieu sauvage durant les activités occupationnelles ou lucratives. Il existe également un cycle de transmission interhumaine en milieu urbain où le virus de la dengue est principalement transmis par l’espèce de moustique *Aedes aegypti* (Vasilakis *et al.,* 2011). Le virus de la dengue a un tropisme pour les cellules immunes comme les monocytes des ganglions lymphatiques et de la rate, les macrophages des alvéoles pulmonaires et les cellules dendritiques du cerveau (Flipse *et al.,* 2016). L’infection est généralement asymptomatique ou bénigne. Néanmoins, 1% des cas peuvent évoluer vers une forme sévère appelée dengue hémorragique ou syndrome de choc de la dengue, pouvant conduire à la mort. Cependant, l’infection par le virus de la dengue peut entrainer des complications neurologiques aussi bien lors de la forme simple que dans le cas d’une infection hémorragique (Carod-Artal *et al.,* 2013). Bien que tous les sérotypes puissent être impliqués, les DEN-2 et 3 sont les plus fréquentes causes d’infections neurologiques sévères dont les encéphalites (Misra *et al.,* 2015). L’encéphalite due au virus de la dengue se manifeste principalement par des maux de tête, des vertiges, des crises et des troubles de conscience (Solbrig & Perng., 2015). Malgré le caractère rare de l’encéphalite due au virus de la dengue, la maladie tend de plus en plus à prendre des proportions inquiétantes dans certaines parties du monde, notamment en Asie du Sud (Malaisie et Birmanie), à Porto Rico et en Inde. En effet, des cas d’encéphalite due à la dengue ont été enregistrés au Sud de l’Inde entre 2011 et 2013, parfois associés à des manifestations inhabituelles (Neeraja *et al.,* 2014). Des cas neurologiques associés au virus de la dengue ont été également décrits en 2013 au Vietnam et en 2011 au Brésil avec des proportions plus élevées que le HSV-1 qui est l’étiologie virale la plus associée aux encéphalites humaines (Soares *et al.,* 2011; Phu Ly *et al.,* 2015). Avec une transmission interhumaine intense durant ces dernières années, près de 390 millions de personnes sont infectées chaque année à travers le monde (Bhatt *et al.,* 2013). En Afrique, une circulation du virus de la dengue a été observée en 2012 dans des pays comme le Cameroun et la République Centrafricaine (rapport IPB, 2012). Récemment, des épidémies ont été rapportées au Gabon

en 2010 (Caron *et al.,* 2013), en Angola entre 2013 et 2014 (Sessions *et al.,* 2013), en Somalie entre 2012 et 2013, en Ethiopie en 2013, au Soudan entre 2012 et 2013, au Kenya entre 2013 et 2014 (Ellis *et al.,* 2015), en Tanzanie en 2014 (Vairo *et al.,* 2014), au Mozambique entre 2014 et 2015 (Massangaie *et al.,* 2016), en Mauritanie en 2014-2015 et au Burkina Faso en 2016 (OMS-REH, novembre 2016). Après une épidémie de DEN-3 en 2009 (Faye *et al,* 2014), le Sénégal a connu une circulation du virus de la dengue entre 2014 et 2015 touchant plusieurs régions du pays (MSAS*,* 2015).

2. 6. 2. Le virus West Nile

Le virus West Nile (WN) ou virus du Nil occidental est un flavivirus isolé pour la première fois en 1937 en Ouganda. Comme tous les flavivirus, le virus WN est un virus enveloppé et son génome est un ARN simple brin, de polarité positive, d'environ 12 kb codant pour une polyprotéine ayant la même structure que celle du virus de la dengue. Le virus WN présente une distribution mondiale et une grande diversité génétique avec huit lignées dont quatre circulent en Afrique. Son cycle naturel se passe entre les oiseaux sauvages, qui sont les réservoirs, et les moustiques généralement du genre *Culex.* Cependant, l'Homme et d'autres mammifères tels que les chevaux peuvent s'infecter de façon accidentelle, constituant ainsi des hôtes ''culs-de-sac'' (Kumar *et al*., 2016). La transmission du virus par transfusion sanguine et transplantation d'organes a été également rapportée. Le virus WN a un tropisme pour les cellules de Langerhans et les tissus lymphoïdes et peut se disséminer vers les organes et probablement le SNC. Durant cette dernière décennie, l'incidence mondiale du virus WN ne cesse d'augmenter. Bien que l'infection humaine par le virus WN soit généralement asymptomatique ou développe un syndrome fébrile, quelques rares cas (< 1%) peuvent progresser vers des complications neurologiques sévères comme les méningites, la paralysie flasque aiguë et les encéphalites, et la mort peut s'en suivre avec un risque plus élevé chez les personnes âgées. L'encéphalite à virus WN se manifeste par des symptômes comme les céphalées, la fatigue, les vertiges, une diminution de l'ouïe et de l'odorat, une altération du niveau de conscience (David & Abraham., 2016). En effet, depuis son introduction en 1999 à New York, il est devenu la principale cause d'encéphalites aux Etats-Unis (Kumar *et al*.,

2016). Il a été également responsable d'épidémies chez l'homme avec de nombreux cas d'encéphalites entre 2009 et 2013, notamment en Europe, sur le bassin méditerranéen, en Afrique du Nord, au Moyen-Orient et en Inde (Di Sabatino *et al.,* 2014). En outre, le virus WN a été récemment identifié en 2015 causant un cas d'encéphalite humaine au Portugal et trois cas en Asie, particulièrement pour la première fois au Sri-Lanka (Zé-Zé *et al.,* 2015; Lohitharajah *et al.,* 2015). En Afrique, des cas d'infections neurologiques au virus WN ont été identifiés entre septembre 2008 et mai 2009 en Afrique du Sud (Zaayman & Venter., 2012). En outre, il existe une séroprévalence assez importante du West Nile en Algérie, au Maroc et en Tunisie (Benjelloun *et al.,* 2016). Bien qu'aucun cas d'infection humaine n'ait encore été signalé au Sénégal, le virus WN a été souvent isolé à partir des lots de moustiques (Fall *et al.,* 2014).

2. 6. 3. Le virus Zika

Le virus Zika est un arbovirus isolé pour la première fois en 1947 d'un singe sur un site sentinelle en Ouganda et appartient à la famille de *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus.* Le virus Zika présente une faible diversité génétique avec trois lignées distinctes; une lignée Ouest-africaine, une lignée Est-africaine et une lignée asiatique séparées par une faible distance génétique < 11.7% (Faye *et al.,* 2014). Le virus Zika est transmis principalement par les moustiques du genre *Aedes*, en particulier par les espèces *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* qui par ailleurs sont également des vecteurs pour le virus de la dengue. Bien que son cycle de transmission naturelle soit encore incertain, les primates non-humains pourraient être de potentiels réservoirs pour le virus Zika et l'Homme pourrait s'infecter lors de son introduction dans le milieu forestier sauvage. Cependant, même si le virus n'a été détecté dans aucun pool de moustiques lors de l'épidémie de l'île de Yap en Micronésie en 2007 (Duffy *et al.,* 2009), il serait hautement probable que les espèces de moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* participent au cycle de transmission urbaine du virus Zika (Diagne *et al,* 2015). D'autres voies de transmission non-vectorielles, comme la transmission sexuelle, verticale ou parentérale et la transfusion sanguine, ont été également documentées (Slavov *et al.,* 2016). L'infection au virus Zika est asymptomatique dans 18% des cas et le virus cause un syndrome

fébrile comparable à l'infection par le virus de la dengue (Wertheim *et al.,* 2012). Le tableau clinique est constitué d'une légère fièvre comprise entre 37,8 to 38,5°C, des céphalées, des myalgies, des arthralgies, des éruptions érythémateuses généralisées (Chan *et al.,* 2016). Le virus Zika peut dans de rares cas affecter les tissus neuronaux et a été principalement associé à de nombreuses complications neurologiques comme le syndrome de Guillain–Barré et une encéphalomyélite aiguë disséminée chez les adultes ou à une augmentation drastique des microcéphalies chez les fœtus et nouveau-nés en 2015 au Brésil (Ramos da Silva & Gao, 2016). L'émergence globale du virus Zika et son association à un syndrome de Guillain-Barré et des microcéphalies ont attiré l'attention de la communauté internationale (Al-Qahtani *et al.,* 2016). En effet, de 2013 à 2015, le virus Zika a causé une épidémie active touchant plusieurs pays. Le Brésil est l'épicentre de cette épidémie courante avec près de 165241 cas enregistrés de janvier à juillet 2015 (Magalhães-Barbosa *et al.,* 2016). Le virus Zika a rapidement migré vers d'autres pays d'Amérique latine et des Caraïbes comme le Salvador, le Venezuela, le Honduras, le Mexique, la Colombie, le Surinam, la Guyane française et le Panama, causant des épidémies actives. Récemment, le virus Zika a été signalé aux Etats-Unis et dans d'autres pays européens tels que l'Italie, la Hollande, le Danemark, la Suisse et l'Angleterre, associé à des cas importés. Actuellement, la présence du virus Zika a été enregistrée dans soixante quatorze pays à travers le monde dont le Cap-Vert et contrairement au virus de la dengue, il a la possibilité d'être endémique dans tous les pays où circule l'espèce de moustique *Aedes aegypti* (Demir & Kilic*.,* 2016). Au Sénégal, des isolements répétés du virus ont été obtenus à partir de lots de moustiques collectés sur le terrain, particulièrement au Sud-Est du pays mais aucun cas d'infection humaine au virus Zika n'a encore été identifié (Diallo *et al.,* 2014; Faye *et al.,* 2014). Cependant, cette absence de détection du virus zika dans la population sénégalaise pourrait être un biais associé à l'absence d'une surveillance pour ce virus dans le pays.

2. 6. 4. Le virus de la fièvre de la vallée du Rift

Isolé pour la première fois en 1931 au Kenya, le virus de la fièvre de la vallée du Rift (VFVR) est un arbovirus zoonotique appartenant à la famille des *Bunyaviridae* et au genre *Phlebovirus.* Le génome viral est un ARN simple brin composé de trois segments; à savoir un

long segment (L) qui code pour la polymérase virale, un segment moyen (M) qui code pour environ quatre protéines (les composantes structurales Gn et Gc de la glycoprotéine, la protéine non-structurale Nsm et la large glycoprotéine LGp) et un petit segment (S) codant pour la nucléoprotéine (N) et la protéine non-structurale NSs. Le VFVR est endémique dans plusieurs régions d'Afrique. Cependant, il a été identifié dans d'autres régions du monde, comme au Yémen, aux îles Comores, et en Arabie Saoudite causant des cas sporadiques ou parfois des épidémies (Mansfield *et al.,* 2015). Un cas d'infection a été également importé en Chine par un homme de 45 ans en provenance d'Angola (Liu *et al.,* 2016). Les moustiques sont à la fois les réservoirs et les vecteurs mais l'infection humaine peut être directe par contact avec du sang et des tissus ou par inhalation d'aérosols libérés de carcasses animales infectées. Causant des lésions spécifiques, le VFVR a un tropisme pour le thymus, le foie et la rate et ses principales cellules cibles sont les macrophages et les cellules dendritiques. Il cause des avortements et des malformations fœtales chez les ruminants, ainsi qu'une fièvre hémorragique, des inflammations de la rétine et des encéphalites chez les humains, surtout par une inhalation d'aérosols (Caroline *et al.,* 2016). L'encéphalite causée par le VFVR se manifeste par une perte de poids, des maux de tête sévères, une baisse de la vision, des troubles neurologiques, des convulsions et souvent le coma (Mohamed *et al.,* 2010). En 2012, le VFVR a été responsable d'une épidémie humaine en Mauritanie causant trente-six cas dont dix-huit décès (OMS-REH, novembre 2012). Il a également été la cause d'une épidémie au Niger touchant cent-cinq personnes dont vingt-huit décès en 2016 (OMS-REH, novembre 2016). En 2013, une circulation du virus a été observée au Sénégal causant quelques cas sporadiques et une mortalité chez le bétail (rapport annuel IPD, 2013). Des cas d'infection humaine au VFVR ont été également identifiés dans le cadre d'une investigation au cours de l'année 2015 au Sénégal, en Mauritanie et au Mali (CRORA, IPD, 2015) (centre collaborateur OMS de référence et de recherche pour les arbovirus et virus de fièvres hémorragiques).

2. 6. 5. Le virus Chikungunya

Le virus Chikungunya est un arbovirus isolé pour la première fois en 1953 en Tanzanie. Le virus Chikungunya appartient à la famille des *Togaviridae* et au genre *Alphavirus*. Le génome des alphavirus est un ARN simple brin positif d'environ 11,5 kb qui code pour quatre

protéines non-structurales (nsP1 à nsP4) et trois protéines structurales (la capside et les deux glycoprotéines de l'enveloppe E1 et E2). Le virus Chikungunya présente trois lignées affectant des millions de personnes dans quarante-deux pays à travers le monde. La lignée africaine circule en Afrique de l'Est, du centre et du Sud. La lignée asiatique est retrouvée en Asie du Sud, aux Caraïbes, en Italie, dans les Antilles françaises et en Amérique. Enfin, la lignée de l'océan indien circule dans plusieurs îles de l'océan indien et en Inde. Dans les régions forestières, le cycle naturel du virus Chikungunya se passe entre les primates non-humains et les moustiques principalement du genre *Aedes.* Cependant, il peut exister des émergences de cycles urbains entre les humains et les espèces de moustiques *Aedes aegypti et Aedes albopictus*, dont la propagation est facilitée par les eaux stockées (Crosby *et al.,* 2016). Le virus cause généralement une maladie bénigne et présente un tropisme pour le foie, les muscles, les articulations, les fibroblastes de la peau, les méninges et les cellules de l'épendyme entourant le SNC. Cependant, la maladie peut se présenter sous des formes sévères causant une septicémie sévère, une maladie cardiaque, des défaillances d'organes, un syndrome de Guillain-Barré, et dans de rares cas des troubles neurologiques centrales ou périphériques comme une encéphalite ou une ischémie cérébrale diffuse pouvant conduire à la mort cérébrale Les formes hémorragiques sont rares et souvent associées à une co-infection avec le virus de la dengue. Les personnes âgées ou immunodéprimées, les nouveau-nés et les petits enfants sont un groupe à risque pour une encéphalite à virus Chikungunya (Weaver et Lecuit., 2015). Cette dernière se manifeste généralement par un état de conscience altéré accompagné au moins d'une fièvre (≥ 38°C) ou de crises, aussi bien chez les adultes que chez les enfants (Oliveira *et al.,* 2016). Après une circulation active en 2009, le virus Chikungunya a été responsable d'une épidémie en septembre 2015 au Sud-Est du Sénégal causant une dizaine de cas humains confirmés (REH-OMS, septembre 2015).

2. 6. 6. Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo

Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (FHCC) est un arbovirus causant une mortalité et une morbidité élevée. Il appartient à la famille des *Bunyaviridae* et au genre *Nairovirus*. Son génome, d'environ 19,2 kb, est un ARN simple brin de polarité négative avec

une organisation presque identique à celle du VFVR, avec un petit segment (S) codant pour la nucléoprotéine, un segment moyen (M) qui code pour un précurseur de la glycoprotéine constitué de deux enveloppes structurales Gn et Gc, et un long segment (L) qui code pour la polymérase virale. En plus d'une distribution mondiale, le virus de la FHCC présente une large diversité génétique répartie en sept clades sur la base de son segment S et en six clades sur la base de son segment M (Chinikar *et al.,* 2016). Il est principalement transmis par les tiques de la famille des *Ixodidae* qui sont à la fois les vecteurs et les réservoirs. Son cycle normal se passe entre les tiques et les vertébrés non-humains. L'Homme est un hôte accidentel et s'infecte à travers une piqûre de tiques du genre *Hyalomma* ou une exposition à de fluides ou tissus provenant d'hôtes infectés (Telmadarraiy *et al.,* 2015). L'infection initiale cause des symptômes non-spécifiques tels qu'une forte fièvre, une myalgie ou une fatigue, généralement accompagnés de diarrhée et de vomissements. Cependant, l'infection peut évoluer vers une forme sévère hémorragique pouvant toucher plusieurs organes dont le cerveau. Lors de l'infection, le virus de la FHCC se distribue dans tout le corps mais il a un tropisme plus élevé pour le foie, les poumons, le cœur, et les tissus intestinaux et cible principalement les cellules endothéliales, les hépatocytes et les cellules phagocytaires mononucléaires (Zivcec *et al.,* 2016). L'infection au virus de la FHCC est plus commune en milieu rural où les populations sont exposées aux piqûres de tiques. Cependant, le personnel de la santé est également un groupe à risque d'une infection nosocomiale, particulièrement lors de la phase hémorragique de la maladie chez le patient (Aslam *et al.,* 2016). Au Sénégal, il existait une surveillance de ce virus depuis les années 90 (Chapman *et al.,* 1991) et une séroprévalence plus élevée chez l'Homme et le bétail a été enregistrée au Nord du pays. Cette séroprévalence diminuait considérablement du Nord vers le Sud et le risque d'infection humaine augmentait avec l'âge (Wilson *et al.,* 1990). Peu de données ont été enregistrées au début des années 2000. Cependant, en novembre 2015, un cas d'infection humaine au virus de la FHCC a été identifié dans la région de Saint-Louis au Nord du Sénégal, dans le cadre du diagnostic de routine des arbovirus menée par l'Institut Pasteur de Dakar (CRORA IPD, 2015). En outre, trois cas d'infection au virus de la FHCC importés de la république de Mauritanie et un cas autochtone habitant la région de Mbour ont été enregistrés au cours lors de l'année 2017 dans le cadre du diagnostic de routine des arbovirus menée par l'Institut Pasteur de Dakar (CRORA IPD, 2017).

2. 7. Le virus de la rage

La rage est une maladie zoonotique causée par un virus généralement transmis à l'Homme à travers la salive, une morsure ou une griffure profonde d'un animal infecté. A l'exception de l'Antarctique, la rage est présente sur tous les continents. Plus de 95% des décès annuels causés par la rage se passent en Afrique et en Asie où plus de 40% des cas concernent des enfants de moins de quinze ans. Malgré l'existence de vaccins et d'immunoglobulines antirabiques, la rage est presque toujours fatale dès l'apparition des symptômes (Vodopija *et al,* 2016). L'agent étiologique est un virus enveloppé avec une nucléocapside à symétrie hélicoïdale. Le virus de la rage est membre de l'ordre des Mononegavirales, de la famille des *Rhabdoviridae* et du genre *Lyssavirus.* Son génome est un virus à ARN simple brin de polarité négative avec une taille d'environ 12 kb. L'ARN viral code pour cinq protéines à savoir la nucléoprotéine (N), phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la glycoprotéine (G) et la polymérase (L). Il présente en extrémité 3' une séquence d'environ 50 nucléotides. Ces protéines sont séparées par des régions inter-géniques non-codantes. L'ordre et la taille relative de ces différentes protéines sont illustrés à la **figure 2**. Les chiens ont toujours été reconnus comme les principaux réservoirs du virus de la rage. Cependant, l'implication des chauves-souris hématophages de l'espèce *Desmodus rotundus,* dans la transmission de la rage en Amérique latine, a également attiré les attentions (da Costa & Fernandes., 2016). En outre, la transmission du virus de la rage à travers l'inhalation d'aérosols, la transplantation d'organes et de la mère au nouveau-né sont possibles, mais restent rares (Zhou *et al.,* 2016; Aguèmon *et al.,* 2016). Le virus de la rage a un fort tropisme pour le SNC. La période d'incubation peut durer de moins d'une semaine à plus d'un an. L'infection par le virus de la rage cause une encéphalite ou inflammation virale du SNC chez les êtres humains et les autres mammifères. En effet, l'encéphalite due au virus de la rage se manifeste par des symptômes neurologiques typiques comme une désorientation, des convulsions, une hydrophobie, parfois une aérophobie, une paralysie et le coma. Au Sénégal, l'infection est fréquente mais la maladie est toujours incomprise par la population. Bien qu'une surveillance active des morsures soit mise en place, il existe toujours un déficit de données sur la rage au Sénégal (Bourhy *et al.,* 2015).

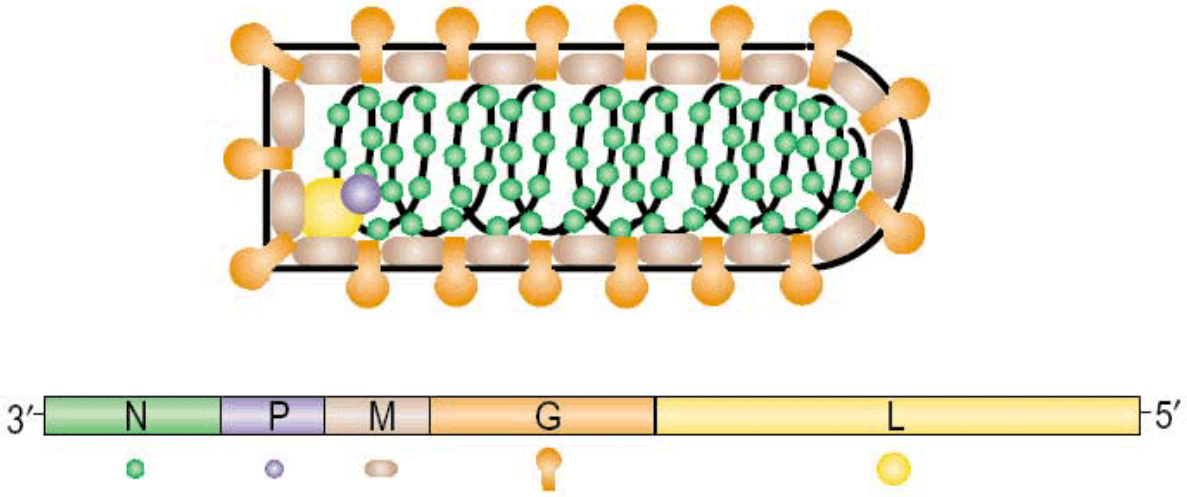


Figure 2: Structure du génome du virus de la rage

(Source: https://fr.wikipedia.org/wiki/Mononegavirales)

3. MOYENS DE DIAGNOSTIC DES ENCÉPHALITES VIRALES

Une encéphalite est une maladie du SNC et son étiologie reste indéterminée dans la majorité des cas. Le diagnostic d'une encéphalite virale est très difficile, surtout dans la phase précoce de l'infection. Cependant, un diagnostic rapide et efficace peut conduire à des une meilleure prophylaxie et souvent à des mesures santé publique, si nécessaire. Ainsi, le choix d'un test de diagnostic approprié est d'une grande importance. En général, les proportions des constituants du sang périphérique et la morphologie cellulaire sont déterminants pour distinguer une infection virale d'une infection non virale. En effet, une lymphocytose dans le sang périphérique est un marqueur commun lors d'une encéphalite virale. L'estimation du taux de sédimentation des érythrocytes est également un autre test couramment utilisé dans l'investigation d'une large gamme d'infections virales. L'examen du liquide céphalo-rachidien (LCR) évaluant la composition en glucose et protéines peut également permettre le diagnostic d'une encéphalite virale.

En outre, les imageries du SNC et l'électro-encéphalographie (EEG) sont principalement recommandées lors de la suspicion d'une infection virale (Moniuszko *et al.,* 2010). L'EEG est généralement considérée comme un outil de diagnostic non spécifique permettant seulement d'évaluer l'implication du SNC. Toutefois, elle peut être très utile dans le diagnostic différentiel entre une encéphalite virale aiguë et une méningite aseptique (Rui-Yun *et al.,* 2016). L'imagerie à résonnance magnétique (IRM) est une technique non irradiante et permet un diagnostic plus spécifique que l'EEG. L'IRM offre également d'autres avantages comme une haute résolution anatomique et une détection précoce de l'inflammation (von Stülpnagel *et al.,* 2016).

En général, l'analyse sur du LCR est le test recommandé pour le diagnostic d'une encéphalite virale. La culture cellulaire du LCR ou de la biopsie de cerveau peuvent être réalisée sur trois lignées cellulaires comme les cellules de singe vert d'Afrique (cellules Vero), les cellules épithéliales amniotiques humaines ou les fibroblastes cutanés de l'embryon humain et les résultats de l'isolement sont confirmés par des tests de neutralisation ou d'immunofluorescence (Steiner *et al.,* 2010). Parallèlement, beaucoup d'autres méthodes microbiologiques telles que les tests sérologiques et la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont utilisées pour l'identification des agents viraux impliqués dans l'infection du SNC tels que les arbovirus, entérovirus, les virus de la grippe A et B, ou les herpèsvirus. La technique PCR est généralement utilisée pour la détection de l'acide nucléique dans le LCR ou la biopsie de cerveau. Toutefois, la détection de l'acide nucléique viral dans le LCR dépend du stade de l'infection. Le moment optimal est la première semaine après l'apparition des symptômes. De nouvelles approches telles que les PCR multiplex ou les méthodes couplant la PCR avec d'autres techniques comme la spectrophotométrie de masse et les puces à ADN sont de plus en plus développées pour un diagnostic différentiel des encéphalites virales (Lévêque *et al.,* 2011; Leveque *et al.,* 2014). La détection des anticorps par ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) peut être réalisée aussi bien sur le sérum que sur le LCR. Pour beaucoup d'arbovirus, il y a plus de chance d'obtenir une sérologie positive car la phase virémique est très rapide et les patients accusent souvent un retard avant leur arrivée dans les structures de santé (Lanciotti *et al.,* 2000). Bien que la présence d'anticorps dans le LCR soit plus indicateur d'une rupture de la membrane hémato-encéphalique et d'une infection du SNC (Johnson *et al.,* 2016), la détection des immunoglobulines de type M (IgM) est plus fréquente dans le sérum où ils peuvent être présents des mois après l'infection aiguë

(Kapoor *et al.,* 2004; Prince *et al.,* 2005). En outre, la détection de l'antigène de certains virus tels que le HSV, le VZV ou les virus grippaux A et B peut être effectuée sur des prélèvements naso-pharyngés par immunofluorescence conventionnelle ou par ELISA mais cette méthode n'est pas très pertinente dans le diagnostic utilisant des prélèvements de LCR.

Malgré l'utilisation croissante de nouvelles approches telles que la spectrométrie de masse MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) et le séquençage à haut débit NGS (*next-generation sequencing*) pour l'identification des marqueurs du système immunitaire en corrélation avec l'infection ou des agents pathogènes spécifiques impliqués dans les cas d'encéphalite virale, l'échec dans le diagnostic de l'infection du SNC reste toujours élevé (Perlejewski *et al.,* 2015; Ng & Solomon., 2015).

4. DÉFICIT DE CONNAISSANCES ET D'OUTILS DE DIAGNOSTIC DES ENCÉPHALITES VIRALES EN AFRIQUE

Bien qu'il y'ait eu de nombreuses avancées dans la mise au point des techniques de diagnostic des encéphalites humaines, la plupart des études utilisant ces outils modernes de virologie a été effectuée dans les pays développés, dans un contexte environnemental et socio-économique différent de celui de l'Afrique. Malgré une incidence globale élevée des encéphalites, peu de données existent pour l'Afrique. En effet, le faible niveau de sensibilisation du personnel de la santé, le manque d'outils de diagnostic efficaces et l'absence de surveillance systématique peuvent être à l'origine d'une sous-estimation de l'incidence des encéphalites. Ainsi, plus de connaissances sur les encéphalites sont nécessaires dans les pays africains. Pour cela, l'établissement d'une définition de cas standardisée pour une encéphalite est très important lors d'une surveillance épidémiologique, dans la recherche clinique ou lors d'investigations d'épidémies. En effet, une définition de cas largement applicable pourrait faciliter la recherche des étiologies impliquées dans les cas d'encéphalites, même dans des régions avec des ressources et des capacités de surveillance sensiblement différentes. En outre, la mise en place d'un algorithme pratique de diagnostic peut aider les cliniciens dans l'appréciation d'une suspicion et faciliter la surveillance des

encéphalites. Il est également important d'avoir une approche standard utilisable dans des études collaboratives et multicentriques. De plus, le manque de tests rapides et fiables au chevet du malade et facilement utilisables sur le terrain, communément appelés « *point of care* », constitue un handicap majeur dans la prise en charge des malades et l'estimation de l'incidence des encéphalites en Afrique (Yansouni *et al.,* 2013). Ainsi, la mise en place d'un algorithme décisionnel de prise en charge des patients atteints d'encéphalites souligne la nécessité d'outils de diagnostic efficaces pour l'identification spécifique d'agents pathogènes nouveaux ou déjà connus (Venkatesan *et al.,* 2013). Cependant, le manque de moyens financiers conséquents en Afrique conduit probablement à un échec considérable dans le diagnostic des cas d'encéphalite et empêche un traitement rapide et efficace des patients. En effet, dans certains pays d'Afrique, le système de santé est inexistant ou gravement affecté par les conséquences de plusieurs années de conflit ou de guerre civile. Dans ces zones, il existe souvent un défit dans le nombre du personnel de santé et les quelques rares médecins disponibles sont concentrés dans les grandes villes. Dans d'autres pays où existe un système de santé fonctionnel, la plupart des personnes n'ont pas de source de revenus ou ne bénéficient pas de soutien financier leur permettant de supporter les frais d'hospitalisation et de traitement de leurs proches atteints d'encéphalite. Même si souvent le problème de moyens financiers est résolu et que le diagnostic d'une encéphalite virale est confirmé, les options de traitement sont parfois limitées ou indisponibles dans certains pays d'Afrique (Birbeck *et al.,* 2015).

DEUXIÈME PARTIE : LES ENCÉPHALITES VIRALES AU SENEGAL

1. PROBLÈMATIQUE DE L'ÉTUDE

Les encéphalites ont plusieurs étiologies mais les virus sont les plus importantes causes identifiées. Elles sont généralement associées à un tableau clinique grave qui nécessite une hospitalisation. Au cours des dernières décennies, des avancées notables ont été faites dans le diagnostic des encéphalites virales. Cependant, une grande majorité des cas demeure inexpliquée. En outre, très peu d'études ont eu pour but d'identifier de façon spécifique l'agent viral impliqué et la plupart d'entre elles a été effectuée dans les pays développés. Par conséquent, plus de connaissances sont nécessaires en Afrique où les moyens de diagnostic sont limités ou parfois inexistants.

C'est dans ce cadre qu'un projet de recherche dénommé DEVINE « Détection de nouveaux virus impliqués dans les encéphalites chez l'homme en Afrique centrale et de l'Ouest » a été mis en place à travers une collaboration entre les instituts Pasteur de Dakar, de la Côte d'ivoire, de Bangui et l'Institut Pasteur à Paris. Dans le cadre d'une approche globale, des signatures biologiques en rapport avec les étiologies virales impliquées dans les cas d'encéphalites ont été recherchées en utilisant des outils de diagnostic spécifiques. Pour cela, des patients âgés de 15 ans ou plus et présentant une suspicion clinique d'une encéphalite virale aiguë ont été recrutés sur une période de trois années, au niveau de trois centres hospitaliers situés dans la région de Dakar.

L'identification rapide d'un agent étiologique peut aider à un traitement approprié et efficace et à temps du patient atteint d'encéphalite. Donc, le développement de tests de diagnostic rapides et fiables est crucial. Pour cela, dans le cadre d'une approche ciblée sur les encéphalites virales, nous avons réalisé une caractérisation moléculaire des souches récentes du virus de la rage provenant de différentes localités du Sénégal afin de voir si elles sont prises en compte par le vaccin disponible qui permet une protection contre le groupe phylogénétique 1 du virus de la rage (Bourhy *et al.,* 2008). En effet, la rage affecte un grand nombre d'espèces animales et présente une grande diversité génétique avec principalement quatre groupes phylogénétiques circulant en Afrique; les lignées Africa 1 et Africa 4 et les clades Africa 2 et Africa 3 (Bourhy *et al.,* 2008; Talbi *et al.,* 2009). En outre, une étude précédente a montré que c'est le clade Africa 2 qui

est principalement retrouvé en Afrique de l'Ouest et du centre (Talbi *et al.,* 2009). Ainsi, des outils de diagnostic capables de fournir une large détection du virus de la rage sont nécessaires. Actuellement, l'immunofluorescence directe (IF) est la technique « standard » pour la confirmation *post-mortem* d'une infection par le virus de la rage (rapport OMS, 2013; manuel OIE, 2016). Toutefois, pour surmonter les limites présentées par l'IF en terme de sensibilité sur les tissus décomposés ou prélevés en phase finale de la maladie et sur les prélèvements *ante-mortem* non neuronaux (manuel OIE, 2016; Fooks *et al.,* 2009; Dacheux *et al,* 2010), de nombreuses méthodes de PCR ont été développées et largement utilisées dans le diagnostic *intra-vitam* de la rage humaine (Dacheux *et al,* 2008; Coertse *et al.,* 2010; Wacharapluesadee *et al.,* 2012; Hayman *et al.,* 2011; Muleya *et al.,* 2012; Fischer *et al.,* 2014). Cependant, aucune d'elles n'a été validée sur une grande collection d'isolats africains avec une large diversité d'origine géographique, exceptée une méthode récente (Dacheux *et al.,* 2016). Toutefois, cette dernière présente des limites sur les isolats du clade Africa 2 circulant au Sénégal. Ainsi, sur la base des génomes complets obtenus, des tests de diagnostic moléculaire ont été développés pour une analyse fiable et à large échelle des échantillons suspects d'une infection par le virus de la rage qui est une cause d'encéphalite presque toujours fatale, principalement en Afrique.

Avec une implication sans cesse croissante des virus émergents dans les cas d'encéphalites, il est important d'avoir une approche sur le futur des étiologies virales pouvant être associées aux encéphalites. Ainsi, nous avons choisi l'exemple du virus Bagaza qui est un membre de la famille des *Flaviviridae* et du genre *Flavivirus,* mais appartenant au groupe Ntaya. Le virus Bagaza a été isolé pour la première fois en 1966 d'un pool de moustiques du genre *Culex* provenant de la République Centrafricaine (Digoutte., 1978). Depuis son premier isolement, le virus Bagaza n'a été isolé que chez des moustiques en Afrique de l'Ouest et du centre et en Inde (Diallo *et al.,* 2005; Bondre *et al.,* 2009). En septembre 2010, le virus Bagaza a été isolé en Espagne causant une encéphalite chez des oiseaux. Ce fut la première fois que ce virus a été isolé chez un vertébré (Aguëro *et al.,* 2011). Bien que quelques études se soient intéressées aux modes de transmission (Sudeep *et al.,* 2013; Sudeep *et al.,* 2015) et à la pathogénicité du virus Bagaza (Gamino *et al.,* 2012), peu de données existent sur sa diversité génétique globale. Ainsi, nous avons effectué une caractérisation moléculaire des isolats du virus Bagaza circulant au Sénégal afin de voir leurs caractéristiques génétiques et leur évolution phylogénétique depuis sa première isolation jusqu'en 2014. En outre, une étude sérologique menée en Inde a montré la présence d'anticorps

neutralisants anti-Bagaza dans des sérums de patients atteints d'encéphalites; suggérant que ce virus pourrait être capable d'infecter les humains (Bondre *et al.,* 2009). Ainsi, nous avons essayé d'évaluer la possibilité d'une adaptation du virus Bagaza à l'Homme. Les séquences ainsi obtenues pourraient être utiles non seulement dans des études futures telles que du «*pathogen-discovery»* chez l'Homme, mais également dans la production de réactifs et le développement d'outils de diagnostic ou de systèmes de génétique inverse pour le virus Bagaza.

2. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

2. 1. Objectif principal

L'objectif principal de ce travail a été d'identifier les agents viraux émergents ou ré-émergents responsables d'encéphalites aiguës chez des patients âgés de quinze ans ou plus au Sénégal et de mieux comprendre l'épidémiologie moléculaire récente des virus de la rage et Bagaza circulant au Sénégal, pouvant être impliqués dans ces cas d'encéphalites aiguës.

2. 2. Objectifs spécifiques

Pour atteindre l'objectif principal de ce travail, il est nécessaire de :

1. Réaliser une analyse moléculaire et sérologique des prélèvements issus de patients atteints d'encéphalite aiguë afin d'identifier une éventuelle signature biologique en lien avec l'agent étiologique suspecté (approche globale).

2. Analyser la phylogénie récente des isolats du virus de la rage circulant au Sénégal et développer des outils moléculaires efficaces pour un large diagnostic de la rage (approche ciblée).

3. Effectuer la caractérisation moléculaire des souches du virus Bagaza circulant au Sénégal en comparaison avec les séquences décrites précédemment dans d'autres pays, analyser son évolution avec une approche phylogénétique et évaluer l'évidence de sa possible adaptation future à l'Homme (approche « future »).

CHAPITRE 1 : APPROCHE GLOBALE SUR LES ENCÉPHALITES VIRALES AIGUËS AU SENEGAL

INTRODUCTION

Dans le cadre d'une approche globale sur les encéphalites virales au Sénégal, des patients avec un âge ≥ 15 ans, hospitalisés pour un tableau clinique d'encéphalite aiguë, ont été recrutés sur une période de deux années (de novembre 2011 à décembre 2013), au niveau de quatres services hospitaliers de la région de Dakar :

- ✓ La clinique des maladies infectieuses au centre hospitalier national universitaire de Fann;
- ✓ Le service de médecine interne au centre hospitalier universitaire Le Dantec;
- ✓ Le service d'anesthésie-réanimation au centre hospitalier universitaire Le Dantec;
- ✓ L'unité des soins intensifs à l'hôpital Principal.

Les prélèvements réalisés au niveau des structures sanitaires citées précédemment, sont acheminés à l'Institut Pasteur de Dakar et analysés en utilisant des techniques sérologiques et moléculaires. Les informations relatives aux prélèvements biologiques provenant des patients recrutés ont été enregistrées sur une base de données centrale sauvegardant les données cliniques et épidémiologiques de ces patients afin de constituer une bio-banque locale.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. 1. Le pays d'étude

Le Sénégal se trouve en Afrique de l'Ouest. Il est bordé par l'océan Atlantique à l'ouest, la Mauritanie au nord, à l'est par le Mali, la Guinée et la Guinée-Bissau au sud. Le Sénégal a une superficie de 196723 km^2 avec une population totale d'environ 14320055 habitants (banque mondiale, juillet 2016) (**Figure 3**). Le climat est tropical et sec avec deux saisons : une saison

sèche et une saison des pluies. Le Sénégal compte 14 régions et sa capitale s'appelle Dakar. La région de Dakar se situe à 14°41'37 Nord et -17°26'38 Ouest et diffère des autres régions par ses caractéristiques socio-économiques et urbaines. Environ 23% de la population sénégalaise (3 millions) y vivent (ANSD: rapport RGPHAE-2013).

Figure 3: Carte de l'Afrique de l'Ouest montrant la position géographique du Sénégal (en violet)

1. 2. Les critères d'inclusion ou d'exclusion

Les critères d'inclusion ont été définis comme tout patient avec un âge ≥ 15 ans, hospitalisé dans un des services partenaires de l'étude, pour une maladie progressive de moins de dix jours, présentant un niveau de conscience altéré depuis plus de 24 heures tel qu'une léthargie, une irritabilité ou un changement de personnalité ou de comportement. Une association de deux ou plus parmi les signes suivants est également prise en compte lors de l'inclusion ; à savoir une fièvre supérieure à 38°C, des crises et/ou des signes neurologiques focaux durant la maladie, une pléïocytose du LCR (> 4 globules blancs/mm^3 ou protéines > 0,4 g/L) sans évidence d'une méningite bactérienne (Granerod *et al.,* 2010). Cependant, tout patient diagnostiqué pour une infection bactérienne ou par le VIH est exclus de l'étude.

1. 3. Approbation éthique

Durant la période de l'étude, un formulaire de consentement éclairé a été signé par les patients recrutés ou par un de leurs parents ou proches si le patient était inconscient. Pour l'analyse des prélèvements, un code anonyme a été affecté à chaque patient. Ce code était relatif au service hospitalier au niveau duquel ils ont été inclus dans l'étude. L'utilisation de ces prélèvements cliniques pour une meilleure connaissance sur les agents étiologiques impliqués dans les encéphalites aiguës a été approuvée par le comité d'éthique nationale et par le comité d'éthique de la recherche de l'université Cheikh Anta DIOP de Dakar (UCAD de Dakar) (référence : Protocole 0131/2015/CER/UCAD).

1. 4. Types de prélèvements

Différents prélèvements biologiques ont été réalisés : LCR, prélèvements sanguins, prélèvements bucco-pharyngés et prélèvements de cerveau *post-mortem* lors d'une suspicion d'une infection par le virus de la rage, sur des patients présentant un tableau clinique

d'encéphalopathies. Ces prélèvements ont été accompagnés d'un questionnaire contenant les données cliniques et épidémiologiques relatives à une exposition spécifique, à un contact avec une personne infectée, aux facteurs de risque, à un voyage ou une maladie antérieure à l'apparition des symptômes et l'admission (**voir Annexes 1 et 2**), remplis et remis par le médecin traitant avant les analyses au niveau du laboratoire. En plus, des prélèvements supplémentaires ont été réalisés après dix jours d'hospitalisation ou lors de la visite de sortie, pour une confirmation des résultats obtenus lors des premières analyses.

1. 5. Analyses au laboratoire

Dans le but de mieux comprendre les agents étiologiques impliqués dans ces cas d'encéphalites aiguës, les prélèvements acheminés au laboratoire ont été d'abord analysés avec un premier panel de tests virologiques (**Tableau 2**). Ce premier panel concerne des tests détectant les causes plus communes et reconnues comme responsables d'encéphalites virales en utilisant l'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) et la RT-PCR (transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne) temps réel respectivement pour une détection spécifique des anticorps et des acides nucléiques (Innis *et al.,* 1989 ; Giri *et al.,* 2013 ; Chheng *et al.,* 2013). Ensuite, ces prélèvements ont été soumis à un second panel de tests concernant des causes d'encéphalites moins communes (**Tableau 2**). L'identification d'un agent étiologique non-viral a été caractérisée par une coloration de Gram ou une culture bactérienne positive à partir du LCR ou par une observation d'une forme asexuée du parasite *Plasmodium falciparum* dans le sang périphérique par une goutte épaisse ou un test de détection rapide (TDR) positif (**Tableau 2**). Parallèlement à ces tests de première ligne, un ensemble d'analyses biologiques telles que la biochimie du LCR, la glycorachie du LCR, la numération et la biochimie sanguines et la présence d'une leucopénie ou d'une thrombocytopénie, a été effectué pour permettre aux cliniciens de donner à temps une prophylaxie appropriée dans les cas de maladie sévère (Thakur *et al.,* 2016). Les échantillons (LCR et sérums) négatifs après toutes ces analyses ont été envoyés au niveau du laboratoire de référence à l'Institut Pasteur à Paris pour une analyse NGS afin d'élargir le spectre de détection de virus émergents et/ou ré-émergents potentiellement impliqués dans ces cas d'encéphalites aiguës.

Tableau 2: Description des différents tests effectués au laboratoire

Premier panel: Tests virologiques de première ligne	Second panel : Autres tests pour des causes moins communes
PCR sur le LCR	**Culture bactérienne sur le LCR**
• virus de l'herpès simplex 1/2	• *Mycobacterium tuberculosis*
• virus de la varicelle et du zona	• *Mycoplasma pneumoniae*
• cytomégalovirus	• *Listeria monocytogenes*
• virus Epstein-Barr	• *Borrelia burgdorferi*
• herpèsvirus humain 6/7	• *Leptospirosis*
• herpèsvirus humain 8	• *Legionella*
• pan-entérovirus non poliovirus	• *Salmonella*
PCR sur les prélèvements naso-pharyngés	• *Streptococcus*
• virus de la grippe A ou B	
PCR sur le sérum	
• arbovirus (dengue, West Nile, Zika VFVR, virus de la FHCC, Chikungunya)	
• pan-flavivirus	
• virus de la rage (lors d'une suspiçion clinique d'une infection par le virus de la rage)	
Sérologie	**Parasite (goutte épaisse)**
• arbovirus (dengue, West Nile, Zika VFVR, virus de la FHCC, Chikungunya)	• *Plasmodium falciparum*
• rougeole	
• rubéole	

LCR: liquide céphalo-rachidien
PCR: réaction de polymérisation en chaîne
VFVR: virus de la fièvre de la vallée du Rift
FHCC: fièvre hémorragique de Crimée Congo

1. 6. Techniques utilisées

1. 6. 1. Extraction des acides nucléiques

Les acides nucléiques (ARN et ADN) ont été extraits avec le kit *PureLink®Viral RNA/DNA Mini Kit* (Invitrogen, Etats-Unis) selon les recommandations du fabricant. Après la lyse des virus par le tampon L22 additionné à de la protéinase K, le lysat a été passé sur une colonne d'affinité. Après trois lavages avec le tampon W5, l'acide nucléique a été élué dans de l'eau stérile E3 du kit, puis conservé à -80°C.

1. 6. 2. RT-PCR temps réel

Les acides nucléiques extraits ont été analysés par RT-PCR temps réel en utilisant le kit *Quantitect® Probe RT-PCR Kit* (Qiagen, Heiden, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, selon le système de PCR utilisé, l'ARN ou l'ADN a été mélangé avec du mélange réactionnel composé du tampon (*QuantiTect Probe RT-PCR- master mix*), du couple d'amorces et de la sonde correspondante à 10 µM, de l'enzyme (*QuantiTect RT-mix*) et de l'eau sans RNase dans un volume final de 25 µL. Les tests ont été effectués sur une machine ABI 7500 Fast Real Time system cycler ou 7500 Real Time system cycler (Applied Biosystems, Foster City, Etats-Unis) en utilisant le programme suivant: une étape de transcription inverse à 50°C pendant 10 min, une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 minute, suivi par 40 cycles de 95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 1 minute. La phase de transcription est éliminée du programme lors de l'analyse ciblant l'ADN. Durant l'amplification, l'activité 5'-3' exonucléasique de la Taq polymérase (enzyme issue de la bactérie *Thermus aquaticus*) dégrade la sonde fixée sur la séquence cible et la fluorescence émise est mesurée par l'appareil. Les résultats de RT-PCR ont été analysés avec le logiciel 7500 (v2.0.1).

1. 6. 3. ELISA

Le test ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) est une méthode immuno-enzymatique permettant la détection et/ou le dosage d'une protéine (antigène ou anticorps) dans un liquide biologique grâce à l'utilisation d'un marqueur. Cette méthode permet de détecter les immunoglobulines (anticorps) dirigés contre un virus (**Figure 4**).

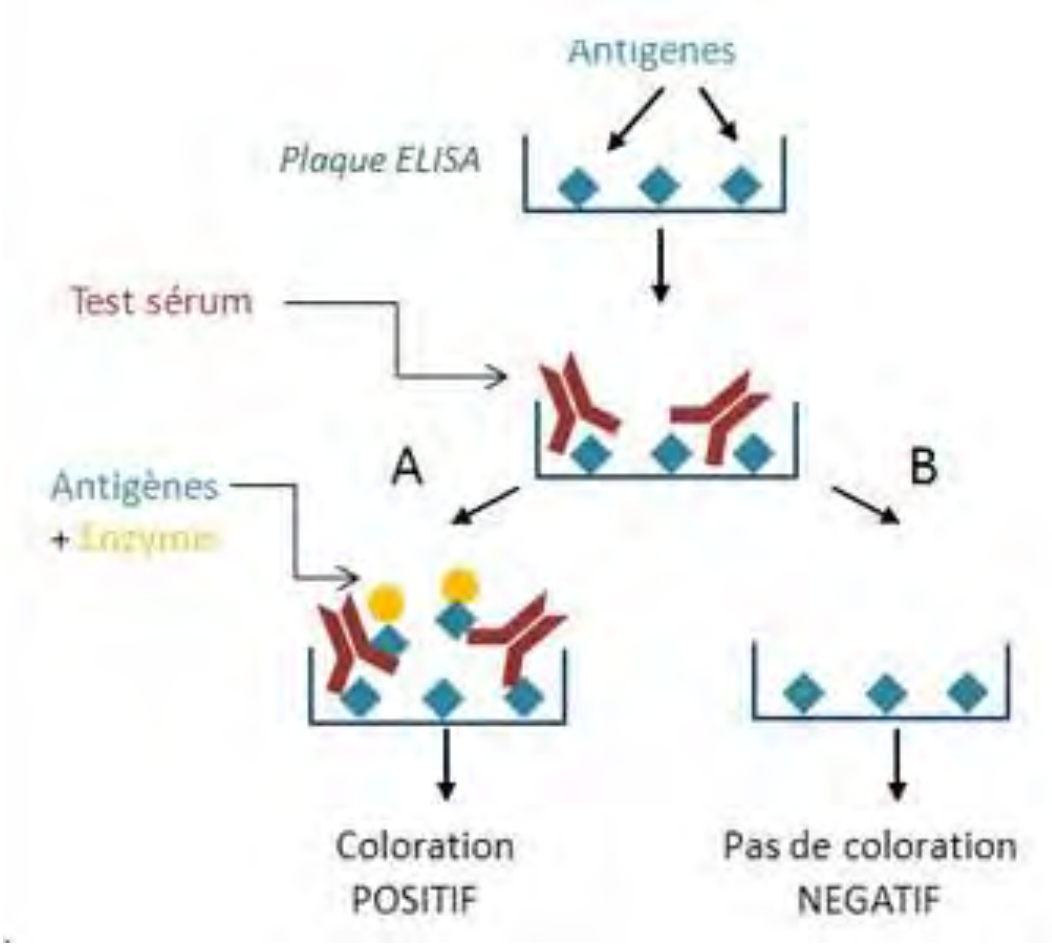


Figure 4: Schéma du principe de l'ELISA *Sandwich* indirecte pour la détection des anticorps dans le sérum

1. 6. 4. Séroneutralisation

Le principe consiste à inhiber le développement de l'effet cyto-pathogène d'un virus sur des supports cellulaires en présence de dilutions croissantes du sérum des patients à tester. Si cette inhibition est obtenue, on observe alors des cellules saines et on conclut à la présence d'anticorps neutralisants spécifiques d'un virus donné. Cette technique permet aussi de doser la quantité d'anticorps neutralisants présents dans un sérum (**Figure 5**).

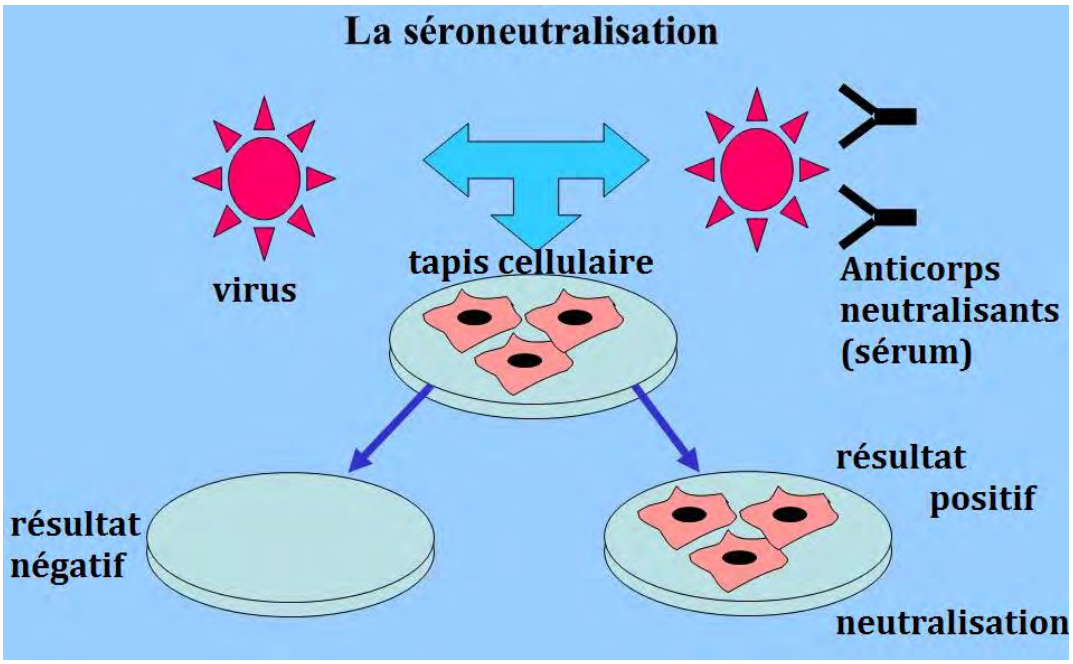


Figure 5: Schéma du principe de la séroneutralisation pour la détection d'anticorps neutralisants spécifiques

1. 7. Analyses statistiques

Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel R (version 3.0.2, *The R Foundation for Statistical Computing*). Les différences entre groupes d'âge entre les zones ont été comparées en utilisant le test exact de Fisher. Ensuite, nous avons analysés l'association entre les causes d'encéphalites identifiées et la zone, le sexe ou l'âge en utilisant le test du Chi^2. Un test statistique est considéré comme significatif lorsque la valeur de p-value obtenue est inférieure à 0,05.

2. RÉSULTATS

2. 1. Caractéristiques des patients recrutés dans cette étude

Au cours de cette étude, un prélèvement de LCR a été positif pour une bactérie appelée *Borrelia burgdorferi.* Par conséquent, le patient correspondant a été par la suite exclu de l'étude. Tous les patients inclus ont été diagnostiqués comme souffrant d'une encéphalite virale en accord avec les critères d'inclusions.

Au total soixante-trois patients présentant un tableau clinique d'une encéphalite virale aiguë ont été inclus durant la période d'étude. L'âge médian était de 26,5 ans (compris entre 15-86 ans) et le ratio homme/femme était de 1,86 (41/22). Parmi les patients inclus, 11% (n= 7) vivaient en zone rurale, 49% (n= 31) en zone péri-urbaine et 40% (n= 25) en zone urbaine (**Figure 6a**). La distribution des groupes d'âge n'était pas significativement différente entre les zones rurale, péri-urbaine et urbaine (p-value= 0,959) (**Figure 6b**).

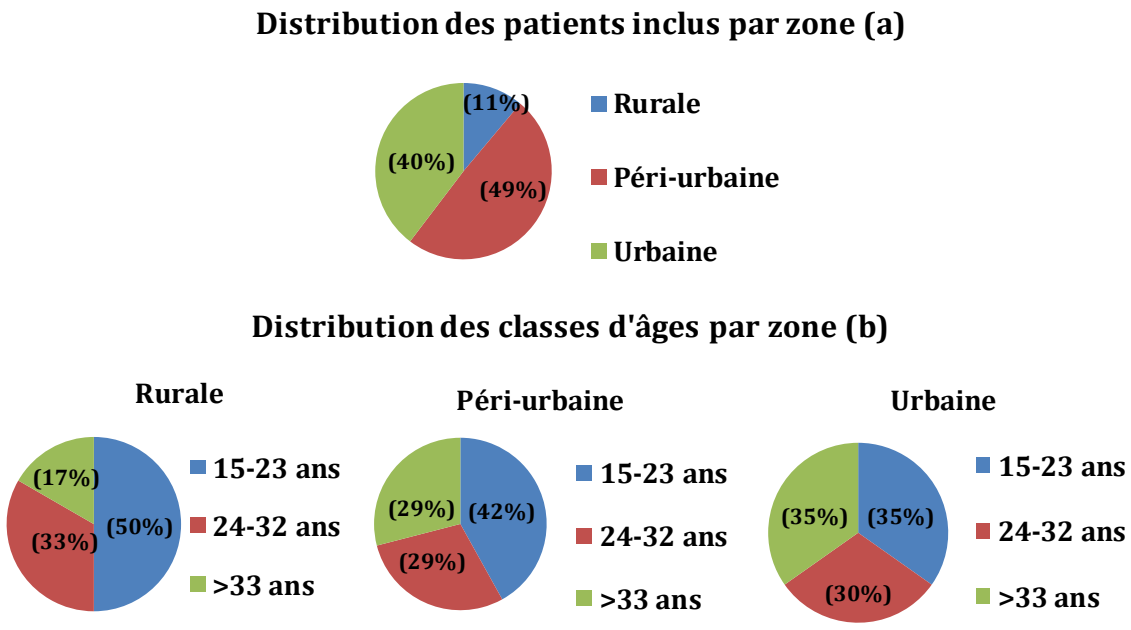


Figure 6: Distribution des patients inclus dans l'étude par zone (a) et distribution des classes d'âge en fonction de la zone (b)

2. 2. Premiers signes cliniques et symptômes neurologiques

Le temps médian entre l'apparition des premiers symptômes cliniques et l'hospitalisation était de 5 jours (entre 0 et 184 jours) tandis que le temps médian entre l'apparition des premiers signes neurologiques et l'hospitalisation était de 3 jours (entre 0 et 61 jours). A l'admission, les patients présentaient un certain nombre de symptômes. En dehors de la forte fièvre (T >38°C) qui était un critère d'inclusion avec une température médiane de 38,5°C (entre 35,7°C et 40,2°C), les symptômes les plus retrouvés ont été les céphalées avec 53,97%. Elles ont été suivies par un second groupe de symptômes neurologiques comprenant les convulsions (11,11%) et l'obnubilation (9,52%). Durant l'hospitalisation, les symptômes ont été majoritairement dominés par des vomissements (4,76%), une perte de conscience (4,76%), des hallucinations (4,76%), un état de coma (score de Glasgow ≤ 14; 4,76%), un déficit visuel (3,17%), une hémiplégie (3,17%), une paresthésie (1,59%), des rhinorrhées (1,59%), des délires (1,59%), une poly-arthralgie (1,59%) et une hypertension artérielle (1,59%) (**Figure 7**). La majorité des patients inclus présentaient une tachycardie (> 80 battements/minute) avec une fréquence cardiaque médiane de 101,01±18,06 battements/minute (compris entre 60-140 battements/minute avec 11 données manquantes). En outre, des tensions artérielles systolique et diastolique médianes respectives de 120 et 80 mmHg (120/80 mmHg); la tension artérielle étant normale quand elle est inférieure à 14/9 ou 140/90 mmHg.

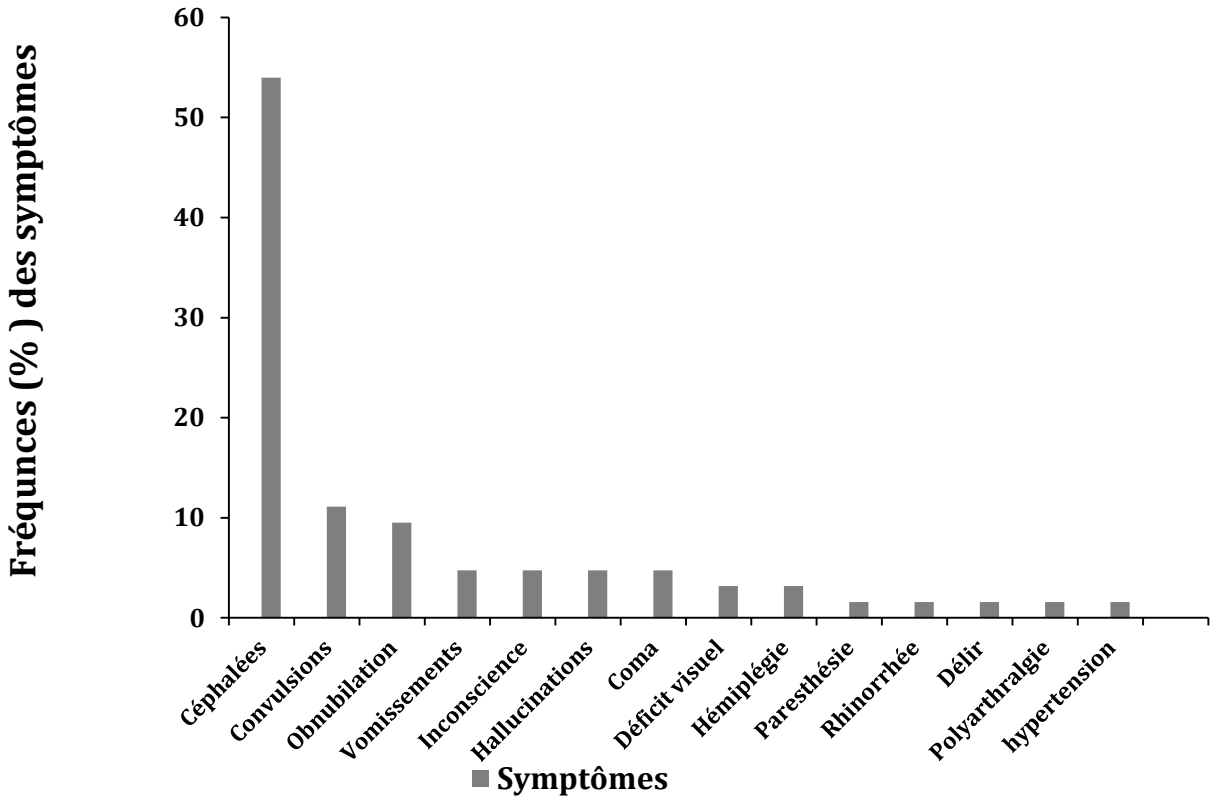


Figure 7: Présentation des symptômes et signes cliniques chez les patients recrutés

2. 3. Analyses biologiques au laboratoire

L'analyse des paramètres biologiques réalisée au laboratoire a montré que 49% des patients avaient une thrombocytopénie (un taux normal de plaquettes sanguines compris entre 150-400giga/L) et 17% présentaient une hypokaliémie (une quantité normale de potassium dans le sang variable entre 3,5-4,5mmol/L). Pour les paramètres biologiques du LCR, le nombre médian de globules blancs était de 6 globules blancs/mm3 (5-130; > 4 globules blancs/mm3) et une protéinorachie médiane de 0,6 g/L (0,5-12; > 0,4 g/L).

2. 4. Présentation des étiologies identifiées

Les résultats montrent qu'aucun patient n'a été infecté par le HSV-2, les entérovirus, le VZV, le virus WN, le virus de la FHCC, le virus Chikungunya, le virus de la dengue, le virus de la rage, les virus de la rougeole ou de la rubéole. En effet, chez 63,5% (n= 40; entre 15-86 ans) des cas d'encéphalites répertoriés, aucune origine virale n'a été identifiée. Cependant, une étiologie virale a été identifiée chez vingt-trois patients (36,5%) dont six étaient des cas de co-infections de deux pathogènes. Parmi les causes identifiées, nous avons enregistré une part significative de paludisme chez quinze patients (17-74 ans) identifiée sur la base des tests rapides. Nous avons également détecté les virus des grippes A et B par PCR temps réel (n= 4; 22-79 ans). L'ADN des herpèsvirus humains a été détecté par RT-PCR temps réel dans le LCR de neuf patients, impliquant le HSV-1 (n= 1; 19 ans), l'EBV (n= 4; 17-82 ans), le CMV (n= 3; 22-38 ans) et le HHV-6 (n= 1; 33 ans). Deux patients (23-34 ans) ont été infectés par le VFVR. Ils présentaient des anticorps de type IgM dans leurs sérums mais la détection de l'ARN viral dans le sérum par PCR a été négative. En outre, un agent viral présentant une homologie de 96% avec la souche du virus *Dézidougou* (DEZV; ArA20086) a été identifié par séquençage haut débit (NGS) dans le LCR d'un patient de 52 ans. Membre du groupe taxonomique appelé Negevirus, le virus *Dézidougou* a été isolé pour la première fois en 1987 à l'Institut Pasteur de Dakar, à partir d'un lot de moustique *Aedes aegypti* collecté dans la localité de Dézidougou en Côte d'ivoire (**Tableau 3**).

Tableau 3: Résutats des tests de première ligne effectués au laboratoire

	Pathogène	Nombre de cas concernés	Pourcentage (%)	Tranche d'âge (ans)
	inconnu	**40**	**63,5**	**15-86**
	Plasmodium	**15**		**17-74**
	virus de la grippe	**4**		**22-79**
herpèsvirus	**virus Epstein-Barr**	**4**		**17-82**
	cytomégalovirus	**3**	**36,5**	**22-38**
	virus de l'herpès simplex 1	**1**		**19**
	6ème herpèsvirus humain	**1**		**33**
arbovirus	**virus de la fièvre de la vallée du Rift**	**2**		**23-34**
	virus proche-*Dezidougou*	**1**		**52**

2. 5. Les cas de co-infections et les cas de décès

Le diagnostic de laboratoire a également révélé la détection de plus d'un agent pathogène chez le même patient; conduisant parfois à des décès. Parmi eux, quatre cas de décès non associés à aucune cause connue ont été enregistrés. En outre, nous avons pu noter trois cas de co-infection *Plasmodium*-CMV, un cas de co-infection *Plasmodium*-grippe (A), un cas de co-infection CMV-VFVR et un cas de co-infection EBV-grippe (A). Nous avons enregistré onze cas de décès (17,46%) dont quatre restent sans aucune cause identifiée, trois infectés par le parasite *Plasmodium,* un cas positif pour les grippes A et B, un cas infecté par le HSV-1, un cas de co-infection *Plasmodium*-HHV-6 et enfin un cas de co-infection EBV-grippe (A) (**Figure 8**).

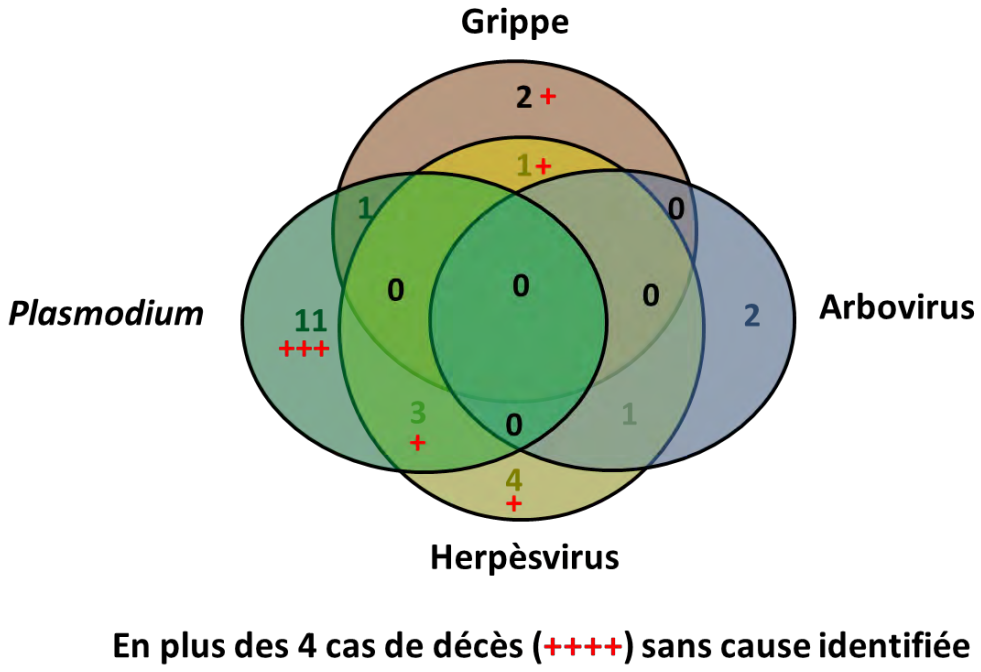


Figure 8: Répartition des causes identifiées et les cas de co-infection.

2. 6. Distribution des causes en fonction de l'habitat, du sexe et de l'âge

Dans notre étude, nous n'avons pas noté une évidence d'une association entre les causes identifiées et la zone d'habitation (p-value= 0,058) ou le sexe (p-value= 0,471). Cependant, le paludisme affectait légèrement plus les patients âgés entre 15-23 ans (53%). Les herpèsvirus humain et les arbovirus ont été retrouvés principalement dans les classes d'âge de 15-23 ans (respectivement 56% et 44%) et de 24-32 ans (respectivement 33% et 67%) tandis que le virus de la grippe a touché légèrement plus les patients âgés de plus de 33 ans (50%). Les cas d'encéphalites sans aucune cause identifiée ont été retrouvés dans les trois classes d'âge approximativement avec les mêmes taux (environ 30%). Malgré ces légères différences observées dans la distribution des causes en fonction de l'âge, il n'y a pas une évidence d'une association (p-value= 0,309) (**Figure 9**).

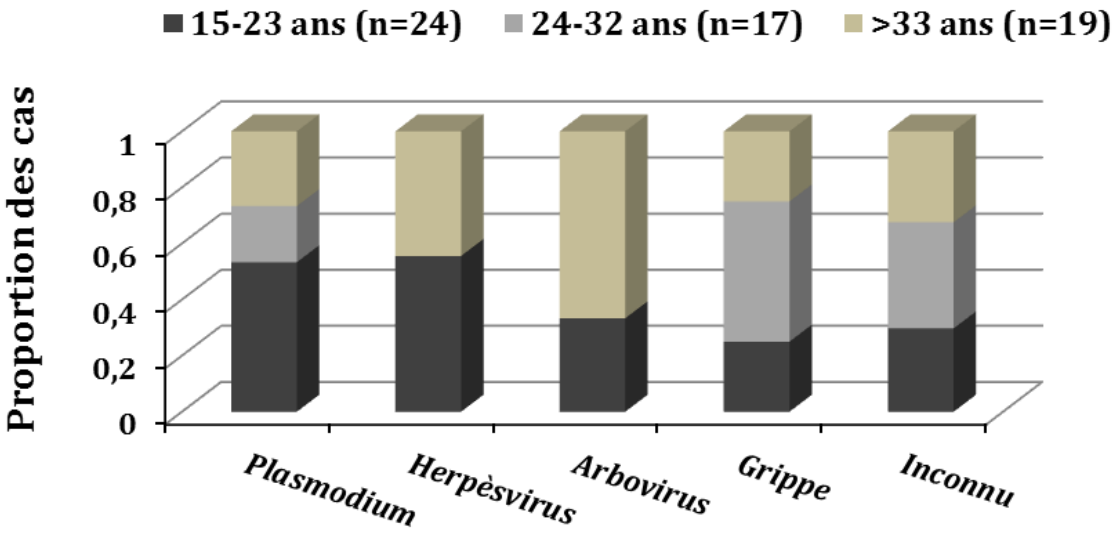


Figure 9: Distribution des causes d'encéphalites identifiées en fonction des classes d'âge

2. 7. Distribution trimestrielle cumulée des agents pathogènes identifiés

Un nombre moyen de vingt et un patients (entre 16-26) par an a été recruté au cours de l'étude. L'analyse de la distribution trimestrielle cumulée des étiologies a montré que les agents pathogènes identifiés ont été enregistrés au cours du troisième et du quatrième trimestre. Toutefois, 69% (16/23) des pathogènes identifiés ont été enregistrés dans le quatrième trimestre avec sept cas de *Plasmodium*, deux cas de co-infection *Plasmodium*-herpèsvirus, un cas de co-infection *Plasmodium*-grippe, un cas d'herpèsvirus, un cas de co-infection herpèsvirus-arbovirus, deux cas d'arbovirus, et deux cas de grippe (**Figure 10**).

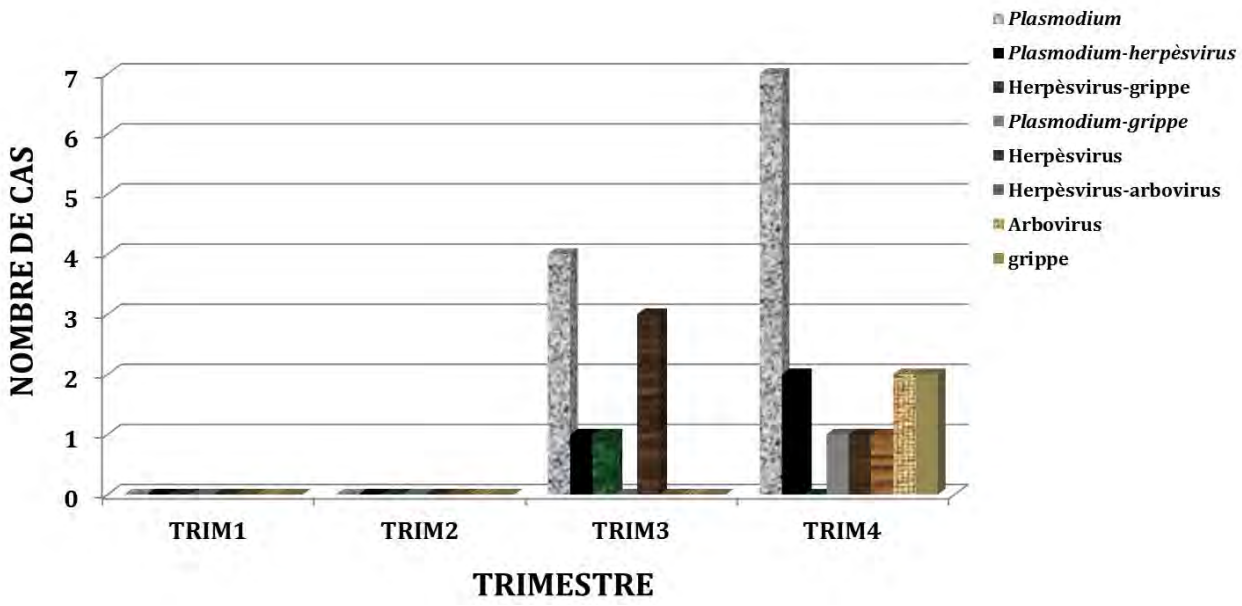


Figure 10: Distribution trimestrielle cumulée des causes d'encéphalite identifiées dans les trois centres hospitaliers, Dakar, Sénégal, novembre 2011-décembre 2013.

3. DISCUSSION

Partout à travers le monde, les encéphalites peuvent être causées par plus d'une centaine de virus présentant souvent des différences en terme de distribution ou d'incidence. Malgré l'utilisation des techniques modernes de laboratoire, la grande majorité des encéphalites virales reste toujours inexpliquée (Steiner *et al.,* 2010). Ainsi, le challenge des chercheurs est de fournir un diagnostic rapide et fiable devant un cas d'encéphalite virale. Dans notre étude multicentrique, les critères d'inclusion ont été l'admission au niveau des trois centres hospitaliers de l'étude situés dans la région de Dakar, un âge supérieur ou égal à quinze ans et un tableau clinique d'encéphalite virale aiguë évoluant depuis moins de dix jours. La majorité des patients inclus dans cette étude présentait des céphalées, souvent accompagnées de complications neurologiques et d'autres signes cliniques retrouvés également lors de l'infection par d'autres agents pathogènes non viraux. Malgré l'utilisation d'un panel de tests virologiques de première ligne, la majorité des patients inclus dans notre étude reste également sans aucune cause identifiée comme cela a été le cas dans des études descriptives précédentes (Michael *et al.,* 2010; Bell *et al.,* 2009; Nwosu *et al.,* 2001). Cependant, cette grande part de cause inexpliquée dans cette étude pourrait être due en partie à l'hospitalisation tardive de certains patients à un stade avancé de l'infection, associée à la distance séparant le lieu d'origine au centre hospitalier. D'autre part, ces cas d'encéphalites inexpliqués pourraient être la signature d'agents non viraux ou de virus émergents.

Cependant, plus du tiers des patients inclus dans cette étude ont été associés à une cause infectieuse identifiée appartenant soit aux herpèsvirus, aux arbovirus ou au virus de la grippe. Cependant, nous avons noté un très faible niveau d'infection avec les HSV-1/2. En effet, d'une façon surprenante, nous n'avons trouvé qu'un seul cas de HSV-1, malgré la réalisation d'un diagnostic moléculaire ciblant tous les herpèsvirus dans cette étude, et pour lequel les résultats ont été confirmés par le laboratoire de référence. Le patient infecté avec le HSV-1 était une jeune femme de dix-neuf ans, habitant en zone péri-urbaine et hospitalisée durant la fin du mois d'août 2011 au niveau de la clinique des maladies infectieuses du CHNU de Fann. Avec une apparition des premiers symptômes sept jours avant son hospitalisation, la patiente souffrait de céphalées. A l'admission, elle présentait une fièvre avec une température maximale de 39,9°C, une septicémie sévère ou choc septique avec une tachycardie. Au cours de son hospitalisation, cette patiente présentait un début d'hydrocéphalie, des toux, un

syndrome méningé (maux de tête, signes de Kernig, raideur de la nuque) et était dans le coma avec un score de Glasgow de 7. Elle était décédée au bout de six jours d'hospitalisation.

En outre, aucun cas de VZV n'a été détecté au cours de cette étude. Ces résultat diffèrent de ce qui a été décrit dans des études précédentes en Europe (Venkatesan *et al.,* 2013; Bernard *et al.,* 2013; de Ory *et al.,* 2013; Silva., 2013) ou même en Asie (Tan *et al.,* 2014; Olsen *et al.,* 2015). Nous avons également identifié l'ADN d'autres herpèsvirus tels que le CMV, l'EBVet le HHV-6 dans le LCR de quelques patients, parfois en co-infection avec d'autres agents étiologiques. En effet, l'EBV ou le HHV-6 a été impliqué dans un cas de co-infection ayant conduit au décès d'un patient comme décrit dans d'autres études précédentes (Akkoc *et al.,* 2016; Ogata, 2016). Bien qu'ils représentent d'autres causes majeures d'encéphalite virale (Ho Dang Trung *et al.,* 2012; de Ory *et al.,* 2013; Tan *et al.,* 2014), les entérovirus n'ont été associés à aucun cas d'encéphalite inclus dans cette étude. La nature des prélèvements analysés au cours de cette étude, différente des fécès sur lesquels les entérovirus sont le plus souvent détectés, pourrait être un facteur limitant (Faleye *et al.,* 2016b).

Avec les épidémies et les épizooties enregistrées dans le monde au cours des dix dernières années, la grippe représente un problème sérieux de santé publique pouvant se produire dans une zone géographique donnée et parfois capable de dépasser les barrières géographiques et se propager avec une large distribution. Sa détection chez certains patients inclus dans cette étude montre son implication rare mais réelle dans les cas d'encéphalite aiguë. Ainsi à côté de la surveillance nationale effective pour la grippe au Sénégal, une prise en charge rapide des cas aigus serait importante afin de réduire de manière considérable les risques de mortalité surtout chez les individus immunodéprimés (Goenka *et al.,* 2014).

La présence d'anticorps IgM dans le sérum de deux patients infectés par le VFVR a coïncidé avec la circulation de ce virus au Sénégal de septembre à décembre 2013 avec des cas sporadiques humains, chez le bétail et chez les moustiques dans différentes localités du pays (Sow *et al.,* 2016a). Le premier cas était un jeune homme de vingt-trois ans, agriculteur habitant en zone rurale et travaillant en contact avec le bétail. Il a été hospitalisé à la fin du mois d'octobre 2013 au niveau du service d'Anesthésie-Réanimation du CHU Le Dantec. Les premiers symptômes apparus neuf jours avant son hospitalisation, étaient constitués de céphalées associées à un syndrome grippal (asthénie, sensation de fièvre) et à des symptômes digestives comme la perte de l'appétit. A l'admission, le patient avait une fièvre avec une

température maximale de 38,3°C et une tachycardie. Durant son hospitalisation, des symptômes neurologiques associés à une perte de conscience (score de Glasgow de 10) et des troubles de comportement comme l'apathie ont été enregistrés comme ce qui a été montré par une étude précédente menée sur le VFVR (Ikegami & Makino, 2011). D'autres symptômes tels que des toux, des crachats et un déficit neurologique moteur accompagné d'une évolution du patient vers une hémiplégie droite ont été également observés chez ce patient. Durant la même période, un second cas d'infection par le VFVR a été trouvé. Il s'agissait d'une femme de 34 ans hospitalisée au niveau du service de neurologie du même hôpital au début du mois de novembre 2013. Vivant également en zone rurale, la patiente menait ses activités en contact avec les vaches, les chevaux et les moutons. Avant son hospitalisation, les premiers symptômes étaient constitués d'une fièvre suivi de maux de tête. Au cours de son hospitalisation, un déficit neurologique moteur a été observé comme pour le premier patient. Elle présentait également une cécité transitoire comme précédemment décrite pour une infection par le VFVR (Ikegami & Makino., 2011). Cette période de la circulation du VFVR en 2013 coïncidait au mois précédent la fête de l'*Aïd El Kebir* qui est une célébration musulmane majeure (OIE, 2013). Durant cette période, il existe une importation fréquente du bétail en provenance des pays frontaliers, en majorité de la république de Mauritanie où le VFVR a connu des émergences fréquentes (Sow *et al.,* 2014). Ainsi, l'érection de marchés de moutons dans les grandes villes du pays comme Dakar et Mbour associée à l'abondance simultanée des principaux vecteurs du VFVR (*Aedes vexans* et *Culex poicilipes*), aux fortes pluies inhabituelles et aux changements écologiques tels que la déforestation et les pratiques agricoles constituent des facteurs de réémergence du virus (Talla *et al.,* 2014; Soti *et al.,* 2012). En général, responsable d'épidémies chez le bétail associées à une forte mortalité, le VFVR peut également affecter les humains par contact avec les fluides ou tissus animaux infectieux ou par piqûre de moustiques. Ainsi, il est souvent une cause d'encéphalite virale pouvant évoluer jusqu'au coma (Caroline *et al.,* 2016).

L'utilisation d'une technique moderne comme le NGS à la suite des tests de première ligne a permis d'élargir notre spectre de détection de pathogènes émergents ou ré-émergents pouvant être impliqués dans ces cas d'encéphalite. Le patient infecté avec un virus proche-*Dezidougou* était un assistant social de cinquante-deux ans, habitant en zone péri-urbaine avec aucun historique de voyage à l'étranger. Il a été hospitalisé au début du mois de juillet 2012 au niveau du service de neurologie du CHNU de Fann. Les premiers symptômes étaient apparus

1 jour avant son hospitalisation et le patient présentait des céphalées. A l'admission, le patient avait une fièvre avec une température maximale de 38°C accompagnée d'une hypertension (150/80 mmHg). Au cours de son hospitalisation, le patient présentait des symptômes digestifs associés à des vomissements. Un déficit neurologique moteur a été également observé. Des symptômes neurologiques tels que des signes extrapyramidaux et de signes de Babinski montrant une lésion du SNC ont été enregistrés chez le patient. Le patient était toujours hospitalisé dix jours avec une persistance du déficit neurologique moteur. Ainsi, la détection d'un virus proche du virus Dezidougou montre qu'une surveillance épidémiologique des arbovirus, utilisant une approche syndromique basée sur les encéphalites et associée aux données épidémiologiques de terrain, pourrait être un moyen intéressant pour évaluer l'incidence de la maladie causée par les arbovirus connus circulant au Sénégal et découvrir d'autres virus émergents en utilisant les techniques modernes de laboratoire. La détection de deux agents pathogènes chez le même individu pourrait être un facteur de risque clef pour le développement d'une encéphalite; l'infection par le premier pathogène causant parfois un état d'immunodépression sévère. Néanmoins, la promptitude dans le diagnostic et le rendu des résultats a fortement participé à la prise en charge efficace et à temps des patients par les médecins.

Cependant, bien que la prédominance des encéphalites virales soit légèrement plus élevée chez les patients de sexe mâle tel que décrit dans une étude précédente (Madrid *et al.,* 2014), nous n'avons noté aucune évidence d'une variation des causes d'encéphalites identifiées en fonction de la zone d'habitation, du sexe ou même de l'âge. Une plus grande proportion d'agents pathogènes identifiés a été enregistrée dans le quatrième trimestre. En général, cette période coincide avec la fin de la saison des pluies au Sénégal et correspond à la période de forte circulation de plusieurs pathogènes, en particulier les arbovirus et le parasite du paludisme (Niang *et al.,* 2016; Sow *et al.,* 2016b). En outre, la présence élevée du paludisme dans cette étude pourrait être associée à sa forte incidence dans les pays d'Afrique sub-saharienne (Ceesay *et al.,* 2012). Sur la base des signes cliniques et des tests biologiques, le paludisme cérébral a été identifié par les médecins chez 23% (n= 15) des patients dont 3 cas de co-infections avec du CMV, de la grippe A et du HHV-6. Ce dernier cas de co-infection a conduit au décès du patient infecté. Ce cas pourrait être associé au paludisme cérébral qui cause entre 10% et 15% de mortalité (Mishra *et al.,* 2006) ou à un syndrome neurologique post-infection après un paludisme sévère non-cérébral (Caetano *et al.,* 2016). Considéré

également comme une « possible » étiologie dans plusieurs cas, le paludisme peut ainsi masquer d'autres agents viraux comme le virus de la rage tel que décrit dans une étude précédente (Mallewa *et al.,* 2007). Ainsi, il serait important d'avoir des outils performants pour un diagnostic rapide et efficace devant des cas d'encéphalite virale. Pour cela, une meilleure connaissance de l'épidémiologie moléculaire des virus responsables d'encéphalites circulant dans la zone géographique est nécessaire.

CONCLUSION

Les encéphalites virales représentent des affections graves dont l'étiologie est inexpliquée dans la majorité des cas. Elles sont généralement associées à un tableau clinique qui requiert l'hospitalisation. Dans une approche globale, nous avons montré la première description des encéphalites aiguës chez des patients avec un âge ≥ 15 ans, dans la région de Dakar au Sénégal, avec un focus spécial sur les encéphalites virales. En dépit de l'utilisation de plus en plus fréquente du séquençage à haut débit NGS, l'étiologie reste non identifiée dans la majorité des cas d'encéphalite. Cependant, la mise en place d'une surveillance hospitalière active des encéphalites virales basée sur un réseau de laboratoires pourrait maximiser les chances de détecter d'autres agents pathogènes moins connus tels que le virus Goutanap (Kallies *et al.,* 2014), fournir des données plus larges, permettre de donner une prophylaxie efficace aux malades et prendre à temps des mesures de santé publique.

CHAPITRE 2 : APPROCHE CIBLÉE SUR LES ENCÉPHALITES VIRALES AIGUËS AU SENEGAL

INTRODUCTION

Bien que la majorité des encéphalites soit toujours inexpliquée, l'avènement des techniques de biologie moléculaire a apporté une nette amélioration dans le diagnostic des encéphalites virales au cours des dernières années. Par ailleurs, une meilleure connaissance de l'épidémiologie moléculaire des virus potentiellement impliqués dans les cas d'encéphalites humaines et la mise au point de techniques plus spécifiques favorisent un diagnostic plus performant. La rage est responsable d'une encéphalite presque toujours fatale. Elle est causée par un virus qui présente une grande diversité génétique avec principalement quatre groupes phylogénétiques circulant en Afrique (Bourhy *et al.,* 2008; Talbi *et al.,* 2009). Ainsi, dans le cadre de cette étude, nous avons réalisé la caractérisation de souches de la rage circulant au Sénégal et sélectionnées à partir de la sérothèque de l'IPD sur une période de quinze années. Dans le but de voir si le vaccin disponible pour l'Homme prend en compte ces souches du Sénégal, nous avons utilisé une analyse phylogénétique. Sur la base de cette analyse phylogénétique, deux systèmes de RT-PCR quantitatives (RT-qPCR) spécifiques et plus adaptés pour la détection du virus de la rage dans le contexte africain ont été également développés et validés en termes de performances analytiques et diagnostiques.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. 1. Choix des couples d'amorces

Nous avons réalisé des alignements multiples sur la base des précédentes séquences complètes des isolats étudiés, disponibles sur la base de données Genbank. Pour cela, nous avons utilisé l'algorithme Muscle implémenté dans le logiciel MEGA 7.0 (Kumar *et al.,* 2016). Sur la base de ces alignements multiples, des couples d'amorces chevauchants ont été dessinés en utilisant le logiciel en ligne Primer3® (version 4.0.0, Whitehead Institute for Biomedical Research), de façon à couvrir le génome viral. Pour prédire toute détection non-spécifique des virus de la même famille, les amorces choisies ont été soumises à une analyse BLAST sur NCBI. Les amorces dessinées ont été synthétisées chez TIBMol-Biol (Berlin, Allemagne) et reconstituées selon les recommandations du fabricant (**Tableaux 4**).

Tableau 4 : Description des amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire du virus de la rage

Nom de l'amorce	Séquence 5'-3'	Direction	Région	Thyb (°C)
SN3race243R	AGCTTGGCAGCATTCATGCCTG	Antisens	nucléoprotéine	53
SN3race298R	TGCTGCTGCCAAGTAGGAACAT	Antisens	nucléoprotéine	53
N127	ATGTAACACCTCTACAATGG	Sens	nucléoprotéine	56
N8m	CAGTCTCYTCNGCCATCTC	Antisens	nucléoprotéine	56
SNRV1342F	TATGTKTCAGTCAGTTCC	Sens	nucléoprotéine	55
SNRV2939R	TCRTCCCAAGTGATCTCY	Antisens	matrice	55
SNRV2745F	ATATTCYGGAAAYCACAGRAT	Sens	matrice	53
SNRV4280R	TGAGACGTCTRAAACTCACTG	Antisens	glycoprotéine	53
M220	TGGTGTATCAACATGRAYTC	Sens	matrice	53
SNG5444R	GGTCATCATAGACCTCYC	Antisens	glycoprotéine	53
G4836-S3	GGRARRGTYATATCTTCNTGGGA	Sens	glycoprotéine	54
PV08	GGTCTGATCTRTCWGARYAATA	Antisens	polymérase L	54
L7386-AS3	CTRTCBGARTARTADAYCCANGACTT	Antisens	polymérase L	54
SNRV5318F	GGGCTGGATCATCTATGCTT	Sens	glycoprotéine	53
SNRV6304R	TTGATGACCTCGTAGCCTGA	Antisens	polymérase L	53
SNRV6281F	TGYGGAAAYTCCGGCTAT	Sens	polymérase L	54
SNRV8504R	GCTCRCTGAGAAATCGRG	Antisens	polymérase L	54
Taq3long	ATGAGAAGTGGAAYAAYCATCA	Sens	polymérase L	54
L9633-AS3	TTGCYRTATATGTTGACAGG	Antisens	polymérase L	54
SNRV8401F	TTCAGAGTTYAGAGAGGCRAT	Sens	polymérase L	53
SNRV9648R	ATGTTAACAGGGAAGATTGTT	Antisens	polymérase L	53
SNRV9263F	ATGTTYCAGCCATTGATGCTT	Sens	polymérase L	54
SNRV10590R	TGAAYACAAGCTTRGCATCYG	Antisens	polymérase L	54
SNRV10331F	TGCTCTGCTCAACAGGTT	Sens	polymérase L	53
SNRV11932R	ACGCTTAACAAATAAACAACA	Antisens	5'NC	53
SN5race11566F	GGTCTGGTGACACCCCGGTCTTCA	Sens	polymérase L	55
SN5race11615F	GAGTCTGTCATCTCACTGGATCA	Sens	polymérase L	55

5'NC : Extrémité 5' non-codante **Thyb :** Température d'hybridation des amorces

Y : C ou T W : A ou T N : A, C, G ou T D : non C (A, C ou T) K : G ou T R : A ou G

1. 2. Les isolats du virus de la rage utilisés

Dans cette étude, nous avons réalisé une caractérisation moléculaire de dix-huit isolats du virus de la rage provenant de différentes localités du Sénégal, sur une période allant de 2001 à 2015. Ces isolats du virus de la rage proviennent de la collection du centre national de référence de la rage (CNR-rage) situé à l'Institut Pasteur de Dakar (IPD) (**Tableau 5**).

Tableau 5: Description des isolats du virus de la rage utilisés dans cette étude

Isolats	Origine	Année d'isolement	Espèce (hôte)
SH155966SEN	Dakar	2001	*Homo sapiens* (humain)
SH177846SEN	Dakar	2005	*Homo sapiens* (humain)
SH184393SEN	Dakar	2005	*Homo sapiens* (humain)
SA194858SEN	Dakar	2008	*Canis lupus familiaris* (chien)
SA204014SEN	Dakar	2010	*Canis lupus familiaris* (chien)
SA206776SEN	Dakar	2010	*Canis lupus familiaris* (chien)
SA221203SEN	Dahra	2011	*Mellivora capensis* (ratel)
SA217694SEN	Linguère	2011	*Canis lupus familiaris* (chien)
SA217695SEN	Dahra	2011	*Canis lupus familiaris* (chien)
SA217750SEN	Dahra	2011	*Canis lupus familiaris* (chien)
SH218152SEN	Dakar	2011	*Homo sapiens* (humain)
SA252888SEN	Dakar	2013	*Canis lupus familiaris* (chien)
SA252913SEN	Diamniadio	2013	*Canis lupus familiaris* (chien)
SA262037SEN	Dakar	2013	*Canis lupus familiaris* (chien)
SA262503SEN	Dakar	2014	*Canis lupus familiaris* (chien)
SA262518SEN	Dakar	2014	*Canis lupus familiaris* (chien)
SA267115SEN	Dakar	2014	*Canis lupus familiaris* (chien)
SA272282SEN	Dakar	2015	*Canis lupus familiaris* (chien)

Les prélèvements humains proviennent de la clinique des maladies infectieuses du CHNU de Fann.

Les prélèvements animaux proviennent de l'école inter-Etats des sciences et médicine vétérinaires de Dakar (EISMV) et des différentes structures vétérinaires du pays.

SEN: Sénégal

1. 3. RT-PCR classique et séquençage

Les ARNs ont été extraits à partir des stocks viraux de différents isolats comme précédemment décrit (**Chapitre 1 : 1. 7. 1.**). La transcription inverse (RT) a été réalisée avec le kit AMV (Promega, Etats-Unis) selon les recommandations du fabricant. Un volume de 1 µL d'amorce antisens a été ajouté à 10 µL d'ARN viral, puis chauffé à 95°C pendant 2 minute. Ce mélange a été ajouté à un second mix constitué de 4 µL de tampon, 0,2 µL de RNasine, 3,5 µL de désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) (10 mM), 0,25 µL d'enzyme et 0,8 µL d'eau, puis incubé à 42°C pendant 1 heure. L'ADN complémentaire (ADNc) ainsi obtenu à partir de la matrice d'ARN, a été ensuite amplifié avec le kit GoTaq (Promega, Etats-Unis) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, 5 µL d'ADNc ont été additionnés d'un mélange contenant 10 µL de tampon 5X, 5 µL d'amorce sens (100 ng/µL), 5 µL d'amorce antisens (100 ng/µL), 5 µL de dNTP (10 mM), 3 µL de MgCl2 (25 mM), 16,5 µL de H2O, et 0,5 µL de Taq polymérase. La PCR consiste en une étape de pré-PCR à 95°C pendant 5 minutes, suivie d'une étape d'amplification de 40 cycles (dénaturation pendant 1 minute à 95°C, hybridation pendant 1 minute en fonction de la température de fusion des amorces et élongation à 72°C pendant un temps T dépendant de la taille du produit de PCR) et d'une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C. La vérification du produit de RT-PCR s'est faite par migration sur un gel à 1% d'agarose additionné de bromure d'éthidium (BET). Les produits obtenus ont été soumis à un séquençage Sanger chez Beckmann-Coulter (Angleterre). Les extrémités non-codantes (NC) ont été séquencées en utilisant les kits 5'et 3' *Rapid Amplification cDNA Ends* (RACE) (Invitrogen, Etats-Unis) selon les recommandations du fabricant.

1. 4. Analyse phylogénétique

Sur la base des génomes complets obtenus, une analyse bayésienne a été effectuée pour l'évaluation de la qualité des données de séquences et la sélection du modèle de substitution nucléotidique le mieux adapté. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel MEGA 7.0 (Kumar *et al.,* 2016) avec une distribution gamma discrète (+G) à 5 catégories. Ainsi, un total de vingt-

quatre différents modèles de substitution nucléotidique a été testé. Le modèle avec le plus faible score BIC (*Bayesian Information Criterion*) a été considéré comme décrivant le meilleur modèle de substitution nucléotidique. Les arbres phylogénétiques ont été tracés avec le programme en ligne de commande FastTree (Price *et al.,* 2010), en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance avec le modèle de substitution nucléotidique approprié. Les nœuds ont été marqués par valeurs de support local calculées avec le test de *Shimodaira-Hasegawa* (SH-like) pour 5000 réplications.

1. 5. Développement d'outils moléculaires de diagnostic pour la rage

1. 5. 1. Choix des amorces et sondes

Sur la base de la phylogénie actuelle des isolats du virus de la rage circulant au Sénégal, deux systèmes de RT-qPCR ont été mis en place pour une large détection du virus, en particulier des isolats circulant en Afrique. Ces systèmes d'amorces et de sondes ont ciblé des régions hautement conservées de la nucléoprotéine (N) et de la polymérase (L) du virus de la rage. Après un alignement multiple et une analyse *in silico* avec des séquences d'une large collection d'isolats venant de différentes régions d'Afrique, les amorces et sondes ont été dessinés en utilisant le logiciel en ligne Primer3® puis soumises à une analyse BLAST pour prédire toute détection non-spécifique. Les amorces ont été synthétisées chez TIBMol-Biol (Berlin, Allemagne) et reconstituées selon les recommandations du fabricant. Ces outils de diagnostic moléculaire ont été validés sur une large collection d'isolats provenant des différentes parties du monde et sur des échantillons cliniques en évaluant des paramètres comme la spécificité analytique, la sensibilité analytique, la spécificité et la sensibilité diagnostiques, la répétabilité et la concordance inter-laboratoire et la sensibilité clinique.

1. 5. 2. Echantillons utilisés dans cette étude

Au total seize isolats du virus de la rage provenant de la collection du CNR-rage à l'IPD et confirmés comme étant positifs au virus de la rage par immunofluorescence directe (IF), ont été utilisés au cours de cette étude. En outre, soixante et un autres isolats issus de différentes

parties du monde et testés positifs en IF par le CNR-rage à l'IPP en France ont été également utilisés. Dans le but d'évaluer la spécificité des nouveaux outils de diagnostic, les deux systèmes de diagnostic ont été testés sur un ensemble de vingt échantillons primaires de cerveau d'animaux importants dans la transmission du virus de la rage, testés négatifs en IF par le CNR-rage à l'IPP et quinze autres isolats de rhabdovirus majeurs, différents du virus de la rage et issus de la collection du CNR-rage à l'IPD. Dans le cadre de la validation de la spécificité clinique, dix-neuf spécimens humains comprenant des biopsies de peau, de la salive et du LCR positifs et négatifs et précédemment testés par le CNR-rage à l'IPP, ont été analysés avec les nouveaux outils moléculaires. Tous les ARN des isolats issus du CNR-rage à l'IPD ont été extraits en utilisant le kit *QIAamp®VIRAL RNA Mini Kit* (Qiagen, Heiden, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Les ARNs correspondant aux échantillons cliniques et aux isolats fournis par le CNR-rage à l'IPP ont été extraits tel que décrit dans une étude précédente (Dacheux *et al.,* 2016).

1. 5. 3. Protocole de RT-qPCR utilisé

Nous avons utilisé un protocole similaire de RT-qPCR pour les deux systèmes de diagnostic. Tous les échantillons ont été analysés en dupliquats, utilisant le kit *Quantitect® Probe RT-PCR Kit* (Qiagen, Heiden, Allemagne). Les tests de RT-qPCR ont été effectués comme précédemment décrit (**Chapitre 1 : 1. 7. 2.**) en utilisant un volume de 5 µL d'ARN dilués au $1/10^{e}$ dans de l'eau sans RNase. Un contrôle positif constitué du mélange réactionnel et d'un ARN standard et un contrôle négatif contenant de l'eau sans RNase ont été inclus dans chaque test.

1. 5. 4. Evaluation de la spécificité analytique

La spécificité analytique a été déterminée en utilisant une collection de quinze autres rhabdovirus importants différents du virus de la rage en même temps que seize isolats du virus de la rage provenant de la collection du CNR-rage à l'IPD. La qualité des produits de PCR ainsi obtenues a été vérifiée sur un gel d'agarose à 2%. Les fragments amplifiés ont été séquencés puis les séquences obtenues ont été soumis à une analyse BLAST sur NCBI. Un

panel de vingt échantillons négatifs en IF, fourni par le CNR-rage à l'IPP, a été inclus dans les tests de spécificité.

1. 5. 5. Evaluation de la sensibilité analytique

Des plasmides ont été générés par insertion des produits de PCR couvrant les zones d'intérêt dans des cellules compétentes pCRII (Life Technologies, GmbH, Darmstadt) et les ARNs standards ont été synthétisés chez TIBMol-Biol (Berlin, Allemagne). Des dilutions sériées au $1/10^{e}$ de l'ARN standard ont été réalisées de 10^{8} à 1 copie dans de l'eau sans RNase. Les valeurs moyennes de **Cq** (quantitative Cycle) obtenues par triplicats pour chaque dilution standard ont été donc tracées proportionnellement aux valeurs logarithmiques des nombres de copies correspondants pour générer une courbe standard de quantification. Les standards de quantification ont été utilisés pour évaluer les paramètres de performance des nouveaux outils de diagnostic comme la limite de détection (**LOD**), le coefficient de détermination ($\mathbf{R^2}$) et l'efficience de l'amplification (**E**). Le LOD représente la plus faible valeur de concentration à laquelle environ 50% des répliquas de chaque dilution ont été détectés. Un test de régression linéaire a été effectué sur le logiciel R (version 3.0.2, *The R Foundation for Statistical Computing*) pour déterminer la valeur du $\mathbf{R^2}$ indiquant l'appréciation de la Régression. L'efficience a été calculée avec la formule $\mathbf{E= 10^{(-1/pente)}-1}$. Le nombre de copies d'ARN relative a été calculé en utilisant la formule $\mathbf{q= 10^{(Cq-b)/a}}$; où « **a** » représente la pente, **b** la valeur de l'intercepte de la courbe standard. En outre, le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé entre les deux courbes standards obtenues; où un coefficient de 1 représente une bonne corrélation.

1. 5. 6. Détermination de la spécificité et de la sensibilité diagnostiques

En plus des isolats et prélèvements négatifs précédemment utilisés, une collection de soixante et un isolats représentatifs de différentes parties du monde a été analysée par les deux systèmes de RT-qPCR afin de voir la diversité génétique que sont capables de couvrir ses nouveaux outils de diagnostic.

La spécificité représente la probabilité d'un test à donner un résultat négatif en l'absence de la région nucléotidique ciblée. Elle a été calculée par la formule **Sp = a/ (a+c);** où **a** est la proportion de vrais négatifs et **c** désigne le nombre de faux positifs. La sensibilité est définie comme la probabilité qu'un test produise un résultat positif en présence de la séquence cible. Elle a été calculée par la formule **Se = d/ (d+b)**; dans laquelle **b** représente le nombre de faux négatifs et **d** est le nombre de vrais positifs. Les valeurs prédictives positive et négative ont été également calculées respectivement par les formules **VPP = d / (d+c)** et **VPN = a/ (b+a).**
Ensuite, une analyse **ROC** («*Receiver Operating Characteristic*») a été effectuée avec le supplément XLSAT de Excel (Version 2015.5.01.23654, Copyright *Addinsoft 1995-2015)* pour déterminer la valeur de Cq (*quantitative cycle*) seuil en-dessous de laquelle le test pourrait être considéré comme positif. La précision du test a été mesurée par l'aire sous la courbe ROC (**AUC**) avec un intervalle de confiance (IC) de 95% de l'AUC. Une AUC supérieure à 0,9 représente un excellent test et une valeur de 0,5 un mauvais test (Hajian-Tilaki., 2013). Enfin, la comparabilité entre les valeurs de Cq données par les deux systèmes de diagnostic (RABV-protéine-N et RABV-protéine-L) a été analysée en utilisant un test de Bland-Altman où l'accord entre ces deux systèmes de détection du virus de la rage a été évalué en utilisant une approche graphique. Les limites statistiques de l'accord ont été calculées en utilisant la moyenne et l'écart-type des différences entre les deux systèmes de diagnostic avec un IC de 95% (Giavarina., 2015).

1. 5. 7. Répétabilité et concordance inter-laboratoire

Les répétabilités intra et inter-essai ont été déterminées par les coefficients de variation (CV) des valeurs de Cq. En effet, l'ARN de l'isolat SA217695SEN a été extrait et amplifié dix fois dans un même essai pour l'évaluation de la répétabilité intra-essai et dans dix essais différents par le même manipulateur, dans le même laboratoire, afin de déterminer la répétabilité inter-essai respective des systèmes de détection RABV-protéine-N et RABV-protéine-L.
La concordance inter-laboratoire a été évaluée en utilisant un panel de neuf échantillons anonymes qui ont été reçus, extraits et précédemment analysés au sein du CNR-rage à l'IPP dans le cadre de sa participation à l'essai inter-laboratoire organisé par le laboratoire union-européen de référence pour la rage situé à Nancy en France (Proficiency test report Diag-06-

2015-V1-EN). Les ARN extraits de ces échantillons ont été envoyés au CNR-rage à l'IPD et testés avec les deux nouveaux systèmes de diagnostic. Les résultats obtenus par les deux systèmes RABV-protéine-N et RABV-protéine-L ont été comparés avec les résultats précédents de RT-PCR temps réel du CNR-rage à l'IPP. Ainsi, nous avons réalisé le test de kappa de Cohen où le coefficient (***k***) mesure l'accord entre deux manipulateurs. Le test statistique a été fait avec le supplément XLSTAT de Excel, une p-value inférieure à 0,05 étant considérée comme significative.

1. 5. 8. Comparaison avec une RT-PCR conventionnelle semi-nichée

Des souriceaux nouveau-nés ont été inoculés expérimentalement avec l'isolat du virus de la rage SA217695SEN et un titre viral de 6,7 10^7 DI_{50}/mL (dose infectieuse à laquelle 50% des souriceaux sont morts) a été obtenu en utilisant la méthode de Reed & Muench (1938). Des dilutions sériées de $1/10^e$ du stock viral ont été utilisées pour comparer la sensibilité des deux systèmes de RT-qPCR à celle d'une RT-PCR conventionnelle semi-nichée précédemment décrite (Dacheux *et al.,* 2008).

1. 5. 9. Evaluation de la sensibilité clinique

Une collection de dix-neuf prélèvements primaires positifs et négatifs au virus de la rage composés de biopsies de peau, de salive et de LCR a été analysée en dupliquats avec RABV-protéine-L pour évaluer sa fiabilité pour le diagnostic clinique *ante-mortem* de la rage humaine en comparaison avec les résultats précédents de RT-qPCR (Dacheux *et al.,* 2016) obtenus au CNR-rage à l'IPP lors d'un essai inter-laboratoire.

2. RÉSULTATS

2. 1. Caractéristiques génétiques des isolats du virus de la rage

Au cours de cette étude, dix-huit isolats du virus de la rage circulant au Sénégal ont été caractérisés. Les séquences obtenues ont été assemblées avec le logiciel Unipro UGENE. Ces isolats ont eu un génome d'une taille totale de 11923 nucléotides (nt). La séquence de la région codante a été de .353 nt pour la nucléoprotéine (N), 894 nt pour la phosphoprotéine (P), 609 nt pour la protéine de matrice (M), 1575 nt pour la glycoprotéine (G) et 6.384 nt pour la polymérase (L). Ces protéines sont séparées par des régions inter-géniques respectives de 90 nt, 88 nt, 221 nt et 518 nt. Les régions 3' et 5' non-codantes ont des tailles respectives de 70 nt et 131 nt. L'analyse BLAST des séquences sur NCBI a montré une similarité (96% d'identité) avec deux isolats appartenant au clade Africa 2 et correspondant à la souche DRV-NG11 (KC196743) isolée d'un chien au Nigéria en 2011 (Zhou *et al.,* 2013) et la souche CAR_11_001h (KF977826) isolée d'un humain en République Centrafricaine en 2011 (Tricou *et al.,* 2014).

L'analyse des distances génétiques entre ces nouvelles séquences obtenues a été effectuée au niveau nucléotidique et au niveau protéique (acides aminés)**.** Une différence moyenne de 1,12 ±0,45% (0,4-3,1%) a été obtenue en comparant les séquences nucléotidiques deux par deux. Ainsi, nous avons noté une faible distance génétique entre les isolats du virus de la rage circulant au Sénégal de 2001 à 2015. Cette faible différence est plus apparente au niveau protéique avec une distance moyenne 0,74 ±0, 32% (0,2-2,0%)**.** Parmi les séquences individuelles, les isolats SA217750SEN_2011_Dahra et SA252913SEN_2013_Diamniadio sont les plus proches et sont séparés par des distances nucléotidique et protéique respectives de 0,4% et 0,2%. Cependant, les plus importances distances génétiques ont été observées entre les isolats SA212203SEN_2011_Dahra et SA217694SEN_2011_Linguère avec 3,1% sur les séquences nucléotidiques et 2,0% sur les séquences des acides aminés de la région codante du génome **(Figure 11)**.

acides aminés

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
A	SH155966SEN_2001_DAKAR		0,9	1,7	0,9	1,3	0,9	0,9	1,0	1,0	1,1	0,8	1,0	0,8	0,9	0,9	0,8	0,8	0,9
B	SH177846SEN_2005_DAKAR	0,9		1,5	1,0	1,3	0,9	0,9	1,2	1,1	1,2	0,9	1,0	0,9	1,1	1,0	1,0	0,9	1,0
C	SA217694SEN_2011_LINGUERE	2,3	2,2		1,6	2,0	1,7	1,6	1,9	1,8	1,9	1,6	1,8	1,7	1,8	1,7	1,8	1,6	1,7
D	SA206776SEN_2010_DAKAR	1,2	1,2	2,4		0,9	0,5	0,5	0,7	0,6	0,7	0,4	0,6	0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,6
E	SA212203SEN_2011_DAHRA	1,9	1,9	3,1	1,5		0,5	0,7	0,9	0,9	1,0	0,8	1,0	0,9	1,0	0,9	1,1	1,0	1,1
F	SA217750SEN_2011_DAHRA	1,2	1,2	2,5	0,8	0,7		0,2	0,5	0,5	0,7	0,4	0,6	0,4	0,6	0,5	0,7	0,6	0,7
G	SA252913SEN_2013_DIAMNIADIO	1,2	1,2	2,5	0,8	1,2	0,4		0,5	0,5	0,6	0,3	0,6	0,5	0,6	0,5	0,7	0,6	0,7
H	SH218152SEN_2011_DAKAR	1,4	1,4	2,6	1,0	1,3	0,6	0,6		0,8	0,9	0,6	0,8	0,7	0,8	0,7	0,9	0,8	0,9
I	SA194858SEN_2008_DAKAR	1,4	1,4	2,7	1,1	1,4	0,8	0,9	1,1		0,6	0,4	0,7	0,6	0,7	0,6	0,8	0,7	0,8
J	SA252888SEN_2013_DAKAR	1,5	1,6	2,9	1,3	1,5	1,1	1,1	1,3	1,0		0,5	0,7	0,6	0,7	0,7	1,0	0,8	0,9
K	SA204014SEN_2010_DAKAR	1,1	1,1	2,4	0,8	1,3	0,6	0,6	0,8	0,8	0,9		0,5	0,3	0,5	0,4	0,6	0,5	0,6
L	SA262503SEN_2014_DAKAR	1,3	1,4	2,7	1,1	1,6	0,9	0,9	1,1	1,1	1,2	0,7		0,4	0,6	0,5	0,8	0,7	0,7
M	SA262518SEN_2014_DAKAR	1,0	1,2	2,5	0,8	1,4	0,7	0,6	0,8	0,9	1,0	0,5	0,7		0,5	0,4	0,7	0,6	0,7
N	SA267115SEN_2014_DAKAR	1,4	1,5	2,8	1,2	1,7	1,0	0,9	1,1	1,2	1,3	0,8	1,0	0,9		0,5	0,9	0,8	0,8
O	SA262037SEN_2013_DAKAR	1,1	1,3	2,6	0,9	1,4	0,7	0,7	0,9	1,0	1,1	0,7	0,8	0,6	0,9		0,8	0,7	0,8
P	SH189343SEN_2007_DAKAR	1,2	1,3	2,5	1,0	1,8	1,1	1,1	1,2	1,3	1,5	1,0	1,3	1,0	1,4	1,2		0,4	0,6
Q	SA217695SEN_2011_DAHRA	0,9	1,1	2,3	0,8	1,6	0,9	0,8	1,0	1,1	1,3	0,8	1,1	0,8	1,2	0,9	0,6		0,3
R	SA272282SEN_2015_DAKAR	1,2	1,3	2,6	1,0	1,8	1,1	1,1	1,3	1,2	1,5	1,0	1,2	1,1	1,4	1,2	1,0	0,5	

nucléotides

Figure 11 : Analyse des distances génétiques (en pourcentage) au niveau nucléotidique (orange) et au niveau des acides aminés (vert) entre les polyprotéines des isolats du virus de la rage caractérisés dans cette étude. Les valeurs extrêmes de la série de distances séparant les isolats du Sénégal ont été encadrés en noir.

2. 2. Analyse phylogénétique des isolats du virus de la rage caractérisés dans cette étude

Au total, soixante-sept séquences de polyprotéine complète d'isolats du virus de la rage ont été utilisées pour construire l'arbre phylogénétique : vingt-six génomes appartenant à la lignée cosmopolitaine Africa 1, vingt-deux génomes du clade Africa 2 et dix-huit polyprotéines d'isolats circulant au Sénégal qui ont été caractérisés au cours de cette étude. L'analyse bayésienne des séquences a montré que le *generalized time-reversible* avec catégories gamma (GTR+G) a été le modèle de substitution nucléotidique le plus adapté. Ainsi, l'arbre phylogénétique a été tracé en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance. Le modèle de substitution nucléotidique GTR+G a été utilisé avec 2000 catégories gamma. Les nœuds ont été marqués par valeurs de support local calculées avec le test de *Shimodaira-Hasegawa* (SH) pour 5000 réplications. L'analyse phylogénétique montre que les isolats récents du Sénégal forment un seul et unique groupe et appartiennent au clade Africa 2 qui ne contient que des souches circulant en Afrique de l'Ouest et du centre (**Figure 12**).

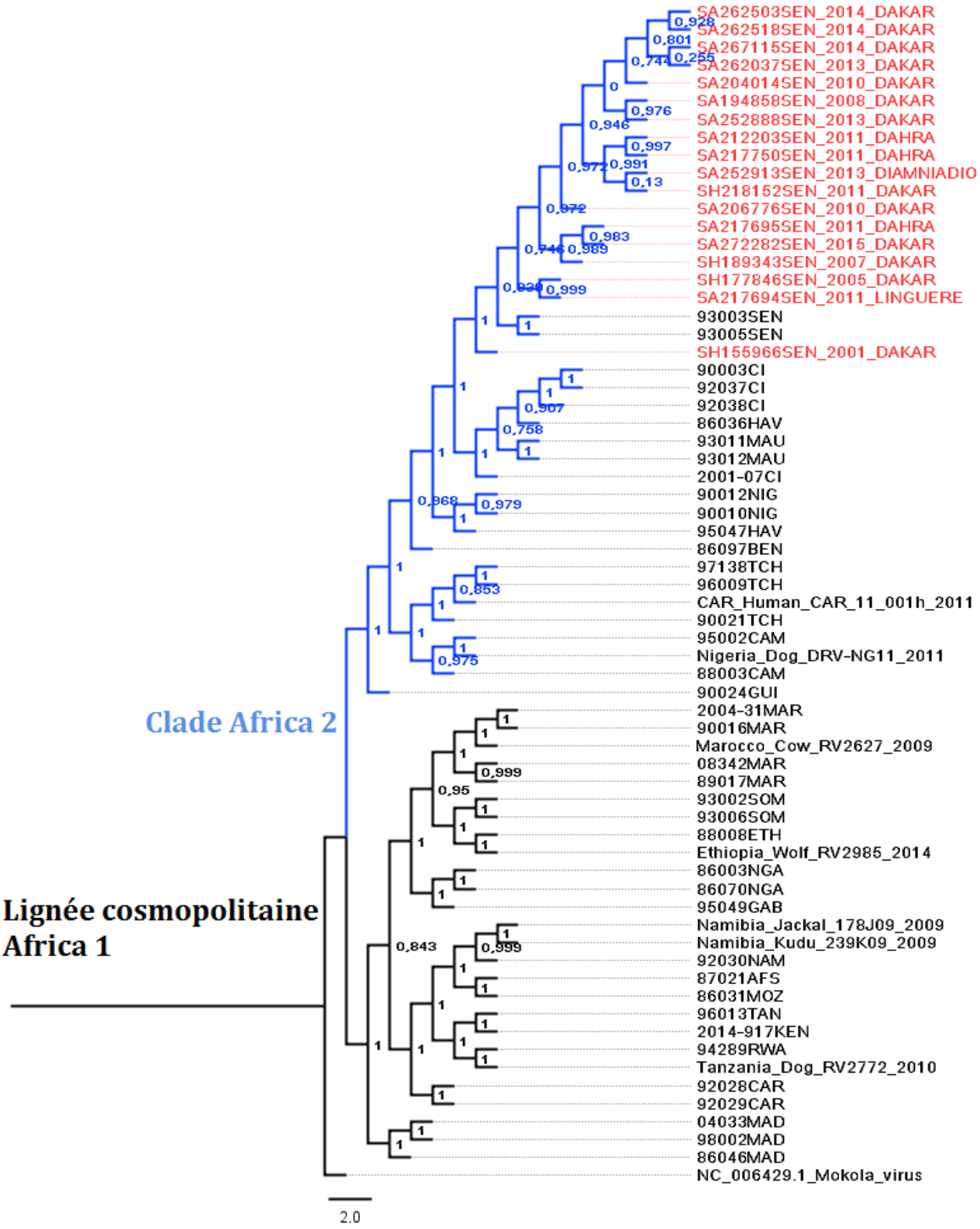


Figure 12 : Arbre phylogénétique basé sur les polyprotéines complètes des isolats du virus de la rage circulant au Sénégal de 2001 à 2015. L'arbre a été tracé avec le programme FastTree en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance. Les isolats du Sénégal séquencés dans cette étude (rouge) ont formé un groupe unique retrouvé dans le clade Africa 2 (bleu) comme précédemment décrit (Talbi *et al.,* 2009).

2. 3. Développement d'outils de diagnostic moléculaire pour la rage

2. 3. 1. Analyse des amorces et sondes

L'analyse BLAST des amorces et sondes au moment du design a montré une forte homologie avec les séquences des régions ciblées du virus de la rage disponibles sur Genbank. L'analyse *in silico* a montré un nombre limité de discordances avec les séquences d'isolats venant d'autres parties de l'Afrique et appartenant à la lignée cosmopolitaine Africa 1 ou au clade Africa 2 (**Annexes 3, 5 et 6**). Les sondes Taqman ont été nommées 5' FAM (6-carboxyfluorescein) / 3' BlackBerry Quencher (BBQ) et les détails sont décrits au niveau du **Tableau 6**.

Tableau 6: Informations sur les oligonucléotides utilisés dans cette étude

Nom	Type	Taille	Direction	Séquence 5'-3'	Protéine	Position[a]	GC (%)	Thyb (°C)[b]
RABVRPN1	amorce	20	sens	GCTCTGGGCTGGTGTCGTTC	nucléoprotéine	707-726	65	58,87
RABVPN	sonde	23	sens	6FAM-CGAGCCARGGCAGGAGACTGCGG--BBQ	nucléoprotéine	819-841	73,91	67,74
RABVFPN2	amorce	20	antisens	TACGGGGACTTCCCGCTCAG	nucléoprotéine	880-899	65	59,14
RABVRPL1	amorce	20	sens	GGTTTCCGGDGCYGTDCCTC	polymérase	9472-9491	65	58,94
RABVPL	sonde	27	sens	6FAM-CCCGTCAYATAGGGTCRGCTCARGGGC--BBQ	polymérase	9561-9587	66,66	67,36
RABVFPL2	amorce	20	antisens	CCTAGGGGAGACYTTGCCRT	polymérase	9660-9679	65	59,02

FAM : fluorescein amidite; **BBQ** : blackberry quencher; **nt :** nucléotides

a : positions des nucléotides en accord avec la séquence de l'isolat CAR_11/001h (GenBank N°. KF977826) du virus de la rage

b : température d'hybridation des amorces (°C)

2. 3. 2. La spécificité analytique

Dans le but d'assurer la spécificité des systèmes de détection développés et l'absence de toute détection croisée non-spécifique, seize isolats du virus de la rage et quinze autres rhabdovirus différents du virus de la rage ont été analysés en dupliquats avec les deux systèmes de détection développés. Aucune amplification non spécifique n'a été observée sur la collection testée. Ces résultats suggèrent que les systèmes d'amorces et de sonde développés ne montrent aucune réactivité croisée avec les rhabdovirus testés (**Tableau 7**). Des tailles de fragments de 193 pb (paires de bases) et 208 pb ont été obtenues sur gel d'électrophorèse et par séquençage, respectivement pour les systèmes RABV-protéine-N et RABV-protéine-L; correspondant ainsi à la taille exacte attendue. En outre, l'analyse BLAST des séquences obtenues a montré des homologies de 99% à 100% avec la séquence de l'isolat CAR_11/001h (GenBank N° KF977826) appartenant au clade Africa 2. Enfin, tous les prélèvements primaires négatifs en IF ont été trouvés négatifs avec les systèmes de détection; ce qui confirme ainsi que leur spécificité analytique est parfaite (**Annexe 4**).

Tableau 7: Description et résultats des isolats utilisés dans l'évaluation de la spécificité des nouvelles RT-qPCR développées

						RABV-protéine-N		RABV-protéine-L	
Isolats	**Virus**	**Références**	**Origine**	**Date[a]**	**Espèces**	**Cq[b]**	**Et**	**Cq[b]**	**Et**
SA221203SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2011	*Mellivora capensis*	**23,40**	**0,08**	**18,05**	**0,31**
SA217694SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2011	*Canis lupus familiaris*	**18,40**	**0,43**	**19,99**	**0,11**
SA217695SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2011	*Canis lupus familiaris*	**16,81**	**0,02**	**19,24**	**0,10**
SA217750SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2011	*Canis lupus familiaris*	**17,31**	**0,19**	**21,89**	**0,47**
SA218152SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2011	*Canis lupus familiaris*	**23,16**	**0,14**	**21,74**	**0,10**
SH155966SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2001	*Homo sapiens sapiens*	**18,20**	**0,02**	**18,73**	**0,18**
SH177846SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2005	*Homo sapiens sapiens*	**30,23**	**0,16**	**35,26**	**0,00**
SA194858SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2008	*Canis lupus familiaris*	**17,18**	**0,01**	**20,37**	**0,22**
SA204014SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2010	*Canis lupus familiaris*	**25,16**	**0,12**	**14,86**	**0,13**
SA206776SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2010	*Canis lupus familiaris*	**25,15**	**0,02**	**15,00**	**0,04**
SA252888SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2013	*Canis lupus familiaris*	**26,75**	**0,10**	**20,26**	**0,43**
SA252913SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2013	*Canis lupus familiaris*	**23,52**	**0,11**	**16,39**	**0,06**
SA262037SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2013	*Canis lupus familiaris*	**25,15**	**0,17**	**24,16**	**0,40**
SA262503SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2014	*Canis lupus familiaris*	**23,22**	**0,06**	**21,01**	**0,07**
SA262518SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2014	*Canis lupus familiaris*	**22,77**	**0,08**	**21,21**	**0,54**
SA267115SEN	rage	Base du CRORA	Sénégal	2014	*Canis lupus familiaris*	**22,46**	**0,37**	**22,62**	**0,14**
DakAnB1094	Kolongo	JX276998	RCA	1970	*Euplectes afra*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
AnY1307	Mokola	NC_006429	CAM	1973	*Crocidura spp.*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
AnB373d	Sandjimba	JX277024	RCA	1970	*Acrocephalus schoenobaenus*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
AnB4289	Nasoule	JX277012	RCA	1973	*Andropadus virens*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
AnD42443	Lagos Bat 3	NC020807	Sénégal	1985	*Eidolon helvum*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
AnB672	Lagos Bat 2	Base du CRORA	RCA	1974	*Micropteropus pusillus*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
An K 6909	Lagos Bat 4	Base du CRORA	Guinée	1985	*Nycteris gambiensis*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
LBVNIG1956	Lagos Bat 6	EF547431	Nigéria	1956	*Eidolon helvum*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
DakHD763	Le Dantec	AY854650	Sénégal	1965	*Homo sapiens sapiens*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
DakAnD5314	Keuraliba	JX276996	Sénégal	1968	*Tatera kempi*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
ArD89384	Chandipura	Base du CRORA	Sénégal	1992	*Phlebotomus sp.*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
SudAr1275	Obodhiang	HM856902	Soudan	1963	*Mansonia uniformis*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
ArY31-65	Nkolbisson	JX277015	CAM	1965	*Eretmapodites leucopus*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
DakAnB439	Garba	KM204982	RCA	1970	*Corythornis cristata*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**
SAAr1995	Mossuril	KM204993	MOZ	1959	*Culex sitiens*	**Nég**	**Nég**	**Nég**	**Nég**

Nég: négatif, pas signal fluorescent, pas de réaction non-spécifique

CRORA: Centre collaborateur OMS pour les Arbovirus et virus de fièvres hémorragiques, Institut Pasteur, BP 220, Dakar, Sénégal **a :** année d'isolement **b:** Moyenne des valeurs de Cq obtenues par dupliquats

MOZ : Mozambique **CAM :** Cameroun **RCA :** République Centrafricaine

Et : écart-type

2. 3. 3. La sensibilité analytique

Les courbes standards tracées montraient des LOD de 100 et 10 copies d'ARN par réaction respectivement pour les systèmes RABV-protéine-N et RABV-protéine-L. Les valeurs de pente de régression de -3,08 et -3,10, respectivement obtenues pour les systèmes RABV-protéine-N et RABV-protéine-L, sont proches de la valeur de pente optimale qui est de -3,3. Les valeurs de p-value significatives de 1,833e-09 et 6,977e-12 obtenues respectivement pour les systèmes RABV-protéine-N et RABV-protéine-L lors du test de régression linéaire et les coefficients de détermination (**R^2**) supérieurs à 0,99 indiquent la perfection des courbes standards de quantification. En outre, les valeurs d'efficience (**E**) élevées ont été obtenues pour les deux systèmes de détection du virus de la rage. Le test de corrélation de Pearson entre les deux courbes standards a déterminé un coefficient de 0,99 (p-value < 0,0001), suggérant que la corrélation entre les valeurs de Cq données par les deux systèmes de RT-qPCR est excellente (**Figure 13**).

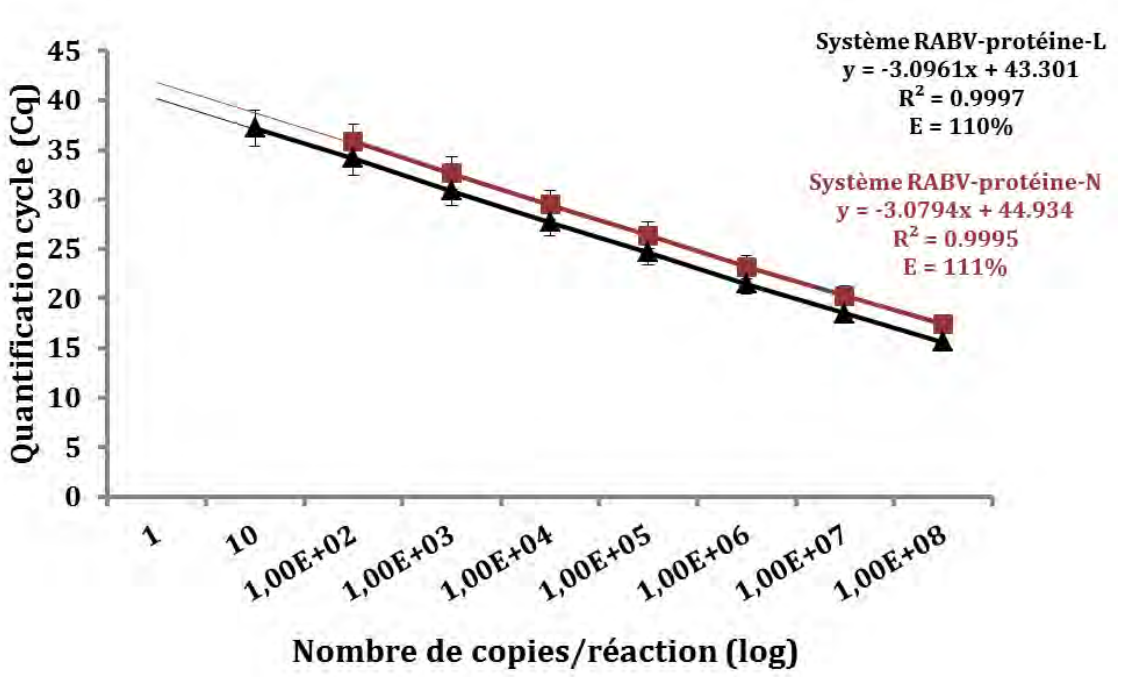


Figure 13: Courbes standards obtenues pour les systèmes de RT-qPCR RABV-protéine-N (rouge) et RABV-protéine-L (noire).

L'équation de la pente, le coefficient de détermination (R^2) et la valeur d'efficience (E) de chaque droite de régression sont mentionnés sur la figure. Les courbes standards ont été générées en utilisant les dilutions sériées des ARNs standards correspondants et les résultats ont été exprimés en nombre de copies par réaction.

2. 3. 4. Spectre de détection des systèmes de RT-qPCR développés

Dans le but de vérifier la large capacité de détection des nouveaux systèmes de RT-qPCR développés, une collection représentative de soixante et un isolats du virus de la rage provenant de différentes parties du monde a été testée. Pour la détection des isolats provenant d'Afrique, le système RABV-protéine-L a été capable de les détecter tous tandis que le système RABV-protéine-N n'a pu détecter que 90% d'entre eux. Ce dernier n'a donné aucun signal fluorescent pour les isolats 93002SOM et 93006SOM de la Somalie, 96013TAN de la Tanzanie et 87012MAR du Maroc (**Tableau 8a**). En outre, le système RABV-protéine-L a détecté également tous les isolats originaires des autres régions du monde tandis que le système RABV-protéine-N n'a détecté que 55% d'entre eux. Ce dernier présentait des limites pour la détection de neuf isolats provenant de la Pologne (96140POL), d'Allemagne (92001GER), d'Arabie Saoudite (87001ARS), de la Turquie (94009TUR), du Laos (99008LAO), d'Afghanistan (02052AFG), de la Russie (91041RUS) et des Etats-Unis (91004USA) (**Tableau 8b**). Au-delà du contexte africain, ces systèmes de RT-qPCR permettent ainsi de détecter une importante diversité d'isolats du virus de la rage circulant presque sur les cinq continents (**Figure 14**).

Tableau 8a: Résultats de l'évaluation du spectre de détection des nouvelles RT-qPCR développées sur des isolats africains

						RABV-protéine-N		RABV-protéine-L	
Isolat	**Origine**	**Hôte**	**Date[a]**	**Référence**	**Lignée-Clade**	**Cq[b]**	**Et**	**Cq[b]**	**Et**
93012MAU	Mauritanie	chien	1993	KX148237	Africa-2	**27,35**	**0,69**	**31,39**	**0,05**
93011MAU	Mauritanie	chien	1993	KX148236	Africa-2	**16,83**	**1,18**	**26,30**	**0,62**
91031MAU	Mauritanie	chien	1991	Base CNR-IPP	Africa-2	**16,21**	**1,66**	**25,22**	**0,29**
90024GUI	Guinée	chien	1990	KX148244	Africa-2	**17,28**	**0,00**	**23,32**	**0,03**
92038CI	Côte d'ivoire	chien	1992	KX148233	Africa-2	**21,56**	**0,10**	**23,93**	**0,15**
90003CI	Côte d'ivoire	chien	1990	Base CNR-IPP	Africa-2	**17,82**	**0,04**	**22,24**	**0,11**
90026CI	Côte d'ivoire	chien	1990	Base CNR-IPP	Africa-2	**16,32**	**0,49**	**26,03**	**0,93**
01007CI	Côte d'ivoire	chien	2001	KX148235	Africa-2	**14,85**	**0,29**	**22,06**	**1,39**
92037CI	Côte d'ivoire	chien	1992	KX148232	Africa-2	**23,23**	**0,12**	**24,46**	**1,05**
95047HAV	Burkina Faso	chien	1995	KX148230	Africa-2	**15,88**	**0,07**	**16,30**	**0,57**
86036HAV	Burkina Faso	chien	1986	KX148234	Africa-2	**11,78**	**0,13**	**17,65**	**0,62**
90012NIG	Niger	chien	1990	KX148229	Africa-2	**19,05**	**0,29**	**20,18**	**0,01**
90010NIG	Niger	chien	1990	KX148231	Africa-2	**14,24**	**0,39**	**17,35**	**0,25**
86070NGA	Nigéria	chien	1986	Base CNR-IPP	Africa-2	**26,40**	**0,03**	**23,31**	**1,52**
86003BRE	Nigéria	chien	1986	KX148201	Cosmo-AF1a	**26,15**	**0,23**	**22,41**	**0,76**
95002 CAM	Cameroun	chien	1994	KX148242	Africa-2	**15,41**	**0,20**	**16,75**	**0,03**
88003CAM	Cameroun	chien	1987	KX148243	Africa-2	**17,93**	**0,03**	**19,14**	**0,08**
88006CAM	Cameroun	chien	1987	Base CNR-IPP	Africa-2	**18,38**	**1,35**	**21,46**	**0,62**
96009TCH	Tchad	chien	1996	KX148241	Africa-2	**13,96**	**0,06**	**18,06**	**0,28**
92018TCH	Tchad	chien	1992	Base CNR-IPP	Africa-2	**24,36**	**0,30**	**23,78**	**0,54**
97138TCH	Tchad	chien	1997	Base CNR-IPP	Africa-2	**15,07**	**0,71**	**20,90**	**0,10**
90021TCH	Tchad	chien	1990	KX148240	Africa-2	**15,49**	**0,02**	**17,70**	**0,97**
86097BEN	Bénin	chat	1986	KX148107	Africa-2	**15,10**	**0,02**	**17,23**	**0,06**
94289RWA	Rwanda	chien	1994	KX148205	Cosmo-AF1b	**28,74**	**0,02**	**22,23**	**0,13**
92028CAR	RCA	chien	1992	Base CNR-IPP	Cosmo-AF1b	**26,42**	**0,20**	**28,10**	**0,40**
92029CAR	RCA	chien	1992	KX148208	Cosmo-AF1b	**23,68**	**0,54**	**21,72**	**1,05**
86031MOZ	Mozambique	chien	1986	KX148203	Cosmo-AF1a	**26,73**	**0,35**	**16,29**	**0,27**
87021AFS	AFS	humain	1981	KX148103	Cosmo-AF1b	**27,69**	**0,35**	**21,12**	**0,20**
92030NAM	Namibie	chien	1992	KX148204	Cosmo-AF1b	**22,91**	**0,81**	**14,66**	**0,34**
86092EGY	Egypte	humain	1979	KX148101	Cosmo-AF4	**25,90**	**0,02**	**26,36**	**0,06**
95049GAB	Gabon	chien	1995	KX148202	Cosmo-AF1a	**30,14**	**0,42**	**25,02**	**0,16**
93002SOM	Somalie	chien	1993	KX148198	Cosmo-AF1a	**Nég**	**Nég**	**25,47**	**0,31**
96013TAN	Tanzanie	chien	1996	KX148206	Cosmo-AF1b	**Nég**	**Nég**	**19,75**	**2,01**
93006SOM	Somalie	chacal	1993	KX148199	Cosmo-AF1a	**Nég**	**Nég**	**22,40**	**0,12**
87012MAR	Maroc	chien	1987	Base CNR-IPP	Cosmo-AF1a	**Nég**	**Nég**	**33,39**	**0,14**
88008ETH	Ethiopie	chien	1988	KX148200	Cosmo-AF1a	**28,11**	**0,24**	**23,99**	**0,11**
04031MAR	Maroc	chien	2004	KX148195	Cosmo-AF1a	**26,13**	**0,01**	**20,09**	**0,11**
90016MAR	Maroc	chien	1990	KX148196	Cosmo-AF1a	**27,78**	**0,22**	**22,62**	**0,24**
98002MAD	Madagascar	humain	1998	KX148210	Cosmo-AF1c	**24,77**	**0,16**	**28,52**	**0,16**
15005AFS	AFS	mangouste	2014	Base CNR-IPP	Africa-3	**23,78**	**0,60**	**31,34**	**0,05**
15002AFS	AFS	mangouste	2014	KX148221	Africa-3	**25,24**	**0,01**	**21,06**	**0,73**

Nég: négatif, pas signal fluorescent, pas de réaction non-spécifique

a : année d'isolement **b:** moyenne des valeurs de Cq obtenues par dupliquats

RCA : République Centrafricaine **AFS**: Afrique du Sud

Détermination des lignées et clades en accord avec l'étude réalisée par Troupin C, *et al.,* en **2016.**

CNR-IPP: centre national de référence pour la rage, Institut Pasteur, Paris, France

Et: écart-type **Cosmo:** lignée cosmopolitaine

Tableau 8b: Résultats de l'évaluation du spectre de détection des nouvelles RT-qPCR développées sur des isolats non-africains

						RABV-protéine-N		RABV-protéine-L	
Isolat	**Origine**	**Hôte**	**Date[a]**	**Référence**	**Lignée -Clade**	**Cq[b]**	**Et**	**Cq[b]**	**Et**
91047FRA	France	renard	1991	KX148127	Cosmo-WE	**27,11**	**0,162**	**22,73**	**0,16**
96002FRA	France	renard	1996	KX148126	Cosmo-WE	**27,38**	**0,077**	**20,41**	**1,3**
96140POL	Pologne	chien	1993	KX148120	Cosmo-CE	**Nég**	**Nég**	**16,31**	**0,11**
92001GER	Allemagne	renard	1991	KX148135	Cosmo-WE	**Nég**	**Nég**	**22,68**	**0,29**
93039EST	Estonie	chien	1991	KX148149	Cosmo-NEE	**35,35**	**0,35**	**22,33**	**0,05**
86054YOU	Bosnie-Herzégovine	loup	1986	KX148145	Cosmo-EE	**37,08**	**0,353**	**25,54**	**0,01**
87001ARS	Arabie Saoudite	renard	1987	Base CNR-IPP	Cosmo-ME1a	**Nég**	**Nég**	**33,08**	**0,18**
94009TUR	Turquie	chien	1993	KX148165	Cosmo-ME2	**Nég**	**Nég**	**26,22**	**0**
94272PHI	Philippines	chien	1994	KX148259	Asiatiaque-SEA4	**31,25**	**0,084**	**32,22**	**0,13**
99009BUR	Birmanie	chien	1999	Base CNR-IPP	Asiatique-SEA3	**19,15**	**0,01**	**33,4**	**0,18**
99008CBG	Cambodge	chien	1999	KX148252	Asiatique-SEA3	**32,05**	**0,01**	**36,51**	**0,01**
99010LAO	Laos	chien	1999	KX148255	Asiatiague-SEA3	**Nég**	**Nég**	**29,6**	**0,46**
02043CHI	Chine	chien	ND	Base CNR-IPP	Asiatique-SEA2a	**36,55**	**0,07**	**36,11**	**1,1**
02045CHI	Chine	chien	ND	Base CNR-IPP	Asiatique-SEA2a	**32,28**	**0,90**	**35,91**	**0,1**
91014MEX	Mexique	chien	1991	KX148110	Cosmo-AM2a	**Nég**	**Nég**	**21,32**	**0,35**
86001BRE	Brésil	chien	1986	KX148216	Cosmo-AM3a	**19,04**	**0,01**	**27,42**	**0,06**
91001USA	Etats-Unis	moufette	1982	KX148213	Cosmo-AM1	**35,61**	**0,34**	**20,81**	**0,14**
91004USA	Etats-Unis	moufette	1991	KX148224	Arctique-A	**Nég**	**Nég**	**23,64**	**0,48**
02052AFG	Afghanistan	chien	2002	KX148225	Arctique-AL1b	**Nég**	**Nég**	**22,4**	**0,03**
91041RUS	Russie	renard	1991	Base CNR-IPP	Cosmo-CA1	**Nég**	**Nég**	**23,18**	**1,01**

Nég: négatif, pas signal fluorescent, pas de réaction non-spécifique

a : année d'isolement **b:** moyenne des valeurs de Cq obtenues par dupliquats

Détermination des lignées et clades en accord avec l'étude réalisée par Troupin C, *et al.,* en 2016.

CNR-IPP: centre national de référence pour la rage, Institut Pasteur, Paris, France

Et: écart-type **ND:** non-déterminée

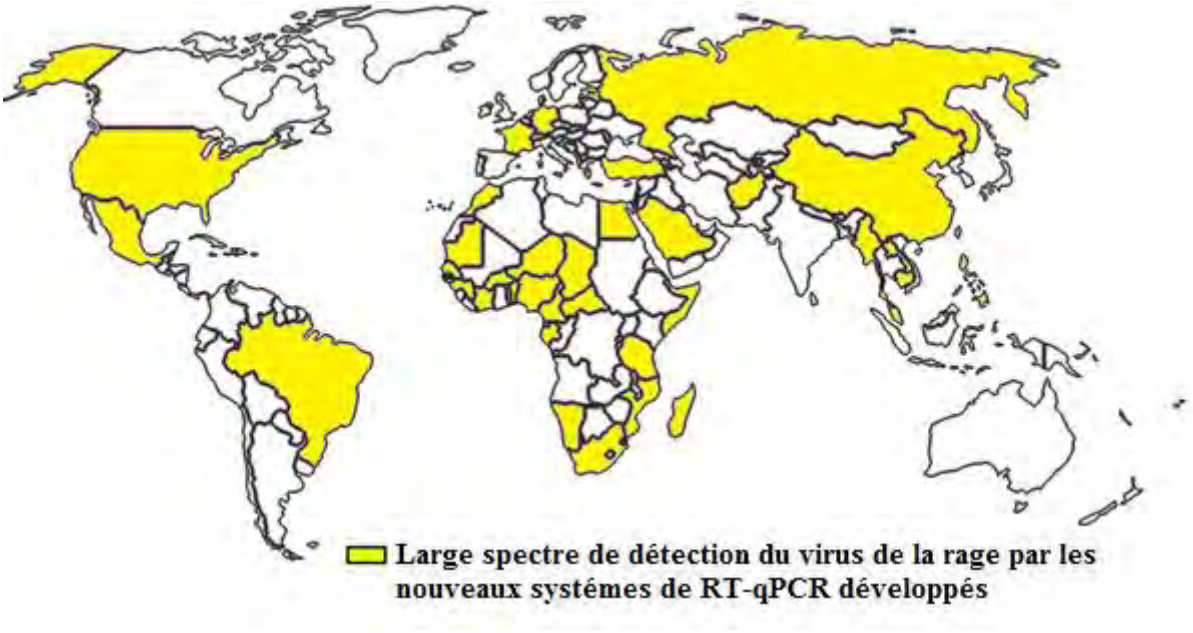


Figure 14: Large spectre de détection du virus de la rage par les nouveaux outils moléculaires développés dans cette étude. Les pays d'où proviennent les isolats détectés ont été colorés en jaune, montrant la détection d'une importante diversité du virus de la rage.

2. 3. 5. La spécificité et la sensibilité diagnostiques

Les résultats de tous les tests précédents ont été résumés dans le **Tableau 9** puis utilisés pour déterminer la spécificité et la sensibilité diagnostic et dans l'analyse ROC telle que décrite précédemment (manuel OIE, 2016). Une spécificité de 100% a été obtenue pour les deux tests de diagnostic. En revanche, les sensibilités diagnostiques étaient respectivement de 100% et 78,70% (IC à 95%; 68,40-89,00%) pour le système RABV-protéine-L et le système RABV-protéine-N, lorsqu'ils sont comparés à la technique standard qui est l'IF. Nous avons également obtenue une VPP de 100% pour chaque système et des VPN respectives de 100% and 72,91% (IC à 95% ; 56,76-82,79%) pour le système RABV-protéine-L et le système RABV-protéine-N (test exact de Fischer p-value <0,0001).

Tableau 9 : Détermination des performances diagnostiques et résultats de l'analyse de la répétabilité

	RABV-protéine-N		RABV-protéine-L	
Résultat de test	**Echantillons positifs**	**Echantillons négatifs**	**Echantillons positifs**	**Echantillons négatifs**
Positif	**64**	**0**	**77**	**0**
Négatif	**13**	**35**	**0**	**35**
TOTAL	**77**	**35**	**77**	**35**
Spécificité diagnostique	**100%**		**100%**	
Sensibilité diagnostique	**78,70% (IC 95% ; 68,40-89,00%)**		**100%**	
Valeur Prédictive Positive (VPP)	**100%**		**100%**	
Valeur Prédictive Négative (VPN)	**72,91% (IC 95% ; 56,76-82,79%)**		**100%**	
CV intra-essai	**1,67%**		**1,08%**	
CV inter-essai	**2,20 %**		**2,16 %**	

% : pourcentage
Tous les échantillons ont été précédemment testés par la technique de référence, l'immunofluorescence directe **(IF)**
CV : coefficient de variation

Tous les échantillons précédemment négatifs en IF ont donné une valeur de Cq indéterminée après 40 cycles. Ainsi, l'analyse ROC a permis de déterminer un Cq de 39,70 comme la valeur seuil (« cut-off ») en-dessus de laquelle le test est positif pour les systèmes RABV-protéine-L et RABV-protéine-N, en considérant un IC de 95%. Une réaction donnant une valeur de Cq supérieure à ce « cut-off » ou indéterminée est considérée comme négative. Un AUC de 1 a été également trouvé pour chaque système, montrant ainsi que les nouveaux outils développés ont une excellente précision de mesure (**Figure 15**). L'analyse graphique de Bland&Altman a déterminé un biais non-spécifique (différence des moyennes) de 1,920 ±6,875 (limites d'accord à 95% ; -11,56 à 15,40), montrant que les deux tests sont équivalents (**Figure 16**).

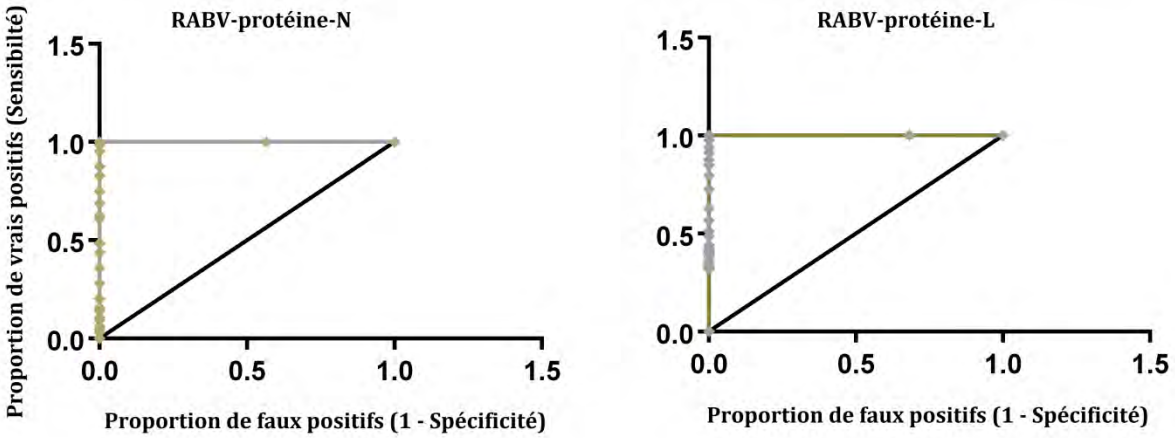


Figure 15 : Courbes ROC des systèmes de RT-qPCR développés pour la détection du virus de la rage. Les courbes ont été tracées en utilisant le complément XLSTAT sur Excel. L'AUC (aire sous la courbe) de 1 indique que les tests sont robustes pour détecter le génome du virus de la rage lorsqu'il est présent dans les échantillons.

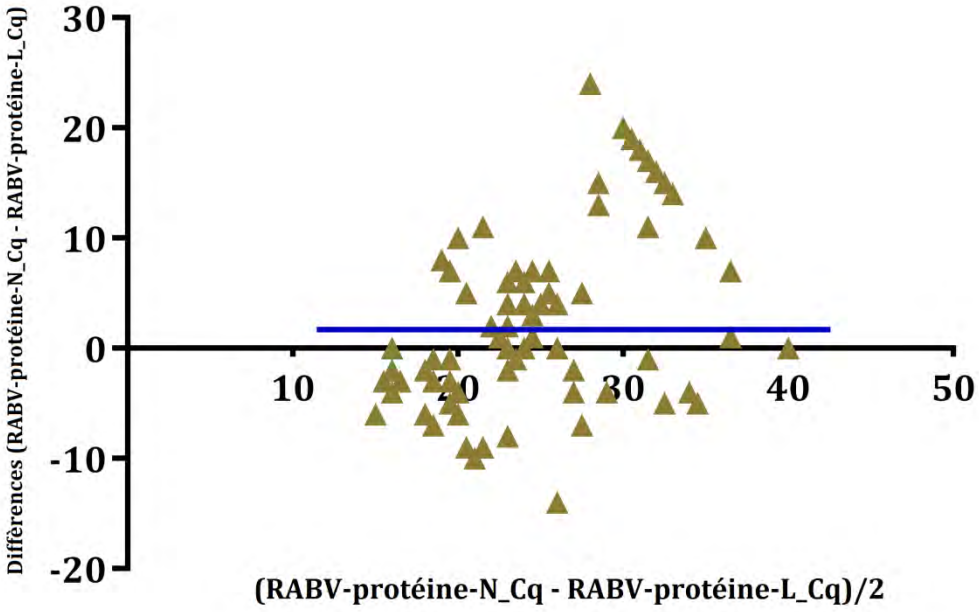


Figure 16 : Graphique de Bland&Altman des différences entre les systèmes de RT-qPCR RABV-protéine-N et RABV-protéine-N en fonction des valeurs moyennes de Cq des deux tests.

Le biais de 1,920 ±6,875 (IC 95% ; -11,56 – 15,40) unités est représenté par le gap entre l'axe des abscisses (pas de différences) et la ligne d'égalité (bleue) parallèle à l'axe des abscisses.

2. 3. 6. Répétabilité et concordance inter-laboratoire

Des CV intra-essai et inter-essai respectifs de 1,08 % et 2,16 % ont été trouvés pour le système RABV-protéine-L tandis que le système RABV-protéine-N a montré des CV intra-essai et inter-essai respectifs de 1,67 % et 2,20 %. Ceci montre que ces outils de détection du virus de la rage sont robustes et ont une répétabilité élevée (**Tableau 9)**. En outre, un coefficient kappa ***(k)*** de 1 ±0,31 (IC à 95%; 0,38-1,61) obtenue indique les tests sont précis car ils ne détectent que le virus de la rage et ont donné une concordance de 100% avec les résultats précédents de RT-qPCR obtenus par le CNR-rage à l'IPP (Dacheux *et al.,* 2016) sur les mêmes échantillons (p-value= 0,001) et avec les résultats attendus par l'essai inter-laboratoire sur les isolats du virus de la rage (**Tableau 10**).

Tableau 10: Description des isolats utilisés et résultats de l'essai de concordance inter-laboratoire

Id	Isolat	virus	Espèce	Origine	Année	Résultat attendu par l'EIL[a]	CNR-rage IPP RT-PCR[b]	RABV-protéine-N	RABV-protéine-L
1	CVS 27 13-14	rage	/	/	/	Positif	Positif	Positif	Positif
2	GS7 18-13	rage	*Vulpes vulpes*	France	1986	Positif	Positif	Positif	Positif
3	GREECE 03-15	rage	*Vulpes vulpes*	Grèce	2012	Positif	Positif	Positif	Positif
4	BBLV 02-15	BBLV	*Myotis natterreri*	France	2012	Positif	Positif	Négatif	Négatif
5	DUVV 02-12	DUVV	*Homo sapiens sapiens*	Afrique du Sud	1971	Positif	Positif	Négatif	Négatif
6	EBL-1a 08-14	EBLV-1	*Eptesicus serotinus*	France	2002	Positif	Positif	Négatif	Négatif
7	EBL-2 01-15	EBLV-2	*Myotis daubentonii*	Royaume-uni	2004	Positif	Positif	Négatif	Négatif
8	Négatif 17-13	/	*Vulpes vulpes*	France	2012	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
9	Négatif 17-13	/	*Vulpes vulpes*	France	2012	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

a: Résultats attendus par le Laboratoire Union-européen de Référence pour la rage lors de l'essai inter-laboratoire 2015 (Proficiency test report Diag-06-2015-V1-EN). **Id :** identification

BBLV : *Bokeloh bat lysssavirus* **DUVV :** virus Duvenhage **EBLV-1 :** *European Lagos bat virus 1* **EBLV-2 :** *European Lagos bat virus 2*

Les nouveaux systèmes détecte uniquement les isolats du virus de la rage et ont donné 100% de concordance avec les résultats obtenus avec la RT-qPCR **(b)** (**Dacheux *et al.*, 2016**) du CNR-rage IPP, utilisé comme technique de référence.

Les nouveaux systèmes ont été également concordants sur les mêmes échantillons avec les résultats attendus par l'essai inter-laboratoire **(a).**

2. 3. 7. Comparaison avec une RT-PCR conventionnelle semi-nichée

De façon simultanée, treize dilutions sériées au $1/10^{e}$ de l'isolat du virus de la rage SA217695SEN avec un titre viral de 6,7 10^{7} DI_{50}/mL, ont été testées à la fois avec les deux nouveaux systèmes et une RT-PCR semi-nichée comme précédemment décrite (Dacheux *et al.,* 2008). Le système RABV-protéine-L a détecté jusqu'à 0,00067 DI_{50}/mL, correspondant à 28 copies de génome en utilisant l'équation de quantification correspondante. Cependant, la RT-PCR semi-nichée et le système RABV-protéine-N n'ont détecté que jusqu'à 6,7 DI_{50}/mL correspondant à 75 copies de génome en calculant avec l'équation standard correspondante (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Limites de détection des nouvelles RT-qPCR développées en comparaison avec une RT-PCR conventionnelle semi-nichée

Titre viral (DI50/mL)	RABV-protéine-L		RABV-protéine-N		RT-PCR semi-nichée
	Cq moyen[a]	Ecart-type	Cq moyen[a]	Ecart-type	Résultat sur gel d'électrophorèse
6,7E+07	11	0,14	15,61	0,82	**(+++)**
6,7E+06	12,74	0,21	18,08	0,05	**(+++)**
6,7E+05	15,63	0,35	21,23	0,01	**(+++)**
6,7E+04	19,57	1,38	24,61	0,60	**(++)**
6,7E+03	24,58	0,52	28,55	0,38	**(++)**
6,7E+02	28,51	0,64	31,79	0,62	**(++)**
6,7E+01	31,74	0,92	36,82	0,02	**(+)**
6,7E+00	33,51	0,49	39,16	0,49	**(+)**
6,7E-01	36,63	0,08	Nég	Nég	Nég
6,7E-02	37,44	0,08	Nég	Nég	Nég
6,7E-03	38,07	0,04	Nég	Nég	Nég
6,7E-04	38,83	0,25	Nég	Nég	Nég
6,7E-05	Nég	Nég	Nég	Nég	Nég

Nég : négatif, pas de signal fluorescent ou pas de bandes sur le gel d'électrophorèse

Cq : quantitative Cycle **a :** Moyenne des valeurs de Cq par dupliquats

(+++) : bande avec une haute intensité

(++) : bande avec une intensité moyenne

(+) : bande avec une faible intensité

Les dilutions sériées de 1/10e de l'isolat SA217695SEN avec un titre initial de 6,7 10^7 DI50/mL ont été testées avec les nouvelles RT-qPCR et la RT-PCR semi-nichée décrite par Dacheux *et al.,* 2008, utilisée comme technique de référence.

2. 3. 8. La sensibilité clinique

Montrant de meilleurs résultats en terme de sensibilité pour la détection du virus de la rage, le système RABV-protéine-L a été ainsi choisi pour l'analyse des prélèvements cliniques primaires provenant de patients suspects d'une infection par le virus de la rage. Comparée à la RT-qPCR décrite par Dacheux *et al.,* en 2016 considérée comme test de référence**,** les quatre prélèvements précédemment positifs au virus de la rage ont été détectés avec le système RABV-protéine-L tandis qu'aucun signal fluorescent n'a été obtenu sur les quinze prélèvements diagnostiqués négatifs. Ainsi, le système RABV-protéine-L a été 100% en accord avec les résultats du test de référence (**Tableau 12**).

Tableau 12: Evaluation de la sensibilité clinique sur des échantillons *intra-vitam* humains

Code du patient	Origine	Hôpital	Echantillon	CNR-rage IPP RT-qPCR	RABV-protéine-L RT-qPCR	Diagnostic final
H14-0004	France	CHU Mondor	LCR	Négatif	Négatif	patient positif à la rage
			Biopsie de peau	Positif	Positif	
			Salive jour 1	Négatif	Négatif	
			Salive jour 2	Négatif	Négatif	
			Salive jour 3	Négatif	Négatif	
			Salive jour 4	Négatif	Négatif	
			Salive jour 6	Négatif	Négatif	
			Salive jour 8	Négatif	Négatif	
H14-0007	Italie	CHU Milan	biopsie de peau	Positif	Positif	patient positif à la rage
			LCR jour 1	Positif	Positif	
			LCR jour 2	Positif	Positif	
H14-0008	France	CH Garches	biopsie de peau	Négatif	Négatif	patient négatif à la rage
			Salive	Négatif	Négatif	
H14-0009	France	CH Bastia	biopsie de peau	Négatif	Négatif	patient négatif à la rage
			LCR	Négatif	Négatif	
H14-0010	France	CHU Cayenne	biopsie de peau	Négatif	Négatif	patient négatif à la rage
			Salive	Négatif	Négatif	
H14-0011	France	CHU Cayenne	biopsie de peau	Négatif	Négatif	patient négatif à la rage
			Salive	Négatif	Négatif	

LCR**:** liquide céphalo-rachidien

Le nouveau système RABV-protéine-L a une concordance de 100% avec les résultats obtenus avec la RT-qPCR (Dacheux *et al.,* 2016) du CNR-rage à l'IPP, utilisé comme technique de référence.

3. DISCUSSION

La rage demeure un vrai problème de santé publique en Afrique et est à l'origine d'une encéphalite presque toujours fatale (manuel OIE, 2016). Dans notre étude, nous avons réalisé la caractérisation moléculaire de dix-huit isolats du virus de la rage circulant au Sénégal de 2001 à 2015. La composition génétique des différents isolats caractérisés a montré des similarités en termes de taille des protéines codantes, des régions inter-géniques et des extrémités non-codantes avec les isolats précédents appartenant au clade Africa 2. Ainsi, ces souches du virus de la rage circulant au Sénégal sont bien prises en compte par le vaccin actuellement disponible pour l'Homme qui permet une protection contre le groupe phylogénétique 1 incluant les isolats du clade Africa 2 (Nel., 2005; Sadkowska-Todys., 2000; Hicks *et al.,* 2012). En outre, la faible diversité génétique globale entre ces séquences montre que les isolats du virus de la rage circulant Sénégal n'appartiennent qu'à un seul groupe phylogénétique. Ceci a été confirmé par leur répartition sur l'arbre phylogénétique où ils ont été tous dans le clade Africa 2 qui ne regroupait que des isolats circulant en Afrique de l'Ouest et du centre tel que décrit dans une étude précédente (Talbi *et al.,* 2009). Bien que le virus de la rage présente une large diversité globale avec sept groupes phylogénétiques majeurs (Bourhy *et al.,* 2008), cette structure devient moins distincte à l'échelle régionale ou à des échelles plus petites avec la possibilité d'une forte subdivision du virus de la rage dans les pays d'Afrique et un mouvement limité du virus entre les localités tel que précédemment décrit en Afrique du Nord (Talbi *et al.,* 2010). Toutefois, les plus importantes distances génétiques ont été relevées entre un isolat de chien (SA217694SEN_2011_Linguère) et une souche isolée pour la première fois chez un ratel (SA212203SEN_2011_Dahra) (aa: 2,0% – nt: 3,1%), provenant de différentes localités du Sénégal. Ainsi, il n'est pas clair que cette structure génétique du virus de la rage au Sénégal pourra persister dans la mesure où elle peut être influencée par la dispersion humaine ou par l'évolution du virus pour une adaptation à de nouveaux hôtes comme le ratel. Ces données de séquences pourraient être utiles dans des études futures de phylodynamique ou de phylogéographie de la rage en Afrique de l'Ouest, à travers l'Afrique ou à l'échelle globale en associant les données similaires obtenues dans d'autres études précédentes effectuées en Afrique (Brunker *et al.,* 2015; Hayman *et al.,* 2011; Mollentze *et al.,* 2014) ou dans le reste du monde (Bielejec *et al.,* 2014; Kuzmina *et al.,* 2013; Ahmed *et al.,* 2015). Ces séquences peuvent également servir dans le développement d'outils de diagnostic ou d'antiviraux plus adaptés dans le contexte africain.

Malgré un nombre important de méthodes sensibles développées pour le virus de la rage au cours des dernières années (Deubelbeiss *et al.,* 2014; Muleya *et al.,* 2012; Wacharapluesadee *et al.,* 2012; Hoffmann *et al.,* 2010; Coertse *et al.,* 2010), seule une d'entre elles a été validée sur une large diversité d'isolats circulant en Afrique (Dacheux *et al.,* 2016), mais elle présente souvent un échec dans la détection des isolats circulant au Sénégal. Ainsi, le développement d'un outil rapide et efficace pour un diagnostic à large spectre de la rage pourrait être utile pour les analyses de routine au laboratoire ou pour une surveillance épidémiologique, particulièrement dans le contexte africain où la rage reste toujours endémique. Dans cette étude, nous avons développé et validé deux systèmes de RT-qPCR utilisant la chimie TaqMan pour une large détection du virus de la rage, plus adaptés au contexte africain et utiles pour le diagnostic *intra-vitam* de la rage humaine et *post-mortem* de la rage animale. Ces systèmes ont été basés sur des régions conservées de la nucléoprotéine (N) et de la polymérase (L) du virus de la rage et les séquences de leurs oligonucléotides ont été dégénérées pour obtenir une large capacité de détection des isolats circulant en Afrique (Dacheux *et al.,* 2008). Les deux systèmes avaient une bonne spécificité analytique et ne montraient aucune réactivité non-spécifique avec les autres rhabdovirus et les échantillons négatifs testés. Cette spécificité a été également observée à travers le séquençage des produits de RT-qPCR positifs. Les limites de détection allant de 100 à 10 copies d'ARN par réaction et les excellentes valeurs de coefficient de détermination (R^2) et d'efficience (E > 100%) obtenues prouvent également que ces tests peuvent être appliqués de façon efficace dans l'analyse quantitative, même sur de faibles concentrations virales présentes dans les prélèvements infectés par le virus de la rage. Ils offrent ainsi une bonne sensibilité analytique, similaire à ce qui a été décrit pour des méthodes précédentes (Deubelbeiss *et al.,* 2014; Farhadi *et al.,* 2015; Choudhary *et al.,* 2015).

Cependant, avec la grande diversité génétique globale du virus de la rage, le développement d'un seul outil sensible en temps réel couvrant tous les groupes phylogénétiques connus du virus de la rage reste un challenge (rapport OMS, 2013). Ainsi, le spectre de détection couvert par les nouveaux outils a été évalué sur une collection représentative de la diversité génétique globale du virus de la rage. Sur les isolats circulant en Afrique, les deux systèmes de RT-qPCR présentaient des taux de détection élevés, en particulier le test RABV-protéine-L. Ainsi, ils peuvent être utilisés comme complément d'une méthode récente présentant des limites sur les isolats du clade Africa 2 circulant au Sénégal (Dacheux *et al.,* 2016). L'évaluation de la performance de nos tests de RT-qPCR sur des isolats provenant d'autres

parties du monde a montré un excellent taux de couverture génétique pour le système RABV-protéine-L tandis que le système RABV-protéine-N a montré des limites dans la détection des isolats non-africains. La sensibilité réduite notée avec le système RABV-protéine-N malgré le bon profil *in silico* et des performances précédentes satisfaisantes, pourrait être expliqué par la formation de structures secondaires au niveau de la zone ciblée, le rendant ainsi moins accessible pour les oligonucléotides du système RABV-protéine-N lors de la phase de transcription inverse (Kuo *et al.,* 1997; Myers *et al.,* 1991). En effet, tous les isolats testés ont été détectés par les nouveaux systèmes de diagnostic, principalement avec le test RABV-protéine-L qui est capable de détecter une large diversité du virus de la rage. Bien qu'en faisant une analyse comparative, le système RABV-protéine-L présente une meilleure performance que le système RABV-protéine-N en considérant la sensibilité diagnostique et les valeurs prédictives, il serait mieux d'effectuer une stratégie de « *double-check* » sur les échantillons à tester, en combinant les deux systèmes telles des méthodes précédentes décrites (Fischer *et al.,* 2014; Dacheux *et al.,* 2016) afin d'obtenir un résultat plus fiable. Les valeurs élevées d'AUC obtenues après l'analyse ROC montrent que les deux nouveaux systèmes sont précis pour une détection du virus de la rage dans un échantillon positif. En outre, ces méthodes de RT-qPCR s'accordent bien sur la mesure des valeurs de Cq tel que montré par les résultats de l'analyse graphique de Bland-Altman qui confirme ainsi leur efficacité à détecter le virus de la rage.

Avec des coefficients de variation intra et inter-essai inférieurs à 3% et une forte concordance inter-laboratoire (100% sur les souches du virus de la rage), les systèmes RABV-protéine-L et RABV-protéine-N ont une forte répétabilité et pourraient être appliqués dans différents contextes géographiques pour un diagnostic de la rage.

L'évaluation des limites de détection dans un prélèvement a été faite en comparaison avec une méthode précédente de RT-PCR semi-nichée (Dacheux *et al.,* 2008) considérée comme test de référence. Le système RABV-protéine-L a été capable de détecter jusqu'à un titre très bas de 6,7 10^{-4} DI_{50}/mL fortement inférieure à la limite de détection du système RABV-protéine-N et du test de référence. Bien que cela puisse être nécessaire de confirmer cette basse limite de détection sur une large collection d'isolats, le système RABV-protéine-L pourrait être utilisé, de façon efficace, dans le processus de diagnostic de la rage en complément de l'IF, particulièrement sur du matériel décomposé ou des prélèvements avec une faible concentration du virus de la rage (Fooks *et al.,* 2009; McElhinney *et al.,* 2014). Malgré une

qualité pas toujours bonne des échantillons reçus dans le cadre de la surveillance nationale des morsures et provenant des différents centres de surveillance à travers le pays, les systèmes de RT-qPCR que nous avons développé permettent également un diagnostic efficace. Comparée à la méthode de RT-PCR conventionnelle semi-nichée, nos systèmes de RT-qPCR offrent également quelques avantages importants dans la réduction de la charge de travail, du risque de contamination et de la durée de test et fournissent une bonne sensibilité.

Sur la base de ses meilleures performances, le système RABV-protéine-L a été évalué pour une possible utilisation dans le diagnostic *intra-vitam* de la rage chez l'humain. Pour cela, une collection de prélèvements primaires positifs et négatifs constituée de biopsie de peau, de salive et de LCR, a été analysée par ce système en considérant comme test de référence une méthode récente de RT-qPCR utilisée au CNR-rage à l'IPP (Dacheux *et al.,* 2016). Comparée à cette dernière, notre système RABV-protéine-L présentait une forte concordance dans les résultats et une sensibilité élevée sur les échantillons cliniques testés. Ainsi, notre système RABV-protéine-L pourrait être utile dans le diagnostic *ante-mortem* de la rage humaine tel que des méthodes décrites dans des études précédentes (Dacheux *et al.,* 2008; Dacheux *et al.,* 2016). Les deux systèmes de RT-qPCR développés et validés au cours de notre étude, en particulier le test RABV-protéine-L, pourraient donc être utilisés pour compléter des méthodes déjà existantes dans la détection du virus de la rage, surtout dans le contexte africain.

CONCLUSION

L'épidémiologie moléculaire d'isolats récents a montré l'évidence d'une faible diversité génétique du virus de la rage au Sénégal. Tous les isolats récents appartiennent au clade Africa 2 qui ne circule que dans les pays d'Afrique de l'Ouest et du centre. Ainsi, sur la base de la phylogénie récente des isolats du virus de la rage circulant au Sénégal, deux outils de RT-qPCR performants et plus adaptés au contexte africain ont été développés pour une large détection du virus de la rage. Ces deux outils spécifiques et sensibles peuvent être utilisés dans le diagnostic de routine de la rage au laboratoire ou dans les études épidémiologiques sur le terrain, particulièrement en Afrique en utilisant une stratégie de « double-check ». Notre système de détection RABV-protéine-L, présentant de meilleures performances, est fortement recommandé comme un outil fiable, utilisable dans la recherche générale et dans le diagnostic *ante-mortem* de la rage humaine. Cette méthode pourrait facilement être utilisée dans les pays où la rage est endémique comme complément des méthodes déjà existantes.

CHAPITRE 3 : APPROCHE « FUTURE » SUR LES ENCÉPHALITES VIRALES AIGUËS AU SENEGAL

INTRODUCTION

Isolé pour la première fois en 1966 d'un pool de moustiques du genre *Culex* provenant de la République Centrafricaine, le virus Bagaza est un flavivirus appartenant au groupe Ntaya (Digoutte, 1978). Comme les autres flavivirus, le génome du virus Bagaza est un ARN linéaire simple brin de polarité positive **(**Lindenbach *et al.,* 2013**).** Son génome d'environ 10941 nucléotides code pour une polyprotéine de 3426 acides aminés constituée de onze protéines virales et flanquée par des régions 5' et 3' non-codantes de 94 nt et 556 nt de tailles respectives (Kuno & Chang., 2007).

Une étude sérologique menée en Inde a montré la présence d'anticorps neutralisants anti-Bagaza dans le sérum d'un patient atteint d'encéphalite. Ainsi, ce virus pourrait être impliqué dans les cas d'encéphalite humaine (Bondre *et al.,* 2009). En septembre 2010, le virus Bagaza a été responsable d'une épidémie d'encéphalite chez des populations d'oiseaux sauvages au Sud de l'Espagne. Ce fut la première fois que ce virus a été isolé chez un vertébré (Aguëro *et al.,* 2011). En Afrique de l'Ouest et du centre, le virus Bagaza n'a jusqu'à présent été isolé que chez les moustiques collectés sur le terrain (Diallo *et al.,* 2005). Ainsi, dans le but de mieux comprendre la diversité génétique du virus Bagaza, la caractérisation moléculaire d'isolats du virus Bagaza circulant au Sénégal et en Côte d'ivoire a été effectuée. Sur la base de ces données de séquences, nous avons analysé l'évolution du virus Bagaza en utilisant une méthode phylogénétique. En outre, dans le but d'évaluer la possibilité d'une adaptation du virus Bagaza à l'Homme dans le futur, une méthode bio-informatique comparant les indices d'adaptation obtenus pour les isolats du virus Bagaza caractérisés dans cette étude à ceux d'autres flavivirus déjà connus chez l'Homme a été utilisée.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. 1. Caractérisation moléculaire des isolats du virus Bagaza

Dans cette étude, les génomes complets de onze isolats du virus Bagaza circulant en Afrique de l'Ouest de 1988 à 2014, dont dix circulant au Sénégal et un provenant de la Côte d'ivoire, ont été réalisés. Ces isolats du virus Bagaza proviennent de la collection du CRORA (**Tableau 1 3**). Cette caractérisation moléculaire a été effectuée en utilisant des systèmes de RT-PCR chevauchantes et des techniques de RACE permettant d'amplifier les différentes régions constituant le génome du virus Bagaza (**Tableau 14**). L'extraction des ARNs, les réactions de PCR et le séquençage ont été effectuées comme précédemment décris (**Chapitre 1 : 1. 7. 1. et 1. 7. 2. ; Chapitre 2 : 1. 1. 3.**).

Tableau 13: Description des isolats du virus Bagaza utilisés dans cette étude

Isolats	Virus	Origine	Année d'isolement	Espèce
ArA23139	Bagaza	Dézidougou (CI)	1988	*Culex poicilipes*
ArD54139	Bagaza	Dakar-Bango (SEN)	1989	*Culex poicilipes*
ArUS20-100	Bagaza	Matam (SEN)	1989	*Culex poicilipes*
ArD99335	Bagaza	Barkédji (SEN)	1994	*Culex neavei*
ArD137998	Bagaza	Diawara (SEN)	2000	*Culex poicilipes*
ArD138018	Bagaza	Diawara (SEN)	2000	*Culex poicilipes*
ArD152146	Bagaza	Diawara (SEN)	2001	*Culex poicilipes*
ArD152207	Bagaza	Diawara (SEN)	2001	*Culex poicilipes*
ArD171075	Bagaza	Barkédji (SEN)	2004	*Culex poicilipes*
ArD171102	Bagaza	Barkédji (SEN)	2004	*Culex poicilipes*
ArD260266	Bagaza	Barkédji (SEN)	2014	*Culex neavei*

Les stocks viraux proviennent de la collection du CRORA, Institut Pasteur de Dakar, Sénégal.

SEN: Sénégal

CI: Côte d'ivoire

Tableau 14: Description des amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire du virus Bagaza

Nom de l'amorce	Séquence 5'-3'	Direction	Région	Thyb (°C)
5'raceBAGV1	CATCAATCCGACATCCAGAG	antisens	enveloppe	53
5'raceBAGV2	CCTTTCGGAAGCTTTTCAAG	antisens	enveloppe	53
BAG28F	TTGACAGCTCAACACAAGTGC	sens	enveloppe	55
BAG1037R	CCATCACGACATCAATCCAC	antisens	enveloppe	55
BAG572F	GCTCTGGATGTCGGATTGAT	sens	enveloppe	55
BAG2069R	TTGTCCCCGATGATGATGTA	antisens	NS1	55
BAG3SEG1F	TCATTTCGAGTTGGCTGTGT	sens	NS1	55
BAG3SEG1R	TATTGGACATGGGTGGAGTG	antisens	NS2B	55
BAG3SEG2F	GTGTAAGGTCCGTGGGAAGA	sens	NS2A	55
BAG3SEG2R	CAAACCAATCAGCACTCCAC	antisens	NS3	55
BAG3538F	GAACCATTTCAGCTGGGTGT	sens	NS3	55
BAG5064R	CCGACAAGAATGCCATTACC	antisens	NS4A	55
BAG4825F	TCGTATGGAGGACCTTGGAA	sens	NS3	55
BAG6324R	CCAAAGCTCAACTGGGTTGT	antisens	NS4B	55
BAG6SEG1F	CGAGCCGGGTTATTGATAGT	sens	NS4B	55
BAG6SEG1R	ACCTGCTGCTGTTCTCCTTT	antisens	NS5	55
BAG6SEG2F	GACGTTTTTGACACCACTGC	sens	NS5	55
BAG6SEG2R	GACGCGGTCTTCTACCATTT	antisens	NS5	55
BAG8234F	GAAAGAACTGGAACGGATGC	sens	NS5	55
BAG9750R	CTCGGGGATGTCTTTTCTGA	antisens	NS5	55
BAG9329F	AGAATGGACCCAGAGCACAG	sens	NS5	55
BAG10853R	TCCCAGGTGTCAATATGCTG	antisens	NS5	55
3'raceBAGV1	AAAGCGCTCAATACCGACTC	sens	NS5	53
3'raceBAGV2	AGTCAGGCCACAGGTTTTGT	sens	NS5	53

Thyb : température d'hybridation des amorces

1. 2. Caractéristiques génétiques du virus Bagaza

Les séquences du virus Bagaza obtenues ont été assemblées en utilisant le logiciel Unipro UGENE (Okonechnikov *et al.,* 2012). Des alignements multiples ont été effectués en utilisant l'algorithme Muscle (Edgar, 2004) implémenté dans le logiciel Unipro UGENE. Sur la base

de ces séquences complètes, nous avons évalué les caractéristiques génétiques des isolats du Sénégal en comparaison avec celui provenant de la Côte d'ivoire et les isolats précédemment séquencés en République Centrafricaine, en Espagne et en Inde. Ainsi, l'analyse a été ciblée sur des paramètres comme la composition des séquences, les distances génétiques et la conservation des principaux motifs d'acides aminés retrouvés chez les flavivirus.

L'évidence de sites d'acides aminés informatifs a été recherchée sur les séquences du virus Bagaza en utilisant le serveur en ligne DIVEIN (Deng *et al.,* 2010). Les sites d'acides aminés informatifs sont des sites dont les modifications peuvent avoir un impact sur la distribution des branches sur l'arbre phylogénétique. Ensuite, une prédiction des sites de N-glycosylation pouvant exister sur le génome du virus Bagaza a été effectuée en utilisant la version en ligne du serveur NetNGlyc 1.0. En effet, la N-glycosylation est un phénomène post-traductionnel où des glucides sont ajoutés aux asparagines qui sont impliqués dans la séquence consensus Asn-Xaa-Ser/Thr, sur laquelle Xaa peut être tout acide aminé excepté la proline. Les scores ou « potentiels » des sites de N-glycosylés prédits le long de la chaine protéique du génome du virus Bagaza, de l'extrémité N-terminal à l'extrémité C-terminal, ont été illustrés en utilisant une valeur seuil de 0,5 et « l'accord du Jury » indique combien parmi les neuf réseaux utilisés par le serveur supportent la prédiction (Gupta *et al.,* 2004).

La prédiction de structures secondaires au niveau des régions 5' et 3' non-codantes a été effectuée en utilisant des méthodes implémentées sur le serveur en ligne Vienna RNA Websuite (Gruber *et al.,* 2008). Ainsi, afin d'identifier les structures secondaires d'ARN non codants conservées et avec une stabilité thermodynamique, la méthode RNAz (Gruber *et al.,* 2007) a été utilisée avec une probabilité de classification $P > 0,5$. Ensuite, les structures secondaires optimales pour les régions non-codantes ont été obtenues avec un minimum d'énergie par la méthode ARNalifold (Bernhart *et al.,* 2008) qui utilise un algorithme dynamique de programmation basé sur des paramètres de prédiction tels que précédemment décrits (Mathews *et al.,* 2004). Sur la base de la structure secondaire obtenue pour la région 3' non-codante, l'organisation des séquences conservées (CS) a été analysée telle que précédemment décrite, avec une possibilité de répétition des séquences conservées (Kuno & Chang., 2007). Une séquence conservée est considérée comme imparfaite (ImCS), lorsqu'elle présente trois différences de bases ou plus par rapport à la séquence consensus correspondante précédemment décrite (Kuno & Chang., 2007), marquées par une insertion, une délétion ou une substitution.

1. 3. Analyse des événements de recombinaison

Afin de prévenir les potentiels biais que la recombinaison peut causer lors de l'analyse phylogénétique (Posada & Crandall., 2002), toutes les séquences polyprotéiques ont été analysées en utilisant sept méthodes (RDP, GENECONV, MaxChi, BootScan, Chimaera, SiScan et 3Seq) implémentées dans le programme RDP4beta 4.8 (Martin *et al.,* 2015) avec les paramètres par défaut. Seuls les événements déterminés par quatre méthodes ou plus avec des p-values $<10^{-6}$ ont été considérés comme représentant une forte évidence d'une recombinaison après 100 permutations en utilisant la correction de Bonferroni pour prévenir les faux positifs (Bland & Altman, 1995). Un test de Chi2 a été utilisé afin de déterminer si l'identité de séquences entre un potentiel recombinant et un parent donné dans la zone recombinante et leur différence en dehors de la région de recombinaison sont significatives. En outre, une analyse Bootscan impliquant le potentiel recombinant et les séquences parentales identifiées a été également effectuée pour confirmer les éventuels événements de recombinaison. L'existence de points de recombinaison ont été également analysée en utilisant la méthode appelée *Genetic Algorithms for Recombination Detection* (GARD) basée sur un algorithme génétique et implémentée sur le serveur en ligne *Datamonkey* (Kosakovsky Pond *et al.,* 2005). L'évidence des points de recombinaison a été évaluée avec le test de *Kishino-Hasegawa (HK)* et une valeur de p-value < 0,05 a été considérée comme significative. Des arbres phylogénétiques séparés ont été tracés en utilisant l'algorithme du maximum de parsimonie pour la région recombinante et les compartiments non recombinants indiqués par la position des points de recombinaison. Les arbres phylogénétiques ont été tracés pour une valeur de bootstrap égale à 100 avec le modèle de substitution nucléotidique le mieux adapté (**Chapitre 2 : I. 4.**).

1. 4. Evaluation des pressions de sélection

La recombinaison peut influencer l'inférence d'une sélection positive lorsqu'elle n'est pas prise en compte (Posada & Crandall, 2002). Ainsi, les potentielles séquences recombinantes ont été exclues des analyses suivantes afin d'éviter les biais dans l'analyse phylogénétique.
Le ratio sites non-synonymes/synonymes (dN/dS) est une méthode largement utilisée pour la

détection d'une sélection positive. Le test statistique permet de distinguer une sélection positive ou diversification (dN/dS > 1) d'une sélection négative ou purification (dN/dS < 1). Une sélection positive est identifiée lorsque le taux de sites non-synonymes (dN) est supérieur à celui de sites synonymes (dN > dS). Les épisodes de sélection positive ont été analysés au niveau de chaque gène du virus Bagaza en utilisant des méthodes d'estimation par site. Pour cela, un total de neuf fragments d'alignement a été effectué correspondant aux protéines C, prM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 de la région codante du génome. Nous avons utilisé deux premières méthodes appelées *single-likelihood ancestor counting* (SLAC) et *mixed effects model of evolution* (MEME) qui estiment respectivement la différence et le rapport entre le taux de sites non-synonymes (dN) et de sites synonymes (dS) par codon à un niveau de significativité égale à 0,1. En outre, une autre méthode appelée *fast unconstrained Bayesian approximation* (FUBAR) a permis d'évaluer les épisodes de sélection au niveau de chaque site avec une probabilité ≥ 0,9 (Murrell *et al.,* 2013). Enfin, une méthode appelée *branch-site random effects likelihood* (Branch-site REL) a été utilisée pour évaluer l'évidence d'une sélection positive sur les sites internes au niveau de chaque branche de l'arbre phylogénétique, considérant une p-value inférieure à 0,05. Ces quatre méthodes ont été analysées avec le programme Hyphy implémenté sur le serveur en ligne *Datamonkey* (Kosakovsky Pond *et al.,* 2005) et un épisode de sélection positive a été considéré lorsqu'il est déterminé par au moins deux de ces méthodes.

1. 5. Analyses phylogénétiques et phylodynamiques

Le choix du modèle de substitution nucléotidique le plus adapté a été effectué comme précédemment décrit (**Chapitre 2 : 1. 1. 4.**). L'arbre phylogénétique a été tracé avec le programme FastTree (Price *et al.,* 2010), en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance avec le modèle déterminé par les critères Bayésiens. Les valeurs de support local des nœuds ont été calculées avec le test de *Shimodaira-Hasegawa* (SH) pour 5000 réplications.

L'analyse évolutive du virus Bagaza a été réalisée en utilisant le modèle Bayésien *Gaussian Markov Random Field* (GMRF*) coalescent skyride* avec une horloge stricte (Baele *et al.,* 2012, Baele *et al.,* 2013). Le modèle de substitution nucléotidique GTR a été utilisé avec 4 catégories gamma. Les algorithmes Bayésiens *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC)

implémentés sur le programme BEAST v1.8.4 (Drummond *et al.,* 2012) ont été utilisés dans le but d'estimer le taux d'évolution du virus Bagaza depuis son premier isolement jusqu'en 2014. L'analyse MCMC a été effectuée pour 100 millions de générations en échantillonnant à chaque 100 milles générations pour assurer une convergence des estimations.
La taille de la population effective (ESS) a été déterminée en utilisant le programme Tracer v1.6 (http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer). La distribution des arbres obtenus avec l'analyse BEAST a été utilisée pour tracer un arbre avec un maximum de crédibilité des clades (MCC) pour ces séquences. Cet arbre a été généré avec le programme TreeAnnotator v.2.3.2 (à partir de 100 millions) après élimination de 10% de la population puis visualisé avec le logiciel FigTree v.1.4.2.

1. 6. Indice d'adaptation des codons de la région codante du virus Bagaza

L'indice d'adaptation des codons ou « *codon adaptation index* » (CAI) est une mesure du biais d'utilisation des codons usuels synonymes. Parmi ses multiples usages possibles, le CAI permet d'évaluer l'adaptation des gènes viraux à leurs hôtes (Sharp & Li, 1987). Le CAI a été utilisé dans de nombreuses études récentes impliquant les humains et les virus à ARN (Andersen *et al.,* 2015; Shin *et al.,* 2015; Nasrullah *et al.,* 2015). Dans le but d'évaluer l'évidence d'une adaptation du virus Bagaza à l'homme, le CAI a été calculé pour la région codante de chaque isolat. Pour calculer le CAI normalisé, les polyprotéines complètes des isolats caractérisés dans cette étude et des isolats précédents disponibles ont été comparées aux codons des gènes de l'humain en utilisant le programme CAIcal v1.4 (Puigbo *et al.,* 2008a). D'abord, un CAI ''brut'' (rCAI) est obtenu. Ensuite, le CAI est normalisé par la valeur de « CAI supposée neutre » (eCAI) basée sur les acides aminés usuels de l'humain et 1000 séquences virales aléatoires générées en utilisant la même taille, la même composition des codons et le même pourcentage de GC. En effet, il existe une table des acides aminés de l'humain déjà disponible en ligne contenant l'ensemble des gènes codants du génome humain (Puigbo *et al.,* 2008b). Le CAI normalisé a été obtenu en calculant le rapport rCAI/eCAI et une valeur supérieure à 1 est différente de la neutralité et considérée comme une évidence d'adaptation des codons du virus aux codons de référence de l'organisme hôte (Puigbo *et al.,* 2008a). Les valeurs de CAI obtenues pour les isolats du virus Bagaza ont été comparées à celles d'autres flavivirus connus chez l'Homme en utilisant le test non-paramétrique de

Wilcoxon avec le logiciel R. Une valeur de p-value inférieure à 0,05 est considérée comme caractéristique d'une différence significative. Le génome du virus de la mosaïque du tabac (VMT) a été comparé aux codons humains et utilisé comme contrôle négatif pour montrer que cette analyse pour l'adaptation au génome humain est fiable et ne produit pas de faux positifs ou des anomalies. Puisque le VMT est un virus de plante et qu'il n'existe aucun cas d'infection humaine connu ou une évidence d'une adaptation à l'Homme, nous espérons que son CAI sera inférieur au CAI seuil (égal à 1).

2. RÉSULTATS

2. 1. Caractéristiques génétiques des isolats du virus Bagaza

Dans cette étude, au total onze séquences complètes d'isolats du virus Bagaza circulant en Afrique de l'Ouest ont été obtenues en utilisant des systèmes de PCR chevauchantes. L'analyse des nouvelles séquences a été réalisée par des alignements multiples au niveau nucléotidique et au niveau des acides aminés, en comparaison avec les séquences précédentes des souches du virus Bagaza isolées en République Centrafricaine (RCA: AY632545) et en Espagne (HQ644143). L'analyse par gène des nouvelles séquences obtenues a montré des polyprotéines de taille identique. Bien que la taille de l'extrémité 5' non-codante soit également de même taille entre les différentes séquences, la région 3' non-codante des isolats de l'Afrique de l'Ouest est plus longue de 10 nt et 137 nt comparée respectivement à celles des isolats de la RCA (AY632545) et d'Espagne (HQ644143) (**Tableau 15**). En effet, la région 3' non-codante des séquences Ouest-africaines présente des insertions de 74 nt et 1 nt respectivement par rapport aux isolats de la RCA (AY632545) et d'Espagne (KR108244-6), à partir de la position nucléotidique 435 après le codon stop.

Tableau 15: comparaison des régions du génome entres les isolats du virus Bagaza

Régions du génome	AY632545_DakARB209_RCA_1966	HQ644143_Espagne_H_2010	Isolats séquencés dans cette étude
5'RNC	94nt	94nt	94nt
Capside	122aa	122aa	122aa
prM	177aa	177aa	177aa
Enveloppe	501aa	501aa	501aa
NS1	342aa	342aa	342aa
NS2A	226aa	226aa	226aa
NS2B	132aa	132aa	132aa
NS3	619aa	619aa	619aa
NS4A	126aa	126aa	126aa
2K	23aa	23aa	23aa
NS4B	253aa	253aa	253aa
NS5	905aa	905aa	905aa
3'RNC	**566nt**	**439nt**	**576nt**
Taille totale	**10941nt**	**10794nt**	**10951nt**

nt: Nucléotide**; aa:** acide aminé.

RNC: région non-codante

La taille des gènes est déterminée par rapport à la séquence de référence du virus Bagaza: AY632545 décrit par Kuno G. & Chang G. J. (2007).

2. 2. Distances génétiques entre les isolats du virus Bagaza

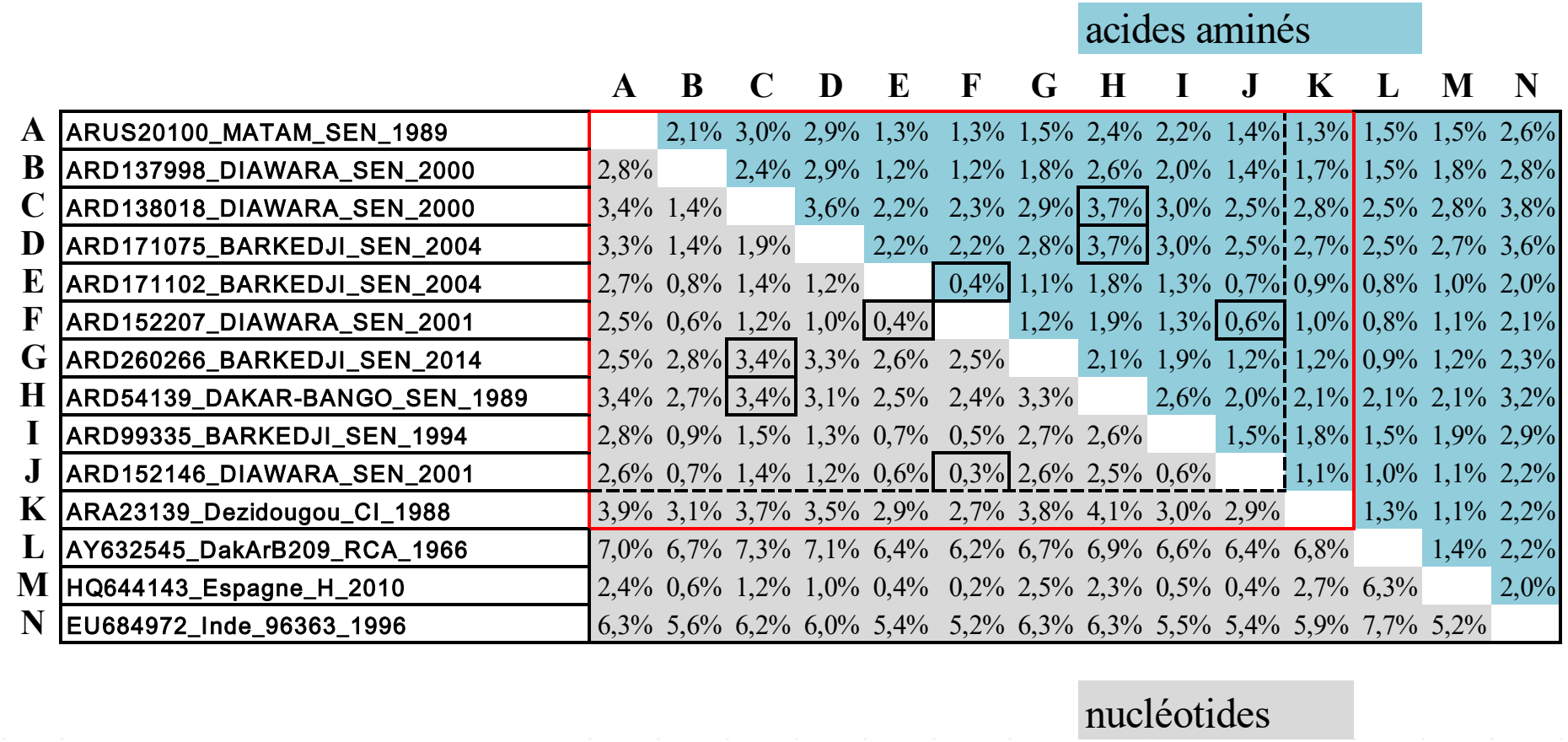
Les distances génétiques par paire de séquences ont été évaluées aux niveaux nucléotidique et protéique entre les isolats du virus Bagaza caractérisés au cours de cette étude puis en comparaison avec les séquences du virus Bagaza déjà disponibles sur Genbank **(Figure 16).**

Au niveau des séquences nucléotidiques, les isolats du virus Bagaza circulant au Sénégal montraient une distance moyenne de 1,9 ±0,8% (0,3-3,4%). La même chose a été également observée au niveau des acides aminés avec une diversité moyenne de 1,9 ±0,6% (0,4-3,7%).

Les plus faibles distances génétiques ont été observées entre les isolats ARD152207_Diawara_SEN_2001 et ARD152146_Diawara_SEN_2001, provenant de la même localité durant la même année, avec respectivement 0,3% au niveau nucléotidique et 0,6% au niveau des acides aminés. Les isolats ARD152207_Diawara_SEN_2001 et ARD171102_Barkédji_SEN_2004 ont été également très proches avec 0,4% au niveau nucléotidique et au niveau des acides aminés. Les distances nucléotidiques enregistrées entre l'isolat ARD138018_Diawara_SEN_2000 et les isolats ARD260266_Barkédji_SEN_2014 et ARD54139_Dakar-Bango_SEN_1989 ont été plus élevées (3,4%). Au niveau des acides aminés, les distances séparant l'isolat ARD54139_Dakar-Bango_SEN_1989 du virus Bagaza provenant de la région de Saint-Louis et les isolats ARD138018_Diawara_SEN_2000 et ARD171075_Baekédji_SEN_2004 ont été plus importantes (3,7%).

En comparaison avec la souche ARA23139_Dézidougou_CI_1988 provenant de la Côte d'Ivoire, les séquences des isolats du Sénégal montraient une distance nucléotidique moyenne plus élevée de 3,4 ±0,5% (2,7-4,1%). Cependant, ces distances ont été moins importantes au niveau des acides aminés, montrant une distance moyenne de 1,7 ±0,7% (2,7-4,1%) (**Figure 17;** cadre en rouge).

Un coefficient de différenciation de 0,17 a été identifié entre les séquences précédemment disponibles sur Genbank et les isolats du virus Bagaza caractérisés au cours de cette étude. En outre, ces derniers montraient des distances nucléotidiques moyennes de 6,7% (6,2-7,3%), 1,3 ±1,0% (0,2-2,7%) et 5,8% (5,2-6,3%), et distances protéiques moyennes de 1,5 ±0,6% (0,8-2,5%), 1,7 ±0,7% (1,0-2,8%) et 2,7 ±0,6% (2,0-3,8%), respectivement par rapport aux polyprotéines des isolats AY632545_DakArB209_RCA_1966, HQ644143_Espagne_H_2010, et EU684972_Inde_96363_1996 du virus Bagaza **(Figure 16)**.



		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
A	ARUS20100_MATAM_SEN_1989		2,1%	3,0%	2,9%	1,3%	1,3%	1,5%	2,4%	2,2%	1,4%	1,3%	1,5%	1,5%	2,6%
B	ARD137998_DIAWARA_SEN_2000	2,8%		2,4%	2,9%	1,2%	1,2%	1,8%	2,6%	2,0%	1,4%	1,7%	1,5%	1,8%	2,8%
C	ARD138018_DIAWARA_SEN_2000	3,4%	1,4%		3,6%	2,2%	2,3%	2,9%	3,7%	3,0%	2,5%	2,8%	2,5%	2,8%	3,8%
D	ARD171075_BARKEDJI_SEN_2004	3,3%	1,4%	1,9%		2,2%	2,2%	2,8%	3,7%	3,0%	2,5%	2,7%	2,5%	2,7%	3,6%
E	ARD171102_BARKEDJI_SEN_2004	2,7%	0,8%	1,4%	1,2%		0,4%	1,1%	1,8%	1,3%	0,7%	0,9%	0,8%	1,0%	2,0%
F	ARD152207_DIAWARA_SEN_2001	2,5%	0,6%	1,2%	1,0%	0,4%		1,2%	1,9%	1,3%	0,6%	1,0%	0,8%	1,1%	2,1%
G	ARD260266_BARKEDJI_SEN_2014	2,5%	2,8%	3,4%	3,3%	2,6%	2,5%		2,1%	1,9%	1,2%	1,2%	0,9%	1,2%	2,3%
H	ARD54139_DAKAR-BANGO_SEN_1989	3,4%	2,7%	3,4%	3,1%	2,5%	2,4%	3,3%		2,6%	2,0%	2,1%	2,1%	2,1%	3,2%
I	ARD99335_BARKEDJI_SEN_1994	2,8%	0,9%	1,5%	1,3%	0,7%	0,5%	2,7%	2,6%		1,5%	1,8%	1,5%	1,9%	2,9%
J	ARD152146_DIAWARA_SEN_2001	2,6%	0,7%	1,4%	1,2%	0,6%	0,3%	2,6%	2,5%	0,6%		1,1%	1,0%	1,1%	2,2%
K	ARA23139_Dezidougou_CI_1988	3,9%	3,1%	3,7%	3,5%	2,9%	2,7%	3,8%	4,1%	3,0%	2,9%		1,3%	1,1%	2,2%
L	AY632545_DakArB209_RCA_1966	7,0%	6,7%	7,3%	7,1%	6,4%	6,2%	6,7%	6,9%	6,6%	6,4%	6,8%		1,4%	2,2%
M	HQ644143_Espagne_H_2010	2,4%	0,6%	1,2%	1,0%	0,4%	0,2%	2,5%	2,3%	0,5%	0,4%	2,7%	6,3%		2,0%
N	EU684972_Inde_96363_1996	6,3%	5,6%	6,2%	6,0%	5,4%	5,2%	6,3%	6,3%	5,5%	5,4%	5,9%	7,7%	5,2%	

Figure 17 : Analyse des distances génétiques (en pourcentage) au niveau nucléotidique (gris) et au niveau des acides aminés (bleu) entre les polyprotéines des isolats du virus Bagaza caractérisés dans cette étude (cadre rouge) et en comparaison avec les séquences précédemment disponibles (cadre noir). Les cellules entre les bordures rouges en trait plein et noires en tirets correspondent aux distances génétiques séparant les isolats du virus Bagaza circulant au Sénégal et celui isolé en Côte d'ivoire. Les valeurs extrêmes de la série de distances, séparant les isolats du Sénégal, ont été encadrées en noir.

2. 3. Les motifs conservés et les sites informatifs sur le génome

Les principaux motifs d'acides aminés impliqués dans la virulence et hautement conservés chez les flavivirus ont été retrouvés au niveau des protéines E, NS1, NS3 et NS5 de toutes les séquences disponibles du virus Bagaza, parfois avec la présence de mutations conservatives entre des acides aminés ayant les mêmes propriétés biochimiques (positions en gras et noir). Cependant, certaines séquences individuelles présentent des mutations d'acides aminés non-conservatives (positions en gras et rouge) (**Tableau 16**). Les mutations non-conservatives sont généralement spontanées, rares et aléatoires, constituent donc la principale source de diversité génétique. Ainsi, entre les positions 667-675 de la protéine d'enveloppe E de tous les isolats du virus Bagaza, nous avons observé un motif non-conservé présentant l'insertion d'une Leucine (L) à la position 674 de la polyprotéine du virus Bagaza. Au niveau de la protéine NS1, les motifs analysés ont été tous conservés mais nous avons observé des mutations non-conservatives chez deux isolats du virus Bagaza. L'analyse a montré des mutations **T**713**P et T**713**A** respectivement sur les séquences des isolats ARD171102_Barkédji_SEN_2004 et EU684972_96363_Inde_1996. Une mutation **P**1127**T** a été également été identifiée au niveau de la NS1 de l'isolat ARD54139_Dakar-Bango_SEN_1989**.**

Au niveau de la protéine NS3, les isolats ARD137998_Diawara_SEN_2000 et ARD138018_Diawara_SEN_2000 montraient des mutations **A**1723**P et P**1724**L** sur un motif conservé localisé entre les positions 1722-1728. Sur ce dernier, une mutation **L**1722**S** a été identifiée pour les séquences des isolats ARD138018_Diawara_SEN_2000 et ARD171075_Barkédji_SEN_2004. En outre, toutes les séquences du virus Bagaza analysées présentaient une mutation **F**1766**L** au niveau d'un motif non-conservé identifié entre les positions 1759-1766 correspondant à la protéine NS3. Sur cette partie du génome, l'isolat ARD138018_Diawara_SEN_2000 a été le seul à présenter les mutations **T**1765**P et D**1785**Y**. Au niveau de la protéine NS5, nous avons observé un motif non-conservé entre les positions 2734-2741 présentant une mutation non-conservative **T**2738**N** sur les séquences de tous les isolats du virus Bagaza. En plus de cette mutation, seul l'isolat ARD54139_Dakar-Bango_SEN_1989 présentait deux autres mutations **S**2734**W** et **S**2737**P** (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Localisation des principaux motifs d'acides aminés hautement conservés chez les flavivirus au niveau des protéines E, NS1, NS3 et NS5

Région	Principaux motifs d'acides aminés décrits chez les flavivirus	Position sur le génome	Conservé	Excepté sur ces isolats	Remplacé par cette séquence consensus
E	DRGWGNGC	387-394	**OUI**	ARD171075_BARKÉDJI_SEN_2004	**ARSR**GNGC
	GLFGKGS	395-401	**OUI**	ARD171102_BARKÉDJI_SEN_2004	GLF**A**KGS
	GHLKCRV	573-579	**OUI**		
	PFGDSYIV	667-675	**NON**	Toutes les séquences du virus Bagaza	PFGDS**FI**L**L**V
NS1	DTAWDFGS	712-719	**OUI**	ARD171102_BARKÉDJI_SEN_2004	D**P**AWDFGS
				EU684972_96363_Inde_1996	D**A**AWDFGS
	GCWYGMEI	1118-1125	**OUI**		
	YGMEIRP	1120-1127	**OUI**	ARD54139_DAKAR-BANGO_SEN_1989	YGMEIR**T**
NS3	GTSGSPI	1633-1639	**OUI**		
	GLYGNG	1648-1653	**OUI**	ARUS20100_MATAM_SEN_1989	G**V**YGNG
	LAPTRVV	1722-1728	**OUI**	ARD137998_DIAWARA_SEN_2000	L**PL**TRLV
				ARD138018_DIAWARA_SEN_2000	**SPL**TRLV
				ARD171075_BARKÉDJI_SEN_2004	**S**APTRLV
	DVMCHATF	1759-1766	**NON**	ARD138018_DIAWARA_SEN_2000	DVMCHA**PL**
				Autres séquences du virus Bagaza	DVMCHAT**L**
	MDEAHF	1784-1789	**OUI**	ARD138018_DIAWARA_SEN_2000	M**Y**EAHF
	SIAARGY	1794-1800	**OUI**		
	MTATPPG	1815-1821	**OUI**		
	ISEMGAN	1911-1917	**OUI**		
	SAAQRRGR	1954-1961	**OUI**		
NS5	DLGCGRG	2601-2607	**OUI**		
	SRNSTHEMY	2734-2741	**NON**	ARD54139_DAKAR-BANGO_SEN_1989	**W**RN**PN**HEMY
				Autres séquences du virus Bagaza	SRNS**N**HEMY
	NMMGKREKK	2977-2986	**OUI**		
	ADDTAGWDT	3056-3064	**OUI**		
	WMTTEDML	3330-3337	**OUI**		

Les motifs d'acides aminés conservés chez les flavivirus décrits par **Kuno & Chang (2007).**
Les positions montrant des mutations conservatives sur la polyprotéine du virus Bagaza ont été marquées **en gras et noir**.
Les positions montrant des mutations non-conservatives sur la polyprotéine du virus Bagaza ont été marquées en **gras et rouge.**
Les noms des isolats ont été constitués dans le format suivant : Numéro d'identification, Origine, code du pays (SEN : Sénégal) et année d'isolement ; excepté l'isolat de l'Inde (numéro d'accession, numéro d'identification, pays, et année d'isolement).

A alanine	**B acide aspartique**	**C cystéine**	**D aspartate**
E glutamine	**F phénylalanine**	**G glycine**	**H histidine**
I isoleucine	**K lysine**	**L leucine**	**M méthionine**
N asparagine	**P proline**	**Q acide glutamique**	**R arginine**
S sérine	**T thréonine**	**U selenocystéine**	**V valine**
W tryptophane	**X aucun**	**Y tyrosine**	**Z acide glutamique ou glutamine**

Majoritairement constitués de mutations non-conservatives entre les acides aminés, les sites informatifs retrouvés sur la région codante du génome virus Bagaza peuvent conduire à des différences phénotypiques entre les différents isolats. Ainsi, trois sites informatifs ont été identifiés respectivement au niveau de la NS3, de la NS4B et de la NS5 des isolats du virus Bagaza. Le site **LAP** identifié entre les positions 1722-1714 au niveau de la NS3, correspond à une partie d'un motif conservé mais présentant des mutations non-conservatives chez trois isolats du virus Bagaza. En outre, les sites informatifs **IEGA** et **GRIWNA,** présents respectivement au niveau des protéines NS4B et NS5, montraient des variations pour les isolats AY632545_DakArB209_RCA_1966 et ARD260266_Barkédji_SEN_2014 (**DKGQ/RRSS** et **RTDMEC**) (**Figure 18**).

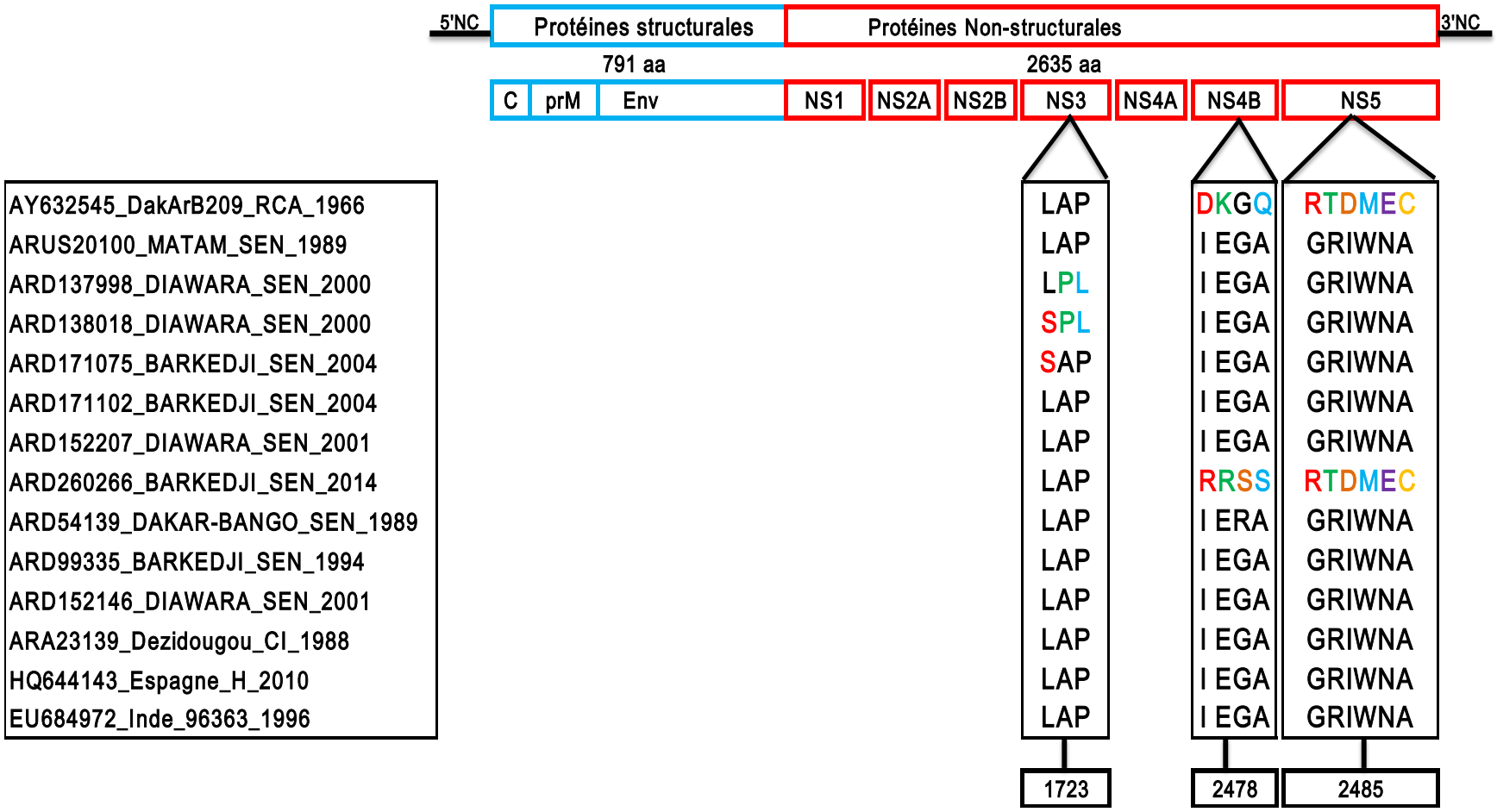
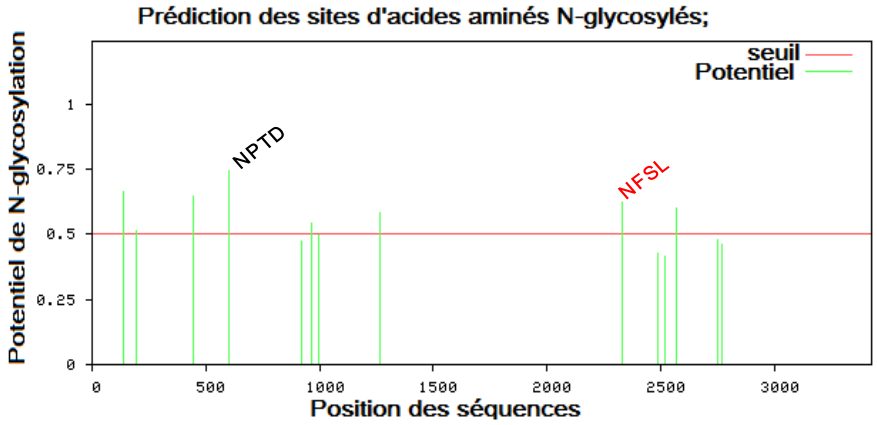


Figure 18 : Détermination des sites informatifs sur les polyprotéines des isolats du virus Bagaza. Les positions en couleur représentent les acides aminés présentant des différences au niveau des sites identifiées pour les isolats correspondants. La localisation de chaque motif peut être identifiée par sa position sur le génome du virus Bagaza.

2. 4. Prédiction de sites d'acides aminés N-glycosylés

La prédiction de sites N-glycolysés sur le génome du virus Bagaza a déterminé deux sites montrant un potentiel plus important. Malgré un score plus élevé (0,7452) et une forte prédiction (9/9), le site **NPTD** retrouvé à la position 603 n'est pas considéré comme pouvant être N-glycosylé car il contient une Proline connue pour empêcher la glycosylation dans la majorité des cas en rendant l'Asparagine inaccessible. Ce site a été localisé au niveau du domaine III de la protéine d'enveloppe E de tous les isolats du virus Bagaza. Cependant, un autre site **NFSL** présentant un potentiel élevé (score 0,6223 (9/9)) a été retrouvé à la position 2333. La position du site N-glycosylé au niveau de l'Asparagine 2333 correspond à l'acide aminé 65 de la protéine NS4B de tous les isolats du virus Bagaza (**Figure 19**).



(Seuil=0.5)	Position	Potentiel	Accord du Jury	Résultat de N-Glyc	
	137	NQTD	0,6618	(8/9) +	
	192	NTTE	0,5120	(6/9) +	
	443	NYSI	0,6462	(7/9) +	
	603	NPTD	0,7452	(9/9) ++	PRO-X1
	920	NNTF	0,4752	(4/9) -	
	965	NTTE	0,5408	(5/9) +	
	997	NGSW	0,4947	(6/9) -	
	1264	NMTI	0,5850	(7/9) +	
	2333	NFSL	0,6223	(9/9) ++	Asn-Xaa-Ser/Thr
	2486	NATT	0,4252	(6/9) -	
	2517	NGSM	0,4174	(7/9) -	
	2570	NVTG	0,6014	(8/9) +	
	2750	NITN	0,4813	(5/9) -	
	2767	NRTN	0,4622	(6/9) -	

\- Potentiel < 0,5 : Sites Non-glycosylés
\+ Potentiel > 0,5 : Sites N-glycosylés
\+ + Potentiel > 0,5 et Accord du Jury (9/9) : Sites N-glycosylés plus prédits

Figure 19: Prédiction des sites d'acides aminés N-glycosylés sur le génome des isolats du virus Bagaza. Les prédictions ont été réalisées en utilisant le serveur en ligne NetNGlyc 1.0.

Les sites avec des Asparagines montrant une plus forte prédiction à être soumises à une glycosylation, ont été montrés en rouge.

2. 5. Structures secondaires au niveau des régions 5' et 3' non-codantes

L'analyse *in silico* des séquences utilisées dans cette étude a montré qu'au niveau de la région 5' non-codante, seules les positions nucléotidiques 52, 55 et 93 ont été différentes. En comparaison avec les isolats séquencés en Espagne, un A est remplacé par un C et un T par un C, respectivement aux positions 52 et 55 sur les séquences des isolats africains. A la position nucléotidique 93, un T est remplacé par un C sur les séquences des isolats ARD54139_Dakar-Bango_SEN_1989 et ARA23139_Dézidougou_CI_1988. Cependant, la région 3' non-codante peut être subdivisée en 3 régions; une première partie très variable constituée des 139 premiers nucléotides suivant le codon stop de la région codante, une seconde partie très conservée localisée entre les positions 140 et 434 et une dernière partie moyennement conservée entre les différents isolats du virus Bagaza et comprenant les 142 derniers nucléotides. Sur cette derniére partie, les séquences des isolats Ouest-africains sont complétement différents de la séquence de la RCA (AY632545) et différents des séquences d'Espagne (KR108244-6) qu'au niveau des 36 derniers nucléotides. Aucune structure secondaire d'ARN n'a été identifiée au niveau de la région 5'non-codante tandis que quatre structures secondaires d'ARN non-codante ont été déterminées au niveau de la région la plus conservée de l'extrémité 3' non-codante avec des probabilités respectives de 0,67, 0,99, 0,97 et 0,84 et des directions de lecture respectives antisens-antisens-sens-antisens (**Figure 20**).

```
>Sequence consensus structure ARN 1     direction: antisens          P= 0,671490
ACAAAACCUGUGGCCUGACUCUGGGUGCCUAUCCUCUCCAACGCCAGGGAGCUCUCCGAGUCGGUAUUGAGCGCUUUGCGUGUUGAGUGUCGGACACUUUGGUGACCCAGUCCUCCUGGG
.....(((.(((..(((((.((((((....))))....((((((((((.((((.(((...)))....)))).))))).)))))))).))))).)))...)))..(((((.....)))))


>Sequence consensus structure ARN 2     direction: antisens          P= 0,994641
GGCCACGGGGGCCUUACGGCUUUGUUUACCCAGUCCACCUGGGGCAUGUCUUUACUCAGGCAGCACUGCAUGCUAGUGGCACAAAACCUGUGGCCUGACUCUGGGUGCCUAUCCUCUCCA
((((((((((((....))))((((...(((((.....)))))((.(((((.....))))).(((((.....)))))))))))..))))))))).......((((....))))......


>Sequence consensus structure ARN 3     direction: sens              P= 0,976295
GCCACUAGCAUGCAGUGCUGCCUGAGUAAAGACAUGCCCCAGGUGGACUGGGUAAACAAAGCCGUAAGGCCCCCGUGGCCCAAGCAAGGGGAUGGUGUGACCCUUGUGUAAGGACUAGAG
(((((....((.((((.(..((((.(((......)))..))))..)))))).))).......(((....)))....)))))((..(((((((..........)))))))....)).......


>Sequence consensus structure ARN 4     direction: antisens          P= 0,846482
GGGGUCUCCUCUAACCUCUAGUCCUUACACAAGGGUCACACCAUCCCCUUGCUUGGGCCACGGGGGCCUUACGGCUUUGUUUACCCAGUCCACCUGGGGCAUGUCUUUACUCAGGCAGCA
((((...))))...((((..((((.....((((((..........))))))...))))...))))(((....))).........(((((.....)))))((.(((((......)))))))).
```

LÉGENDE :

"**.**" : Représente une base non appariée,
"**(**" : Correspond à une base appariée dont l'autre base impliquée dans la paire est encore 3 '
"**)**" : Correspond à une base appariée dont l'autre base impliquée dans la paire est encore 5 '

Figure 20: Structures d'ARN consensus identifiées à partir des séquences de la région 3'non-codante du virus Bagaza utilisées dans cette étude. La prédiction a été effectuée en utilisant la méthode implémentée sur le serveur Vienna RNA Websuite (Gruber *et al.,* 2008). Une probabilité de classification supérieure à 0,05 a été considérée comme significative.

Les structures secondaires consensus des régions non-codantes ont été obtenues avec la méthode RNAalifold. Ainsi, l'extrémité 5' présente une large structure en tiges-loupes (SL-A) qui sert de promoteur à l'activité de la polymérase virale suivie par un court ensemble qui contient la séquence de cyclisation en amont du codon initiateur 5'AUG (SL-B). Comme celles d'autres flavivirus transmis par des moustiques (Roby *et al.,* 2014), la structure secondaire de la région 3' non-codante est constituée de trois parties; un domaine proximal très variable suivant le codon stop, constitué par une structure en tiges et loupes (tiges-loupes), riche en liaisons A-U (SL-I), un second domaine moyennement conservé, composé de deux éléments en tige-boucle et un domaine distal très conservé constituant une structure d'ARN subgénomique (ARNsg) et présentant un élément en tiges-loupes (SL-II) connectée à un pseudo-nœud (PK1) et précédé par une courte loupe conservée RCS3. Ce motif est répété sur une structure SL-III avec un pseudo-nœud PK2. En aval de cette dernière, il existe deux structures en forme d'haltère (DB1 et DB2) et l'haltère DB1 prédit le troisième pseudo-nœud (PK3). Enfin, la structure secondaire de la région 3' non-codante se termine par une courte région tige-loupe (**Figure 21**). En outre, sur la base de cette structure secondaire consensus, l'organisation des séquences conservées (CS) pour la structure secondaire de la région 3' non-codante du virus Bagaza a été RCS3-CS3-RCS2-CS2-ImCS1 comme précédemment décrite (Kuno & Chang., 2007). Cependant, la séquence conservée CS1 n'a été identifiée comme imparfaite (ImCS1) que sur les séquences Ouest-africains du virus Bagaza avec neuf substitutions de bases par rapport à la séquence consensus précédemment décrite (Kuno & Chang, 2007).

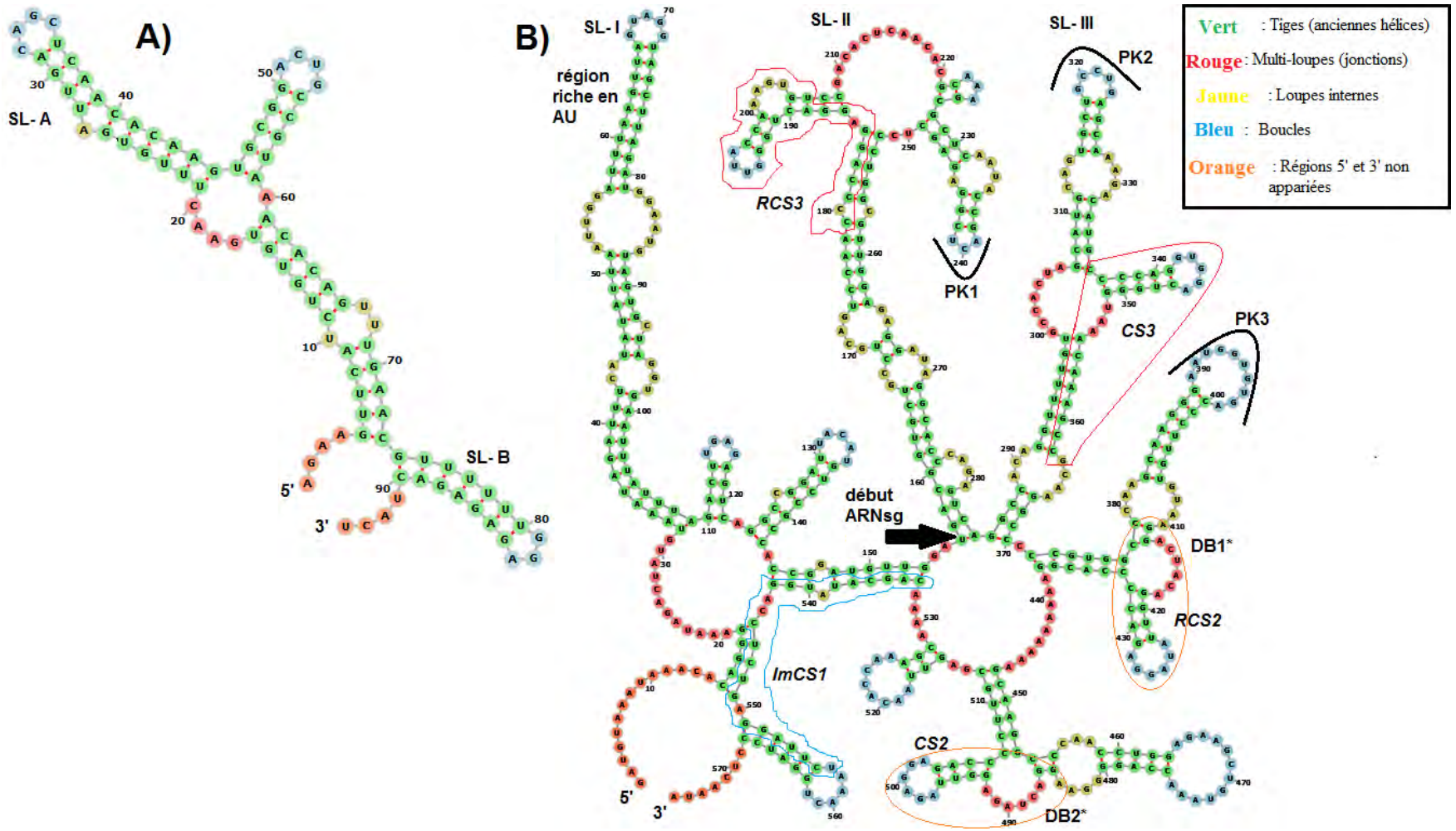


Figure 21: Structures secondaires consensus des régions 5' (A) et 3' (B) non-codantes du virus Bagaza. Les prédictions effectuées en utilisant la méthode RNAalifold implémentée sur le serveur Vienna RNA Websuite ont permis de voir une structure d'ARN subgénomique (ARNsg) au niveau de la région 3' non-codante avec une organisation 5'-3' des séquences conservées RCS3-CS3-RCS2-CS2-ImCS1.

2. 6. Analyse phylogénétique des séquences du virus Bagaza

Pour construire l'arbre phylogénétique, nous avons utilisé au total vingt séquences de polyprotéine complète d'isolats du virus Bagaza avec une taille de 10.281 pb (**Figure 22**). Ces séquences ont été constituées des onze polyprotéines obtenues au cours de cette étude, les cinq séquences de l'Espagne, les séquences de l'Inde et de la République Centrafricaine, une séquence du virus ITV identique au virus Bagaza. La séquence du virus Ntaya a été utilisée comme *''outgroup''*. L'analyse bayésienne de nos données de séquences a déterminé le *generalized time-reversible* avec une catégorie gamma discrète et une proportion de sites invariables (GTR+I) comme étant le modèle de substitution nucléotidique le plus adapté, en présentant des scores de 69924,128, 69453,449 et -34680,714 respectivement pour les critères Bayésiens BIC, AICc et *lnL*. Ainsi, l'analyse phylogénétique montre l'évidence d'un seul clade du virus Bagaza. En outre, l'analyse montre que l'ITV est relativement proche du virus Bagaza (**Figure 22**).

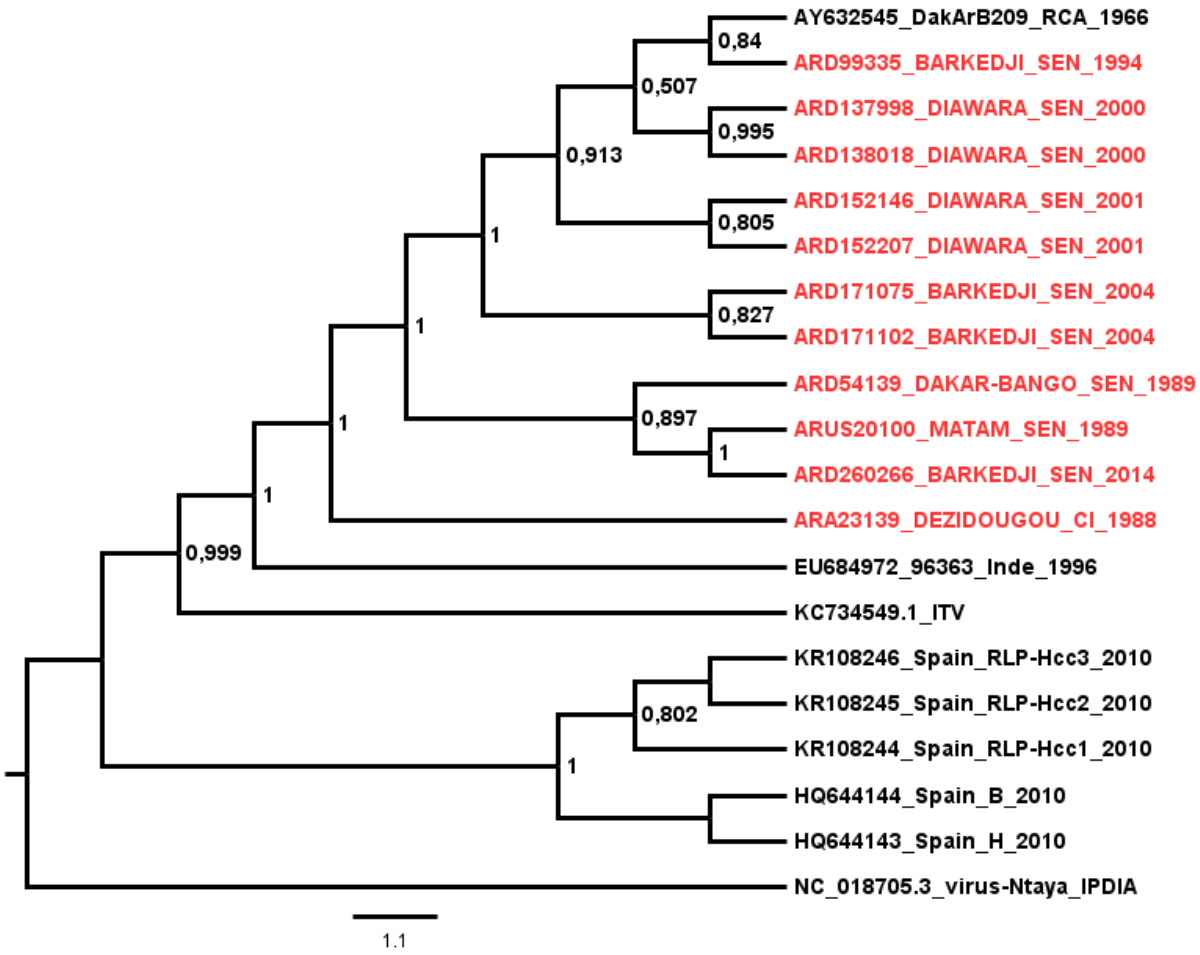


Figure 22: Arbre phylogénétique basé sur les séquences complètes d'isolats du virus Bagaza circulant au Sénégal et en Côte d'ivoire de 1988 à 2014. Les isolats caractérisés au cours de cette étude ont été marqués en rouge sur l'arbre phylogénétique tracé en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance avec le modèle GTR+I. Les nœuds ont été marqués par valeurs de support local calculées avec le test de *Shimodaira-Hasegawa* (SH) pour 5000 réplications.

2. 7. Identification des évènements de recombinaison

Compte tenu des implications majeures de la recombinaison dans l'évolution, la pathogénicité ou le diagnostic des virus non segmentés à ARN positive tels que les flavivirus (Twiddy & Holmes, 2003), il est clairement important de déterminer leur présence sur le génome du virus Bagaza. Le programme RDP4 n'a déterminé que l'évidence d'un seul évènement crédible de recombinaison localisé entre les positions 2202 et 4908 du génome correspondant respectivement à la protéine d'enveloppe E et la NS2B. Cet événement de recombinaison concerne l'isolat ARD54139_Dakar-Bango_SEN_1989 provenant de la région de Saint-Louis au Nord du Sénégal et ses séquences parentales minoritaire et majoritaire ont été respectivement les isolats ARD260266_Barkédji_SEN_2014 et ARD171075_Barkédji _SEN_2004 avec des similarités respectives de 98,8% et 97%. Cet événement de recombinaison a été trouvé par les méthodes RDP, GENECONV, Bootscan, Maxchi, Chimaera, SiSscan et 3Seq avec des p-values respectives de 3,09E-16, 9,23E-12, 7,36E-13, 8,45E-7, 1,59E-7, 3,60E-8 et 1,17E-12. Les analyses BootScan et GARD ont également un point de recombinaison à la position nucléotidique 2201 correspondant à la région de la protéine d'enveloppe E avec des valeurs de p-values of 0,024 et 0,001 (**Figure 23**). La position de ce point de recombinaison divise le génome en deux régions : une codant pour les protéines structurales et une autre codant pour les protéines non-structurales. Cet évènement de recombinaison conduit à une discordance entre les arbres phylogénétiques tracés en utilisant la méthode du maximum de parsimonie pour comparer les séquences nucléotides du fragment recombinant (positions 2202-4908) et celles des régions non-recombinantes (positions 1-2201 et 4909-10281) **(Figure 24).**

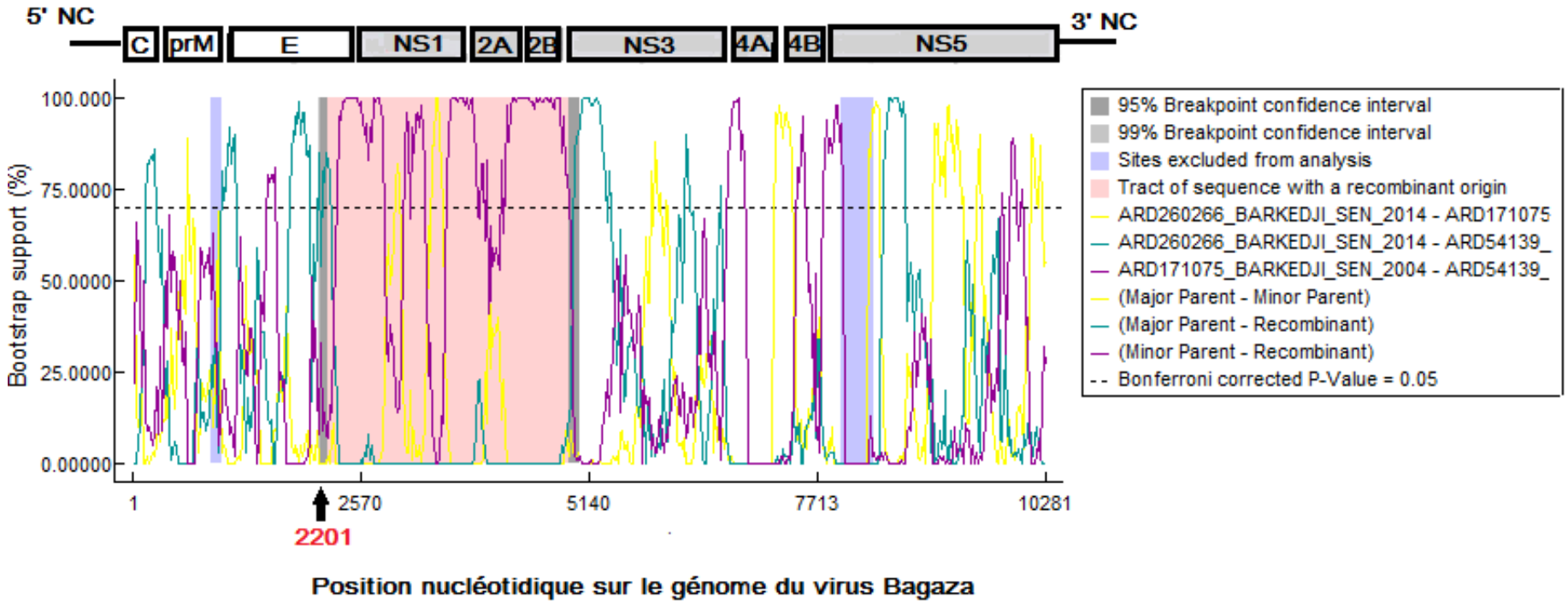


Figure 23: Identification des événements de recombinaison sur le génome du virus Bagaza. Les analyses ont été effectuées avec le programme RDP4. Seul un épisode de recombinaison hautement crédible a été observé et impliquait l'isolat ARD54139_Dakar-Bango_SEN_1989 du Sénégal. Les méthodes BootScan et GARD ont identifié un point de recombinaison à la position nucléotidique 2201 dans la région de la protéine d'enveloppe E, soutenu par des valeurs de bootstrap élevées et des p-values significatives (0,024 et 0,001).

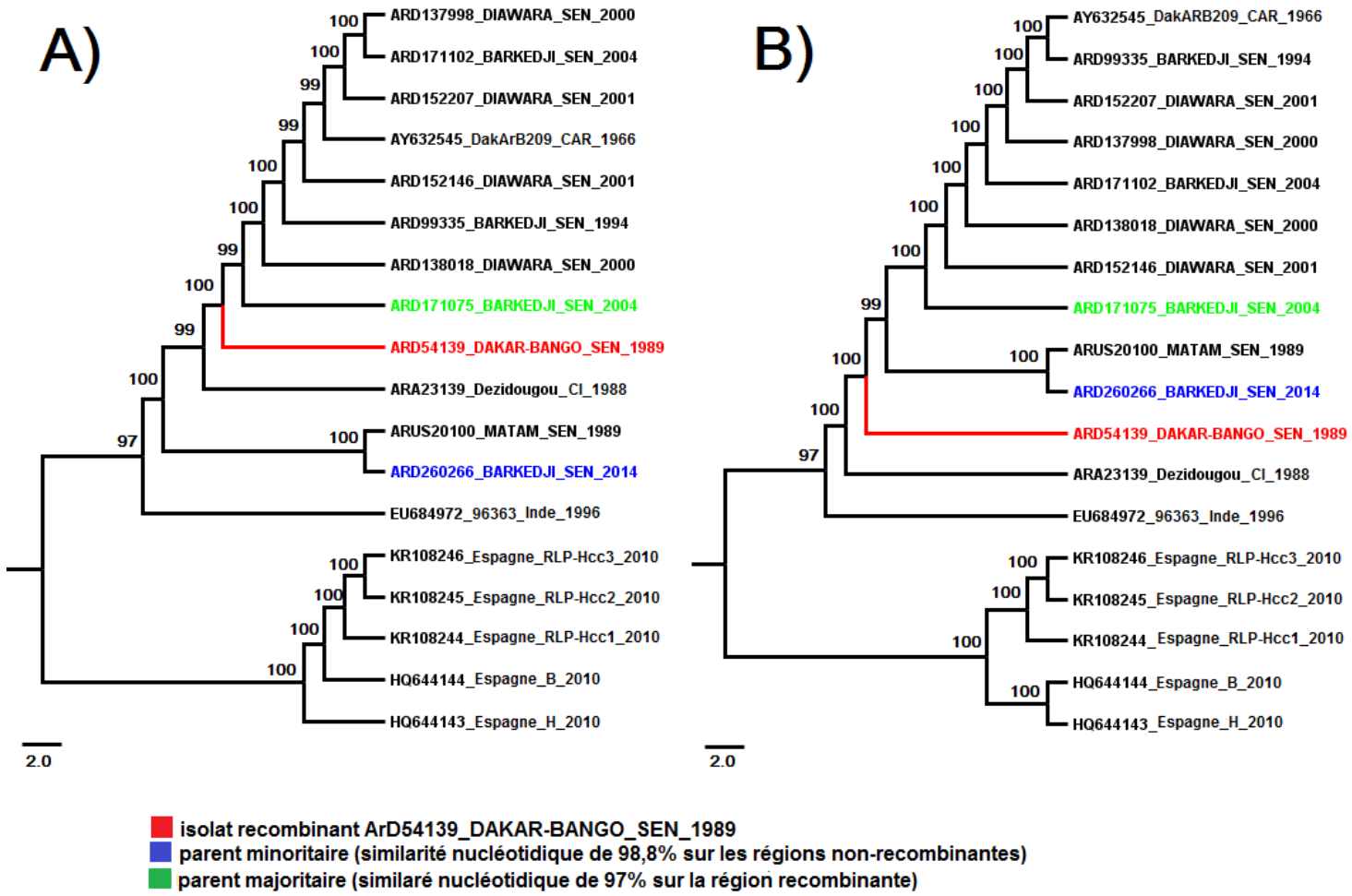


Figure 24: Abres phylogénétiques montrant la discordance entre la région recombinante (A) et les fragments non-recombinants (B) identifiés sur le génome du virus Bagaza par sept méthodes différentes mise en œuvre dans le programme RDP4. Les arbres phylogénétiques ont été tracés avec la méthode du maximum de parsimonie pour 100 réplications et enracinés sur les nœuds.

2. 8. Détermination des épisodes de sélection positive

Chaque gène de la région codante du génome a été analysé avec quatre méthodes différentes pour l'estimation de sites évoluant sous une sélection positive. En utilisant cette approche, nous avons trouvé un nombre important de sites soumis à une sélection négative et la plupart d'entre eux a été localisée au niveau des protéines E, NS3 et NS5. Cependant, l'évidence d'un épisode de sélection ($p < 0,1$) positive a été trouvée au niveau de tous les gènes, à l'exception de la prM, de la NS2B et de la NS4A. Tous les épisodes de sélection positive estimés avec le modèle FUBAR (probabilité $\geq 0,9$) ont été également identifiés par la méthode MEME ($p < 0,1$). Ainsi, un nombre important de sites soumis à des pressions de sélection positive a été identifié et la majorité a été trouvée au niveau des protéines E, NS1 et NS5. L'analyse avec la méthode Branch-site REL a déterminé 11 branches évoluant sous une pression de sélection positive ($p < 0,05$) et les plus grandes proportions ont été détectées au niveau des protéines E et NS1 (**Tableau 17**).

Tableau 17 : Identification des épisodes de sélection positive ou diversification sur les gènes du virus Bagaza

Gènes		Nombre de sites détectés par méthode				Evidence d'une sélection positive
		SLAC ($p < 0.1$)	FUBAR (probabilité $\geq 0,9$)	MEME ($p < 0,1$)	Branch-site REL ($p < 0,05$)	
Capside	Sites sous une sélection négative (dN/dS < 1)	0	4	0	0	OUI
	Sites sous une sélection positive (dN/dS >1)	0	2	2	0	
prM	Sites sous une sélection négative (dN/dS < 1)	6	11	0	0	NON
	Sites sous une sélection positive (dN/dS >1)	0	0	0	0	
E	Sites sous une sélection négative (dN/dS < 1)	15	88	0	0	OUI
	Sites sous une sélection positive (dN/dS >1)	0	1	15	4	
NS1	Sites sous une sélection négative (dN/dS < 1)	7	33	0	0	OUI
	Sites sous une sélection positive (dN/dS >1)	0	0	11	3	
NS2A	Sites sous une sélection négative (dN/dS < 1)	3	9	0	0	OUI
	Sites sous une sélection positive (dN/dS >1)	0	0	1	1	
NS2B	Sites sous une sélection négative (dN/dS < 1)	4	8	0	0	NON
	Sites sous une sélection positive (dN/dS >1)	0	0	0	0	
NS3	Sites sous une sélection négative (dN/dS < 1)	17	63	0	0	OUI
	Sites sous une sélection positive (dN/dS >1)	0	0	4	1	
NS4A	Sites sous une sélection négative (dN/dS < 1)	2	5	0	0	NON
	Sites sous une sélection positive (dN/dS >1)	0	0	0	0	
NS4B	Sites sous une sélection négative (dN/dS < 1)	2	14	0	0	OUI
	Sites sous une sélection positive (dN/dS >1)	0	0	3	1	
NS5	Sites sous une sélection négative (dN/dS < 1)	0	274	0	0	OUI
	Sites sous une sélection positive (dN/dS >1)	0	0	10	1	

2. 9. Analyse phylodynamique

Une convergence du MCMC a été obtenue pour trois analyses indépendantes avec 100 millions de générations, lesquelles ont été suffisantes pour obtenir une taille de population (ESS) supérieure à 200 pour chaque gène. En outre, les taux d'évolution (μ) et les densités de postérieur les plus élevées (à un intervalle de confiance de 95%) ont été de 1,226 x 10^{-3} (1,271 x 10^{-3} - 1,178 x 10^{-3}), 4,218 x 10^{-7} (4,262 x 10^{-3} - 4,168 x 10^{-3}), 3,181 x 10^{-3} (3,224 x 10^{-3} - 3,125 x 10^{-3}), 1,092 x 10^{-3} (1,142 x 10^{-3} - 1,044 x 10^{-3}), 3,910 x 10^{-3} (3,951 x 10^{-3} - 3,882 x 10^{-3}), 1,921 x 10^{-3} (1,970 x 10^{-3} - 1,868 x 10^{-3}) and 6,430 x 10^{-3} (6,480 x 10^{-3} - 6,386 x 10^{-3}) substitutions/site/an, respectivement pour les protéines C, E, NS1, NS2A, NS3, NS4B et NS5. L'analyse Bayésienne du MCC par gène a montré l'évidence d'un seul groupe phylogénétique du virus Bagaza évoluant à partir d'un plus proche ancêtre commun (MRCA) originaire de l'Inde. Ainsi, l'arbre consensus obtenu avec les séquences concaténées des différents gènes en utilisant l'approche Bayésienne du MCC indique une introduction du virus Bagaza en Afrique depuis le 15e siècle tandis que ce virus a connu une introduction récente en Europe durant le 20e siècle (**Figure 25**). L'estimation des dates de divergence (à 95% d'intervalle de crédibilité Bayésienne) a déterminé que les protéines C, E, NS1, NS2A, NS3, NS4B et NS5 ont évolué respectivement depuis 398 (93 - 3.358), 1577 (267 - 1,88E4), 938 (164 - 9.092), 308 (93 – 3.358), 1627 (284 - 1,71E4), 946 (136 - 1,14E4) et 4525 (535 - 5,57E4) années à partir d'un plus proche ancêtre comm (MRCA) originaire de l'Inde.

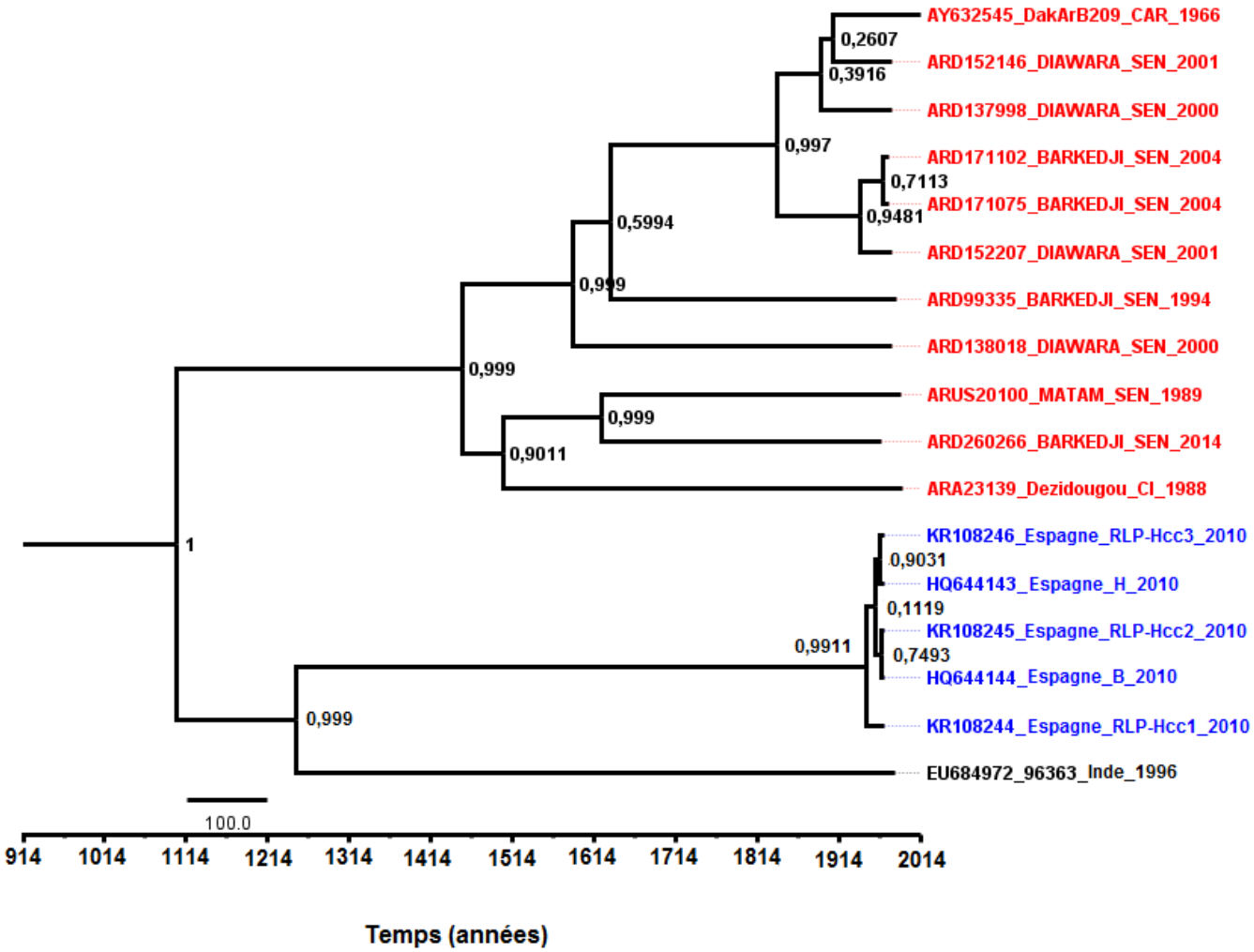


Figure 25: Arbre phylogénétique tracé avec la méthode Bayésienne du maximum de crédibilité des clades (MCC) en utilisant les séquences concaténées des protéines C, E, NS1, NS2A, NS3, NS4B et NS5 des isolats du virus Bagaza virus.

Les isolats africains ont été marqués en rouge et ceux provenant d'Espagne en bleu. Sur cet arbre consensus du MCC, les nœuds ont été soutenus par les valeurs de postérieurs et l'arbre a été enraciné sur le temps d'émergence estimé à partir de l'ancêtre commun le plus proche (MRCA).

10. Evidence d'une adaptation du virus Bagaza à l'Homme

L'évidence d'une adaptation du virus Bagaza aux codons humains a été analysée en calculant l'indice d'adaptation des codons ou CAI. Des valeurs de CAI supérieures à 1 ont été obtenues avec les polyprotéines de tous les isolats du virus Bagaza. Ainsi, il existe bien une évidence que le virus Bagaza peut s'adapter au génome humain. Les isolats du Sénégal ont un CAI moyen de 1,044 et un CAI médian de 1,044 pour les génes humains. Comparés aux séquences des isolats du virus Bagaza d'Espagne, leurs CAI ont été significativement plus élevés (Test de Wilcoxon, p-value < 0,002). Les isolats du Sénégal ont également présenté des valeurs de CAI supérieures de façon significative à la DEN-2 (Test de Wilcoxon, p-value < 1,4e-06). Toutefois, ils ont été inférieurs à la DEN-1 (Test de Wilcoxon, W= 231, p-value= 2,869e-06) et comparables aux sérotypes DEN-3 et DEN-4 (Test de Wilcoxon, respectivement W= 3258, p-value= 0,06477 et W= 824, p-value= 0,3463). Les isolats du virus Bagaza circulant au Sénégal ont également présenté des valeurs de CAI supérieures de façon significative à celles des virus Usutu (Test de Wilcoxon, p-value < 6,796e-09), West Nile (Test de Wilcoxon, p-value < 2,718e-10) et Zika (Test de Wilcoxon, p-value < 1,67e-08). Cependant, le virus de la fièvre jaune a le plus important CAI pour les gènes humains (CAI moyen : 1,075 et CAI médian : 1,072). Il a des différences significatives avec les séquences du virus Bagaza isolés en Espagne (Test de Wilcoxon, W= 704, p-value= 1,028e-07) et au Sénégal (Test de Wilcoxon, W= 320, p-value= 0,0001). Comparées aux codons des gènes humains, les séquences du virus de la mosaïque du tabac (VMT) ont présenté un CAI moyen de 0,9587 et un CAI médian de 0,9592 (**Figure 26**).

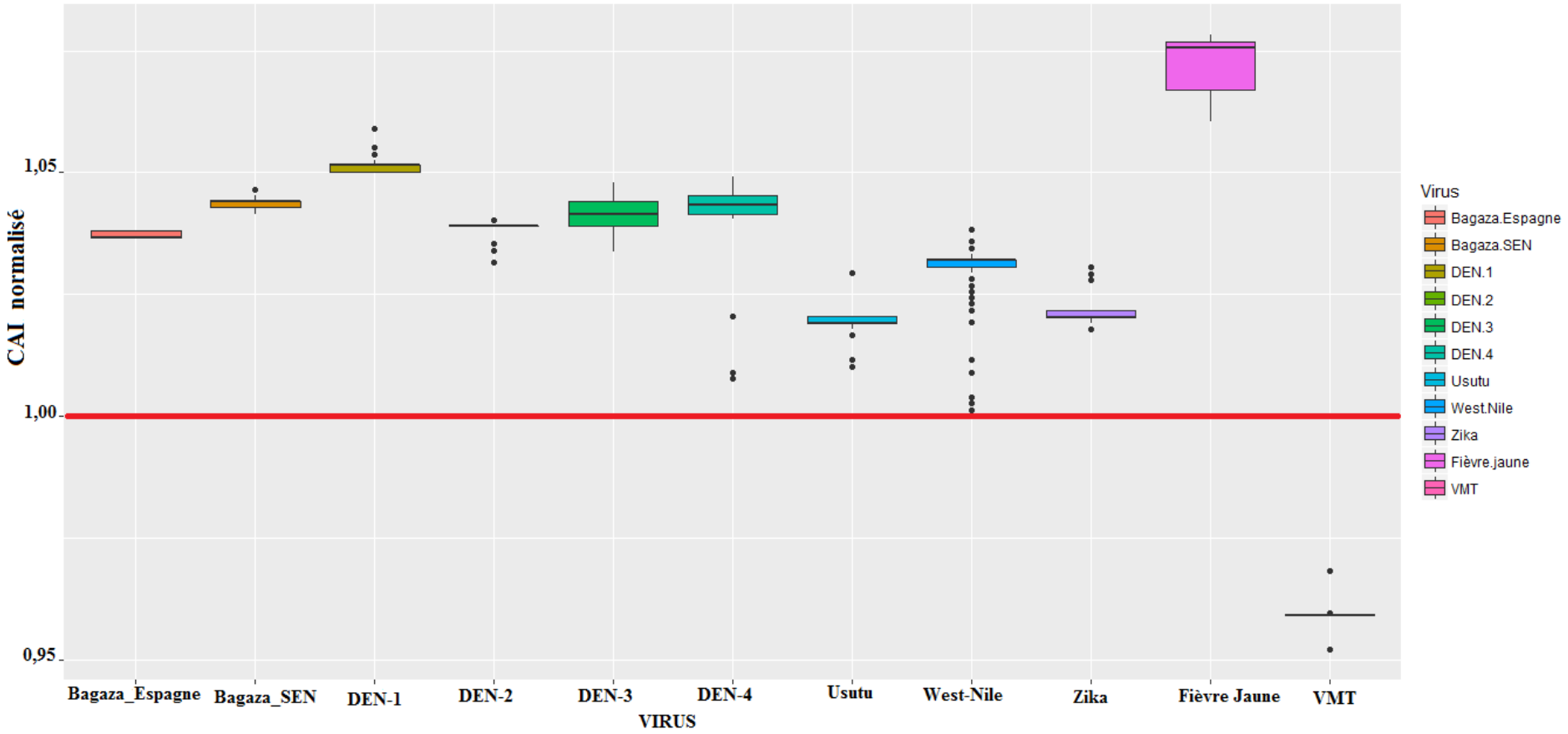


Figure 26: Evidence d'une adaptation du virus Bagaza au génome humain en comparaison avec d'autres flavivirus transmis à l'homme par des moustiques. Les valeurs de CAI normalisé obtenues avec les polyprotéines des isolats du virus Bagaza circulant au Sénégal ont été comparées à celles de différents flavivirus connus chez l'Homme. Une valeur de CAI seuil égale à 1 est définie sur la figure pour l'analyse.

3. DISCUSSION

Avec un nombre élevé de virus émergents ou ré-émergents impliqués dans les cas d'encéphalite humaine, il est important de mieux connaître les étiologies virales pouvant être responsables d'encéphalite humaine dans le futur. Le virus Bagaza est un flavivirus circulant dans la nature chez les insectes en Afrique de l'Ouest et du centre et en Inde (Sudeep *et al.,* 2015). En outre, le virus Bagaza a été responsable d'une épidémie en 2010 chez des espèces d'oiseaux sauvages en Espagne (Aguëro *et al.,* 2011). Ainsi, avec les possibles événements de passage à de nouveaux hôtes (*host-switching*) (Kitchen *et al.,* 2011), le virus Bagaza pourrait s'adapter à d'autres vertébrés tels que l'Homme (Villordo *et al.,* 2016). Au cours de cette étude, les caractéristiques génétiques des isolats du virus Bagaza circulant au Sénégal, l'évolution phylogénétique du virus Bagaza et l'évidence de son adaptation au génome humain ont été évaluées en comparaison avec les séquences disponibles du virus Bagaza et d'autres flavivirus connus chez l'Homme.

Nous avons réalisé la caractérisation de onze souches du virus Bagaza isolés de moustiques entre 1988 à 2014, dont dix provenant de différentes localités du Sénégal. La composition du génome montre des similarités de taille avec les séquences précédentes des isolats caractérisés en RCA (AY632545) et en Espagne (HQ644143) au niveau de la région 5'NC et de la partie codante du génome (de la Capside à NS5). Cependant, l'extrémité 3'NC des isolats circulant au Sénégal et en Côte d'ivoire présente des différences en termes de taille et de structure. Comme pour d'autres flavivirus transmis par des moustiques (Roby *et al.,* 2014), un ARNsg est identifié sur le génome du virus Bagaza. En effet, la dégradation incomplète de l'ARN génomique par l'activité 5'-3' de l'exonucléase cellulaire XRN1 bloquée par les structures très stables SL/PK, entraîne la formation d'un court ARNsg qui joue un rôle dans la pathogénicité virale (Pijlman *et al.,* 2008; Liu *et al.,* 2010; Chapman *et al.,* 2014). En outre, une étude précédente a montré que la partie 3' terminale de la région 3' non-codante suivant les séquences conservées (CS), associée au début de la région 5', est nécessaire pour la cyclisation de l'ARN génomique lors de la traduction et de la réplication virale (Thurner *et al.,* 2004). Toutefois, l'ARNsg peut être en compétition avec la région 3' non-codante de l'ARN génomique pour la fixation sur les protéines des complexes de réplication virales (Chang *et al.,* 2013) et/ou la machinerie cellulaire (Polacek *et al.,* 2009), et ainsi ralentir la

réplication ou la traduction et favoriser l'assemblage des particules virales (Roby *et al.* 2014). En plus de l'inhibition de la dégradation de l'ARN génomique, le ARNsg inhibe également la réponse interféron de l'hôte (Clarke *et al.,* 2015). Ainsi, la région 3'NC joue de multiples rôles dans la réplication et les interactions hôte-virus (Hussain *et al.,* 2012). Une meilleure connaissance du rôle potentiel de l'ARN subgénomique dans l'interaction du virus Bagaza avec l'arthropode (moustiques) pourrait être utile dans l'étude des mécanismes impliqués dans la pathogénicité des isolats circulant au Sénégal (Wang *et al.,* 2015).

Les faibles distances génétiques (< 2%) obtenues entre les isolats du virus Bagaza circulant au Sénégal et le faible coefficient de différenciation (0,17) existant entre les isolats du Sénégal et les séquences précédentes, ne montrent qu'une évidence de la faible diversité du virus Bagaza comme décrite dans une étude précédente (Aguëro *et al.,* 2011). Avec des distances génétiques inférieures à 0,7%, les isolats de Diawara en 2001 et de Barkédji en 2004 pourraient être une même et unique souche du virus Bagaza. Diawara est une ville du Sénégal oriental, située dans la région de Bakel, à environ 660 kilomètres (km) de la région de Dakar. C'est une zone située sur la rive gauche du fleuve Sénégal, à la frontière avec la Mauritanie. Barkédji est une localité située dans le département de Linguère dans la région de Louga et héberge la réserve sylvo-pastorale de Barkédji-Dodji, à environ 340 km de la région de Dakar. Ces deux zones représentent ainsi des contextes appropriés pour une prolifération des moustiques vecteurs d'arbovirus. Malgré la distance séparant ces deux localités, une même souche pourrait migrer entre ces deux localités, via le transport par l'Homme des moustiques infectés en vol passif sur plusieurs kilomètres (Verdonschot & Besse-Lototskaya, 2014). Les isolats du Sénégal ont été globalement plus proches de l'isolat AY632545_DakArB209_RCA_1966 (1,5% ±0,6% (0,8-2,5%)).

La plupart des motifs de virulence précédemment décrits au niveau des protéines E, NS1, NS3, NS5 des flavivirus, a été conservée chez les isolats du virus Bagaza. Cependant, les mutations non-conservatives observées sur certains motifs, chez quelques isolats du virus Bagaza, peuvent conduire à des différences phénotypiques au niveau des mécanismes comme l'entrée dans les cellules de l'hôte, la réplication, la production de particules virales et l'assemblage tel que décrit pour d'autres flavivirus comme le virus de la dengue (Hanley *et al.,* 2003). En effet, la protéine E est impliquée dans les phénomènes comme la reconnaissance des récepteurs cellulaires, le tropisme, l'attachement, la fusion cellulaire et la virulence (Roby *et al.,* 2015). Avec les autres protéines non-structurales, la protéine NS1 joue

un rôle dans la réplication virale, l'assemblage des virions et l'évasion à la réponse antivirale de l'hôte (Rastogi *et al.,* 2016). La protéine NS3 est la composante principale de la machinerie de réplication et assure des fonctions multiples dans l'évasion virale à la réponse immune de l'hôte et dans la production et l'assemblage des particules virales infectieuses (Gebhard *et al.,* 2016). Bien que les isolats virus Bagaza circulant au Sénégal soient plus proches de la souche AY632545_DakArB209_RCA_1966, deux des trois sites informatifs identifiés respectivement au niveau de la NS4B et de la NS5, montraient des différences pour cet isolat de la RCA et un isolat circulant en 2014 au Sénégal. Cependant, étant la partie d'un motif de virulence précédemment décrit, le site informatif identifié au niveau de la protéine NS3 ne présente des modifications que sur les séquences de trois isolats du Sénégal. En outre, la prédiction d'un site de N-glycosylation sur l'Asparagine 2333 (Asn-2333) localisée au niveau de la protéine NS4B montre que le virus Bagaza pourrait subir des modifications post-traductionnelles pouvant conduire à une acquisition ou une perte de capacités dans des mécanismes comme la pathogénicité ou l'évasion à la réponse antivirale de l'hôte. En effet, la protéine NS4B des flavivirus joue un rôle important dans la réplication de l'ARN viral en facilitant la formation des complexes de réplication et en modulant les réponses immunes innées de l'hôte comme les interférons, les microARNs et les ARN interférences, la formation de granules de stress et la réponse protéique, pour favoriser la réplication virale (Zmurko *et al.,* 2015). Ainsi, la protéine NS4B représente un cible approprié pour le développement d'antiviraux car elle est indispensable pour la réplication des flavivirus (Youn *et al.,* 2012; Chatel-Chaix *et al.,* 2015). Une étude récente a montré qu'une N-glycosylation au niveau de la NS4B du virus de la Dengue n'affecte pas la stabilité de la protéine mais entraîne une réduction considérable de l'efficience de la production virale (Naik & Wu., 2015). Néanmoins, il serait intéressant d'évaluer le rôle et l'impact d'une modification du site de N-glycosylation localisé sur l'Asparagine 2333 et des sites informatifs identifiés sur la biologie du virus Bagaza en produisant des clones infectieux sur lesquels il n'existera que la modification du site d'intérêt et réaliser des études *in vitro* sur des lignées cellulaires continues de mammifères et de moustiques et *in vivo* chez le moustique ou sur des modèles animaux comme la souris (Liu *et al.,* 2015).

Malgré les différences microscopiques identifiées ci-dessus, l'analyse phylogénétique des isolats du virus Bagaza ne montre qu'un seul groupe phylogénétique. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer cette diversité sur un nombre plus important d'isolats. Au cours de cette

étude, nous avons également analysé les événements d'évolution présents sur les séquences disponibles, tels que la recombinaison. L'identification d'un événement de recombinaison naturelle entre les séquences des différents isolats est importante pour notre compréhension de l'évolution du virus. Notre étude est la première à identifier un phénomène de recombinaison sur le génome du virus Bagaza. Bien que la recombinaison soit décrite chez d'autres flavivirus (Simon-Loriere & Holmes, 2011; Waman *et al.,* 2016), elle n'a pas été précédemment démontrée chez le virus Bagaza. La protéine d'enveloppe E est très importante car elle est nécessaire dans la biologie du virus. Ainsi, des importants changements dans cette région, provoqués par la recombinaison, pourraient avoir un impact significatif sur le phénotype du virus (Twiddy & Holmes., 2003). L'analyse des points de recombinaison et la détection graphique des signaux conflictuels dans la phylogénie ont permis de confirmer cet évènement de recombinaison comme dans une étude précédente (Martynova *et al.,* 2016). Ainsi, nos résultats montrent une preuve convaincante de la recombinaison sur l'isolat ARD54139_Dakar-Bango_SEN_1989 du Sénégal, avec un point de recombinaison localisé au niveau de la protéine E, comme précédemment décrit pour le virus Zika (Faye *et al.,* 2014). Bien que les mécanismes précis du déplacement d'un fragment du génome soient incompris, il serait important de noter que les phénomènes de recombinaison pourraient influencer plusieurs fonctions importantes dans la biologie du virus (Twiddy & Holmes, 2003). Cependant, le développement de modèles expérimentaux de co-infections et la production de souches recombinantes pourraient permettre de mieux comprendre ce phénoméne.

L'estimation des pressions de sélection s'exerçant sur la polyprotéine du virus Bagaza a permis d'identifier l'évidence d'un nombre important d'épisodes de sélection négative sur des gènes fonctionnellement importants pour le virus. Ces résultats suggèrent une fréquente purification du génome du virus Bagaza qui pourrait être associée à une accumulation de mutations conservatives (Hanada *et al.* 2004). Cependant, la localisation d'un nombre plus important d'épisodes de sélection positive sur les protéines E, NS1 et NS5 indique qu'elles pourraient représenter des cibles préférentielles de sélection pour l'évolution du virus Bagaza (Carney *et al.,* 2012). En effet, la protéine d'enveloppe E des flavivirus est cruciale dans les premières étapes de l'attachement et de l'entrée dans la cellule hôte et représente une cible principale pour les réponses immunes influençant la réponse antigénique (Roehrig., 2003). Un épisode de sélection positive sur la protéine E accompagne souvent l'émergence des flavivirus (Bennett *et al.* 2006). Cependant, même si un épisode de sélection positive a été

précédemment décrit pour la capside de la DEN-3 (Chwan-Chuen *et al.* 2008), l'impact de sites soumis à une sélection positive au niveau de la capside du virus Bagaza mériterait d'être mieux compris. De même, les protéines structurales peuvent également être des cibles d'une sélection naturelle positive. La protéine NS1 est importante pour la réplication de l'ARN viral, est impliquée dans l'évasion à la réponse immune et a été la cible majeure d'une sélection positive lors de la spéciation des flavivirus comme la dengue et le Zika (Sironi *et al.,* 2016). Les protéines NS2A et NS4B ont été montré comme étant des antagonistes de la réponse interféron lors de l'infection avec le virus de la dengue (Munoz-Jordan *et al.,* 2003) et des changements sur ces régions devraient être avantageux pour les isolats du virus Bagaza possédant des mécanismes capables d'induire une forte suppression de la réponse immune. En outre, les mutations au niveau de la protéine NS4B sont également capables de moduler plusieurs mécanismes impliqués dans le phénotype des flavivirus tels que la pathogénicité (Miller *et al.,* 2006), l'adaptation virale (Maringer & Fernandez-Sesma., 2014), la réplication (Youn *et al.,* 2012), la neurovirulence (Zmurko *et al.,* 2015) et les préférences d'hôtes (Han *et al.,* 2014). Ainsi, la présence de sites soumis à une sélection positive au niveau de la protéine NS4B peut avoir un impact majeur sur l'évolution du virus Bagaza. Jouant des rôles cruciaux pour la réplication virale, des mutations non conservatives au niveau des protéines NS3 et NS5 pourraient modifier les activités de protéase et d'ATPase/hélicase de la NS3 (Luo *et al.,* 2008) et la fonction d'ARN polymérase de la NS5 (Egloff *et al.,* 2007). Ces multiples sites d'acides aminés polymorphes identifiés indiquent que ces gènes du virus Bagaza peuvent expérimenter des changements relativement adaptatifs dans la nature et devraient recevoir la priorité dans les futures études expérimentales.

Dans le but de comprendre l'évolution du virus Bagaza, nous avons estimé son taux de diversification et déterminer l'échelle temporelle à laquelle il a évolué. Pour cela, nous avons utilisé la méthode Bayésienne du maximum de crédibilité des clades qui se sert d'une information comme la date d'isolement pour estimer le taux d'évolution moléculaire au niveau des gènes du virus Bagaza. Les taux de diversification peuvent être corrélés aux fonctions respectives des différents gènes analysés; la NS5 étant la polymérase et donc la protéine la plus conservée (Bennett *et al.,* 2006). Les arbres obtenus avec cette approche Bayésienne indique une seule introduction du virus Bagaza en Afrique et en Europe à partir de l'Inde, suggérant une origine indienne du virus Bagaza, contrairement à d'autres flavivirus africains comme le West Nile (Añez *et al.,* 2013) et le Zika (Faye *et al.,* 2014). Les temps

d'émergence estimés à partir de l'ancêtre commun le plus proche indiquent une origine lointaine des séquences du virus Bagaza analysées dans cette étude, durant le 15e siècle. D'autres analyses phylodynamiques basées sur plus de séquences complètes du virus Bagaza pourraient être intéressantes afin de déterminer les voies géographiques et les potentiels modèles d'évolution en corrélation avec la migration du virus Bagaza de l'Inde vers les continents Africain et Européen.

Le CAI représente une approche bio-informatique fiable pour mesurer les biais associés à l'utilisation des codons usuels synonymes et évaluer l'adaptation des gènes viraux à un hôte donné (Sharp & Li., 1987). Les virus de la fièvre jaune et de la dengue ont de longues histoires d'infection humaine (Kraemer *et al.,* 2015). Les virus de la fièvre jaune et de la dengue se maintiennent dans des cycles endémiques et sauvages qui ont conduit à des épidémies répétées depuis plusieurs centaines d'années. Toutefois, le virus de la fièvre jaune montre une virulence plus forte lors de l'infection humaine, particulièrement lorsqu'il est comparé aux infections du virus de la dengue en Afrique (Beasley *et al.,* 2015). Ceci pourrait expliquer la valeur de CAI plus élevée du virus de la fièvre jaune comparé aux codons usuels du génome humain. Avec l'évidence d'une adaptation au génome humain, le virus Bagaza pourrait être responsable d'une infection humaine dans le futur. Les valeurs de CAI obtenues pour les isolats du virus Bagaza du Sénégal ont été plus élevées que celles observées pour la souche de virus Bagaza ayant causée une épidémie chez des oiseaux sauvages en 2010 au Sud de l'Espagne (Aguëro *et al.,* 2011). Ainsi, comme dans une étude virale précédente, l'adaptation du virus Bagaza à un vertébré pourrait conduire à une extension à d'autres hôtes vertébrés (Andersen *et al.,* 2015). De façon intéressante, les isolats du Sénégal ont montré des indices supérieurs à ceux du virus WN qui est actuellement la principale cause d'encéphalite humaine aux Etats-Unis et responsable d'épidémies récentes en Europe (Kumar *et al*., 2016). Ils ont également des valeurs de CAI plus élevées que le virus Zika qui a été responsable de microcéphalies chez les fœtus et nouveau-nés en 2015 au Brésil (Ramos da Silva & Gao, 2016). D'autres analyses comparatives de CAI des régions non-codantes du génome telle que la 3'NC d'isolats présentant des caractéristiques biologiques, écologiques et génétiques différents, pourraient aider à caractériser l'adaptation évolutionnaire du génome du virus Bagaza à des hôtes vertébrés (Villordo *et al.,* 2016; Taylor *et al.,* 2017). Toutefois, dans le but d'évaluer la possible implication du virus Bagaza dans les cas d'encéphalites humaines, il serait intéressant d'analyser son potentiel infectieux sur des cellules souches pluripotentes de

cerveau humain comme les cellules pluripotentes humaines (iPSC) capables de se différencier en cellules micro-vasculaires endothéliales du cerveau (BMEC) et constituer un modèle robuste de la barrière hémato-encéphalique humaine (Canfield *et al.,* 2016). Les cellules iPSC peuvent également générer des cellules souches neurales primitives (NSC) pouvant se différencier en neurones, astrocytes ou en oligodendrocytes (Yan *et al.,* 2013). Les séquences du virus Bagaza obtenues au cours de cette étude pourraient être utilisées non seulement dans des études futures mais également dans la production de réactifs de génétique réverse et le développement d'outils de diagnostic efficaces pour la recherche de ce virus dans la population humaine.

CONCLUSION

L'épidémiologie moléculaire du virus Bagaza a montré une faible diversité génétique des isolats du virus Bagaza analysés au cours de cette étude. Cependant, les isolats du virus Bagaza circulant au Sénégal et en Côte d'ivoire présentent des caractéristiques spécifiques comme les différences au niveau de la région 3'NC du génome. Ainsi, il serait intéressant de mieux comprendre l'impact de cette variabilité sur la biologie du virus. En outre, le virus Bagaza a montré des caractéristiques spécifiques telles que la présence de sites informatifs comme le site N-glycosylé sur la protéine NS4B. Il serait intéressant d'étudier la fonction de ces sites d'intérêt en utilisant des clones infectieux sur des lignées cellulaires de moustiques et de mammifères afin de mieux comprendre leur influence sur le phénotype du virus dans la nature. Notre étude fournit des données informatives en ce qui concerne l'origine indienne du virus Bagaza, son évolution moléculaire vers l'Afrique et son introduction récente en Europe. La reconnaissance de la recombinaison comme un mécanisme conduisant l'évolution naturelle du virus Bagaza souligne l'importance de collecter des données génomiques complètes des isolats d'origines diverses pour mieux comprendre sa dynamique de dispersion à travers le monde. Ceci pourrait permettre de mieux comprendre l'histoire naturelle qui a conduit à la migration du virus Bagaza de l'Inde vers les autres continents et les facteurs ayant favorisé son adaptation à un hôte vertébré. Malgré l'évidence d'une adaptation du virus Bagaza au génome humain, des études de neuro-infection pourraient être intéressantes afin de déterminer son potentiel à infecter le SNC de l'Homme.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'expansion dramatique de virus bien connus comme le virus West Nile et le virus Zika et les épidémies humaines causées par des virus émergents comme le virus Nipah au cours des dernières années sont la preuve que les encéphalites virales représentent un problème global de santé publique. Dans un contexte africain où il existe un déficit de connaissances et d'outils de diagnostic pour les encéphalites, cette étude est la première en Afrique de l'Ouest visant à déterminer de façon spécifique les étiologies virales impliquées dans les cas d'encéphalites humaines. Malgré l'utilisation des techniques sensibles de virologie dans une approche globale sur les encéphalites virales, la plupart des causes reste indéterminée comme dans les études précédentes réalisées en Europe, aux Etats-Unis ou en Asie. Cependant, la détection de virus déjà connus et l'identification d'un agent viral pas avant documenté chez l'Homme (virus *proche-Dezidougou*) montrent la nécessité d'une surveillance basée sur une approche syndromique et utilisant des outils à large spectre de diagnostic afin de permettre une prise en charge adéquate des patients, de fournir plus de connaissances sur les encéphalites virales et une meilleure évaluation de leur incidence au Sénégal. Les séquelles neurologiques après une encéphalite virale restent également des manifestations post-infectieuses bien connues. Ces séquelles peuvent généralement aller d'un changement comportemental à des troubles cognitifs. Ainsi, il serait aussi intéressant d'explorer de façon systématique dans les encéphalites l'existence de séquelles intellectuelles et l'altération de ces fonctions cognitives. Il serait également intéressant dans une étude future d'élargir cette étude à d'autre localités du Sénégal en incluant la tranche d'âge infantile afin de déterminer l'incidence réelle des encéphalites virales au Sénégal.

Pour mettre en place un réseau de surveillance des encéphalites virales, il est nécessaire d'avoir des outils de diagnostic rapides et efficaces pour la détection des étiologies virales probablement impliquées dans ces cas d'encéphalites comme le virus de la rage. Dans une approche ciblée sur les encéphalites virales, la caractérisation d'isolats récents du virus de la rage a permis de voir l'évidence d'une faible diversité génétique au Sénégal où seul le clade Africa 2 a été jusqu'alors retrouvé. Les données de séquences ainsi obtenues pourraient être utilisables dans des études comme la phylodynamique ou la phylogéographie de la rage en Afrique de l'Ouest ou à l'échelle globale en associant les données similaires obtenues dans d'autres études précédentes. Les outils moléculaires performants développés et validés au

cours de cette étude peuvent être utiles dans le diagnostic de routine au laboratoire ou dans les études épidémiologiques de terrain, surtout dans le contexte africain. Ces techniques peuvent être appliquées de façon efficace dans le diagnostic *intra-vitam* de la rage chez l'humain et *post-mortem* chez les animaux. Dans un contexte africain où le respect des conditions de prélèvement et de conservation ou de la chaîne de froid lors de l'acheminement des échantillons de rage est difficile ou souvent impossible, ces méthodes pourraient être applicables de façon efficace pour un diagnostic sensible. Néanmoins, il serait important de développer des outils de diagnostic non seulement rapides et efficaces, mais également facilement utilisables dans les zones à ressources limitées comme des techniques moléculaires isothermales ou des systèmes en bandelettes.

Dans une approche « future » sur les encéphalites virales, nous avons essayé de mieux comprendre les caractéristiques génétiques des isolats du virus Bagaza circulant au Sénégal et d'évaluer sa capacité d'adaptation au génome humain car il peut devenir une cause potentielle d'encéphalite humaine. Malgré une faible diversité génétique, le virus Bagaza présente des différences microscopiques dont il serait intéressant d'évaluer l'impact sur le phénotype du virus. Le virus Bagaza présentant un modèle d'évolution différent de ceux d'autres flavivirus transmis par des moustiques et originaires d'Afrique comme le West Nile et le Zika, ces séquences pourraient être combinées à des données similaires provenant d'autres pays et utiliser dans la détermination des facteurs géographiques et socio-environnementales accompagnant cette évolution du virus Bagaza de l'Inde vers l'Afrique. Bien que le virus Bagaza présente un potentiel à s'adapter au génome humain, mieux que certains flavivirus connus chez l'Homme, des études complémentaires basées sur des modèles cellulaires du SNC de l'Homme seraient nécessaires afin d'évaluer sa possible implication dans les cas d'encéphalite humaine et de déterminer les possibles mécanismes d'interaction cerveau-virus en utilisant des méthodes de protéomique. Le développement d'outils de génétique inverse (clônes moléculaires, pseudoparticules retrovirales, *Reporter Virus Particles* (RVP)) pourrait également servir de base pour la mise en place d'une technique de neutralisation ou de tests rapides permettant de rechercher les marqueurs biologiques de l'infection par ce virus dans la population humaine. En outre, l'étude de la pathogénécité et du tropisme du virus Bagaza circulant au Sénégal, en réalisant des infections expérimentales basées sur des modéles souris et utilisant des particules vivantes marquées avec des protéines fluorescentes comme la *Green Fluorescent protein* (GFP) ou la Luciférase, pourrait être intéressante. Enfin, l'étude de sa

compétence vectorielle ou de sa transmission verticale chez le moustique pourrait également aider à mieux comprendre le cycle naturel du virus Bagaza et l'absence jusqu'à présent d'épidémies majeures de ce virus au Sénégal.

RÉFÉRENCES

1. **Aguèmon CT, Tarantola A, Zoumènou E, Goyet S, Assouto P, Ly S, Mewanou S, Bourhy H, Dodet B & Aguèmon AR**. Rabies transmission risks during peripartum--Two cases and a review of the literature.*Vaccine.* **2016** Apr 4;34(15):1752-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.02.065.

2. **Aguëro, M., Fernandez-Pinero, J., Buitrago, D., Sa ´nchez, A., Elizalde, M., San Miguel, E., Villalba, R., Llorente, F. & Jimenez-Clavero, M. A.** Bagaza virus in partridges and pheasants, Spain, 2010. *Emerg Infect Dis*. **2011**; 17: 1498–1501.

3. **Agut H**. Infections virales du système nerveux central chez l'homme. *Annales de Biologie Clinique* **2016**. Vol. 74, No. 1, pp. 55-67.

4. **Ahmed K, Phommachanh P, Vorachith P, Matsumoto T, Lamaningao P, Mori D, Takaki M, Douangngeun B, Khambounheuang B & Nishizono A.** Molecular epidemiology of rabies viruses circulating in two rabies endemic provinces of Laos, 2011-2012: regional diversity in Southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. **2015** Mar 31; 9(3):e0003645.

5. **Ahn KH, Park YJ, Hong SC, Lee EH, Lee JS, Oh MJ & Kim HJ.** Congenital varicella syndrome: A systematic review. *J Obstet Gynaecol.* **2016** Jul;36(5):563-6. doi: 10.3109/01443615.2015.1127905.

6. **Akhmadishina LV, Govorukhina MV, Kovalev EV, Nenadskaya SA, Ivanova OE & Lukashev AN**. Enterovirus A71 Meningoencephalitis Outbreak, Rostov-on-Don, Russia, 2013. *Emerg Infect Dis*. **2015** Aug; 21(8):1440-3. doi: 10.3201/eid2108.141084.

7. **Akkoc G, Kadayifci EK, Karaaslan A, Atici S, Yakut N, Ocal Demir S, Soysal A & Bakir M**. Epstein-Barr Virus Encephalitis in an Immunocompetent Child: A Case Report and Management of Epstein-Barr Virus Encephalitis. *Case Rep Infect Dis.* **2016;** 2016:7549252. doi: 10.1155/2016/7549252.

8. **Al-Qahtani AA, Nazir N, Al-Anazi MR, Rubino S & Al-Ahdal MN.** Zika virus: a new pandemic threat. *J Infect Dev Ctries.* **2016** Mar 31;10(3):201-7. doi: 10.3855/jidc.8350.

9. **Al-Qayoudhi A, Al-Kindi H, Meki N & Al-Maani A**. Acute Measles Encephalitis in an Immigrant Syrian Child: Case *Report and Review of the Literature.* Oman Med J. **2016** Mar;31(2):150-3. doi: 10.5001/omj.2016.29.

10. **Andersen KG**, ***et al.*** Clinical Sequencing Uncovers Origins and Evolution of Lassa Virus. *Cell* (**2015**) 162(4):738–750.

11. **Añez G, Grinev A, Chancey C, Ball C, Akolkar N, Land KJ, Winkelman V, Stramer SL, Kramer LD & Rios M.** Evolutionary dynamics of West Nile virus in the United States, 1999-2011: phylogeny, selection pressure and evolutionary time-scale analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* **2013** May 30;7(5):e2245. doi: 10.1371/journal.pntd.0002245.

12. **ARYOSHI K, SCHIM VM, COOK P, CORRAH T, JAFFAR S, *et al***. Kaposi's sarcoma in the Gambia, West Africa, is less frequent in Human Immunodeficiency virus type 2 than in

Human Immunodeficiency virus type 1 infection despite a high prevalence of Human Herpesvirus 8.*J Human Virol,* **1998,** 1,193-199.2.

13. **Aslam S, Latif MS, Daud M, Rahman ZU, Tabassum B, Riaz MS, Khan A, Tariq M & Husnain T.** Crimean-Congo hemorrhagic fever: Risk factors and control measures for the infection abatement. *Biomed Rep.* **2016** Jan;4(1):15-20.

14. **Baele Guy, Lemey Philippe, Bedford Trevor, Rambaut Andrew, Suchard Marc A. & Alekseyenko Alexander V. 2012.** Improving the accuracy of demographic and molecular clock model comparison while accommodating phylogenetic uncertainty. *Mol. Biol. Evol.* 29(9):2157-2167.

15. **Baele Guy, Li Wai Lok Sibon, Drummond Alexei J., Suchard Marc A. & Lemey Philippe. 2013**. Accurate model selection of relaxed molecular clocks in Bayesian phylogenetics. *Mol. Biol. Evol*. 30(2):239-243.

16. **Bates M & Brantsaeter AB**. Human cytomegalovirus (CMV) in Africa: a neglected but important pathogen. *J Virus Erad.* **2016** Jul 1;2(3):136-42.

17. **Beasley DWC, McAuley AJ & Bente DA.** Yellow fever virus: Genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. *Antiviral Res* **(2015)** 115**:**48–70.

18. **Begré L, Rohner E, Mbulaiteye SM, Egger M & Bohlius J.** Is human herpesvirus 8 infection more common in men than in women? Systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. **2016** Apr 7. doi: 10.1002/ijc.30129.

19. **Bell DJ, Suckling R, Rothburn MM, Blanchard T, Stoeter D, Michael BD, *et al*.**Management of suspected herpes simplex virus encephalitis in adults in a UK Teaching Hospital.*Clin Med* **2009**;9:1–5.

20. **Ben Achour N, Benrhouma H, Rouissi A, Touaiti H, Kraoua I, Turki I & Gouider-Khouja N**. Epidemic of rubella encephalitis. *Arch Pediatr.* **2013** Aug;20(8):858-62. doi: 10.1016/j.arcped.2013.05.010.

21. **Benjelloun A, El Harrak M, & Belkadi B**. West Nile Disease Epidemiology in North-West Africa: Bibliographical Review. *Transbound Emerg Dis.* **2016** Dec;63(6):e153-e159. doi: 10.1111/tbed.12341.

22. **Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, *et al.*** Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. *J Gen Virol.* **2006** Apr;87(Pt 4):885–93. pmid:16528038.

23. **Bernard S, Mailles A, & Stahl JP.** Epidemiology of infectious encephalitis, differences between a prospective study and hospital discharge data. *Epidemiology and infection*. **2013**;141(11):2256-68. doi: 10.1017/S0950268812002518.

24. **Bernhart SH, Hofacker IL, Will S, Gruber AR & Stadler PF**.RNAalifold: improved consensus structure prediction for RNA alignments. *BMC Bioinformatics.* **2008** Nov 11;9:474.

25. **BESTETTI G, RENON G, MAUCHERE P, RUFFIE A, KEOU FXM, *et al.*-**High seroprevalence of Human Herpesvirus 8 in pregnant women and prostitutes from Cameroon. *J AIDS,* **1998** , 12 , 541 - 543.

26. **Bhanushali MJ, Kranick SM, Freeman AF, Cuellar-Rodriguez JM, Battiwalla M, Gea-Banacloche JC, Hickstein DD, Pavletic S, Fahle G, & Nath A**. Human herpes 6 virus encephalitis complicating allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Neurology*. **2013** Apr 16;80(16):1494-500. doi: 10.1212/WNL.0b013e31828cf8a2.

27. **Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, & Hay SI**. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. **2013** Apr 25; 496(7446):504-7.

28. **Bielejec F, Lemey P, Baele G, Rambaut A, & Suchard MA**. Inferring heterogeneous evolutionary processes through time: from sequence substitution to phylogeography.*Syst Biol*. **2014** Jul; 63(4):493-504.

29. **Birbeck GL, Meyer AC, & Ogunniyi A**. Nervous system disorders across the life course in resource-limited settings. *Nature.* **2015** Nov 19;527(7578):S167-71. doi: 10.1038/nature16031.

30. **Bitnun A, & Richardson SE.** Childhood encephalitis in Canada in 2015. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* **2015**;26:69–72.

31. **Bland JM & Altman DG** (**1995**). Multiple significance tests: the Bonferroni method. BMJ 310: 170.

32. **Bondre, V. P., Sapkal, G. N., Yergolkar, P. N., Fulmali, P. V., Sankararaman, V., Ayachit, V. M., Mishra, A. C. & Gore, M. M**. Genetic characterization of Bagaza virus (BAGV) isolated in India and evidence of anti-BAGV antibodies in sera collected from encephalitis patients. *J Gen Virol.* **2009**; 90: 2644–2649.

33. **Bourhy H, Troupin C, Faye O, Meslin FX, Abela-Ridder B, Sall AA, & Kraehenbuhl JP**. Customized online and onsite training for rabies-control officers. *Bull World Health Organ*. **2015** Jul 1;93(7):503-6. doi: 10.2471/BLT.14.149849.

34. **Bourhy, H., Reynes, J. M., Dunham, E. J., Dacheux, L., Larrous, F., Huong, V. T., Xu, G., Yan, J., Miranda, M. E. & Holmes, E. C.** The origin and phylogeography of dog rabies virus. *J Gen Virol* (**2008**). 89, 2673–2681.

35. **Brunker K, Marston DA, Horton DL, Cleaveland S, Fooks AR, Kazwala R, Ngeleja C, Lembo T, Sambo M, Mtema ZJ, Sikana L, Wilkie G, Biek R, & Hampson K**. Elucidating the phylodynamics of endemic rabies virus in eastern Africa using whole-genome sequencing. *Virus Evol.* **2015** Sep 10;1(1):vev011.

36. **Bulletin epidémiologique hebdomadaires (BEH) du MSAS du Sénégal**: données de surveillance reçues de l'Institut Pasteur de Dakar (IPD); données non-publiées des Centres Nationaux de Référence (CNR) ;S1 à S52 ; **2016**.

37. **Caetano A, Mendonça MD, Ferreira NR, & Alves L.** Post-malaria neurological syndrome or viral encephalitis? *BMJ Case Rep*. **2016** Jan 7;2016. pii: bcr2015213591. doi: 10.1136/bcr-2015-213591.

38. **Canfield SG, Stebbins MJ, Morales BS, Asai SW, Vatine GD, Svendsen CN, Palecek SP, Shusta & EV.** An Isogenic Blood-Brain Barrier Model Comprising Brain Endothelial Cells, Astrocytes and Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J Neurochem*. **2016** Dec 9. doi: 10.1111/jnc.13923.

39. **Carney J, Daly JM, Nisalak A & Solomon T**. Recombination and positive selection identified in complete genome sequences of Japanese encephalitis virus. *Arch Virol.* **2012** Jan;157(1):75–83. doi: 10.1007/s00705-011-1143-4. pmid:22033595.

40. **Carod-Artal FJ, Wichmann O, Farrar J, & Gascón J.** Neurological complications of dengue virus infection. *Lancet Neurol*. **2013** Sep; 12(9):906-19.

41. **Caroline AL, Kujawa MR, Oury TD, Reed DS, & Hartman AL**. Inflammatory Biomarkers Associated with Lethal Rift Valley Fever Encephalitis in the *Lewis Rat Model.* Front Microbiol**. 2016** Jan 7;6:1509. doi: 10.3389/fmicb.2015.01509.

42. **Caron M, G Grard, C Paupy, IM Mombo, BBB Nso, FRK Kassa, D Nkoghe & EM Leroy**. First evidence of simultaneous circulation of three different dengue virus serotypes in Africa. *PLoS One,* **2013,** 8(10): e78030.

43. **Ceesay Serign J., et al.** Sahel, Savana, Riverine and Urban **Malaria** in **West Africa**: Similar Control Policies with Different Outcomes. *Acta Trop.* **2012** March; 121(3): 166–174. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.11.005.

44. **Chan J, Dey A, Wang H, Martin N, & Beard F.** Australian vaccine preventable disease epidemiological review series: rubella 2008-2012. *Commun Dis Intell Q Rep*. **2015** Mar 31; 39(1):E19-26.

45. **Chan JF, Choi GK, Yip CC, Cheng VC, & Yuen KY.** Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *J Infect.* **2016** May; 72(5):507-24.

46. **Chang RY, Hsu TW, Chen YL, Liu SF, Tsai YJ, Lin YT, Chen YS &Fan YH.** Japanese encephalitis virus non-coding RNA inhibits activation of interferon by blocking nuclear translocation of interferon regulatory factor 3.*Vet Microbiol.* **2013** Sep 27; 166(1-2):11-21.

47. **Chapman LE, Wilson ML, Hall DB, LeGuenno B, Dykstra EA, Ba K, & Fisher-Hoch SP.** Risk factors for Crimean-Congo hemorrhagic fever in rural northern Senegal. *J Infect Dis.* **1991** Oct;164(4):686-92.

48. **Chapman, E.G., Costantino, D.A., Rabe, J.L., Moon, S.L., Wilusz, J., Nix, J.C., & Kieft, J.S.** The structural basis of pathogenic subgenomic flavivirus RNA (sfRNA) production. *Science* **2014**. 344, 307–310.

49. **Chatel-Chaix L, Fischl W, Scaturro P, Cortese M, Kallis S, Bartenschlager M, Fischer B, & Bartenschlager R.** A Combined Genetic-Proteomic Approach Identifies Residues within Dengue Virus NS4B Critical for Interaction with NS3 and Viral Replication. *J Virol.* **2015** Jul;89(14):7170-86. doi: 10.1128/JVI.00867-15.

50. **Chheng K, Carter MJ, Emary K, Chanpheaktra N, Moore CE, *et al.*** A prospective study of the causes of febrile illness requiring hospitalization in children in Cambodia. *PLoS One* (**2013**) 8: e60634.

51. **Chinikar S, Bouzari S, Shokrgozar MA, Mostafavi E, Jalali T, Khakifirouz S, Nowotny N, Fooks AR, & Shah-Hosseini N.** Genetic Diversity of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus Strains from Iran. *J Arthropod Borne Dis.* **2016** Jan 5;10(2):127-40. eCollection 2016.

52. **Chou IC, Lin CC, & Kao CH.** Enterovirus Encephalitis Increases the Risk of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Taiwanese Population-based Case-control Study. *Medicine (Baltimore).* **2015** Apr;94(16):e707. doi: 10.1097/MD.0000000000000707.

53. **Choudhary N, Wei G, Govindarajulu A, Roy A, Li W, Picton DD, Nakhla MK, Levy L, & Brlansky RH:** Detection of Citrus leprosis virus C using specific primers and TaqMan probe in one-step real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays. *J Virol Methods.* **2015** Nov; 224:105-9. doi: 10.1016/j.jviromet. 2015.08.022.

54. **Chwan-Chuen King, Day-Yu Chao, Li-Jung Chien, Gwong-Jen J Chang, Ting-Hsiang Lin, Yin-Chang Wu, & Jyh-Hsiung Huang.** Comparative analysis of full genomic sequences among different genotypes of dengue virus type 3. *Virol J.* **2008**; 5: 63. doi: 10.1186/1743-422X-5-63.

55. **Clarke M. Newton RW. Klapper PE. Sutcliff e H. Laing I. & Wallace G**. Childhood encephalopathy: viruses. Immune response and outcome. *Dev Med Child Neurol* **2006**; 48:294–300.

56. **Clarke, B.D., et al.,** Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3 untranslated region. *Virus Res.* (**2015**), http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.026.

57. **Coertse, J., Weyer, J., Nel, L.H., & Markotter, W.,**. Improved PCR methods for detection of African rabies and rabies-related lyssaviruses. *J. Clin. Microbiol*. **2010** 48 (11), 3949–3955.

58. **Cohen JI**: Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* **2000**,343(7):481-492.

59. **Corey L, & Wald A**. Maternal and neonatal herpes simplex virus infections. *N Engl J Med* **2009**;361(14):1376–85.

60. **Courville EL, Sohani AR, Hasserjian RP, Zukerberg LR, Harris NL, & Ferry JA.** Diverse clinicopathologic features in human herpesvirus 8-associated lymphomas lead to diagnostic problems. *Am J Clin Pathol.* **2014** Dec; 142(6):816-29. doi: 10.1309/AJCPULI3W6WUGGPY.

61. **CRORA: Base du Centre collaborateur OMS pour les Arbovirus et virus de fièvre hémorragiques**, données **2015;** Institut Pasteur, BP 220, Dakar, Senegal.

62. **Crosby L, Perreau C, Madeux B, Cossic J, Armand C, Herrmann-Storke C, Najioullah F, Valentino R, & Thiéry G.** Severe manifestations of chikungunya virus in critically ill patients during the 2013-2014 Caribbean outbreak. *Int J Infect Dis.* **2016** Jul;48:78-80. doi: 10.1016/j.ijid.2016.05.010.

63. **da Costa LJ, & Fernandes ME**. Rabies: Knowledge and Practices Regarding Rabies in Rural Communities of the Brazilian Amazon Basin. *PLoS Negl Trop Dis.* **2016** Feb 29;10(2):e0004474. doi: 10.1371/journal.pntd.0004474.

64. **Dacheux L, Larrous F, Lavenir R, Lepelletier A, Faouzi A, Troupin C, Nourlil J, Buchy P, & Bourhy H.** Dual Combined Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay for the Diagnosis of Lyssavirus Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* **2016** Jul 5;10(7):e0004812.

65. **Dacheux L, Reynes JM, Buchy P, Sivuth O, Diop BM, Rousset D, Rathat C, Jolly N, Dufourcq JB, Nareth C, Diop S, Iehlé C, Rajerison R, Sadorge C, & Bourhy H.** A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin Infect Dis.* **2008** Dec 1; 47(11):1410-7. doi: 10.1086/592969.

66. **Dacheux L, Wacharapluesadee S, Hemachudha T, Meslin FX, Buchy P, Reynes JM, *et al.*** More accurate insight into the incidence of human rabies in developing countries through validated laboratory techniques. *PLoS Negl Trop Dis.* **2010**;4(11):e765.

67. **Daud II, Coleman CB, Smith NA, Ogolla S, Simbiri K, Bukusi EA, Ng'ang'a ZW, Sumba PO, Vulule J, Ploutz-Snyder R, Dent AE, & Rochford R.** Breast Milk as a Potential Source of Epstein-Barr Virus Transmission Among Infants Living in a Malaria-Endemic Region of Kenya. *J Infect Dis*. **2015** Dec 1;212(11):1735-42. doi: 10.1093/infdis/jiv290.

68. **David S, & Abraham AM.** Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infect Dis (Lond).* **2016** Aug;48(8):571-86. doi: 10.3109/23744235.2016.1164890.

69. **De Graaf H, Pelosi E, Cooper A, Pappachan J, Sykes K, MacIntosh I, Gbesemete D, Clark TW, Patel SV, Faust SN, & Tebruegge M.** Severe Enterovirus Infections in Hospitalized Children in the South of England-Clinical Phenotypes and Causative Genotypes. *Pediatr Infect Dis J*. **2016** Feb 11.

70. **de Ory F, Avellon A, Echevarria JE, Sanchez-Seco MP, Trallero G, Cabrerizo M, *et al.*** Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study. *J Med Virol*. **2013**;85(3):554-62. doi: 10.1002/jmv.23470.

71. **Debiasi R.L. *et al.*** Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev.* **2004**. 17(4):903-25.

72. **Demir T, & Kilic S.** Zika virus: a new arboviral public health problem. *Folia Microbiol (Praha*). **2016** Jul 28.

73. **Deng Wenjie, Maust Brandon S., Nickle David C., Learn Gerald H., Liu Yi, Heath Laura, Kosakovsky Pond Sergei L, & Mullins James I.** DIVEIN: A Web Server to Analyze Phylogenies, Sequence Divergence, Diversity, and Informative Sites. *Biotechniques*. **2010** May; 48(5): 405–408. doi: 10.2144/000113370.

74. **Deubelbeiss A, Zahno ML, Zanoni M, Bruegger D, & Zanoni R.** Real-Time RT-PCR for the Detection of Lyssavirus Species. *J Vet Med.* **2014**; doi: 10.1155/2014/476091.

75. **Di Sabatino D, Bruno R, Sauro F, Danzetta ML, Cito F, Iannetti S, Narcisi V, De Massis F, & Calistri P.** Epidemiology of West Nile disease in Europe and in the Mediterranean Basin from 2009 to 2013. *Biomed Res Int.* **2014**. doi: 10.1155/2014/907852.

76. **Dia N, Fall A, Ka R, Fall A, Kiori DE, Goudiaby DG, Fall AD, Faye el HA, Dosseh A, Ndiaye K, Diop OM, & Niang MN.** Epidemiology and genetic characterization of measles strains in Senegal, 2004-2013. *PLoS One.* **2015** May 22;10(5):e0121704. doi: 10.1371/journal.pone.0121704.

77. **Dia N, Ndiaye MN, Monteiro Mde L, Koivogui L, Bara MO, & Diop OM**. A subregional analysis of epidemiologic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09 in Africa: Senegal, Cape Verde, Mauritania, and Guinea, 2009-2010. *Am J Trop Med Hyg*. **2013** May;88(5):946-53. doi: 10.4269/ajtmh.12-0401.

78. **Diagne Cheikh Tidiane, Diallo Diawo, Faye Oumar, Ba Yamar, Faye Ousmane, Gaye Alioune, Dia Ibrahima, Faye Ousmane, Weaver Scott C., Sall Amadou Alpha, & Diallo Mawlouth.** Potential of selected Senegalese Aedes spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect Dis.* **2015**; 15: 492.doi: 10.1186/s12879-015-1231-2.

79. **Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y, Hanley KA, Buenemann M, Weaver SC, & Diallo M.** Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011.*PLoS One.* **2014** Oct 13;9(10):e109442. doi: 10.1371/journal.pone.0109442.

80. **Diallo, M., Nabeth, P., Ba, K., Sall, A. A., Ba, Y., Mondo, M., Girault, L., Abdalahi, M. O. & Mathiot, C.** Mosquito vectors of the 1998-1999 outbreak of Rift Valley Fever and other arboviruses (Bagaza, Sanar, Wesselsbron and West Nile) in Mauritania and Senegal. *Med Vet Entomol.* **2005**; 19: 119–126.

81. **Dicky O, Cheuret E, & Berthomieu L.** Severe neurological forms of influenza in children: report on three cases of severe encephalitis in France. *Arch Pediatr*. **2014** May;21(5):514-7. doi: 10.1016/j.arcped.2014.02.015.

82. **Digoutte JP:** Bagaza (BAG): Strain: Dak Ar B 209. *Am J Trop Med Hyg* **1978**, 27:376–377.

83. **Dodd KC, Michael BD, Ziso B, Williams B, Borrow R, Krishnan A, & Solomon T**. Herpes simplex virus encephalitis in pregnancy - a case report and review of reported patients in the literature. *BMC Res Notes.* **2015** Apr 1;8:118. doi: 10.1186/s13104-015-1071-6.

84. **Donoso Mantke O. *et al.*** Analysis of the surveillance situation for viral encephalitis and meningitis in Europe. *Euro Surveill*. **2008**. 13(3). pii: 8017.

85. **Drummond AJ, Suchard MA, Xie D & Rambaut A**. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol Biol Evol* (**2012**) 29(8):1969–73.

86. **Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, & Hayes EB**. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia.*N Engl J Med.* **2009** Jun 11; 360(24):2536-43.

87. **Edgar RC**. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**;32(5):1792–7. doi: 10.1093/nar/gkh340.

88. **Egloff MP, Decroly E, Malet H, Selisko B, Benarroch D, *et al.*** Structural and functional analysis of methylation and 5'-RNA sequence requirements of short capped RNAs by the methyltransferase domain of dengue virus NS5. *J Mol Biol* (**2007**) 372: 723–736.

89. **Ellis EM, JC Neatherlin, M Delorey, M Ochieng, AH Mohamed, DO Mogeni, E Hunsperger, S Patta, S Gikunju & L Waiboic**. A household serosurvey to estimate the magnitude of a dengue outbreak in Mombasa, Kenya, 2013. *PLoS Negl Trop Dis,* **2015**, 9(4): e0003733.

90. **Faleye TO, Adewumi MO, & Adeniji JA.** Defining the Enterovirus Diversity Landscape of a Fecal Sample: A Methodological Challenge? *Viruses*. **2016a** Jan 12;8(1). pii: E18. doi: 10.3390/v8010018.

91. **Faleye TO, Adewumi MO, Coker BA, Nudamajo FY & Adeniji JA.** Direct Detection and Identification of Enteroviruses from Faeces of Healthy Nigerian Children Using a Cell-Culture Independent RT-Seminested PCR Assay.*Adv Virol.* **2016b** doi: 10.1155/2016/1412838.

92. **Fall G, Diallo M, Loucoubar C, Faye O, & Sall AA.** Vector competence of Culex neavei and Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) from Senegal for lineages 1, 2, Koutango and a putative new lineage of West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg*. **2014** Apr;90(4):747-54. doi: 10.4269/ajtmh.13-0405.

93. **Farhadi Saeede Salehi; Setare Adibzadeh; Farzaneh Aboualizadeh; Parniyan Alavi; Negin Nikouyan; Mohammad Ali Okhovat; Reza Ranjbaran; Gholam Reza Rafiei Dehbidi; & Arash Shakibzadeh**: Development of an In-House TaqMan Real Time RT-PCR Assay to Quantify Hepatitis C Virus RNA in Serum and Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepat Mon.* **2015** August; 15(8): e28895. DOI: 10.5812/hepatmon.28895.

94. **Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, de Oliveira JV, Diallo M, Zanotto PM, & Sall AA**. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis.* **2014**; 8(1):e2636.

95. **Faye Ousmane, Ba Yamar, Faye Oumar, Talla Cheikh, Diallo Diawo, Chen Rubing, Mondo Mireille, Ba Rouguiétou, Macondo Edgard, Siby Tidiane, Weaver Scott C., Diallo Mawlouth, & Sall Amadou Alpha**. Urban Epidemic of Dengue Virus Serotype 3 Infection, Senegal, 2009.*Emerg Infect Dis.* **2014** Mar; 20(3): 456–459. doi: 10.3201/eid2003.121885.

96. **Fernandez-Garcia MD, Kebe O, Fall AD, Dia H, Diop OM, Delpeyroux F, & Ndiaye K**. Enterovirus A71 Genogroups C and E in Children with Acute Flaccid Paralysis, West Africa. *Emerg Infect Dis***. 2016** Apr;22(4):753-5. doi: 10.3201/eid2204.151588.

97. **Fernandez-Gerlinger M, Greffe S, Meffre A, Grenet J, Au S, Bojanova M, Rouveix E, & Rozenberg F**.HSV-2 meningoencephalitis in an immunocompetent young man: what is the pathogenesis and what is the treatment? *J Clin Virol.* **2015** Aug;69:40-3. doi: 10.1016/j.jcv.2015.05.027.

98. **Figueiredo CA, Oliveira MI, Afonso AM, Curti SP, & Durigon EL.** Rubella encephalitis in a young adult male: Isolation and genotype analysis. *Infection* **2011**;39:73-5.

99. **Filia A, Tavilla A, Bella A, Magurano F, Ansaldi F, Chironna M, Nicoletti L, Palù G, Iannazzo S, Declich S, & Rota MC.** Measles in Italy, July 2009 to September 2010. *Euro Surveill*. **2011** Jul 21;16(29). pii: 19925.

100. **Fischer M, Freuling CM, Müller T, Wegelt A, Kooi EA, Rasmussen TB, Voller K, Marston DA, Fooks AR, Beer M, & Hoffmann B.** Molecular double-check strategy for the identification and characterization of European Lyssaviruses. *J Virol Methods*. **2014** Jul; 203:23-32. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.03.014.

101. **Flipse J, Torres S, Diosa-Toro M, van der Ende-Metselaar H, Herrera-Rodriguez J, Urcuqui-Inchima S, Huckriede A, Rodenhuis-Zybert IA, & Smit JM.** Dengue tropism for macrophages and dendritic cells: the host cell effect. *J Gen Virol*. **2016** Apr 5. doi: 10.1099/jgv.0.000474.

102. **Flores-Gonzalez JC, Jordan-Garcia I, Turon-Vinas E, Montero-Valladares C, Tellez-Gonzalez C, Fernandez-Carrion F, Garcia-Iniguez JP, Onate-Vergara E, & Rodriguez-Nunez A.** Etiology, clinical presentation and outcome of severe viral acute childhood encephalitis (ECOVE study). *Rev Neurol*. **2015** Jul 1;61(1):7-13. PMID: 26108903.

103. **Fooks, A.R., Johnson, N., Freuling, C.M., Wakeley, P.R., Banyard, A.C., McElhinney, L.M., Marston, D.A., Dastjerdi, A., Wright, E., Weiss, R.A., & Müller, T.,**. Emerging technologies for the detection of rabies virus: challenges and hopes in the 21st century. *PLoS Negl.* Trop. Dis. **2009**. 3, e530.

104. **Fowlkes AL, Honarmand S, Glaser C, Yagi S, Schnurr D, Oberste MS, Anderson L, Pallansch MA, & Khetsuriani N.** Enterovirus-associated encephalitis in the California encephalitis project, 1998-2005. *J Infect Dis*. **2008** Dec 1;198(11):1685-91. doi: 10.1086/592988.

105. **Gabutti G, Franchi M, Maniscalco L, Stefanati A. Varicella-zoster virus: pathogenesis, incidence patterns and vaccination programs.** Minerva Pediatr. 2016 Jun;68(3):213-25.

106. **Gamino Virginia, Gutiérrez-Guzmán Ana-Valeria, Fernández-de-Mera Isabel G, Ortíz José-Antonio, Durán-Martín Mauricio, de la Fuente José, Gortázar Christian, & Höfle Ursula.** Natural Bagaza virus infection in game birds in southern Spain. *Vet Res.* **2012**; 43(1): 65. 2012 Sep 11. doi: 10.1186/1297-9716-43-65.

107. **Gaye-Diallo A, Touré AT, Gessain A, Guèye-Ndiaye A, Ndour AN, Touré-Kane NC, Dia MC, de Thé G, & Mboup S.** [Preliminary study of human Herpesvirus type 8 infection in pregnant women in Dakar (Senegal)]. *Bull Soc Pathol Exot.* **2001** Aug;94(3):231-4.

108. **Gebhard LG, Iglesias NG, Byk LA, Filomatori CV, De Maio FA, & Gamarnik AV.A** Proline-Rich N-Terminal Region of the Dengue Virus NS3 Is Crucial for Infectious Particle Production. *J Virol.* **2016** May 12;90(11):5451-61. doi: 10.1128/JVI.00206-16.

109. **Gendelman HE & Persidsky Y.** Infections of the nervous system. *Lancet Neurol*. **2005** Jan. 4(1):12-3.

110. **Giavarina Davide**. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med* (Zagreb**). 2015** Jun; 25(2): 141–151. doi: 10.11613/BM.2015.015.

111. **Giri A, Arjyal A, Koirala S, Karkey A, Dongol S, *et al.*** Aetiologies of central nervous system infections in adults in Kathmandu, Nepal: a prospective hospital-based study. *Sci Rep* (**2013**) 3: 2382.

112. **Glaser CA. Honarmand S. Anderson LJ. *et al.*** Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis* **2006**; 43:1565–1577.

113. **Goenka A, Michael BD, Ledger E, Hart IJ, Absoud M, Chow G, Lilleker J, Lunn M, McKee D, Peake D, Pysden K, Roberts M, Carrol ED, Lim M, Avula S, Solomon T, & Kneen R.** Neurological manifestations of influenza infection in children and adults: results of a National British Surveillance Study.*Clin Infect Dis.* **2014** Mar;58(6):775-84. doi: 10.1093/cid/cit922. Epub 2013 Dec 18.

114. **González-Sánchez HM, Monsiváis-Urenda A, Salazar-Aldrete CA, *et al*.** Effects of cytomegalovirus infection in human neural precursor cells depend on their differentiation state. *J Neurovirol.* **2015**;21:346–357.

115. **Granerod J. & Natasha S. Crowcroft**. The epidemiology of acute encephalitis, *Neuropsychological Rehabilitation*, (**2007**) 17:4-5, 406-428, DOI: 10.1080/09602010600989620.

116. **Granerod J. Ambrose HE. Davies NWS. *et al.*** Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicenter population based prospective study. *Lancet Infect Dis* **2010**; 10:835–844.

117. **Grouille, J., Maillot, F., De Toffol, B., Perrotin, D., Bernard, L., & Garot, D.** Méningo-encéphalites: étude rétrospective sur 4 ans au CHRU Bretonneau de Tours. *La Revue de Médecine Interne* (**2016**).

118. **Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, & Hofacker IL.** The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Res.* **2008.**

119. **Gruber AR, Neubock R, Hofacker IL & Washietl S.**The RNAz web server: prediction of thermodynamically stable and evolutionarily conserved RNA structures. Nucleic Acids Res. **2007.**

120. **Gualberto FA, de Oliveira MI, Alves VA, Kanamura CT, Rosemberg S, Sato HK, Arantes BA, Curti SP, & Figueiredo CA**. Fulminant encephalitis associated with a vaccine strain of rubella virus. *J Clin Virol.* **2013** Dec; 58(4):737-40. doi: **10.1016/j.jcv.2013.10.016.**

121. **Gupta R. Jung E. & Brunak S.** Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.In preparation, **2004.**

122. **Hajian-Tilaki Karimollah.** ROC curve analysis for medical diagnostic test evaluation.Caspian *J Intern Med* 2013; 4 (2): 627-635.

123. **Han N, Adams J, Chen P, Guo ZY, Zhong XF, Fang W, *et al.*** Comparison of genotypes I and III in Japanese encephalitis virus reveals distinct differences in their genetic and host diversity. *J Virol.* **2014** Oct; 88(19):11469–79. doi: 10.1128/JVI.02050-14. pmid: 25056890.

124. **Hanada K, Suzuki Y, Gojobori T**. A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol Biol Evol* (**2004**) 21: 1074–1080 doi:10.1093/molbev/msh109.

125. **Hanley KA, Manlucu LR, Gilmore LE, *et al.*** A trade-off in replication in mosquito versus mammalian systems conferred by a point mutation in the NS4B protein of dengue virus type 4. *Virology* **2003;** 312: 222–232.

126. **Hayman DT, Johnson N, Horton DL, Hedge J, Wakeley PR, Banyard AC, Zhang S, Alhassan A, & Fooks AR.** Evolutionary history of rabies in Ghana. *PLoS Negl Trop Dis*. **2011** Apr 5; 5(4):e1001. doi: 10.1371/journal.pntd.0001001.

127. **Hill JA, HallSedlak R, Magaret A, Huang ML, Zerr DM, Jerome KR, & Boeckh M.** Efficient identification of inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 using specimen pooling. *J Clin Virol.* **2016** Apr;77:71-6. doi: 10.1016/j.jcv.2016.02.016.

128. **Ho Dang Trung N, Le Thi Phuong T, Wolbers M, Nguyen Van Minh H, Nguyen Thanh V, Van MP, *et al.*** Aetiologies of central nervous system infection in Viet Nam: a prospective provincial hospital-based descriptive surveillance study. *PLoS One.* **2012**;7(5):e37825. doi: 10.1371/journal.pone.0037825.

129. **Hoffmann, B., Freuling, C.M., Wakeley, P.R., Rasmussen, T.B., Leech, S., Fooks, A.R., Beer, M., & Müller, T.,** . Improved safety for molecular diagnosis of classical rabies viruses by use of a TaqMan real-time reverse transcription-PCR "double check" strategy. *J. Clin. Microbiol.* 2010. 48 (11), 3970–3978.

130. **Honnorat E, De Broucker T, Mailles A, & Stahl JP;** Le Comité de Pilotage et Groupe des Investigateurs. Encephalitis due to Mycobacterium tuberculosisin France. *Med Mal Infect.* **2013**; 43:230–8. http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2013.05.003.

131. **Hope-Simon** RE: The nature of herpes zoster: a longterm study and a new hypothesis. *Proc R Soc Med* 58:9, **1965**.

132. **Houldcroft CJ & Kellam P. Host genetics of Epstein - Barr** virus infection, latency and disease. *Rev Med Virol.* **2015**;25(2):71–84. doi: 10.1002/rmv.1816.

133. **Huppatz C. *et al.*** Etiology of encephalitis in Australia. 1990-2007. *Emerg Infect Dis*. **2009**. 15(9):1359-65.

134. **Hussain M, Torres S, Schnettler E, Funk A, Grundhoff A, Pijlman GP, Khromykh AA, & Asgari S.** West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3' untranslated region which up-regulates GATA4 mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells. *Nucleic Acids Res*. **2012** Mar;40(5):2210-23. doi: 10.1093/nar/gkr848.

135. **Hussain RS, & Hussain NA**. Ataxia and Encephalitis in a Young Adult with EBV Mononucleosis: A Case Report. *Case Rep Neurol Med*. **2013**; 516325.

136. **Hussey HS, Abdullahi LH, Collins JE, Muloiwa R, Hussey GD, & Kagina BM.** Varicella zoster virus-associated morbidity and mortality in Africa: a systematic review protocol.*BMJ Open.* **2016** Apr 20;6(4):e010213. doi: 10.1136/bmjopen-2015-010213.

137. **Ikegami T, & Makino S.** The pathogenesis of Rift Valley fever. *Viruses.* **2011;**3(5):493-519. doi: 10.3390/v3050493.

138. **Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V,Suntayakorn S, Puttisri P, & Hoke CH:**An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate.*Am J Trop Med Hyg* **1989**,40(4):418-427.

139. **Jaques DA, Bagetakou S, L'Huillier AG, Bartoli A, Vargas MI, Fluss J, & Kaiser L.** Herpes simplex encephalitis as a complication of neurosurgical procedures: report of 3 cases and review of the literature. *Virol J.* **2016** May 23;13:83. doi: 10.1186/s12985-016-0540-4.

140. **Jaskula E, Dlubek D, Sedzimirska M, Duda D, Tarnowska A, & Lange A**. Reactivations of cytomegalovirus, human herpes virus 6, and Epstein-Barr virus differ with respect to risk factors and clinical outcome after hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant Proc.* **2010** Oct;42(8):3273-6. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.07.027.

141. **Jenson HB.** Epstein-Barr virus. Pediatr Rev. **2011** Sep; 32(9):375-83; quiz 384.

142. **Jha HC, Mehta D, Lu J, El-Naccache D, Shukla SK, Kovacsics C, Kolson D, & Robertson ES.** Gammaherpesvirus Infection of Human Neuronal Cells. *mBio.* **2015** Nov-Dec; 6(6): doi: 10.1128/mBio.01844-15.

143. **Johnson BW, Goodman CH, Jee Y, & Featherstone DA.** Differential Diagnosis of Japanese Encephalitis Virus Infections with the Inbios JE Detect™ and DEN Detect™ MAC-ELISA Kits.*Am J Trop Med Hyg*. **2016** Apr; 94(4):820-8. doi: 10.4269/ajtmh.15-0631.

144. **Kaeley N, Bansal S, Bhatia R, & Ahmad S.** Herpes Simplex Encephalitis: An Uncommon Presentation. *J Clin Diagn Res.* **2016** May;10(5):OD25-6. doi: 10.7860/JCDR/2016/19040.7801.

145. **Kakkar M, Rogawski ET, Abbas SS, Chaturvedi S, Dhole TN, Hossain SS, et al .** Acute encephalitis syndrome surveillance, Kushinagar district, Uttar Pradesh, India, 2011-2012. *Emerg Infect Dis* **2013;**19:1361-7.

146. **Kallies René, Kopp Anne, Zirkel Florian, Estrada Alejandro, Gillespie Thomas R., Drosten Christian & Junglen Sandra:** Genetic Characterization of Goutanap Virus, a Novel Virus Related to Negeviruses, Cileviruses and Higreviruses. *Viruses* **2014**, 6, 4346-4357; doi:10.3390/v6114346. ISSN 1999-4915.

147. **Kapoor H, Signs K, Somsel P, Downes FP, Clark PA, & Massey JP**. Persistence of West Nile Virus (VIRUS WN) IgM antibodies in cerebrospinal fluid from patients with CNS disease. *J Clin Virol* **2004;** 31:289–91.

148. **Katchanov J, Branding G, & Stocker H**. Combined CMV- and HSV-1 brainstem encephalitis restricted to medulla oblongata. *J Neurol Sci.* **2014**;339:229–230.

149. **Kaufer BB, Flamand L.** Chromosomally integrated HHV-6: impact on virus, cell and organismal biology. *Curr Opin Virol*. **2014;**9C:111–118.

150. **Kawai K, Gebremeskel BG, & Acosta CJ.** Systematic review of incidence and complications of herpes zoster: towards a global perspective.*BMJ Open.* **2014** Jun 10; 4(6):e004833.

151. **Kennedy PG.** Viral encephalitis. *J Neurol* **2005**; 252: 268–72.

152. **Kitchen, A., Shackelton, L. A., & Holmes, E. C.** Family level phylogenies reveal modes of macroevolution in RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (**2011**). 108(1), 238-243.

153. **Korostil IA, & Regan DG.** Varicella-Zoster Virus in Perth, Western Australia: Seasonality and Reactivation. *PLoS One.* **2016** Mar 10;11(3):e0151319. doi: 10.1371/journal.pone.0151319.

154. **Kosakovsky Pond Sergei L., Frost Simon D. W. & Muse Spencer V.** (**2005**) HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21:676-679.

155. **Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, Van Bortel W, Hendrickx G, Schaffner F, Elyazar IR, Teng HJ, Brady OJ, Messina JP, Pigott DM, Scott TW, Smith DL, Wint GR, Golding N, & Hay SI**. The global distribution of the arbovirus vectors Aedes aegypti and Ae. albopictus. *Elife.* **2015** Jun 30;4:e08347. doi: 10.7554/eLife.08347.

156. **Kumar A, Shukla D, Kumar R, Idris MZ, Misra UK, & Dhole TN.** Molecular epidemiological study of enteroviruses associated with encephalitis in children from India. *J Clin Microbiol.* **2012** Nov; 50(11):3509-12. doi: 10.1128/JCM.01483-12.

157. **Kumar M, Belcaid M, & Nerurkar VR**. Identification of host genes leading to West Nile virus encephalitis in mice brain using RNA-seq analysis. *Sci Rep.* **2016** May 23;6:26350. doi: 10.1038/srep26350.

158. **Kumar S, Pandey AK, Gutch M, Razi SM, Gupta A, Jain N, Shakya S, & Gupta KK.** Acute viral encephalitis clinical features and outcome: Experience from a tertiary center of North India. *Ann Trop Med Public Health* **2015**;8:262-6 .

159. **Kuno G., & Chang G. J.** Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol* **2007**. 152, 687–696.

160. **Kuo KW, Leung MF, & Leung WC.** Intrinsic secondary structure of human TNFR-I mRNA influences the determination of gene expression by RTPCR. *Mol Cell Biochem* **1997**;177:1–6.

161. **Kuzmina NA, Lemey P, Kuzmin IV, Mayes BC, Ellison JA, Orciari LA, Hightower D, Taylor ST, & Rupprecht CE.** The phylogeography and spatiotemporal spread of south-central skunk rabies virus. *PLoS One.* **2013** Dec 3; 8(12):e82348.

162. **Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, *et al.*** Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* **2000**; 38:4066–71.

163. **Leveque N, Van Haecke A, Renois F, Boutolleau D, Talmud D, Andreoletti L.** 2011. Rapid virological diagnosis of central nervous system infections by use of a multiplex reverse transcription-PCR DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.* **2011**. 49:3874–3879.Doi :10.1128/JCM.01214-11.

164. **Lévêque Nicolas, Legoff Jérôme, Mengelle Catherine, Mercier-Delarue Séverine, N'guyen Yohan, Renois Fanny, Tissier Fabien, Simon François, Izopet Jacques, & Andréolettia Laurent.** Virological Diagnosis of Central Nervous System Infections by Use of PCR Coupled with Mass Spectrometry Analysis of Cerebrospinal Fluid Samples. *J. Clin. Microbiol.* January **2014;** 52:1 212-217 doi:10.1128/JCM.02270-13.

167. Lindenbach BD, Murray CL, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae In: Knipe DM, Howley PM, & editors. *Fields Virology*. 16th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and W; **2013**. p. 712–46.

168. Liu H, Liu Y, Wang S, Zhang Y, Zu X, Zhou Z, Zhang B, & Xiao G. Structure-based mutational analysis of several sites in the E protein: implications for understanding the entry mechanism of Japanese encephalitis virus. *J Virol.* **2015** May;89(10):5668-86. doi: 10.1128/JVI.00293-15.

169. Liu W, Sun FJ, Tong YG, Zhang SQ, & Cao WC. Rift Valley fever virus imported into China from Angola. *Lancet Infect Dis***. 2016** Nov;16(11):1226. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30401-7.

170. Liu, R., L. Yue, X. Li, X. Yu, H. Zhao, Z. Jiang, E. Qin, & C. Qin. Identification and characterization of small sub-genomic RNAs in dengue 1-4 virus-infected cell cultures and tissues. Biochem. Biophys. *Res. Commun.* **2010.** 391:1099-1103.

171. Lohitharajah J, Malavige GN, Chua AJ, Ng ML, Arambepola C, & Chang T. Emergence of human West Nile Virus infection in Sri Lanka. *BMC Infect Dis*. **2015** Jul 31;15: 305. doi: 10.1186/s12879-015-1040-7.

172. Lopo S, Vinagre E, Palminha P, Paixao MT, Nogueira P, & Freitas MG. Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population, 2002-2003.*Euro Surveill.* **2011** Jun 23; 16(25).

173. Ludlow M, McQuaid S, Milner D, de Swart RL, & Duprex WP. Pathological consequences of systemic measles virus infection.*J Pathol.* **2015** Jan; 235(2):253-65.

174. Luo D, Xu T, Hunke C, Gruber G, Vasudevan SG, *et al.* Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *J Virol* (**2008**) 82: 173–183.

175. Madrid Rodríguez A, Ramos Fernández JM, Calvo Medina R, & Martínez Antón J. Acute disseminated encephalomyelitis: epidemiological, clinical, and outcome analysis in 16 patients. *An Pediatr (Barc).* **2014** Mar;80(3):165-72. doi: 10.1016/j.anpedi.2011.07.020.

176. Magalhães-Barbosa MC, Prata-Barbosa A, Robaina JR, Raymundo CE, Lima-Setta F, & Cunha AJ. Trends of the microcephaly and Zika virus outbreak in Brazil, January-July 2016.*Travel Med Infect Dis.* **2016** Sep - Oct;14(5):458-463. doi: 10.1016/j.tmaid.2016.09.006.

177. Mailles. A. *et al.* Infectious encephalitis in France in 2007: a national prospective study. *Clin Infect Dis.* **2009.** 49(12):1838-47.

178. Mallewa M, Fooks AR, Banda D, Chikungwa P, Mankhambo L, Molyneux E, *et al.* Rabies encephalitis in malaria-endemic area, Malawi, Africa. *Emerg Infect Dis*. **2007**;13(1):136-9. doi: 10.3201/eid1301.060810.

179. Mansfield KL, Banyard AC, McElhinney L, Johnson N, Horton DL, Hernández-Triana LM, & Fooks AR. Rift Valley fever virus: A review of diagnosis and vaccination, and implications for emergence in Europe. *Vaccine***. 2015** Oct 13;33(42):5520-31. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.08.020.

180. **Maringer K & Fernandez-Sesma A**. Message in a bottle: lessons learned from antagonism of STING signalling during RNA virus infection. *Cytokine Growth Factor Rev*. **2014** Dec;25(6):669–79. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.08.004. pmid:25212897.

181. **Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A & Muhire B. 2015**. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution 1*:vev003.

182. **Martynova EU, Schal C & Mukha DV**. Effects of recombination on densovirus phylogeny. *Arch Virol.* **2016** Jan;161(1):63-75. doi: 10.1007/s00705-015-2642-5.

183. **Massangaie M, G Pinto, F Padama, G Chambe, M da Silva, I Mate, C Chirindza, S Ali, S Agostinho & D Chilaule**. Clinical and Epidemiological Characterization of the First Recognized Outbreak of Dengue Virus-Type 2 in Mozambique, 2014. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **2016**, 94(2): 413-416.

184. **Mathews DH, Disney MD, Childs JL, Schroeder SJ, Zuker M, & Turner DH**. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* (**2004**) 101(19):7287-92.

185. **McElhinney LM, Marston DA, Brookes SM, & Fooks AR**. Effects of carcase decomposition on rabies virus infectivity and detection. *J Virol Methods*. **2014** Oct; 207:110-3. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.06.024.

186. **Michael BD, Menezes BF, Cunniffe J, Miller A, Kneen R, Francis G, *et al*.**Effect of delayed lumbar punctures on the diagnosis of acute bacterial meningitis in adults. *Emerg Med J* **2010**;27:433–8.

187. **Miller S, Sparacio S & Bartenschlager R**. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 Non-structural protein 4B. *J Biol Chem.* **2006** Mar 31;281(13):8854–63. pmid:16436383.

188. **Mishra SK, Mohanty S, Mohanty A, & Das BS**. Management of severe and complicated malaria. *J Postgrad Med*. **2006** Oct-Dec;52(4):281-7.

189. **Misra UK, Kalita J, Mani VE, Chauhan PS, & Kumar P**. Central nervous system and muscle involvement in dengue patients: A study from a tertiary care center. *J Clin Virol.* **2015** Nov;72:146-51. doi: 10.1016/j.jcv.2015.08.021.

190. **Mohamed M, Mosha F, Mghamba J, Zaki SR, Shieh WJ, Paweska J, Omulo S, Gikundi S, Mmbuji P, Bloland P, Zeidner N, Kalinga R, Breiman RF, & Njenga MK**. Epidemiologic and clinical aspects of a Rift Valley fever outbreak in humans in Tanzania, 2007. *Am J Trop Med Hyg.* **2010** Aug; 83(2 Suppl):22-7.

191. **Mollentze N, Nel LH, Townsend S, le Roux K, Hampson K, Haydon DT, & Soubeyrand S.** A Bayesian approach for inferring the dynamics of partially observed endemic infectious diseases from space-time-genetic data.*Proc Biol Sci.* **2014** May 7; 281(1782):20133251.

192. **Moniuszko A, Pancewicz SA, Czupryna P, Grygorczuk S, Kondrusik M, & Zajkowska J.** Diagnostics of selected viral infections of central nervous system. *Przegl Epidemiol*. **2010**;64(3):355-60.

193. **Muleya W, Namangala B, Mweene A, Zulu L, Fandamu P, Banda D, Kimura T, Sawa H, & Ishii A.** Molecular epidemiology and a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of infection with rabies virus in Zambia. *Virus Res.*2012Jan; 163(1):160-8. doi: 10.1016/j.virusres.**2011**.09.010.

194. **Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M & Garcia-Sastre A**. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA* (**2003**) 100: 14333–14338.

195. **Murata KY, Miwa H, & Kondo T.** Polyneuritis cranialis caused by varicella zoster virus in the absence of rash. *Neurology* 74: 85-86, **2010.**

196. **Murrell B, Moola S, Mabona A, Weighill T, Sheward D, Kosakovsky Pond SL, *et al*.** FUBAR: a fast, unconstrained bayesian approximation for inferring selection. *Mol Biol Evol.* **2013** May; 30(5):1196–205. doi: 10.1093/molbev/mst030.

197. **Myers, T.W., & Gelfand, D. H.,** Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **1991**, *30*, 182–192.

198. **Naik Nenavath Gopal & Wu Huey-Nan**. Mutation of Putative N-Glycosylation Sites on Dengue Virus NS4B Decreases RNA Replication. *J Virol.* **2015** Jul 1; 89(13): 6746–6760.doi: 10.1128/JVI.00423-15.

199. **Nasrullah I, Butt AM, Tahir S, Idrees M, & Tong Y**. Genomic analysis of codon usage shows influence of mutation pressure, natural selection, and host features on Marburg virus evolution. *BMC Evol Biol* (**2015**) 15(1):174.

200. **Neeraja M, Iakshmi V, Teja VD, Lavanya V, Priyanka EN, Subhada K, Parida MM, Dash PK, Sharma S, Rao PV, & Reddy G**. Unusual and rare manifestations of dengue during a dengue outbreak in a tertiary care hospital in South India. *Arch Virol.* **2014** Jul;159(7):1567-73. doi: 10.1007/s00705-014-2010-x.

201. **Ng LF, & Solomon T.** Decade in review-CNS infections: major advances against a moving target of CNS infections. *Nat Rev Neurol.* **2015** Nov; 11(11):623-4. doi: 10.1038/nrneurol.2015.202.

202. **Niang M, Loucoubar C, Sow A, Diagne MM, Faye O, Faye O, Diallo M, Toure-Balde A, & Sall AA.** Genetic diversity of Plasmodium falciparum isolats from concurrent malaria and arbovirus co-infections in Kedougou, southeastern Senegal. *Malar J.* **2016** Mar 11;15:155. doi: 10.1186/s12936-016-1208-7.

203. **Nichols RA, Averbeck KT, Poulsen AG, al Bassam MM, Cabral F, Aaby P, & Breuer J**. Household size is critical to varicella-zoster virus transmission in the tropics despite lower viral infectivity. *Epidemics*. **2011** Mar;3(1):12-8. doi: 10.1016/j.epidem.2010.11.003.

204. **Njiki Bikoï Jacky, Ndom Paul, Mupang Lilian, & Agokeng Demanou Sylvie**. Seroprevalence of human herpes virus-8 in HIV-positive patients at the General Hospital of Yaounde–Cameroon. *Pan Afr Med J*. 2015; 20: 69. DOI : 10.11604/pamj.**2015**.20.69.5671.

205. **Nwosu CM, Njeze GE, Opara C,Nwajuaku C, & Chukwurah CK:** Central nervous system infections in the rainforest zone of Nigeria. *East African Medical Journal* **2001**, 78:97-101.

206. **Ogata M**. Human Herpesvirus-6 Encephalitis in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Brain Nerve.* **2015** Jul;67(7):919-30. doi: 10.11477/mf.1416200231.

207. **Ogata M.** Human herpesvirus-6-associated diseases in hematopoietic stem cell transplantation: an update. *Rinsho Ketsueki.* **2016**; 57(3):298-306. doi: 10.11406/rinketsu.57.298.

208. **Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M & the UGENE team.** Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* **2012** 28: 1166-1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091.

209. **Oliveira JR, Gérardin P, Couderc T, Randrianaivo H, Fritel X, & Lecuit M.** Chikungunya virus-associated encephalitis: A cohort study on La Réunion Island, 2005-2009. *Neurology.* **2016** May 24;86(21):2025-6. doi: 10.1212/WNL.0000000000002732.

210. **Olsen SJ, Campbell AP, Supawat K, Liamsuwan S, Chotpitayasunondh T, Laptikulthum S, *et al.*** Infectious causes of encephalitis and meningoencephalitis in Thailand, 2003-2005. *Emerg Infect Dis.* **2015**;21(2):280-9. doi: 10.3201/eid2102.140291.

211. **Parry HM, Zuo J, Frumento G, Mirajkar N, Inman C, Edwards E, Griffiths M, Pratt G, & Moss P**. Cytomegalovirus viral load within blood increases markedly in healthy people over the age of 70 years. *Immun Ageing.* **2016** Jan 5;13:1. doi: 10.1186/s12979-015-0056-6.

212. **Peng H, Chen L, Zhang Y, Guo R, Li WF, Mao YP, Tan LL, Sun Y, Zhang F, Liu LZ, Tian L, Lin AH & Ma J.** Survival analysis of patients with advanced-stage nasopharyngeal carcinoma according to the Epstein-Barr virus status. *Oncotarget.* **2016** Mar 17. doi: 10.18632/oncotarget.8144.

213. **Perlejewski K, Popiel M, Laskus T, Nakamura S, Motooka D, Stokowy T, Lipowski D, Pollak A, Lechowicz U, Caraballo Cortés K, Stępień A, Radkowski M, & Bukowska-Ośko I.** Next-generation sequencing (NGS) in the identification of encephalitis-causing viruses: Unexpected detection of human herpesvirus 1 while searching for RNA pathogens.*J Virol Methods.* **2015** Dec 15;226:1-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.09.010.

214. **Phu Ly MH, Takamatsu Y, Nabeshima T, Pham Hoai LL, Pham Thi H, Dang Thi D, Nguyen NL, Nguyen Thi TT, Le Thi QM, Buerano CC, Morita K, & Hasebe F.** Isolation of dengue serotype 3 virus from the cerebrospinal fluid of an encephalitis patient in Hai Phong, Vietnam in 2013. *J Clin Virol.* **2015** Sep;70:93-6. doi: 10.1016/j.jcv.2015.07.295.

215. **Pijlman, G. P., A. Funk, N. Kondratieva, J. Leung, S. Torres, L. van der Aa, W. J. Liu, A. C. Palmenberg, P. Y. Shi, R. A. Hall, & A. A. Khromykh.** A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe* **2008.** 4:579-591.

216. **Plattet P, Alves L, Herren M, & Aguilar HC.** Measles Virus Fusion Protein: Structure, Function and Inhibition. *Viruses.* **2016** Apr 21;8(4). pii: E112. doi: 10.3390/v8040112.

217. **Polacek C, Friebe P & Harris E.** Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J Gen Virol.* **2009** Mar; 90(Pt 3):687-92.

218. **Pons-Salort M, Parker EP, & Grassly NC.** The epidemiology of non-polio enteroviruses: recent advances and outstanding questions. *Curr Opin Infect Dis.* **2015** Oct;28(5):479-87. doi: 10.1097/QCO.0000000000000187.

219. **Posada D. & Crandall K.** The effect of recombination on the accuracy of phylogeny estimation. *J Mol Evol* (**2002**). 54: 396–402 doi:10.1007/s00239-001-0034-9.

220. **Price MN, Dehal PS, & Arkin AP.** FastTree 2: Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *Plos One* **2010.** http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0009490.

221. **Prince HE, Tobler LH, Lapé-Nixon M, Foster GA, Stramer SL, & Busch MP.** Development and persistence of West Nile virus-specific immuno-globulin M (IgM), IgA, and IgG in viremic blood donors. *J Clin Microbiol* **2005**; 43:4316–20.

222. **Proficiency test report Diag-06-2015-V1-EN:** European Union Reference Laboratory for Rabies (**2015**) Inter-laboratory test for rabies diagnosis.

223. **Puigbo, P., Bravo, I. G., & Garcia-Vallve, S.** CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biol Direct* (**2008a**). 3, 38.

224. **Puigbo, P., Bravo, I. G., & Garcia-Vallve, S**. E-CAI: a novel server to estimate an expected value of Codon Adaptation Index (eCAI). *BMC Bioinformatics* (**2008b**) 9: 65.

225. **Ramos da Silva S, & Gao SJ.** Zika virus: An update on epidemiology, pathology, molecular biology, and animal model. *J Med Virol*. **2016** Aug;88(8):1291-6. doi: 10.1002/jmv.24563.

226. **Rapport Organisation Mondiale de Santé (OMS), 2013.** Expert Consultation on Rabies. Second report. Geneva, Switzerland: *World Health Organization;* p.139 and Ser. 982. pp. 1–150.

227. **Rastogi M, Sharma N, & Singh SK.** Flavivirus NS1: a multifaceted enigmatic viral protein. *Virol J.* **2016** Jul 29;13:131. doi: 10.1186/s12985-016-0590-7.

228. **Reed & Muench.** A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene.* Vol 27. May **1938.**

229. **Rhoades RE, Tabor-Godwin JM, Tsueng G, & Feuer R**. Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology*. **2011** Mar 15; 411(2):288-305.

230. **Roby JA, Pijlman GP, Wilusz J & Khromykh AA.** Noncoding subgenomic flavivirus RNA: multiple functions in West Nile virus pathogenesis and modulation of host responses. *Viruses.* **2014** Jan 27;6(2):404-27. doi: 10.3390/v6020404.

231. **Roby JA, Setoh YX, Hall RA, & Khromykh AA**. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *J Gen Virol.* **2015** Jul;96(Pt 7):1551-69. doi: 10.1099/vir.0.000097.

232. **Roehrig JT.** Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv Virus Res***. 2003**;59:141–75. pmid:14696329.

233. **Rota PA, Moss WJ, Takeda M, de Swart RL, Thompson KM, & Goodson JL**. Measles. *Nat Rev Dis Primers*. **2016** Jul 14;2:16049. doi: 10.1038/nrdp.2016.49.

234. **Rui-Yun Zhang, Ming Li, Yi-Ming Zhao, Xiu-Min Lv, & Xiu-Xia Chen.** Research on early diagnosis and impact prognostic factors of herpes simplex encephalitis. *Int J Clin Exp Med* **2016**;9(2):4695-4698.

235. **Sessions OM, K Khan, Ya Hou, E Meltzer, M Quam, E Schwartz, DJ Gubler & A Wilder-Smith**. Exploring the origin and potential for spread of the 2013 dengue outbreak in Luanda, Angola. *Global health action***, 2013**, 6.

236. **Sharp PM, & Li WH**: The codon Adaptation Index- a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res* **1987**, 15:1281-1295.

237. **Shin YC, Bischof GF, Lauer WA, & Desrosiers RC**. Importance of codon usage for the temporal regulation of viral gene expression. *Proc Natl Acad Sci* (**2015**) 112 (45) :201515387.

238. **Sili U, Kaya A, & Mert A;** HSV Encephalitis Study Group. Herpes simplex virus encephalitis: clinical manifestations, diagnosis and outcome in 106 adult patients. *J Clin Virol*. **2014** Jun;60(2):112-8. doi: 10.1016/j.jcv.2014.03.010.

239. **Silva Marcus Tulius T.;** Viral encephalitis. *Arq Neuropsiquiatr* **2013**;71(9-B):703-709 DOI: 10.1590/0004-282X20130155.

240. **Simon P, Sasse M, Laudi S, Petroff D, Bartels M, Kaisers UX, & Bercker S.** Two strategies for prevention of cytomegalovirus infections after liver transplantation.*World J Gastroenterol.* **2016** Mar 28;22(12):3412-7. doi: 10.3748/wjg.v22.i12.3412.

241. **Simon-Loriere E, Holmes EC.** Why do RNA viruses recombine? *Nat Rev Microbiol* **(2011)** 9: 617–626 doi:10.1038/nrmicro2614.

242. **Singh DV, Kumar A, Kumar P, Baluni M, Ghildiyal S, Kumar R, Misra UK, & Dhole TN.** An outbreak of encephalitis associated with echovirus 19 in Uttar Pradesh, India, in 2011. *Arch Virol*. **2016** Apr;161(4):967-70. doi: 10.1007/s00705-015-2714-6.

243. **Sironi M, Forni D, Clerici M & Cagliani R**. Nonstructural Proteins Are Preferential Positive Selection Targets in Zika Virus and Related Flaviviruses. *PLoS Negl Trop Dis* (**2016**) 10(9): e0004978. doi:10.1371/journal.pntd.0004978.

244. **Slavov SN, Otaguiri KK, Kashima S, & Covas DT.** Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. *Braz J Med Biol Res.* **2016**;49 (5):e5420. doi: 10.1590/1414-431X20165420.

245. **Soares CN, Cabral-Castro MJ, Peralta JM, de Freitas MR, Zalis M, & Puccioni-Sohler M.** Review of the etiologies of viral meningitis and encephalitis in a dengue endemic region. *J Neurol Sci*. **2011** Apr 15;303(1-2):75-9. doi: 10.1016/j.jns.2011.01.012.

246. **Solbrig MV, & Perng GC**. Current neurological observations and complications of dengue virus infection. *Curr Neurol Neurosci Rep.* **2015** Jun;15(6):29. doi: 10.1007/s11910-015-0550-4.

247. **Solomon T. Hart I. & Beeching N.** Viral encephalitis: a clinician's guide. *Pract Neurol* **2007**; 7:288–305.

248. **Soti V, Tran A, Degenne P, Chevalier V, Lo Seen D, Thiongane Y, Diallo M, Guégan JF & Fontenille D.** Combining hydrology and mosquito population models to identify the drivers of Rift Valley fever emergence in semi-arid regions of West Africa.*PLoS Negl Trop Dis*. **2012**;6(8):e1795. doi: 10.1371/journal.pntd.0001795.

249. **Sow A, Faye O, Ba Y, Ba H, Diallo D, Faye O, Loucoubar C, Boushab M, Barry Y, Diallo M & Sall AA.** Rift Valley fever outbreak, southern Mauritania, 2012.*Emerg Infect Dis*. **2014** Feb; 20(2):296-9.

250. **Sow A, Faye O, Ba Y, Diallo D, Fall G, Faye O, Bob NS, Loucoubar C, Richard V, Dia AT, Diallo M, Malvy D & Sall AA.** Widespread Rift Valley Fever Emergence in Senegal in 2013-2014. *Open Forum Infect Dis***. 2016a** Jul 21; 3(3):ofw149. eCollection 2016.

251. **Sow A, Loucoubar C, Diallo D, Faye O, Ndiaye Y, Senghor CS, Dia AT, Faye O, Weaver SC, Diallo M, Malvy D, & Sall AA**. Concurrent malaria and arbovirus infections in Kedougou, southeastern Senegal.*Malar J.* **2016b** Jan 28; 15:47. doi: 10.1186/s12936-016-1100-5.PMID: 26821709.

252. **Staheli JP, Dyen MR, Deutsch GH, Basom RS, Fitzgibbon MP, Lewis P, & Barcy S.** Complete unique genome sequence, expression profile and salivary gland tissue tropism of the herpesvirus-7 homolog in pigtailed macaques. *J Virol.* **2016** May 11. pii: JVI.00651-16.

253. **Stahl, J. P., & Mailles, A**. Les méningo-encéphaLites infectieuses. (**2010**).

254. **Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, Koskiniemi M, Sainio K, Salonen O, & Kennedy PG.** Viral meningoencephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management. *Eur J Neurol.* **2010** Aug;17(8):999-e57. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.02970.x.

255. **Sudeep AB, Bondre V, George R,Ghodke , YS, Aher RV, & Gokhale MD**. Bagaza virus inhibits Japanese encephalitis & West Nile virus replication in Culex tritaeniorhynchus & Cx. quinquefasciatus mosquitoes. *Indian J Med Res***. 2015** Dec; 142(Suppl 1): S44–S51. doi: 10.4103/0971-5916.176618.

256. **Sudeep AB, Bondre VP, Mavale MS, Ghodke YS, George RP, Aher RV, & Gokhale MD.** Preliminary findings on Bagaza virus (Flavivirus: Flaviviridae) growth kinetics, transmission potential & transovarial transmission in three species of mosquitoes. *Indian J Med Res.* **2013**;138:257-61.

257. **Talbi C, Holmes EC, de Benedictis P, Faye O, Nakouné E, Gamatié D, Diarra A, Elmamy BO, Sow A, Adjogoua EV, Sangare O, Dundon WG, Capua I, Sall AA, Bourhy H**. Evolutionary history and dynamics of dog rabies virus in western and central Africa. *J Gen Virol.* **2009** Apr; 90(Pt 4):783-91. doi: 10.1099/vir.0.007765-0.

258. **Talbi C, Lemey P, Suchard MA, Abdelatif E, Elharrak M, Nourlil J, Faouzi A, Echevarría JE, Vazquez Morón S, Rambaut A, Campiz N, Tatem AJ, Holmes EC, & Bourhy H.** Phylodynamics and human-mediated dispersal of a zoonotic virus.*PLoS Pathog*. **2010** Oct 28; (10):e1001166.

259. **Talla C, Diallo D, Dia I, Ba Y, Ndione JA, Sall AA, Morse A, Diop A & Diallo M.** Statistical modeling of the abundance of vectors of West African Rift Valley fever in Barkédji, Senegal. *PLoS One.* **2014** Dec 1;9(12):e114047. doi: 10.1371/journal.pone.0114047

260. **Kumar S, Stecher G & Tamura K**. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets**.** ***Molecular Biology and Evolution,*** Volume 33, Issue 7**, 1 July 2016**, Pages 1870–1874, https://doi.org/10.1093/molbev/msw054.

261. **Tan le V, Thai le H, Phu NH, Nghia HD, Chuong LV, Sinh DX, *et al.*** Viral aetiology of central nervous system infections in adults admitted to a tertiary referral hospital in southern Vietnam over 12 years. *PLoS Negl Trop Dis*. **2014**; 8 (8):e3127. doi: 10.1371/journal.pntd.0003127.

262. **Taylor TL, Dimitrov KM & Afonso CL.** Genome-wide analysis reveals class and gene specific codon usage adaptation in avian paramyxoviruses 1. *Infect Genet Evol.* **2017** Feb 9. pii: S1567-1348(17)30046-1. doi: 10.1016/j.meegid.2017.02.004.

263. **Telmadarraiy Z, Chinikar S, Vatandoost H, Faghihi F, & Hosseini-Chegeni A.** Vectors of Crimean Congo Hemorrhagic Fever Virus in Iran. *J Arthropod Borne Dis.* **2015** Mar 11; 9(2):137-47. eCollection 2015.

264. **Tembo J, Kabwe M, Chilukutu L, Chilufya M, Mwaanza N, Chabala C, Zumla A, & Bates M**. Prevalence and risk factors for betaherpesvirus DNAemia in children >3 weeks and <2 years of age admitted to a large referral hospital in sub-Saharan Africa.*Clin Infect Dis.* **2015** Feb 1;60(3):423-31. doi: 10.1093/cid/ciu853.

265. **Thakur KT, Motta M, Asemota AO, Kirsch HL, Benavides DR, Schneider EB, McArthur JC, Geocadin RG, & Venkatesan A**: Predictors of outcome in acute encephalitis.Neurology.**2013**-Aug-27;81(9):793-800. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a2cc6d.

266. **Thurner Caroline, Witwer Christina, Hofacker Ivo L & Stadler Peter F.** Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes.Journal of General Virology. 01 May **2004**, 85: 1113-1124, doi: 10.1099/vir.0.19462-0.

267. **Torisu H, Hara T.** Influenza-Associated Encephalopathy. *Brain Nerve.* **2015** Jul;67(7):859-69. doi: 10.11477/mf.1416200224.

268. **Tricou V, Berthet N, Nakouné E, & Kazanji M.** Complete genome sequence of a rabies virus isolated from a human in central african republic. *Genome Announc*. **2014** Jun 19;2(3). pii: e00598-14. doi: 10.1128/genome A.00598-14.

269. **Troupin C, Dacheux L, Tanguy M, *et al.*** Large-Scale Phylogenomic Analysis Reveals the Complex Evolutionary History of Rabies Virus in Multiple Carnivore Hosts. *Parrish C, ed. PLoS Pathogens.***2016**;12(12):e1006041. doi:10.1371/journal.ppat.1006041.

270. **Twiddy, S. S., & Holmes, E. C. (2003).** The extent of homologous recombination in members of the genus Flavivirus. *Journal of general virology,* 84(2), 429-440.

271. **Vairo F, Nicastri E, Yussuf SM, Cannas A, Meschi S, Mahmoud MA, Mohamed AH, Maiko PM, De Nardo P, Bevilacqua N, Castilletti C, Di Caro A, Racalbuto V & Ippolito G**. IgG against dengue virus in healthy blood donors, Zanzibar, Tanzania. *Emerg Infect Dis,* **2014**, 20(3): 465-468.

272. **Vasilakis N, Cardosa J, Hanley KA, Holmes EC, & Weaver SC**. Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat Rev Microbiol.* **2011** Jun 13; 9(7): 532–541.

273. **Vemula SV, Zhao J, Liu J, Wang X, Biswas S, & Hewlett I**. Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. *Viruses.* **2016** Apr 12;8(4). pii: E96. doi: 10.3390/v8040096.

274. **Venkatesan A, Tunkel AR, Bloch KC, Lauring AS, Sejvar J, Bitnun A, Stahl JP, Mailles A, Drebot M, Rupprecht CE, Yoder J, Cope JR, Wilson MR, Whitley RJ, Sullivan J, Granerod J, Jones C, Eastwood K, Ward KN, Durrheim DN, Solbrig MV, Guo-Dong L, & Glaser CA;** International Encephalitis Consortium. Case definitions, diagnostic algorithms, and priorities in encephalitis: consensus statement of the international encephalitis consortium. *Clin Infect Dis*. **2013** Oct;57(8):1114-28. doi: 10.1093/cid/cit458.

275. **Verdonschot P.F.M. & Besse-Lototskaya A.A.** Flight distance of mosquitoes (Culicidae): a metadata analysis to support the management of barrier zones around rewetted and newly constructed wetlands. *Limnologica* (**2014**), 45, 69–79.doi:10.1016/j.limno.2013.11.002.

276. **Villordo, S. M., Carballeda, J. M., Filomatori, C. V., & Gamarnik, A. V**. RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation. *Trends in Microbiology,* (**2016**). 24(4), 270-283.

277. **Vodopija R, Racz A, & Pahor Đ**. THE INCIDENCE OF JACKAL BITES AND INJURIES IN THE ZAGREB ANTI RABIES CLINIC DURING THE 1995-2014 PERIOD. *Acta Clin Croat.* **2016** Mar;55(1):151-5.

278. **von Stülpnagel C, Winkler P, Koch J, Zeches-Kansy C, Schöttler-Glas A, Wolf G, Niller HH, Staudt M, Kluger G, & Rostasy K.** MRI-imaging and clinical findings of eleven children with tick-borne encephalitis and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol*. **2016** Jan;20(1):45-52. doi: 10.1016/j.ejpn.2015.10.008.

279. **Vora NM, Holman RC, Mehal JM, Steiner CA, Blanton J, & Sejvar J**. Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1998–2010. *Neurology.* **2014**;82:443–51.

280. **Wacharapluesadee S, Tepsumethanon V, Supavonwong P, Kaewpom T, Intarut N, & Hemachudha T.,** Detection of rabies viral RNA by TaqMan real-time RT-PCR using non-neural specimens from dogs infected with rabies virus. *J Virol Methods.* **2012** Sep; 184(1-2):109-12. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.05.013.

281. **Waman, V. P., Kolekar, P., Ramtirthkar, M. R., Kale, M. M., & Kulkarni-Kale, U.** Analysis of genotype diversity and evolution of Dengue virus serotype 2 using complete genomes. *PeerJ,* (**2016**). 4, e2326.

282. **Wang J, Liu W, Meng G, Zhao K, Gu J, Chen P, & Cao R.** Isolation and genome characterization of a novel duck Tembusu virus with a 74 nucleotide insertion in the 3' non-translated region. *Avian Pathol.* **2015**;44(2):92-102. doi: 10.1080/03079457.2015.1006167.

283. **Weaver Scott C, & Lecuit M.** Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med* **2015**; 372:1231–9.

284. **Weinberg A, Li S, Palmer M, & Tyler KL**: Quantitative CSF PCR in Epstein-Barr virus infections of the central nervous system. *Ann Neurol* **2002**, 52(5):543-548.

285. **Wertheim HF, Horby P & Woodall JP**. Atlas of human infectious diseases. *John Wiley & Sons*, **2012**.

286. **Whithley RJ**. Herpes virus encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res* **2006**;71:141-148.

287. **Wilson ML, LeGuenno B, Guillaud M, Desoutter D, Gonzalez JP, & Camicas JL.** Distribution of Crimean-Congo hemorrhagic fever viral antibody in Senegal: environmental and vectorial correlates. *Am J Trop Med Hyg.* **1990** Nov;43(5):557-66.

288. **Xuan L, Jiang X, Sun J, Zhang Y, Huang F, Fan Z, Guo X, Dai M, Liu C, Yu G, Zhang X, Wu M, Huang X, & Liu Q**. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation.* **2013** Sep;96(6):560-6. doi: 10.1097/TP.0b013e31829d38af.

289. **Xue C, Chen S, Lin Q, Zhou H, Huang C, Lin J, Xie W, Chen K, Zhou D, Ma W, Ma F, & Xu H**. Double **encephalitis** with herpes simplex virus type II and cytomegalovirus in an elder Chinese: a case report. *Neuropsychiatr Dis Treat.* **2015** Nov 2;11:2833-6. doi: 10.2147/NDT.S92366.

290. **Yan Y, Shin S, Jha BS, Liu Q, Sheng J, Li F, Zhan M, Davis J, Bharti K, Zeng X, Rao M, Malik N, & Vemuri MC**. Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* **2013** Nov;2(11):862-70. doi: 10.5966/sctm.2013-0080.

291. **Yansouni CP, Bottieau E, Lutumba P, Winkler AS, Lynen L, Büscher P, Jacobs J, Gillet P, Lejon V, Alirol E, Polman K, Utzinger J, Miles MA, Peeling RW, Muyembe JJ, Chappuis F, & Boelaert M.** Rapid diagnostic tests for neurological infections in central Africa. *Lancet Infect Dis.* **2013** Jun;13(6):546-58. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70004-5.

292. **Youn S, Li T, McCune BT, *et al*.** Evidence for a genetic and physical interaction between nonstructural proteins NS1 and NS4B that modulates replication of West Nile virus. *Journal of Virology* **2012**; 86: 7360–7371.

293. **Zaayman D, & Venter M.** West Nile Virus Neurologic Disease in Humans, South Africa, September 2008–May 2009. *Emerging Infectious Diseases.* **2012**;18(12):2051-2054. doi:10.3201/eid1812.111208.

294. **Zander A, Britton PN, Navin T, Horsley E, Tobin S, & McAnulty JM.** An outbreak of enterovirus 71 in metropolitan Sydney: enhanced surveillance and lessons learnt. *Med J Aust.* **2014** Dec 11;201(11):663-6.

295. **Zé-Zé L, Proença P, Osório HC, Gomes S, Luz T, Parreira P, Fevereiro M, & Alves MJ.** Human case of West Nile neuroinvasive disease in Portugal, summer **2015**. *Euro Surveill*. 2015;20(38). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.38.30024.

296. **Zhang L, Yan J, Ojcius DM, Lv H, Miao Z, Chen Y, Zhang Y, & Yan J.** Novel and predominant pathogen responsible for the enterovirus-associated encephalitis in eastern China. *PLoS One.* **2013** Dec 30;8(12):e85023. doi: 10.1371/journal.pone.0085023.

297. **Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, *et al.*** TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science* **2007**;317(5844):1522–7.

298. **Zhang T, Liu Y, Zhang Y, Wang J, Minhas V, Wood C, & He N.** Seroprevalence of human herpesvirus 8 and hepatitis C virus among drug users in Shanghai, China. *Viruses*. **2014** Jun 23;6(6):2519-30. doi: 10.3390/v6062519.

299. **Zhou H, Zhu W, Zeng J, He J, Liu K, Li Y, Zhou S, Mu D, Zhang K, Yu P, Li Z, Zhang M, Chen X, Guo C, & Yu H**. Probable Rabies Virus Transmission through Organ Transplantation, China, 2015. *Emerg Infect Dis.* **2016** Aug;22(8):1348-52. doi: 10.3201/eid2208.151993.

300. **Zhou M, Zhou Z, Kia GS, Gnanadurai CW, Leyson CM, Umoh JU, Kwaga JP, Kazeem HM, & Fu ZF**. Complete genome sequence of a street rabies virus isolated from a dog in Nigeria.*Genome Announc.* **2013** Jan; 1(1). pii: e00214-12. doi: 10.1128/genomeA.00214-12.

301. **Zis P, Stritsou P, Angelidakis P, & Tavernarakis A.** Herpes Simplex Virus Type 2 Encephalitis as a Cause of Ischemic Stroke: Case Report and Systematic Review of the Literature. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* **2016** Feb;25(2):335-9. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.10.002.

302. **Zivcec M, Scholte FE, Spiropoulou CF, Spengler JR, & Bergeron É.** Molecular Insights into Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus. *Viruses.* **2016** Apr 21;8(4). pii: E106. doi: 10.3390/v8040106.

303. **Zmurko J, Neyts J, & Dallmeier K**. Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention. *Rev Med Virol.* **2015** Jul;25(4):205-23. doi: 10.1002/rmv.1835.

304. **Nel LH.** Vaccines for lyssaviruses other than rabies. *Expert Rev Vaccines.* **2005** Aug; 4(4):533-40.

305. **Sadkowska-Todys M**. Phylogenetic relationship of street rabies virus strains and their antigenic reactivity with antibodies induced by vaccine strains. II. Correlation between genetic distance and antibody reactivity. *Med Dosw Mikrobiol.* **2000**; 52(2):185-96.

306. **Hicks DJ, Fooks AR & Johnson N.** Developments in rabies vaccines. *Clin Exp Immunol.* **2012** Sep; 169(3):199-204. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04592.x.

WÉBOGRAPHIE

1. **Agence Nationale de la Statistique et de la Démographie (ANSD**): Rapport RGPHAE-2013. Rapport final publié en Août **2016.** Consulté le **03/01/17 :** http://www.ansd.sn/index.php?option=com_ansd&view=titrepublication&id=23.

2. **Lettre circulaire du Ministère de la Santé et des affaires sociales** (**MSAS)** du Sénégal. **octobre 2015.** Consulté le **06/01/17 :** www.dirpharm.net/index.php/contact/msas-ministere-de-la-sante-et-de-l-action-sociale.

3. **Manuel OIE. Rabies. 2016.** In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals **2016**. Paris: World Organisation for Animal Health. Consulté le **05/01/17:** http://www.oie.int/en/international-standardsetting/terrestrial-manual/access-online.

4. **OIE. Rift Valley fever, Senegal, 2013.** Consulté le **17/06/14:** http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=14211.

5. **Organisation Mondiale de Santé (OMS)- Relevé épidémiologique hebdomadaire (REH)**: 9 **novembre 2012,** vol. 87, 45 (pp. 437–448). Consulté le **09/12/16 :** http://www.afro.who.int/fr.

6. **Organisation Mondiale de Santé (OMS)- Relevé épidémiologique hebdomadaire (REH)**: 18 **novembre 2016.** Consulté le **09/12/16 :** http://www.afro.who.int/fr/ .

7. **Organisation Mondiale de Santé (OMS)- Relevé épidémiologique hebdomadaire (REH)**: 3 **juin 2016**, vol. 91, 22 (pp. 285–296). Consulté le **07/11/16 :** http://www.afro.who.int/fr.
8. **Organisation Mondiale de Santé (OMS): 14 septembre 2015.** Consulté le **24/08/16 :** http://www.afro.who.int/fr/groupes-organiques-et-programmes/4746-chikungunya-au-senegal-14-septembre-2015.html.
9. **Rapport annuel 2012 Institut Pasteur Bangui**. Consulté le **09/12/16 :** pasteur-bangui.org/wp-content/themes/bangui/IPB-RAPPORT-ANNUEL-2012.pdf.
10. **Rapport annuel 2012 Institut Pasteur de Dakar (IPD).** Consulté le **17/01/17 :** www.pasteur.sn/dmdocuments/20131219-Rapport2012.pdf.
11. **Rapport annuel 2013 Institut Pasteur de Dakar (IPD).** Consulté le **15/10/16 :** www.pasteur.sn/dmdocuments/Rapport-Annuel-IPD-2013.pdf.

12. **Rapport annuel 2014 Institut Pasteur de Dakar (IPD).** Consulté le **25/11/16 :** www.pasteur.sn/dmdocuments/Rapport-Annuel-IPD-2014.pdf.

13. **Rapport d'activités 2015-Institut Pasteur d'Algérie (IPA).** Consulté le **09/08/16 :** http://www.pasteur.dz/presentation.php?page=72.

ANNEXES

ANNEXE 1: NOTE D'INFORMATION

«Détection de nouveaux virus impliqués dans les encéphalites chez l'homme en Afrique centrale et de l'OUEST (DEVINE)»

Madame, Monsieur,
L'hôpital ……..……, en collaboration avec l'Institut Pasteur de Dakar et de Paris, réalise une étude épidémio-clinique et diagnostique chez les adultes atteints d'encéphalite aigue, présumée d'origine virale.
L'encéphalite aigue est une atteinte grave du cerveau, dont l'origine principale est liée à une infection, majoritairement de type viral. Cependant, l'origine et la cause précise de cette maladie ne peuvent être identifiées que dans 30 à 70% des cas selon les différentes études disponibles. De plus, les données épidémiologiques recueillies en Afrique restent très limitées, voire inexistantes. L'amélioration des connaissances sur cette maladie et de ses causes possibles dans ce contexte géographique permettrait donc d'apporter une meilleure prise en charge des patients atteints.

Vous êtes hospitalisé(e) dans le cadre de votre maladie, une encéphalite aigue présumée d'origine virale. C'est pourquoi nous vous proposons de participer à une étude ayant pour but d'améliorer le diagnostic de cette maladie, c'est-à-dire l'identification précise de sa cause, ainsi que d'identifier les caractéristiques cliniques, épidémiologiques et biologiques qui lui sont associées. Cette étude se compose de trois volets :

- un volet "clinico-épidémiologique"
Ce volet consiste en le recueil, la compilation et l'analyse de données cliniques et épidémiologiques des patients pré-sélectionnés dans cette étude, au travers de questionnaires d'enquête que vous renseignerez avec l'aide du médecin en charge de l'étude au sein du service hospitalier où vous avez été admis. Ces informations permettront de mieux documenter les aspects cliniques de la maladie dont vous êtes atteint, ainsi que de déterminer les potentiels facteurs épidémiologiques qui lui sont associés. Ces questionnaires d'enquête de façon codifiée au microbiologiste référent à l'Institut Pasteur de Dakar et à l'épidémiologiste en charge de l'étude à l'Institut Pasteur de Paris. Les informations codifiées seront recueillies dans une base de données informatique et feront l'objet d'une analyse statistique globale.

- un volet "diagnostic biologique"
Ce volet se déroule simultanément au volet "clinico-épidémiologique". La cause de votre encéphalite sera recherchée d'une façon approfondie, suivant les recommandations de bonne pratique approuvées au niveau international pour la prise en charge diagnostique des encéphalites aigues. Cette exploration approfondie contribuera à une optimisation de votre prise en charge médicale. Elle comprend notamment la recherche de différents agents pathogènes, principalement viraux, qui sera réalisée au sein des laboratoires spécialisées de l'Institut Pasteur de Dakar. Afin de réaliser ces examens diagnostiques, des quantités supplémentaires de 10 ml de sang et de 1,5 ml de liquide céphalo-rachidien (LCR) de plus qu'à l'accoutumée seront prélevées. Ces quantités supplémentaires de sang et de LCR seront prélevées au cours d'une seule prise de sang et d'une seule ponction lombaire réalisées habituellement pour le diagnostic et la prise en charge habituelle de votre maladie. Ces quantités supplémentaires ne présentent pas de risque supplémentaire. Un prélèvement de gorge (écouvillonnage pharyngé) et un prélèvement de peau au niveau de la nuque (de la taille du dessin dans la marge) seront également réalisés si nécessaire. L'ensemble des examens pratiqués sur ces prélèvements sont gratuits. De plus, les bilans biologiques habituels (examens biochimiques et biologiques) qui doivent être réalisés sur ces prélèvements dans le cadre de la prise en charge normale des patients atteints d'encéphalite aigue sont également gratuits. Enfin, en cas de diagnostic positif d'encéphalite herpétique obtenu au cours de la réalisation du volet "diagnostic biologique", un traitement antiviral adapté et reconnu internationalement à base d'aciclovir vous sera proposé de façon gratuite. A la fin de ce volet "diagnostic biologique", le reste des prélèvements sera intégré dans le volet "collection biologique" décrit ci-dessous.Les données obtenues au cours de ce volet seront

transmises de façon codifiée au microbiologiste référent à l'Institut Pasteur de Dakar et à l'épidémiologiste en charge de l'étude à l'Institut Pasteur de Paris. Les informations codifiées seront recueillies dans une base de données informatique et feront l'objet d'une analyse statistique globale.

- Un volet « collection biologique »
Ce volet se déroule simultanément aux volets "diagnostic biologique" et "clinico-épidémiologique" et consiste en la constitution d'une collection biologique codifiée conservée selon la réglementation en vigueur sous la responsabilité du Docteur Ousmane Faye au sein du laboratoire des arbovirus et virus de fièvres hémorragique de l'Institut Pasteur de Dakar ainsi que sous la responsabilité du Dr Dacheux au sein du laboratoire DyLAH de l'Institut Pasteur de Paris. Ces prélèvements seront destinés à être utilisés dans le cadre de cette étude. Ils seront conservés dans ces lieux pendant toute la durée nécessaire à la réalisation de cette étude. Au cours de ce volet, un prélèvement de 10 ml de sang et un prélèvement de 1,5 ml de LCR (réalisé à deux reprises au cours de l'étude) de plus qu'à l'accoutumée seront prélevés dans la mesure du possible. Les quantités supplémentaires de sang et de LCR seront prélevées au cours des prises de sang ou des ponctions de LCR réalisées habituellement pour le diagnostic et la prise en charge habituelle de votre maladie. Deux prélèvements sanguins de 10 ml seront réalisés spécifiquement pour cette étude (à mi-parcours et à la fin de la période d'inclusion). Ainsi un volume maximum de 30 ml de sang et de 3 ml de LCR pourra vous être prélevé pour ce volet à l'issue de votre hospitalisation. Il n'y a aucun risque supplémentaire lié à cette recherche. Egalement, le reste des prélèvements utilisés au cours du volet "diagnostic biologique" sera également conservé et intégré au sein de cette collection biologique. Une fois l'étude terminée et en cas de non-opposition de votre part, ces différents échantillons pourront être maintenu dans cette collection biologique (pour une durée de 15 ans) et être ainsi utilisés dans des travaux de recherche fondamentale sur les encéphalites, qui concerneront notamment l'identification de nouveaux virus, la compréhension des mécanismes physiopathologiques ou immunologiques, et le développement de nouvelles méthodes diagnostiques. En aucun cas, ces échantillons ne pourront servir à des projets de recherche sur d'autres maladies sans lien avec les encéphalites. A terme, ces recherches permettront d'améliorer le diagnostic et potentiellement le traitement de ces affections.
De plus et si vous y consentez, une analyse génétique pourrait également être réalisée secondairement sur ces prélèvements au sein des Instituts Pasteur de Dakar et de Paris. Elle consistera en la recherche et l'analyse non exhaustive de marqueurs génétiques en lien avec la maladie et son évolution, tels les mécanismes physiopathologiques de l'infection, la réponse immunitaire et inflammatoire et la susceptibilité à l'infection. Ces recherches seront effectuées uniquement sur les prélèvements codifiés présents dans la collection biologique. En aucun cas, ces analyses génétiques seront réalisées pour des projets de recherches sur d'autres maladies sans lien avec les encéphalites. A terme, ces recherches permettront d'améliorer la compréhension de la maladie et potentiellement le traitement, les mécanismes physiopathologiques ou la prévention de ces affections.

Vous êtes totalement libre de votre décision de participer ou non à cette recherche dans son intégralité ou partiellement et vous n'avez pas à fournir de raison quelconque. Le fait de ne pas participer à cette étude ou de retirer votre consentement ne portera pas atteinte à vos relations avec le médecin chargé de votre suivi, ne vous privera pas de vos droits et vous n'encourrez aucune responsabilité ni préjudice de ce fait.

Si vous décidez de participer à cette recherche, vous êtes en droit de revenir sur votre décision à tout moment et sans avoir à fournir de raison quelconque. Dans ce cas, vos échantillons restants ou conservés ainsi que les données associées seront automatiquement détruits. Une attestation de destruction vous sera donnée sur demande.

Les résultats des analyses et les informations cliniques et épidémiologiques recueillies seront regroupés avec ceux d'autres patients participant à l'étude. Un simple code sera attribué à votre prélèvement ainsi qu'à vos données qui seront enregistrées dans une base de données informatisée, dans le strict respect de la confidentialité. Aucune donnée clinique, épidémiologique, biologique ou génétique identifiante ne sera recueillie pour cette étude et les prélèvements seront confiés aux équipes de recherche de manière codifiée. Votre nom ne sera mentionné dans aucun document, ni aucune publication. Vous pourrez à tout moment exercer votre droit d'accès et de rectification ou d'opposition de ces données directement auprès du médecin référent de l'étude, selon la réglementation en vigueur1. Les médecins et scientifiques responsables de l'étude utiliseront ces données uniquement dans le cadre de cette étude.

Seuls les médecins en charge de l'étude au sein du service hospitalier dans lequel vous avez été admis auront la possibilité de revenir à l'identification du nom des patients volontaires à partir du code attribué au cours de l'étude. En effet, ces médecins auront ainsi la possibilité de vous communiquer les résultats diagnostiques

obtenus au cours de cette étude s'ils jugent que ces informations s'avèreraient importantes pour votre suivi médical après hospitalisation.

Si vous acceptez de participer à cette recherche, il vous sera demandé de remplir et de signer un formulaire de consentement. Ce formulaire sera conservé dans le dossier médical du médecin clinicien vous ayant pris en charge.

Si vous avez des questions complémentaires sur la recherche précédemment mentionnée, n'hésitez pas à interroger un des médecins de l'équipe qui vous suit. Vous gardez un exemplaire de cette note d'information remise par le Dr…… et du consentement que vous avez signé.

Cette étude a également reçu l'avis favorable des comités d'éthique (Paris et Dakar) et du Comité de Protection des Personnes : .

ANNEXE 2: FORMULAIRE DE CONSENTEMENT

«Détection de nouveaux virus impliqués dans les encéphalites chez l'homme en Afrique centrale et de l'OUEST (DEVINE)»

Le Docteur……, médecin dans le service de ……..de l'hôpital de ……..m'a proposé de participer à une **étude épidémio-clinique et diagnostique chez les adultes atteints d'encéphalite aigue, présumée d'origine virale** afin d'améliorer les connaissances sur cette maladie et de ses causes possibles. Cette étude se déroule selon trois volets différents : "clinicoépidémiologique", "diagnostic biologique" et "collection biologique".
Le médecin m'a précisé que je suis libre d'accepter ou de refuser de participer à tout ou partie de cette étude. Cela ne changera pas nos relations pour mon traitement et ma prise en charge.
Afin d'éclairer ma décision, j'ai bien compris les informations suivantes qui m'ont été données par écrit et oralement dans la lettre d'information qui m'a été remise.
En donnant mon consentement pour participer à cette étude, j'accepte :

1. qu'au travers du volet "**clinico-épidémiologique**", les informations cliniques et épidémiologiques figurant dans mon dossier médical soient transmises de façon codifiée aux collaborateurs épidémiologistes des Instituts Pasteur de Dakar et de Paris en charge de cette étude. J'accepte que les données nominatives me concernant recueillies à l'occasion de cette étude puissent faire l'objet d'un traitement automatisé par les organisateurs de l'étude.

2. qu'au travers du volet **"diagnostic biologique"**, le médecin me prélève 1,5 ml de liquide céphalo-rachidien (LCR) de plus qu'à l'accoutumée au cours d'une ponction lombaire réalisée habituellement dans le cadre de la prise en charge de la maladie dont je souffre. J'accepte également que me soit prélevé 10 ml de sang supplémentaire au cours d'un prélèvement sanguin réalisée habituellement dans le cadre de la prise en charge de la maladie dont je souffre. Ces prélèvements ne présentent aucun risque supplémentaire. J'accepte également que soient réalisés si nécessaire un écouvillonnage pharyngé et une biopsie de peau au niveau de la nuque. J'ai bien noté que les analyses effectuées à partir de ces prélèvements seront gratuites, et qu'à l'issue de ces analyses un traitement antiviral pourra m'être proposé également de façon gratuite. J'accepte que les données obtenues soient transmises de façon codifiée aux collaborateurs de l'étude à l'Institut Pasteur de Dakar et à l'Institut Pasteur de Paris pour être analysées.

3. qu'au travers du volet "**collection biologique**", un volume de 10 ml de sang de plus qu'à l'accoutumée soient prélevés à une reprise, et 1,5 ml de LCR de plus qu'à l'accoutumée soient prélevés à deux reprises si possible, lors des prélèvements sanguins et de LCR réalisés habituellement pour le diagnostic et la prise en charge habituelle de ma maladie. J'accepte aussi que deux prélèvements sanguins d'un volume de 10 ml chacun soient réalisés spécifiquement pour cette étude (à mi-parcours et à la fin de la période d'inclusion). J'accepte également que ces prélèvements ainsi que les fonds de tube issus du volet "diagnostic biologique" puissent constituer une collection biologique codifiée qui sera conservée selon la réglementation en vigueur sous la responsabilité du Docteur Ousmane Faye au sein du laboratoire des arbovirus de l'Institut Pasteur de Dakar ainsi que sous la responsabilité du Docteur Dacheux au sein du laboratoire DyLAH de l'Institut Pasteur de Paris pendant toute la période nécessaire à la réalisation de cette étude.

4.
Si je ne m'y oppose pas, ces différents échantillons pourront être maintenu dans cette collection biologique pour une période de 15 ans et être ainsi utilisés dans des travaux de recherche fondamentale sur les encéphalites, qui concerneront notamment l'identification de nouveaux virus, la compréhension des mécanismes physiopathologiques ou immunologiques, et le développement de nouvelles méthodes diagnostiques. En aucun cas, ces échantillons ne pourront servir à des projets de recherche sur d'autres maladies sans lien avec les encéphalites. A terme, ces recherches permettront d'améliorer le diagnostic et potentiellement le traitement de ces affections. Ces travaux pourront comporter des analyses génétiques recherchant des facteurs en lien avec la maladie et son évolution, uniquement si je consens à ce que les échantillons conservés au cours du volet "collection biologique" puissent être utilisés pour réaliser des analyses génétiques. En aucun cas, ces analyses génétiques seront réalisées pour des projets de recherches sur d'autres maladies sans lien avec les encéphalites.
Je suis parfaitement conscient(e) que je peux retirer mon consentement à cette recherche et cela quelles que soient mes raisons et sans en supporter aucune responsabilité. Le fait de retirer mon consentement impliquera la destruction de tous les échantillons restants prélevés et des données collectées pour la recherche et une attestation de cette destruction me sera remise sur ma demande.

J’ai été informé(e) de la finalité de cette étude et des trois volets la constituant. Je peux à mon libre choix participer à tout ou partie de l’étude.

Je m’oppose Je ne m’oppose pas

à la conservation des échantillons réalisés dans le cadre de cette étude et à leur utilisation pour d’autres recherches en lien avec les encéphalites aigues afin d’améliorer les connaissances sur cette maladie.

Je consens Je ne consens pas

à l’utilisation des échantillons conservés pour la réalisation d’analyses génétiques visant à identifier des facteurs génétiques en lien avec la maladie et son évolution.

Signature du Patient :

Nom, prénom : ……
Fait à Dakar, . le ……,
Signature :

Signature du Médecin :
Nom, prénom : ……
N° de tél : …….
Fait à Dakar, le ……,
Signature

Cachet du service :

• Les données médicales associées au prélèvement seront réunies sur un fichier informatique permettant leur traitement automatisé dans le cadre des recherches. Vous disposez à leur égard d’un droit d’accès, de rectification et d’opposition conformément à la réglementation en vigueur

• Les informations portées sur ce document sont strictement confidentielles et couvertes par le secret médical et professionnel. A aucun moment, les données personnelles qui y figurent n’apparaîtront lors de la publication des résultats de travaux de recherche.

NB : ce document est à signer en deux exemplaires originaux, dont l'un est remis au patient et l'autre conservé dans son dossier hospitalier

ANNEXE 3: Tableau S1

Tableau S1: Description des isolats africains du virus de la Rage utilisés pour l'analyse *in silico* des nouveaux tests développés

Origine	Isolat	Hôte	Date d'isolement	Clade - sous_clade Phylogénétique	N° d'accession
Benin	86097BEN	Chat	1986	Africa-2	KX148107
Burkina Faso	86036HAV	Chien	1986	Africa-2	KX148234
Burkina Faso	95047HAV	Chien	1995	Africa-2	KX148230
Cameroun	88003CAM	Chien	1987	Africa-2	KX148243
Cameroun	95002CAM	Chien	1994	Africa-2	KX148242
Répubique Centre-Africaine	92029CAR	Chien	1992	Cosmopolitain – AF1b	KX148208
Répubique Centre-Africaine	CAR_11_001	Humain	2011	Africa-2	KF977826
Tchad	90021TCH	Chien	1990	Africa-2	KX148240
Tchad	96009TCH	Chien	1996	Africa-2	KX148241
Ethiopie	88008ETH	Chien	1988	Cosmopolitain – AF1a	KX148200
Ethiopie	RV2985	Loup éthiopien	2014	Cosmopolitain – AF1a	KP723638
Gabon	95049GAB	Chien	1995	Cosmopolitain – AF1a	KX148202
République de Guinée	90024GUI	Chien	1990	Africa-2	KX148244
Côte d'Ivoire	01007CI	Chien	2001	Africa-2	KX148235
Côte d'Ivoire	92037CI	Chien	1992	Africa-2	KX148232
Côte d'Ivoire	92038CI	Chien	1992	Africa-2	KX148233
Kenya	14015ITA	Humain	2014	Cosmopolitain – AF1a	KX148207
Madagascar	04033MAD	Chien	2004	Cosmopolitain – AF1c	KX148209
Madagascar	86046MAD	Chien	1986	Cosmopolitain – AF1c	KX148211
Madagascar	98002MAD	Humain	1998	Cosmopolitain – AF1c	KX148210
Mauritanie	93011MAU	Chien	1993	Africa-2	KX148236
Mauritanie	93012MAU	Chien	1993	Africa-2	KX148237
Monzambique	86031MOZ	Chien	1986	Cosmopolitain – AF1a	KX148203
Maroc	04031MAR	Chien	2004	Cosmopolitain – AF1a	KX148195
Maroc	08342MAR	Chien	2008	Cosmopolitain – AF1a	KX148193
Maroc	89017MAR	Chien	1989	Cosmopolitain – AF1a	KX148194
Maroc	90016MAR	Chien	1990	Cosmopolitain – AF1a	KX148196
Maroc	RV2627	Vache	2009	Cosmopolitain – AF1a	KF155001
Namibie	92030NAM	Chien	1992	Cosmopolitain – AF1b	KX148204
Namibie	178J09	Jackal	2009	Cosmopolitain – AF1b	JX473838
Namibie	239K09	Vache sauvage namibienne	2009	Cosmopolitain – AF1b	JX473840
Niger	90010NIG	Chien	1990	Africa-2	KX148231
Niger	90012NIG	Chien	1990	Africa-2	KX148229
Nigéria	86003BRE	Chien	1986	Cosmopolitain – AF1a	KX148201
Nigéria	DRV_NG11	Chien	2011	Africa-2	KC196743
Rwanda	94289RWA	Chien	1994	Cosmopolitain – AF1b	KX148205
Sénégal	93003SEN	Chien	1991	Africa-2	KX148238
Sénégal	93005SEN	Chien	1992	Africa-2	KX148239
Somalie	93006SOM	Chacal	1993	Cosmopolitain – AF1a	KX148199
Afrique du Sud	87021AFS	Humain	1981	Cosmopolitain – AF1b	KX148103
Tanzanie	96013TAN	Chien	1996	Cosmopolitain – AF1b	KX148206
Tanzanie	RV2772	Chien	2009	Cosmopolitain – AF1b	KF155002

Détermination des clades et sous_clades faite en accord avec **Troupin *et al.,* 2016**

ANNEXE 4: Tableau S2

Tableau S2: Résultats de la spécificité analytique des nouveaux tests sur des prélévements *post-mortem* negatifs au virus de la Rage

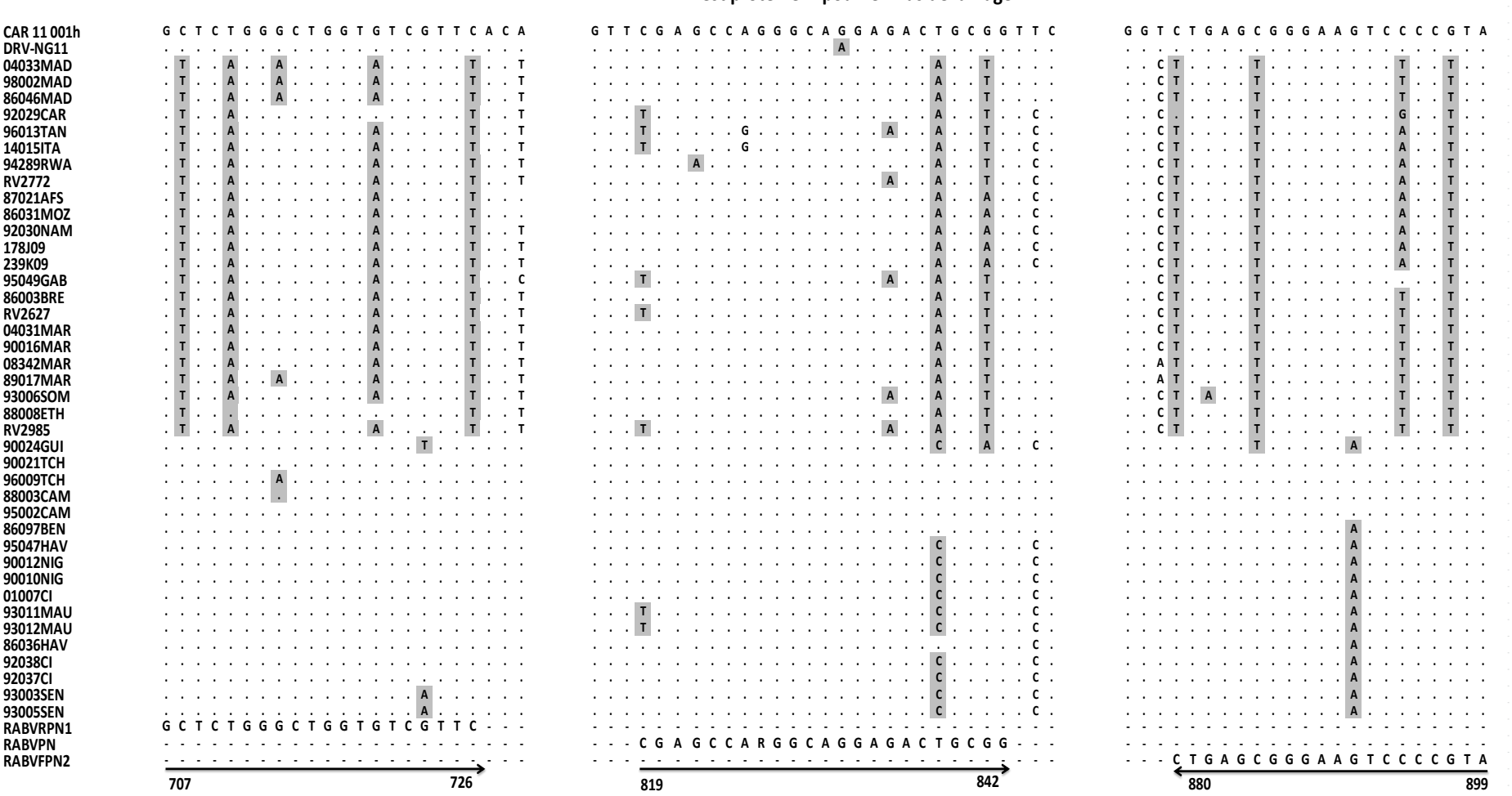
Isolat[a]	Type de prélèvement	Hôte	Origine	Résultat IF	Test protéine N	Test protéine L
03-0816FRA	P	Chauve-souris	France	négatif	négatif	négatif
09-0907FRA	P	Chien	France	négatif	négatif	négatif
09-0923FRA	P	Renard	France	négatif	négatif	négatif
09-0934FRA	P	Chat	France	négatif	négatif	négatif
09-0945FRA	P	Chien	France	négatif	négatif	négatif
09-0957FRA	P	Chat	France	négatif	négatif	négatif
09-0960FRA	P	Chien	France	négatif	négatif	négatif
10-0016FRA	P	Blaireau	France	négatif	négatif	négatif
10-0084FRA	P	Blaireau	France	négatif	négatif	négatif
10-0438FRA	P	Renard	France	négatif	négatif	négatif
10-0498FRA	P	Mouton	France	négatif	négatif	négatif
10-0527FRA	P	Mangouste	France	négatif	négatif	négatif
10-0533FRA	P	Chat	France	négatif	négatif	négatif
10-0534FRA	P	Chien	France	négatif	négatif	négatif
10-0560FRA	P	Chien	France	négatif	négatif	négatif
10-0615FRA	P	Chat	France	négatif	négatif	négatif
10-0621FRA	P	Chat	France	négatif	négatif	négatif
10-0793FRA	P	Bovin	France	négatif	négatif	négatif
10-0814FRA	P	Chien	France	négatif	négatif	négatif
10-0913FRA	P	Chien	France	négatif	négatif	négatif

a: Tous les prélèvements ont été testés au CNR-Rage à l'Institut Pasteur, Paris.

P: prélèvement primaire de cerveau

IF: test d'immunofluorescence directe

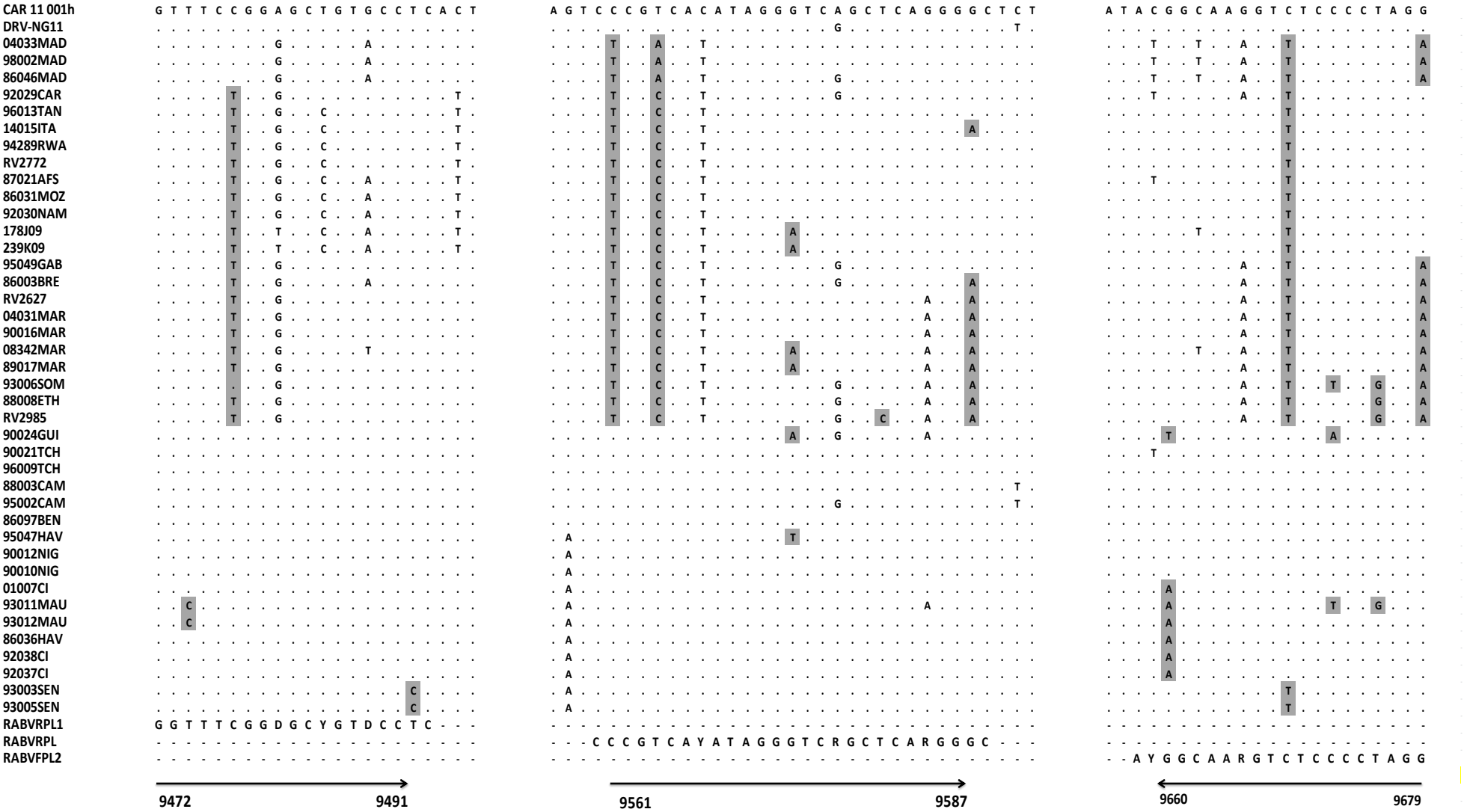
ANNEXE 5: Figure A1:



<u>Figure A1</u>: Alignement multiple *in silico* des amorces et sonde du système RABV-protéine-N (CNR-rage à l'IPD) avec 44 séquences partielles de la nucléoprotéine d'isolats du virus de la rage appartenant à la lignée Africa 1 et au clade Africa 2. Les positions de chaque oligonucléotide sont indiqués en accord avec la séquence de référence CAR_11/001h (GenBank N°. KF977826). Les flèches et les points indiquent respectivement la direction des oligonucléotides et la similarité avec la séquence de référence CAR_11/001h (GenBank N°. KF977826). Les différences avec les séquences des oligonucléotides sont marquées en gris. Les informations sur les isolats utilisés pour cette analyse sont décrites au niveau du **Tableau S1.**

<u>ANNEXE 6</u>: <u>Figure A2:</u>

Test protéine L pour le virus de la Rage



<u>Figure A2</u>: Alignement multiple *in silico* des amorces et sonde du système RABV-protéine-L (CNR-rage à l'IPD) avec 44 séquences partielles de la nucléoprotéine d'isolats du virus de la rage appartenant à la lignée Africa 1 et au clade Africa 2. Les positions de chaque oligonucléotide sont indiqués en accord avec la séquence de référence CAR_11/001h (GenBank N°. KF977826). Les flèches et les points indiquent respectivement la direction des oligonucléotides et la similarité avec la séquence de référence CAR_11/001h (GenBank N°. KF977826). Les différences avec les séquences des oligonucléotides sont marquées en gris. Les informations sur les isolats utilisés pour cette analyse sont décrites au niveau du **Tableau S1.**

Auteur : Martin FAYE **Résumé**

En général, les encéphalites virales sont associées à un tableau clinique grave qui nécessite une hospitalisation. Malgré les avancées notables faites dans le diagnostic des encéphalites virales au cours des dernières décennies, la grande majorité des cas demeure inexpliquée. En outre, très peu d'études ont eu pour but d'identifier de façon spécifique l'agent viral impliqué et la plupart de ces études utilisant les méthodes de diagnostic moléculaires ou sérologiques modernes a été effectuée dans les pays développés. Par conséquent, plus de connaissances sont nécessaires en Afrique où les moyens de diagnostic sont limités ou parfois inexistants.

Ainsi, dans une approche globale, nous avons recherché les étiologies virales impliquées dans les cas d'encéphalites aiguës, chez des patients avec un âge ≥15 ans, sur la période de novembre 2011 à décembre 2013 dans la région de Dakar, Sénégal. Toutefois, un diagnostic performant souligne la nécessité d'outils fiables pour la détection de nouveaux agents pathogènes ou la détermination de nouvelles manifestations d'agents pathogènes déjà connus associés aux encéphalites. Pour cela, dans une approche ciblée, nous avons développé des RT-qPCRs pour une large détection du virus de la rage, particulièrement plus adaptés pour le contexte africain. En outre, dans une approche « future », nous avons montré les caractéristiques génétiques du virus Bagaza qui peut devenir une étiologie impliquée dans les encéphalites humaines.

L'ensemble de nos résultats ont montré que malgré l'utilisation extensive du séquençage à haut débit NGS, l'étiologie demeure non identifiée dans la majorité des cas d'encéphalite aiguë. Les outils moléculaires développés et validés au cours de cette étude, peuvent être utilisés dans le diagnostic de routine de la rage au laboratoire ou dans les études épidémiologiques sur le terrain, particulièrement en Afrique. Malgré l'évidence d'une adapation du virus Bagaza au génome humain, d'autres études seraient nécessaires afin d'évaluer son implication probable dans les cas d'encéphalite humaine.

Molecular epidemiology of acute viral encephalitis in Senegal

Summary

Viral encephalitis is generally associated with a serious hallmark that requires hospitalization. Despite significant advances observed in diagnostic of viral encephalitis in the past decades, the vast majority of cases remains unexplained. In addition, very few studies have attempted to identify specific viral agent involved and most of these studies using modern molecular or serological diagnostic methods have been performed in developed countries. Therefore, more knowledge is needed in Africa where diagnostic means are limited or sometimes non-existent.

Thus, in a global approach, we investigated the viral etiologies involved in acute encephalitis cases, in more than fifteen years-old patients, from November 2011 to December 2013 in Dakar, Senegal. However, an effective diagnosis highlights the need of reliable tools for detection of new pathogens or identification of new manifestations of known pathogens associated with encephalitis. In a targeted approach, we developed molecular tools for a broad detection of rabies virus, particularly more adapted to the African context. In addition, in a "future" approach, we showed the genetic characteristics of the Bagaza virus which could be involved in human encephalitis.

In conclusion, our results show that despite the extensive use of NGS, the etiology remains non-identified in the majority of acute encephalitis cases. Molecular tools developed and validated in this study could be used in routine laboratory diagnostic of rabies or in epidemiological field, particularly in Africa. Despite the evidence of Bagaza virus adaptation to the human genome, further studies are needed to assess its likely implication in human encephalitis cases.

Discipline: Sciences de la vie, de la santé et de l'environnement

Mots-clés: Encéphalite virale aiguë – patients avec un âge ≥15 ans –étiologie – Dakar-Sénégal - virus de la rage – RT-qPCR – Afrique - virus Bagaza – adaptation

Génétique des populations UER 203, Faculté des Sciences et Techniques, Avenue Cheikh Anta Diop, Dakar-Sénégal.