

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION
NATIONALE

Un Peuple - Un But - Une Foi

Direction Nationale de l'Enseignement
Supérieur

ÉCOLE NATIONALE
DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1990

N° 15.....

**Epidémiologie moléculaire des Méningites à
Méningocoque au Mali en 1990. (Partie II)**

THESE

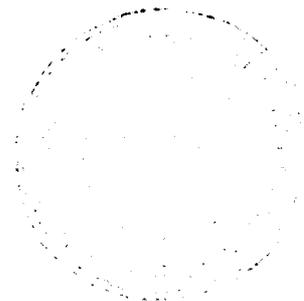
Présentée et soutenue publiquement ledevant
l'École Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali

P A R

Djénèba SIDIBE

Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie

(DIPLOME D'ÉTAT)



Examineurs

PRESIDENT : *Professeur Ag RHILY*

MEMBRES : *Professeur Brehima KOUmare*

Professeur Mamadou Marouf KEITA

Professeur Gaoussou KANOUTE

LISTE DES PROFESSEURS

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI
ANNEE UNIVERSITAIRE 1990/1991

LISTE DES PROFESSEURS

Professeur Sambou SOUMARE	Directeur Général
Professeur Moussa TRAORE	Directeur Général Adjoint
Docteur Hubert BALIQUE	Conseiller Technique
Professeur Bakary M. CISSE	Sécretaire Général

D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeur Mamadou Lamine TRAORE	Chef de DER Chirurgie
Professeur Aliou BA	Ophtalmologie
Professeur Bocar SALL	Ortho.Traumat.Sécourisme
Professeur Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Professeur Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Professeur Amadou DOLO	Gynéco-Obstétrique

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Madame Sy Aida SOW	Gynéco-Obstétrique
Docteur Kalilou OUATTARA	Urologie
Docteur Mamadou L. DIOMBANA	Odonto-Stomatologie
Docteur Djibril SANGARE	Chirurgie Générale
Docteur Salif DIAKITE	Gynéco-obstétrique
Docteur Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
Docteur Alhousséini Ag MOHAMED	O.R.L.
Docteur Mme DIANE F.S. DIABATE	Gynéco-Obstétrique
Docteur Abdoulaye DIALLO	Anesth.-Réanimation
Docteur Sidi Yaya TOURE	Anesth.-Réanimation
Docteur Gangaly DIALLO	Chirurgie Générale

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeur Bréhima KOUMARE	Microbiologie (Chef de DER)
Professeur Siné BAYO	Anatomie-Path.
Professeur Gaoussou KANOUTE	Chimie analytique

2. DOCTEURS D'ETAT

Professeur Yéya Tiémoko TOURE	Biologie
Professeur Amadou DIALLO	Biologie-Génétique

3. DOCTEURS 3^e CYCLE

Professeur Moussa HARAMA	Chimie organique
Professeur Massa SANOGO	Chimie analytique
Professeur Mme THIAM Aïssata SOW	Biophysique
Professeur Bakary M. CISSE	Biochimie
Professeur Mamadou KONE	Physiologie

4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Anatole TOUNKARA	Immunologie
Docteur Amadou TOURE	Histo-embryologie

5. MAITRES ASSISTANTS

Docteur Abdrahamane TOUNKARA	Biochimie
------------------------------	-----------

DER DE MEDECINE ET SPECIALITE MEDICALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeur Souleymane SANGARE	Pneumo-Phtisio (Chef de DER)
Professeur Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Professeur Aly GUINDO	Gastro-Enterologie
Professeur Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Professeur Mahamane MAIGA	Méphrologie
Professeur Ali Nouhoum DIALLO	Médecine interne
Professeur Baba KOUMARE	Psychiatrie
Professeur Moussa TRAORE	Neurologie
Professeur Issa TRAORE	Radiologie
Professeur Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
Professeur Eric PICHARD	Médecine interne
Professeur Toumani SIDIBE	Pédiatrie

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Balla COULIBALY	Pédiatrie
Docteur Boubacar DIALLO	Cardiologie
Docteur Dapa Ali DIALLO	Hémato-Médec.-interne
Docteur Somita KEITA	Dermato-Leprologie

D.E.R. DE SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeur Boubacar CISSE	Toxicologie (Chef DER)
---------------------------	------------------------

2. MAITRES ASSISTANTS

Docteur Boulkassoum HAIDARA	Législ. Gest. Pharm.
Docteur Elimane MARIKO	Pharmacodynamie
Docteur Arouna KEITA	Matières Médicales
Docteur Ousmane DOUMBIA	Pharmacie chimique

3. DOCTEURS 3° CYCLE

Docteur Mme CISSE Aminata GAKOU	Pharmacie Galénique
---------------------------------	---------------------

DER DE SANTE PUBLIQUE

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeurs Sidi Yaya SIMAGA	Santé Publique (Chef DER)
Docteur Hubert BALIQUE	Maitre de Conf. Santé Pub.

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Moussa A. MAIGA	Santé Publique
Docteur Georges SOULA	Santé Publique
Docteur Pascal FABRE	Santé Publique
Docteur Bocar G. TOURE	Santé Publique

CHARGES DE COURS

Professeur N'Golo DIARRA	Botanique
Professeur Bouba DIARRA	Bactériologie
Professeur Souleymane TRAORE	Physiologie générale
Professeur Salikou SANOGO	Physique
Professeur Daouda DIALLO	Chimie générale et minér.
Professeur Messaoud LAHBIB	Biologie
Professeur Bakary I. SACKO	Biochimie
Professeur Yoro DIAKITE	Maths
Professeur Sidiki DIABATE	Bibliographie
Docteur Aliou KEITA	Galénique
Docteur Boubacar KANTE	Galénique
Docteur Souleymane GUINDO	Gestion
Docteur Mme Sira DEMBELE	Maths
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du milieu

ASSISTANTS

Docteur Bah KEITA	Pneumo-Phtisiologie
Docteur Hamar A. TRAORE	Médecine interne
Docteur Sékou SIDIBE	Ortho-traumatologie
Docteur Abdoul K. TRAORE dit DIOP	Chirurgie générale
Docteur Flabou BOUGOUDOGO	Microbiologie
Docteur Moussa Y. MAIGA	Gastro-Enterologie
Docteur Abdoul K. TRAORE	Médecine interne
Drissa DIALLO	Matières médicales
Docteur Nouhoum ONGOIBA	Chirurgie générale
Docteur Sahari FONGORO	Néphrologie
Docteur Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie
Docteur Benoît KOUMARE	Chimie Analytique

C E S

Docteur Mamadou A. CISSE	Urologie
Docteur Filifing SISSOKO	Chirurgie générale
Docteur Daba SOGODOGO	Chirurgie générale
Docteur Georges YAYA	Ophtalmologie
Docteur Mahamane S. ASKIA	Ophtalmologie
Docteur Amadou NDene DIALLO	Ophtalmologie
Docteur Abdou ISSA	Ophtalmologie
Docteur NDJIKAM	Ophtalmologie
Docteur DEZOMBE	Ophtalmologie
Docteur Oumar BORE	Ophtalmologie
Docteur Aboubacrine A. MAIGA	Santé Publique
Docteur Dababou SIMPARA	Chirurgie
Docteur Mahamane TRAORE	Chirurgie
Docteur Mohamed Ag BENDECH	Santé Publique
Docteur Mamadou MAIGA	Dermatologie

PROFESSEURS MISSIONNAIRES

Professeur Philippe VERIN	C.E.S. Ophtalmologie
Professeur E.A. YAPO (AUPELF)	Biochimie
Professeur Babacar FAYE (AUPELF)	Pharmacodynamie
Professeur FOURASTE	Matière médicale
Professeur Léopold TCHAKPE	Galénique

PERSONNELS RESSOURCES

Docteur Madani TOURE	H.G.T.
Docteur Tahirou BA	H.G.T.
Docteur Amadou MARIKO	H.G.T.
Docteur Badi KEITA	H.P.G.
Docteur Antoine Niantao	H.G.T.
Docteur Kassim SANOGO	H.G.T.
Docteur Yéya I. MAIGA	I.N.R.S.P.
Docteur Chompéré KONE	I.N.R.S.P.
Docteur Adama S. SANOGO	I.N.R.S.P.
Docteur BA Marie P. DIALLO	I.N.R.S.P.
Docteur Almahdy DICKO	P.M.I. Sogoninko
Docteur Mohamed TRAORE	KATI
Docteur Arkia DIALLO	P.M.I. CENTRALE
Docteur Reznikoff	I.O.T.A.
Docteur TRAORE J. THOMAS	I.O.T.A.
Docteur Pierre BOBIN	MARCHOUX
Docteur Alain DELAYE	H.P.G.

DEDICACES

Cette thèse est dédiée :

- A toutes les victimes de la méningite

A tous ceux qui oeuvrent dans le but de résoudre le majeur problème de santé publique que représente cette maladie dans les pays en voie de développement comme le Mali.

- A ma tante feu Djénèba SIDIBE

Vous m'avez guidé dès mes premiers pas dans le sens de la réussite basée sur les principes fondamentaux de notre société : "courage, détermination dans le travail et respect de la parole donnée".

J'aurais bien voulu partager avec vous ce moment solennel de ma vie mais le "suprême" vous a précocement rappelé.

Qu'il vous accorde le paradis éternel.

- A mon Père et à ma Mère

Pour votre profond amour, vos prières, vos encouragements et tous les sacrifices consentis. Puisse nous vous procurer les plus grandes satisfactions.

Trouvez-ici ces remarques de respect, d'obéissance, d'amour de votre fille.

- A mes Frères et Soeurs

Puisse se réserver d'avantage les sentiments fraternels que nous nous portons.

Ne me considérez pas comme un exemple, mais plutôt une étape à transcender.

- A ma Tante feu Kadia SIDIBE

Que ton âme repose en paix.

- A mes Oncles

Feu Bourama SIDIBE, que la terre lui soit légère

Nouhoun SIDIBE

Mountaga COULIBALY

Toute ma gratitude.

- A Mes Tantes

Atou NIARE
Ami NIARE
Fily NIARE
Batourou NIARE

Je vous dois la réussite de ce travail. Vos aides morales et matérielles ne m'ont jamais fait défaut durant mes études.
Trouvez ici toutes mes profondes reconnaissances.

- A Madame DIAKITE Awa SIDIBE
A Madame CAMARA Salimata COULIBALY
A Madame SAMAKE Fily CAMARA

Pour tout ce que vous avez consenti pour moi
Sincères remerciements.

- A mon Fiancé Youchaou TRAORE

Votre patience est non seulement exemplaire mais aussi salutaire. Peu d'hommes pourraient endurer de telles situations.
Vos remarques pertinentes m'ont toujours servi dans mes actes quotidiens.
Votre conseil et votre participation morale et matérielle ont conduit à l'élaboration de ce présent travail.
Sois assuré de ma profonde reconnaissance.

- A ma fille Mariam TRAORE dite "Barô"

L'élaboration de ce travail t'a souvent privé de mon affection.
Garante de ton développement physique et morale ton sourire sera la source de ma joie et mon futur qui ne sera jamais sans toi.

- A toutes mes amies

- . Haba TRAORE
- . Alimatou DIALLO
- . Mme COULIBALY Sira SIMAGA
- . Fatoumata Zan TRAORE
- . Mme KEITA Oumou TOUNKARA
- . Niakalé TRAORE

Pour tout l'intérêt que je porte à l'amitié sincère

- A mon camarade de classe Docteur Ousmane TOURE dit "Euzo"

Pour la bonne collaboration qui a toujours existée entre nous.

- A mon Docteur, Fatoumata Sambou DIABATE

Votre bonté et votre sens de l'éthique médicale
me serviront toujours de modèle dans l'exercice
de mes fonctions.

Trouvez ici l'expression de ma singulière
reconnaissance.

- A toute la promotion 1984-1990.

Courage et bonne chance dans la vie.

- A tous les étudiants de l'E.N.M.P., courage

"Que ceux que je n'ai pu citer dans ces espèces
étroites veuillent bien me pardonner".

REMERCIEMENTS

Tous nos remerciements vont :

- Au corps professoral de l'E.N.M.P.
Pour la qualité de l'enseignement dispensé et sa disponibilité entière. Nous disons merci.
- A tout le personnel de l'E.N.M.P., particulièrement à la Comptable Ramata CAMARA.
- A tout le Personnel de l'I.N.R.S.P.
- A tout le Personnel du Service de Bactériologie de l'INRSP pour l'accueil fraternel qui nous a été réservé.
- A Mr. Mahamoud CISSE, Assistant au "Projet Méningite" à l'INRSP.
Votre collaboration a été déterminante dans l'élaboration de ce travail. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.
- A Mr. Achtman Mark et à Melle Monica Bopp pour votre profonde disponibilité à participer dans l'élaboration de ce travail.
Soyez assurés de l'expression de notre profonde gratitude.
- A tout le Personnel du Service de Pédiatrie de l'Hôpital Gabriel TOURE.
- A tout le Personnel du "Lazaret des Roches", particulièrement à Mr. Karim KAMARA, votre collaboration a été totale.
- A mon compagne de travail, Amadou Diadié TRAORE
Votre collaboration a été déterminante et totale.
- A tous mes camarades de classes, en souvenir du temps passé.
- A Bintou DIARRA (Secrétaire à l'ENI)
Pour avoir eu la gentillesse de mettre en forme ce document.
Toutes mes profondes reconnaissances.
- Enfin, à tous ceux qui ont contribué pour la réalisation de ce présent travail.

A NOS JUGES

. A notre Président du Jury :

Le Professeur Abdoulaye Ag Rhaly : Agrégé en Médecine Interne, Directeur Général de l'INRSP,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations.

Soyez assuré de nos sentiments les plus distingués.

. Au Professeur Mamadou Marouf KEITA : Agrégé - Chef de Clinique en Pédiatrie,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant avec enthousiasme de siéger à notre jury de thèse malgré vos nombreuses préoccupations.

Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

. Au Professeur Gaoussou KANOUTE : Agrégé en Chimie Analytique Chef de D.E.R. de Chimie Analytique -

Nous avons pu apprécier vos qualités d'hommes, votre simplicité et votre amabilité qui ont suscité notre admiration.

Soyez assuré de notre reconnaissance pour avoir accepté d'être parmi nos juges.

A NOTRE DIRECTEUR DE THESE

. Professeur Bréhima KOUMARE : Agrégé en microbiologie, Chef de Service de la Bactériologie à l'INRSP - Directeur Général Adjoint de l'INRSP -

Vous avez guidé ce travail avec le maximum de rigueur scientifique.

Vos qualités scientifiques, votre rigueur dans le travail et votre contact facile nous ont permis de découvrir et d'aimer la biologie.

Soyez assuré de notre profonde gratitude.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABREVIATIONS

APS	:	Ammonium Persulphate
AB	:	Antibiotique
CPS	:	Capsular Polysaccharid
cm	:	Centimètre
CMI	:	Concentration Minimale Inhibitrice
E.N.M.P.	:	Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie
E.coli	:	Escherichia coli
Déc.	:	Décembre
Janv.	:	Janvier
Fév.	:	Février
Juil.	:	Juillet
Sept.	:	Septembre
Oct.	:	Octobre
Nov.	:	Novembre
g	:	Gramme
g/l	:	Gramme par litre
g/j	:	Gramme par jour
H.G.T.	:	Hôpital Gabriel TOURE
W.Kati	:	Hôpital de Kati
Hi	:	Haemophilus influenzaeb
I.N.R.S.P.	:	Institut National de Recherche en Santé Publique
IM	:	Intramusculaire
IV	:	Intraveineuse
Kg	:	Kilogramme
KD	:	Kilo Dalton
LCR	:	Liquide Céphalorachidien
LPS	:	Lipo polysaccharide
LOS	:	Ligo oli gosa saccharide
Mn	:	Neisseria meningitidis
MnA	:	Neisseria meningitidis A
MnC	:	Neisseria meningitidis C
MnX	:	Neisseria meningitidis X
mm	:	Millimètre
mm ³	:	Millimètre cube
mmoles	:	Millimoles
ul	:	Micro litre
mg	:	Milligramme
ml	:	Millilitre
mA	:	Milliampère
n°	:	Numéro
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
Pn	:	Pneumocoque (Streptococcus pneumoniae)
PBS	:	Phosphate Buffer Solution
q.s.p.	:	Quantité suffisante pour
S.D.S.	:	Sodium Dodecyl sulphate
SDS-Page	:	Sodium Dodecyl sulphate - Polyacrylamid gel electrophoresis
S	:	Sensible

R : Résistant
% : Pourcentage
UI : Unité internationale
P1.2 : Variant 2 de la protéine de classe 1
P1.7 : Variant 7 de la protéine de classe 1
P1.Y : Variant Y de la protéine de classe 1
T2a : Anticorps monoclonal de sérotypage
MB : Milian Blake (anticorps monoclonal dirigé
contre les protéines de classe 5).

SOMMAIRE

I. <u>INTRODUCTION</u>	1
II. <u>MENINGITE CEREBROSPINALE : GENERALITES</u>	3
II.1. Définition.....	
II.2. Historique.....	
II.3. Différents faciès épidémiologiques de la méningite cérébrospinale dans le monde.....	4
II.4. Différents clones.....	
II.5. Facteurs épidémiologiques et fréquence du méningocoque en Afrique.....	5
II.5.1. Influence de l'âge.....	6
II.5.2. Influence du sexe.....	
II.5.3. Climat et situation géographique.....	
II.5.4. Saison.....	7
II.6. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES.....	8
II.6.1. Habitat.....	
II.6.2. Morphologie.....	
II.6.3. Caractères culturels.....	
II.6.4. Biochimie.....	
II.7. CARACTERES ANTIGENIQUES.....	9
II.7.1. Structure du méningocoque.....	
a)- Capsule et CPS (Polysaccharides capsulaires).....	10
b)- Pili.....	
c)- Proteines de la membrane externe..	
d)- Lipopolysaccharides (LPS).....	11
II.7.2. Les Sérogroupes.....	12
II.7.3. Le Sérotypage.....	
II.7.4. Le Séro sous typage.....	
II.7.5. Le Clonage.....	13
II.7.6. Intérêt vaccinal.....	
II.8. Sensibilité aux antibiotiques.....	14
III. <u>DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE</u>	
<u>LE LIQUIDE CEPHALORACHIDIEN</u>	
1. Prélèvement	
1.1. Examen macroscopique.....	15
1.1.1. Aspect.....	
1.1.2. Chimie.....	
1.2. Cytologie	16

1.3. Bactériologie classique.....	
1.3.1. Examen direct.....	
1.3.2. Culture.....	17
1.3.3. Antibiogramme.....	
1.3.4. Conservation des souches.....	
1.4. Technique immunologique moderne.....	18
1.4.1. Agglutination au latex.....	
IV/ <u>TRAITEMENT</u>	19

PARTIE EXPERIMENTALE

Etude des méningites purulentes diagnostiquées de 1989 A 1990 dans le Laboratoire de Bactériologie A l'INRSP

I- <u>Sujets étudiés et Méthodes</u>	20
A/- <u>Sujets étudiés</u>	
B/- <u>Méthodes</u>	
B.1. <u>L'extraction des membranes externes des méningocoques (MnA et MnC)</u>	21
B.1.1. Réisolement des souches et culture.....	
B.1.2. Sonication.....	22
B.2. <u>Préparation des tampons des échantillons</u>	23
B.3. <u>Préparation de gels pour Electrophorèse</u>	
B.3.1. Appareillage.....	
B.3.2. Technique.....	
B.3.2.1. Le "Running gel".....	24
B.3.2.2. Le "Stacking gel".....	25
B.4. <u>Technique du SDS Page</u>	26
B.4.1. Définition.....	
B.4.2. Formule du gel de Polyacrylamide.....	27
B.4.3. Principe.....	
B.4.4. Mode opératoire.....	28
B.5. <u>Technique du Western-Blot</u>	29
B.6. <u>Technique de l'Elisa</u>	32
B.7. <u>Prélèvement: de sang</u>	35

II- RESULTATS

II.1. <u>Nombre de prélèvements</u>	36
II.1.1. Provenance des prélèvements de LCR	
II.1.2. Répartition en fonction de l'aspect du LCR...	
II.1.3. Répartition des LCR en fonction de la période de prélèvements.....	37
II.1.4. Répartition selon la tranche d'âge et le sexe	38
II.2. <u>Germes</u>	
II.2.1. Répartition des LCR positifs en fonction des germes en cause.....	39
II.2.2. Répartition des LCR positifs en fonction de leur provenance et du germe.....	40
II.2.3. Répartition des LCR positifs en fonction de leur aspect et du germe.....	
II.2.4. Répartition des LCR positifs en fonction de la période et des germes isolés.....	42
II.2.5. Répartition des LCR positifs en fonction de la tranche d'âge et des germes isolés.....	46
II.2.6. Répartition des LCR positifs en fonction du sexe et des germes en cause.....	49
II.3. <u>Niveaux de sensibilité et de résistance des souches testées aux antibiotiques</u>	51
II.4. <u>Résultats des techniques du SDS-Page et du Western Blot</u>	53
II.4.1. SDS-Page.....	
II.4.2. Western Blot.....	60
III/- DISCUSSION	
III.1. Positivité en fonction de l'aspect du LCR.....	61
III.2. Répartition des LCR positifs en fonction du Mois....	
III.3. Fréquence du germe isolé.....	
III.4. Répartition selon l'âge.....	62
III.5. Répartition selon le sexe.....	
III.6. Sensibilité aux antibiotiques.....	63
III.7. Commentaire de la technique du SDS-Page.....	64
III.8. Commentaire du Western Blot	
IV CONCLUSION	65

**INTRODUCTION ET PARTIE
THEORIQUE**

La méningite cérébrospinale est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Son incidence est plus élevée dans les pays en voie de développement : 10 à 20/10 000 habitants (3).

Les pays de la "ceinture de la méningite de l'Afrique" définie par Lapeyssonnie connaissent des épidémies de méningite tous les 10 à 15 ans.

Ces pays sont : le Bénin, le Burkina-Faso, l'Ethiopie, la Gambie, le Ghana, le Mali, le Niger, le Nigéria, la République Centrafricaine, le Sénégal, le Soudan, le Tchad et le Togo.

En période d'épidémie de méningite, la morbidité est souvent très élevée dans certains de ces pays. Le Mali par exemple a connu en 1969 une sévère épidémie de méningite avec une morbidité de 218/100 000 habitants contre 20/100 000 habitants en 1968 (33).

Cette épidémie a atteint la moitié du pays notamment les régions de Bamako, Sébou et Kayes.

Une nouvelle flambée a eu lieu en 1981 faisant 4601 cas et 498 décès (50).

Des poussées ont eu lieu au Burkina Faso en 1970-1972 et en 1982-1983.

L'agent responsable de l'épidémie de la méningite est le méningocoque de séro-groupe A. Mais ces dernières années nous avons noté une prédominance de méningocoque de séro-groupe C au cours de certaines épidémies notamment l'épidémie de Kolokani en 1990 et de Dalakana en 1991.

En dehors des périodes épidémiques, les cas de méningites purulentes sont dûs en plus du Neisseria meningitidis, à deux autres germes qui sont :

- Haemophilus influenzae
- Streptococcus pneumoniae

Ces deux derniers germes sont actuellement plus fréquents que Neisseria meningitidis.

S'il existe de vaccins efficaces contre les méningocoques (A et C), la prophylaxie par la vaccination contre l'Haemophilus influenzae et le Streptococcus pneumoniae pose actuellement des difficultés.

Les vaccins anti-méningococciques modernes (polyosides capsulaires purifiés de méningocoque A et C) ont déjà fait la preuve de leur efficacité et de leur innocuité en Afrique et en Amérique Latine :

- premier succès en Afrique en 1970
- première campagne de vaccination de masse au Brésil en 1974.

Mais ces vaccins confèrent une immunité de courte durée ne dépassant pas 3 à 5 ans. C'est ainsi que de nombreuses équipes de Chercheurs essayent de mettre au point un vaccin de deuxième génération susceptible d'immuniser pendant une plus longue période les populations.

De tel vaccin devrait contenir en plus du polysaccharide capsulaire des protéines de la membrane externe du méningocoque. Or, ces protéines de la membrane externe sont le plus souvent variables entre les souches et à l'intérieur d'un même sérotype.

L'astuce consiste à identifier les protéines les moins variables et les proposer comme vaccin si elles sont suffisamment immunogènes et si les anticorps élaborés sont protecteurs.

Trois techniques sont utilisées pour l'étude des protéines de la membrane externe du méningocoque. Ce sont :

- la technique ELISA
- l'Analyse clonale
- le SDS - Page et le Western BLOT.

Ces techniques de biologie moléculaire ont montré que les épidémies survenues en 1981-1984 dans certains pays de l'Afrique de l'Ouest (Burkina Faso, Mali, Sénégal et Gambie) étaient dues au clone IV.1 du sérotype A contenant toujours la protéine de membrane externe P1.7 (2).

Les souches isolées en périodes non épidémiques en 1963 et en 1987 dans différents pays africains (Tchad, Niger, Cameroun, Ghana, Burkina Faso, Gambie et Soudan) appartenaient au même clone.

Par contre les nouvelles épidémies survenues en 1988 au Tchad, au Soudan, en Ethiopie, et en 1989 au Kenya étaient dues à un autre clone appelé clone III.1. contenant la protéine P1.9,X. Cette souche a été aussi identifiée à la Mecque en 1987 chez les Pèlerins et dans leurs pays de retour en Egypte, en France, en Angleterre et aux Etats-Unis.

Cette même souche a été retrouvée en Gambie en 1989 mais n'a pas provoqué d'épidémie (12).

Ce travail a pour but :

- d'isoler et d'identifier les souches de méningocoques à partir des liquides céphalorachidiens collectés et des prélèvements de gorge ;

- déterminer la sensibilité de ces souches aux antibiotiques ;

- d'identifier les différentes classes de protéines de la membrane externe du méningocoque par les techniques de SDS-Page, Elisa et Western Blot.

II.- MENINGITE CEREBROSPINALE : GENERALITES

II.1. Définition :

La méningite cérébrospinale est une inflammation des méninges et des espaces sous-arachnoïdiens par des bactéries pyogènes. Cette inflammation, quel que soit la nature du microbre ou du virus qui la provoque se traduit par des modifications du liquide céphaloradridien.

II.2. Historique

La méningite cérébrospinale fut décrite pour la première fois, avec précision en 1836, à l'occasion de l'épidémie qui avait frappé une garnison de Basses-Pyrénées en France et avait gagné, lors des déplacements de cette garnison toutes les villes traversées (50).

- En 1887, Weichselbaun découvre un diplocoque en grain de café, Gram négatif dans le LCR de sujets atteints de méningite.

- En 1903, Weichselbaun, Albrecht et Ghon arrivent à établir avec certitude que le méningocoque est l'agent responsable de la méningite cérébrospinale.

- En 1908, Flexner et Dopter préparent un sérum antiméningococcique. La sérothérapie polyvalente fit abaisser le taux de mortalité. Mais après quelques années les échecs de cette thérapeutique furent de plus en plus fréquents.

- En 1933, Domagk découvre la sulfamido-chrysoïdine vendue en France sous le nom de Rubiazol ou de Prontosil.

- En 1940, la Pénicilline découverte par Fleming est employée à Oxford par Florey, Chain et collaborateurs contre les méningococcies. Son utilisation a amélioré le pronostic des formes sévères.

- Dès 1949, le Chloramphénicol s'est révélé comme un des antibiotiques les plus actifs.

- Les vaccins polysaccharidiques mono ou polyvalents ont permis durant la dernière décennie de diminuer la mortalité due à l'infection méningococcique.

II.3. Différents Faciès épidémiologiques de la méningite cérébrospinale dans le monde :

La méningite à Méningocoque, affection cosmopolite, revêt plusieurs aspects :

- Dans les pays tempérés, elle sévit à l'état endémo-sporadique souvent dans les collectivités, en Hiver et au printemps.

- On observe au contraire dans les zones tropicales des épidémies massives, périodiques, survenant en saison sèche.

Chaque année en Avril-Mai, cette zone appelée par Lapeyssonnie "Ceinture de la méningite de l'Afrique" est le siège d'une vague épidémique se déplaçant d'Est en Ouest, du Soudan vers le Sénégal où elle s'épuise.

La ceinture de la méningite est comprise entre les isohyètes 300 mm au nord et 1100 mm au Sud.

Cette zone intéresse une douzaine de Pays, son Centre Géographique est le Tchad et son Centre Epidémiogène est le Soudan.

Ces pays sont : le Bénin, le Burkina Faso (20.000 en 1970), la Gambie, le Niger, le Nigéria, le Mali (1160 cas en 1969), le Sénégal, le Soudan, le Tchad, la République Centrafricaine, le Togo et l'Ethiopie.

Dans ces pays où il existe un fond endémique permanent élevé avec une incidence moyenne annuelle de 25 cas par 100.000 habitants, surviennent des poussées épidémiques d'une périodicité de 8 à 15 ans environ (28).

II.4. Différents clônes

Les Méningocques isolés dans les pays de la "ceinture méningitidique de l'Afrique" au début de l'année 1980 étaient de clône IV.1.

Ces bactéries de clone IV.1. ont été isolées pour la première fois en 1937 aux Etats-Unis au cours d'épidémies de méningite.

Entre 1967 et 1969, dans les pays d'Afrique du Nord, en Grèce et en Iran les épidémies de méningite provoquées par le Méningocoque de Séro groupe A était de clone I.1. Ce même clone a été responsable de flambées épidémiques chez les Indiens d'Amérique du Nord (Manitoba-Canada) et dans le Nord-Ouest pacifique des Etats-Unis (6).

En début des années 1970, au Brésil les méningocoques de séro groupe C ont été responsables d'une épidémie au cours de laquelle des souches de clones I-1 ont été identifiées (1).

De 1969 à 1972 le clone III.1 a été responsable de méningite dans le Nord de la Norvège et a provoqué une épidémie en Finlande et au Brésil. En ce moment ce clone résidait en Suède et a été retrouvé en URSS et en Roumanie en 1970 (1).

Il faudrait noter également que pendant les périodes endémiques, le méningocoque ne semble pas être le seul agent en cause ; en effet il est associé à Streptococcus pneumoniae et Haemophilus influenzae.

Mais l'agent pathogène épidémiogène est le méningocoque du séro groupe A. Les deux autres espèces de Méningocoques ne provoquent pas d'épidémies importantes. Cependant au cours des années 1970, plusieurs poussées de méningites cérébrospinales dues au méningocoque du séro groupe C ont été signalées au Nigéria Septentrional en 1975, au Burkina Faso en 1979 (51) et au Mali en 1990 et en 1991.

Dans les pays européens comme la France et la Belgique le méningocoque du groupe B est prédominant. Les Pays-bas et l'Ecosse ont signalé une fréquence d'isolement accrue des méningocoques de groupe W135 surtout chez les personnes âgées.

Trois nouveaux groupes ont été décrits en Chine (H, I, K) et un au Canada (L) (51).

II.5. Facteurs épidémiologiques et Fréquence du Méningocoque en Afrique :

Les facteurs intervenant dans l'évolution de la méningite sont l'âge, le sexe, la saison et la situation géographique.

Nous étudierons la fréquence de Neisseria meningitidis en fonction de ces différents facteurs épidémiologiques.

II.5.1. Influence de l'âge

Neisseria meningitidis affecte les sujets de tous les âges aussi bien l'enfant, l'adolescent que l'adulte.

II.5.2. Influence du sexe :

L'incidence de la méningite cérébrospinale est la même dans les deux sexes (48).

D'après nos études effectuées au Laboratoire de l'INRSP, il n'y a pas eu de différence significative entre les patients de sexe féminin et de sexe masculin ($X^2 = 0,69$).

II.5.3. Climat et situation géographique

La méningite cérébrospinale sévit dans la zone Soudano-Sahélienne pendant la saison sèche.

La fréquence du méningocoque varie suivant les lieux et les périodes (épidémiques ou interépidémiques).

La tableau n°1 donne les résultats obtenus dans certains pays d'Afrique situés ou non dans la "ceinture méningitique".

Tableau 1 : Répartition de *Neisseria meningitidis* dans divers pays d'Afrique (46)

Auteurs - Pays	Années	Pourcentage par rapport à Hi et au Pn
Hassan (Egypte)	1961-1966	71,5
Sirol (Tchad)	1970-1973	81
Perreve (Burkina Faso)	1970-1973	63,3
Rey (Sénégal)	1965-1970	35
Oranga (Zaire)	1958-1977	1,6
Thomson (Nigeria)	1970	8
Edoh (Côte d'Ivoire)	1955-1965	7,27
Jones (Afrique du Sud)	1955-1965	30,03
Sokona H. (Mali)	1988	24,29

L'Egypte et l'Afrique du Sud, Pays situés hors de la "ceinture méningitique", présentent néanmoins une fréquence assez élevée.

II.5.4. Saison

Dans les régions tempérées, les épidémies sévissent pendant l'hiver et le printemps.

Dans les régions tropicales, les réveils épidémiques ont eu lieu en Novembre, Décembre lorsque débute la saison froide.

L'épidémie progresse en Janvier, Février pour aboutir à un pic en Mars avant de décroître en Juin avec le retour de la saison de pluies. Ces variations mensuelles suivent un cycle régulier propre à chaque pays.

II.6. Caractères Bactériologiques

Neisseria meningitidis a été décrit en 1887 par Weichselbaun dans le LCR des sujets atteints de méningite aigue sous le nom de diplokokus intracellularis meningitidis (27).

II.6.1. Habitat (56) :

C'est un germe strictement humain, commensal des muqueuses du rhinopharynx. On le trouve chez le porteur sain et le malade.

II.6.2. Morphologie

Neisseria meningitidis a la forme d'un diplocoque Gram négatif asymétrique en grain de café. Les 2 coques adjacents par leur face aplatie mesurent chacun 0,5 à 1 micron de diamètre.

II.6.3. Caractères culturaux (56) :

C'est un germe exigeant, nécessitant pour sa culture des milieux enrichis.

La culture se fait sur gélose au sang cuit avec VCN (Vancomycine-Colistine-Nystatine) ou sur gélose columbia (GC medium base) enrichi et dans une atmosphère enrichie à 10 % de CO₂.

La température optimum est de 36° et le pH optimum est 7. Il est aérobic strict.

En 24 heures, à 36-37° les colonies apparaissant sont petites, rondes, bombées, lisses et transparentes.

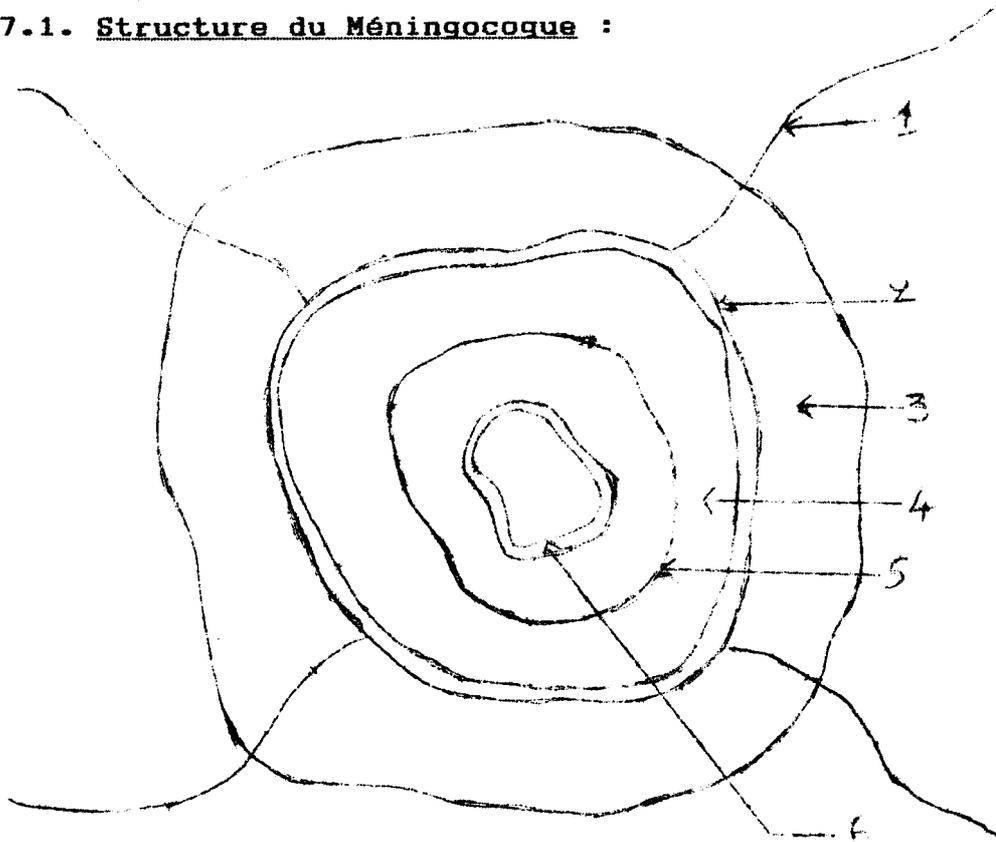
II.6.4. Caractères biochimiques :

Neisseria meningitidis possède une oxydase et une catalase. Il attaque par voie oxydative le glucose et le maltose. Il réduit parfois les nitrites mais pas les nitrates.

II.7. Caractères antigéniques

L'étude des caractères antigéniques a un intérêt certain non seulement pour le diagnostic rapide et simple de l'infection, mais aussi pour l'obtention de bons vaccins.

II.7.1. Structure du Méningocoque :



Légende :

1. Pili
2. Membrane externe
3. Capsule
4. Espace périplasmique
5. Mureine
6. Membrane cytoplasmique.

Neisseria meningitidis possède une enveloppe cellulaire typique des GRAM négatifs, qui consiste en :

- une membrane cytoplasmique
- une couche de peptidoglycane (Mureïne)
- une membrane externe contenant des lipopolysaccharides (LPS) et des protéines.

Plusieurs méningocoques portent une capsule polysaccharidique (CPS) et des pili.

Nous distinguons alors deux composantes antigéniques chez le méningocoque :

- les composantes antigéniques de surface : la capsule et les pili ;

- les composantes antigéniques non capsulaires : les protéines de la membrane externe, les LPS et les LOS (Lipooligosaccharides).

a)- La Capsule (6) :

La capsule consiste en des polysaccharides anioniques de grande masse moléculaire et est retrouvée dans les souches isolées à partir du LCR des patients atteints de méningite cérébrospinale.

Les souches dépourvues de capsule provoquent rarement la maladie. Les CPS (Polysaccharides capsulaires) sont à la base de la classification de Neisseria meningitidis en sérogroupes.

b)- Pili (6) :

Les pili sont des polymères filamenteux apparaissant à la surface du méningocoque. L'infection par les méningocoques est initiée par l'adhésion du microorganisme aux récepteurs de la cellule hôte. Cette adhésion est effectuée par les pili. Ces pili sont constitués d'une répétition de sous-unités protéiques appelée piline.

La masse moléculaire apparente varie de 17.000 à 20.600 kd (Kd = kilo dalton).

c)- Les protéines de la membrane externe :

La membrane externe des méningocoques contient 2 à 5 protéines principales quand les souches ont été examinées par le SDS-Page.

Toutes les souches de méningocoques ont soit la protéine de membrane externe de classe 2 ou 3.

Les protéines de classe 2 ou 3 ont une région hydrophile variable qui est probablement exposée et qui est responsable de la spécificité du sérotype observé.

Les protéines de classe 1 induit des anticorps bactéricides spécifiques de type. Ce qui explique la grande immunogénicité de cette protéine. Cette protéine se retrouve chez tous les sérogroupes mais présente une variabilité quantitative dans son expression.

La protéine de classe 5 montre une hétérogénéité entre les souches et à l'intérieur des souches ; cette variabilité n'est pas seulement quantitative mais qualitative. Ces protéines sont hautement immunogènes et peuvent induire la production d'anticorps bactéricides.

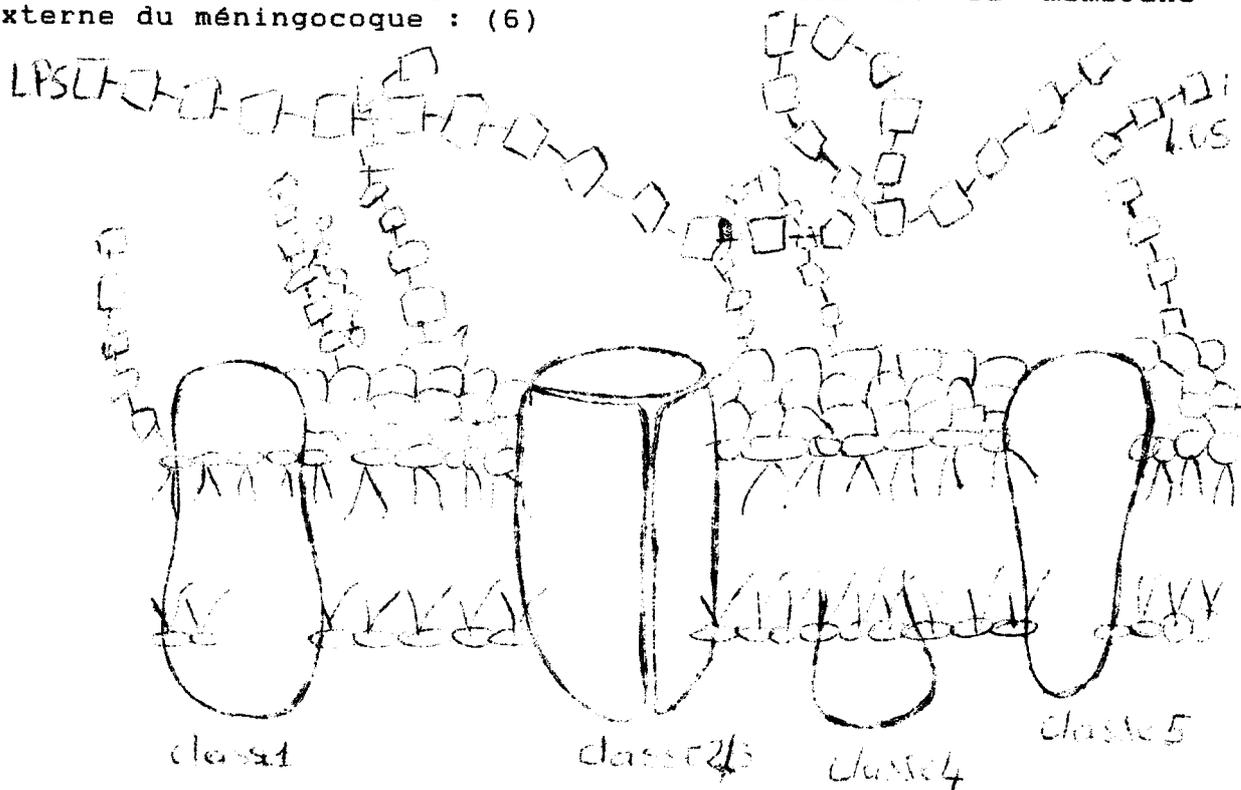
Les protéines de classe 4 sont présentes dans certaines souches en association avec les protéines de classe 2 ou 3.

Les protéines de classe 6 sont très rares, et sont rencontrées uniquement chez certains méningocoques de sérogroupe A.

d)- Les lipopolysaccharides (LPS)

Les LPS des méningocoques sont retrouvés au niveau de la membrane externe et sont formés d'un lipide A et d'une fraction polysidique. Les LPS définissent des sérotypes.

Figure N°1:
Représentation schématique de la structure de la membrane externe du méningocoque : (6)



Légende :

- LPS : Lipo polysaccharides
- LOS : Lipo oligosacchacides
- Classe 1 : Protéine de classe 1
- Classe 2/3 : Protéine de classe 2 ou 3
- Classe 4 : Protéine de classe 4
- Classe 5 : Protéine de classe 5

II.7.2. Les Sérogroupes (38) :

Les polysides capsulaires, du fait de leurs structures biochimiques différentes et de leur pouvoir antigénique, ont permis de définir grâce aux antisérums correspondants 13 sérogroupes de méningocoques désignés par des lettres majuscules dont 9 anciennement connus : A, B, C, D, X, Y, Z, 29E, W135 et 4 récemment définis H, I, K en chine et L au Canada.

Les 9 sérogroupes classiques (A à W135) peuvent être tous à l'origine de 50 % des affections, les autres sont de simples hôtes du rhinopharynx.

Ces antigènes sont solubles et peuvent être mis en évidence dans les produits pathologiques par simple agglutination au latex.

Le méningocoque présente des communautés autigéniques non seulement entre groupe mais aussi avec d'autres espèces.

Ainsi l'acide gamma 2,9 N-acétyl neuraminique constitue l'antigène du groupe C, mais il est associé à l'acide gamma 2,8 N-acétyl neuraminique pour donner un hétéropolymère d'*Escherichia coli* K92 (50).

II.7.3. Le Sérotypage (18) :

Le typage de *Neisseria meningitidis* est basé d'une part sur la détection immunologique des antigènes spécifiques des protéines de membrane externe et, d'autre part par les LPS. L'application récente de la technologie des anticorps monoclonaux sur ces antigènes a contribué largement aux études épidémiologiques.

En fait le sérotypage est axé essentiellement sur la recherche des protéines de classe 2 ou 3 qui s'excluent mutuellement.

Toutes les bactéries de séro groupe A retrouvées jusqu'à présent ont la protéine de classe 3 tandis que celles du groupe C ont la protéine de classe 2.

Actuellement les sérotypages se font par la technique ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbed Assay) et les anticorps monoclonaux.

II.7.4. Le Séro sous typage (18) :

Epidémiologiquement, la surveillance des protéines de classe 1 est plus utile que celle des protéines de classe 2 ou 3, du fait de l'hétérogénéité des protéines de classe 1.

Les anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines de classe 1 ont une activité bactéricidique plus élevée comparativement aux anticorps dirigés contre les protéines de classe 2 ou 3.

Actuellement il existe 7 variantes électrophorétiques des protéines de classe 1 réparties en 5 variantes sérologiques qui sont : 2, 6, 7, 9 et 10.

- Le P1.2 possède une seule variante électrophorétique
- Le P1.6 : une seule variante électrophorétique
- Le P1.7 : deux variantes "-"
- Le P1.9 : deux variantes "-"
- Le P1.10 : une variante "-"

Variants électrophorétiques :	1	2	3	4	5	6	7
	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Variants sérologiques :	10	7	6	9	2	7	9

II.7.5. Le clonage (2) :

L'analyse clonale est basée sur la variation électrophorétique des isoenzymes cytoplasmiques regroupant ainsi les méningocoques en différents clones.

Par définition un clone est constitué d'un ensemble de bactéries dont les isoenzymes étudiés ont les mêmes types électrophorétiques (ETS).

II.7.6. Intérêt vaccinal : (56)

Les vaccins polysaccharidiques jouent un rôle important dans la lutte contre les méningites purulentes. Ils sont préparés sous forme d'antigènes monovalents et bivalents.

Les premières vaccinations ont eu lieu en 1968.

- En 1970 : premiers succès en Afrique.
- En 1974 : première campagne de vaccination de masse au Brésil (A + C).

Les vaccins monovalents A et C, bivalents A + C sont utilisés aux USA. Suivant chaque zone géographique, est employé le vaccin polysaccharide A, C ou A + C.

C est commercialisé aux USA depuis 1974.

A est autorisé en France en Juillet 1974 et préparé par l'Institut Mérieux, puis distribué au Nigéria, au Soudan, à l'Egypte et au Brésil.

A + C est autorisé en France en janvier 1975.

II.8 Sensibilité du germe aux Antibiotiques :

Neisseria meningitidis est sensible à de nombreux antibiotiques. Dans le traitement spécifique, le produit actif in vitro doit être capable de traverser la barrière méningée et d'atteindre la CMI du germe dans le LCR.

La Pénicilline^f et le Chloramphénicol sont très actifs, comme l'Ampicilline.

La Chimio prophylaxie par le sulfamide a été abandonnée : efficacité temporaire, apparition de résistance, possibilité d'accidents iatrogènes à la suite de prises répétées (56).

L'antibioprophylaxie fait appel à plusieurs antibiotiques actifs sur le méningocoque mais c'est la Spiramycine qui se révèle le meilleur du fait de son spectre, de ses fortes concentrations amygdaliennes et salivaires, du faible nombre de souches résistantes et l'absence d'effets secondaires (24).

Enfants : Dose 50 mg/Kg/j

Adulte : Dose 2g/j pendant 5 jours.

III/- DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

Le Laboratoire joue un rôle essentiel dans le diagnostic étiologique des méningites purulentes.

L'utilisation courante des techniques rapides permet un diagnostic de présomption en un minimum de temps et avec un minimum de matériel.

Le liquide Céphalorachidien (LCR) :

III.1. Prélèvement

Le prélèvement est effectué par ponction lombaire nécessitant des précautions d'asepsie très strictes, afin d'éviter les germes de souillure. Le LCR recueilli dans un tube est rapidement transporté au Laboratoire.

L'exposition au froid, à la chaleur lors du transport est à éviter car le méningocoque y est très sensible.

Au Laboratoire, ce prélèvement sera soumis aux différents examens suivants :

III.1.1. Examen macroscopique

III.1.1.1. Aspect

Le LCR normal est limpide, incolore comme "l'eau de roche".

Le liquide pathologique peut être :

- clair au début de la maladie
- trouble ou louche
- xanthochromique
- franchement purulent
- hémorragique

Le liquide hémorragique s'observe à la suite d'une hémorragie méningée évoluant quelques temps ou au cours de certaines affections du névraxe.

L'aspect trouble est provoqué par l'hypercytose.

Dans tous les cas, on effectue une culture systématique.

III.1.1.2. Chimie du LCR :

L'examen biochimique concerne :

- protéine : hyperalbuminorachie
- glucose : hypoglycorachie
- chlorures : normales ou abaissés
- pH : diminué.

Tableau 2 : Aspect et composition du LCR chez l'Adulte (49)

LCR	Normal	Pathologique
Aspect	Limpide	Louche - trouble
Protéine g/l	0,25 ± 0,05	Augmenté
Glucose g/l	0,50 ± 0,05	Très diminué
Chlorure g/l	7,50 (NaCl)	Normal ou abaissé
Acide lactique	0,15 ± 0,8	Elévation importante
Cytologie	1 - 2 élément/mm ³	Polynucléaires ± altérés
Bactériologie	Stérile	Germes

Tableau 3 : Répartition des valeurs normales des protéines chez l'enfant (3)

Protéines totales	LCR (g/l)
Naissance	0,8 - 1,2
1 an	0,1 - 0,2
3 ans	0,15 - 0,35

III.1.2. Cytologie

III.1.2.1. Cytologie quantitative

C'est la numération des éléments à la cellule de Malassez ou de nageotte. On dénombre des éléments cellulaires présents par unité de volume, en l'occurrence dans un millimètre cube. Une augmentation des éléments cellulaires est signe d'infection.

La normale ne dépassant pas un ou deux éléments lymphocytaires par mm³ et une ou deux hématies.

III.1.2.2. Cytologie qualitative :

Elle consiste à déterminer la nature des éléments cellulaires à partir du culot de centrifugation.

Le culot recueilli est étalé sur une lame, colorée au May Grun Wald Giemsa ou au bleu de méthylène pour la formule leucocytaire.

On observe des polynucléaires plus ou moins altérés au cours des méningites purulentes.

Le liquide clair peut être composé de lymphocytes et de polynucléaires plus ou moins altérés. Ce cas est fréquent lors d'une méningite décapitée ou prise au tout début.

III.1.3. Bactériologie

III.1.3.1. Examen direct

A partir du culot de centrifugation, des frottis sont préparés, fixés et colorés au bleu de méthylène et au Gram.

L'examen direct montre :

- les diplocoques Gram négatifs en forme de grain de café, les faces en regard étant légèrement bombées, intra et extra-cellulaires et peu nombreux.

On ensemence rapidement le produit pathologique dès sa réception car les germes sont très fragiles.

III.1.3.2. La Culture :

Elle s'effectue sur les milieux enrichis : gélose au sang cuit avec ou sans VCN, gélose columbia enrichi (GC medium base). On ensemence sur ces différents milieux et on incube les boîtes à 37°C eo atmosphère enrichie à 10 % de CO₂.

Le CO₂ favorise le démarrage de la croissance et permet d'isoler les germes exigeants comme le méningocoque. Les colonies apparaissent au bout de 24 à 48 heures d'étuve à 37°C.

III.1.3.3. Antibiogramme :

Il est effectué selon la technique de Chabbert (méthodes de disques). On réalise l'antibiogramme sur gelose au sang cuit car nos germes sont exigeants.

Après une incubation de 24 heures à 37°C sous CO₂, la lecture est effectuée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des différents disques d'antibiotiques.

Le résultat est interprété à l'aide dn abaque qui permet de savoir si la souche est sensible, intermédiaire ou résistante à l'antibiotique.

Une souche est dite sensible à un produit si elle peut être atteinte par un traitement avec ce dernier à dose habituelle par voie générale.

Elle est dite intermédiaire, si elle peut être atteinte par un traitement local avec le produit concerné, ou par une concentration physiologique particulière.

La souche est dite résistante quand elle ne peut pas être atteinte par le produit quel que soit le type de traitement.

III.1.4. Conservation des souches

La conservation des souches est effectuée en fixant les bactéries sur billes stériles contenues dans un tube également stérile.

Le tout est placé au congélateur à -80°C en utilisant comme cryoprotecteur une suspension à 10% de lait écrémé stérile.

III.1.4. Technique immunologique :

La recherche par une méthode immunologique, d'antigènes solubles libérés par la bactérie dans le LCR lors de l'infection, permet un diagnostic rapide.

On utilise des particules de latex sensibilisées, par des anticorps monoclonaux de souris, qui en présence d'antigène dans le surnageant de centrifugation du liquide se fixe spécifiquement à ce dernier. Une agglutination des particules de latex est alors visible à l'oeil nu.

IV/- Traitement :

Le traitement est basé sur l'emploi d'un antibiotique diffusant bien dans les méninges, peu coûteux, peu toxique et actif sur le méningocoque.

Avec l'apparition de souches sulfamido-résistantes, le choix est donc limité aux trois antibiotiques suivants :

. Le Chloramphénicol :

Posologie : **Adultes** : 2 à 3 g/j en IM (Tifomycine) ou
en IV (Solnicol)

Enfants : 50 mg/kg/j

Avantages : Grande diffusibilité dans le LCR où l'on obtient 30 à 50 % des taux sériques. Ce qui correspond à une concentration de 3 à 5mg/l de LCR.

Inconvénients : Toxicité hématologique, antagonisme théorique avec la Pénicilline, coûte relativement moins cher. On utilise le chloramphénicol en suspension huileuse en injection intramusculaire unique. Une deuxième injection au 3ème ou au 4ème jour peut être nécessaire dans certaines formes où la réponse clinique est insuffisante. Cette forme "retard" est particulièrement adaptée aux traitements de masse.

. La Pénicilline G :

. **Posologie** : De préférence en perfusion en phase aiguë et ensuite en injection IM

- Adultes : 20 millions UI/jour en perfusion

- Enfants : 500 000 à 1 million UI/kg/j.

Avantages : Excellente tolérance, très bonne diffusibilité dans le LCR et très actif.

Inconvénients : Mauvaise diffusibilité dans le LCR sauf à la phase aigue quand les méninges sont inflammatoires ce qui oblige à administrer de fortes doses ; sa concentration est de 1UI/ml de LCR.

• **L'Ampicilline**

- **Posologie** : Adultes : 12 g/jour en perfusion de préférence pendant la phase aigue, puis per os.

Enfants : 200 mg/kg/jour.

- **Avantages** : Assez bonne diffusion dans le LCR où l'on obtient 40 % des taux sériques. La diffusion diminue au fur et à mesure que l'inflammation s'atténue. On peut utiliser l'Ampicilline seule.

- **Inconvénients** : Possibilité d'éruption cutanée, d'hypertension artérielle basse au début du traitement coût assez onéreux.

• **La Céfatoxime** : Elle est utilisé également en perfusion et est l'Antibiotique le plus actif dans le traitement de la méningite.

- **Posologie** : est utilisée en IV en raison de 50 mg/kg/j pendant 3 jours.

- **Avantages** : Excellente tolérance, très bonne diffusibilité dans le LCR et très actif.

- **Inconvénients** : Très onéreux, ce qui limite son utilisation, son rapport coût-efficacité est le plus élevé des antibiotiques utilisés.

METHODOLOGIE

**ETUDE DES MENINGITES PURULENTES DIAGNOSTIQUES DE 1989 A 1990
DANS LE LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE DE L'INRSP**

I- Sujets étudiés et Méthodes

A- Sujets étudiés :

A l'Hôpital Gabriel TOURE et au "Lazaret des Roches" les ponctions lombaires ont été effectuées chez tous les malades hospitalisés pour syndrome méningé. C'est ainsi que nous avons pu collecter 157 liquides céphalorachidiens.

Ces 157 LCR ont été analysés au Laboratoire de Bactériologie de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) de Bamako de Décembre 1989 à Décembre 1990.

A ces LCR s'ajoutent 11 autres collectés lors de l'épidémie de Kolokani en 1990; et un autre envoyé par l'Hôpital de Kati. Les patients sont âgés de 3 jours à 56 ans.

Une fiche de renseignements sur l'âge, le sexe, l'adresse, le service d'origine, la date de prélèvement, l'aspect du LCR, le germe en cause, le traitement, la date de sortie, est remplie pour chaque patient.

B- Méthodes :

Les liquides prélevés sont rapidement acheminés vers le Laboratoire de Bactériologie de l'INRSP où ils sont soumis à :

- un examen macroscopique
- une agglutination à l'aide d'immuno sérum spécifique
- un examen cytologique
- un examen bactériologique direct après coloration de Gram.

- Une culture sur gélose au sang cuit enrichie à l'extrait globulaire ou sur gélose columbia enrichi (pour les méningocoques).

Pour le pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*) le milieu utilisé est la gélose au sang cuit.

Les boîtes sont mises à incuber à 37°C en atmosphère enrichie de CO₂ (10%) pendant 24 à 48 heures.

Les souches isolées sont identifiées par la méthode classique. On teste leur sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé (Antibiogramme par la méthode des disques) selon les recommandations de l'OMS.

Les antibiotiques utilisés sont :

- la Pénicilline G (10 UI)
- l'ampicilline (10 Ug)
- le Chloramphénicol (30 Ug)
- les Sulfamides (200 ug)
- le Cotrimoxazole (S = 23,75 mcg + T=1,25 mcg)
- le Céfotaxime (30 ug)
- l'Oxacilline (1 ug).

Les souches isolées sont ensuite conservées au congélateur à -80°C :

. A partir d'une colonie suspecte isolée sur la boîte de culture, on prépare une suspension avec de l'eau physiologique (environ 1 ml) puis on effectue un réisolement en déposant 2 ou 3 gouttes de cette suspension bactérienne sur une nouvelle boîte de culture.

. L'ensemencement est effectué à l'aide d'un rateau stérile devant une flamme et sous une hotte stérile.

La boîte est ensuite placée à l'étuve à 37°C sous CO₂ (10 %) pendant 24 heures. Au bout de ce temps les colonies bactériennes ainsi apparues sont raclées à l'aide d'une lame stérile.

Puis on procède à la préparation d'une autre suspension bactérienne avec du lait écrémé stérile contenu dans un tube "ependorf" stérile.

Le tout est ensuite placé au congélateur à -80°C. Ensuite on effectue les techniques de biologie moléculaire.

B.1. L'extraction des membranes externes des méningocoques (Neisseria meningitidis A et C)

B.1.1. Réisolement des souches et culture

Préléver une micro bille congelée (sur laquelle se trouvent fixer des bactéries) et placer sur une boîte de culture.

Déposer ensuite 2 ou 3 gouttes d'eau physiologique sur la bille et procéder à l'ensemencement à l'aide d'un rateau stérile.

Placer la boîte à l'étuve à 37°C sous CO₂(10%) pendant 24 heures. Au bout de ce temps, les colonies apparues sont raclées à l'aide d'une lame stérile. Puis préparer une suspension à l'aide d'une solution de Tris (hydroxyméthyl) aminométhane 10 mmles à pH8et à raison de 700 ul par souche.

Cette solution de Tris (hydroxyméthyl) aminométhane est une solution tampon envoyée par l'Institut Max planck (Berlin). Homogénéiser les suspensions bactériennes et les placer dans un bain de glace.

B.1.2. Sonication

Elle est réalisée sous une hotte stérile grâce à un dispositif émettant des ultrasons.

Ces ultrasons vont provoquer la cassure des bactéries afin d'obtenir les membranes externes.

L'opération doit être réalisée dans des conditions stériles et sous protection (port de gants, de blouse, endroit calme et désinfection de la hotte à l'alcool), en maintenant toujours les suspensions dans le bain de glace.

Après sonication, retirer les suspensions du bain de glace et procéder aux opérations suivantes :

- centrifuger à raison de 7000 tours/minute pendant 6 minutes :
- récupérer le surnageant constitué par des membranes externes et jeter le culot qui est composé des autres parties de la bactérie et des méningocoques qui n'ont pas éclaté ;
- récentrifuger le surnageant ainsi obtenu pendant 15 minutes à raison de 14000 tours/minute ;
- jeter le nouveau surnageant obtenu et récupérer uniquement le culot contenant les membranes de méningocoques ;
- ajouter 100 ul d'eau distillée et homogénéiser à l'aide d'un agitateur manuel ;
- diluer les membranes à l'aide de deux solutions tampons à différentes concentrations :
 - . la 1ère solution appelée Lug simple ou 1 x Lug
 - . la 2ème solution appelée 2 x Lug
(ou solution de Lug simple deux fois concentrée)

(La composition et la préparation de ces solutions figurent en annexe).

Le Lug est un solvant très lourd permettant de dissoudre les protéines de la membrane externe des méningocoques. Il favorise la migration des différentes classes de protéines au moment de l'Electrophorèse tout en maintenant le pH constant.

B.2. Préparation des tampons des échantillons :

Pour chaque souche de Neisseria meningitidis (A et C) prendre :

- . 5 ul de la solution 2 x Lug puis 90 ul de la solution de Lug simple ;
- . ajouter 5 ul de la solution de membrane précédemment préparée, bien mélanger à l'aide d'un agitateur afin d'obtenir un mélange homogène ;
- . conserver le mélange obtenu au réfrigérateur à -20°C pour une utilisation ultérieure.

B.3. Préparation de gels pour Electrophorèse

B.3.1. Appareillage

Pour un gel, on se sert :

- d'une plaque d'aluminium ayant 8 cm de longueur et 10 cm de largeur ;
- de 2 espaceurs en plastique ayant chacun 0,75 mm d'épaisseur, 8 cm de long et 1 cm de large ;
- d'une plaque en verre ayant les mêmes dimensions que celles de la plaque d'aluminium.

.Placer les deux espaceurs de façon verticale au niveau des 2 bouts de la plaque d'aluminium. Puis déposer ensuite la plaque en verre ; l'ensemble donnera l'aspect d'un moule.

L'espace compris entre les deux plaques est susceptible de contenir la solution de gel.

Nous disposons aussi d'un appareil appelé "Multiple gel Caster" pouvant recevoir au maximum 5 moules (voire photo en annexe).

B.3.2. Technique

Les gels préparés sont de 2 groupes :

- les gels à 11 % d'acrylamide et à 3 molaires d'urée
- les gels à 15 % d'acrylamide mais sans urée.

Chaque gel se compose de 2 parties :

- . le "running gel" où se fait la migration des protéines ;
- . le "stacking gel" où sont déposés les échantillons

Le "running gel" est préparé en premier lieu, le "stacking gel" en second et est déposé au dessus du premier déjà polymérisé.

B.3.2.1. Le "Running gel"

Il représente les 3/4 de l'ensemble du gel.

. Composition :

- 1,5 molaire de Tris (hydroxyméthyl) aminométhane pH8,8
- solution d'acrylamide et de N, N'- Méthylène-bis acrylamide à 40 %
- SDS (Dodécyl sulfate de sodium) à 10 %
- l'urée à 3 molaires (ou sans urée pour le second groupe de gels)
- APS (persulfate d'Ammonium) à 10 %
- TEMED ou N, N, N', N'- Tétraméthylène diamine
- Eau distillée.

. Protocole de préparation (pour 5 gels)

Dans un erlenmeyer stérile mettre à tour de rôle :

- + 10ml de Tris (Hydroxyméthyl)aminométhane 1,5 M à pH8,8
- + 10,2 ml de la solution d'acrylamide et de N, N'- Méthylène bis acrylamide à 40%
- + 0,4 ml de SDS à 10%
- + 15,75 ml d'urée 3 molaires
- + 5,24 Ml d'eau distillée.

Bien mélanger et placer l'erlenmeyer dans un bain de glace. Boucher et dégager pendant 20 à 30 minutes en se servant d'une pompe appelée "Vacum pump" marque "eppendorf.

Au bout de ce temps, retirer l'erlenmeyer du bain de glace et ajouter rapidement à la solution 35 µl de Temed et 180µl d'APS à 10 % (le temed joue le rôle de catalyseur et l'APS est l'initiateur de la réaction de polymérisation).

Mélanger doucement et couler de façon rapide la solution dans le "multiple gel caster".

Vérifier ensuite que tous les gels ont les mêmes niveaux, puis ou les recouvre, avec 0,5 ml de SDS à 10 % chacun.

Laisser polymériser pendant 30 minutes environ.

. Rôle :

Le "running gel" permet la migration des protéines membranaires au moment de l'Electrophorèse.

B.3.2.2. Le "Stacking gel" :

Il représente le 1/4 de l'ensemble du gel.

. Composition :

- Solution d'acrylamide et de N, N'- Méthylène bis acrylamide à 30 %
- SDS à 10 %
- 0,25 Molaire de Tris (hydroxyméthyl) aminométane à pH6,8
- APS à 10 %
- Temed
- Eau distillée.

. Protocole de préparation

Dans un erlenmeyer stérile mettre à tour de rôle :

- + 1,66 ml de la solution d'Acrylamide et de N, N'- méthylène bis acrylamide à 30 %
- + 100 µl de SDS à 10 %
- + 5 ml de Tris (Hydroxyméthyl) aminométhane 0,25 M à pH6,8
- + 3,22 ml d'eau distillée.

Mélanger et placer la solution dans un bain de glace.

Boucher et dégager pendant 10 à 15 minutes.

Au bout de ce temps, retirer l'erlenmeyer du bain de glace et ajouter très rapidement 20 μ l de Temed et 24 μ l d'APS à 10 %.

Mélanger doucement et verser la solution au-dessus du "running gel" déjà polymérisé.

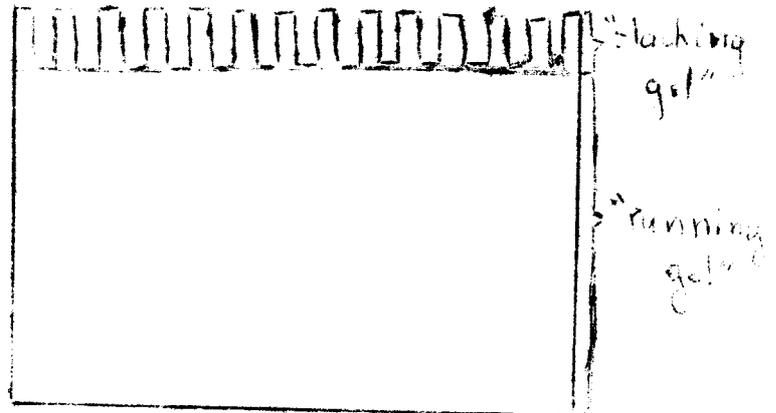
Introduire rapidement un peigne en plastique dans chaque gel afin d'obtenir des puits après polymérisation.

Laisser en contact pendant 30 à 40 minutes.

Enlever ensuite les peignes et récupérer les différents moules et les placer au réfrigérateur à +4° pour une utilisation ultérieure.

Les gels vont rester en sandwich entre les plaques d'aluminium et de verre.

Figure N°2: Représentation
schematique d'un gel



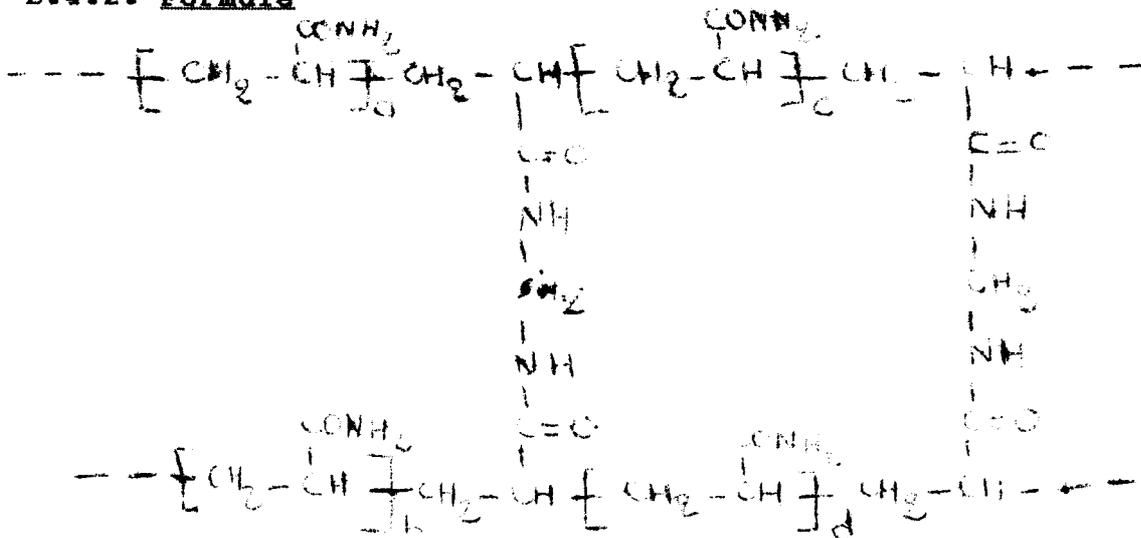
B.4. Technique du SDS-Page

B.4.1. Définition :

C'est une technique qui utilise l'électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Dodécyl sulfate de sodum).

Le gel de polyacrylamide joue le rôle de support. C'est un copolymère d'acrylamide et de N, N'- Méthylène bis acrylamide.

B.4.2. Formule



Acrylamide - N, N'- Méthylène bis-acrylamide.

En changeant le taux de pontage il est possible de modifier la réticulation donc le diamètre des pores. Dès lors le gel de polyacrylamide se comportera comme un tamis se superposant à la séparation électrophorétique.

L'électrolyte (ou solvant) utilisé est composé :

- d'une solution de Lug 5 fois concentrée
- SDS à 10 %
- eau distillée.

B.4.3. Principe

C'est une électrophorèse unidimensionnelle au cours de laquelle les protéines sont fractionnées d'abord sur la base de leurs propriétés physiques puis sur d'autres propriétés (par exemple l'isoélectricité).

Le détergent anionique (le SDS) utilisé déplie les protéines natives, se lie à elles et leur confère une charge proportionnelle à la dimension de la chaîne polypeptidique.

La séparation des protéines dénaturées par le SDS dépend uniquement de la taille moléculaire.

Exemples de différentes concentrations d'acrylamide pour des protéines de tailles différentes :

Pourcentage d'acrylamide	Taille des protéines en kilodaltons (Kd)
15 %	12 - 45
11 %	15 - 70
5 %	60 - 200

Donc, plus le pourcentage d'acrylamide diminue, plus le diamètre des pores augmente et plus la taille des protéines augmente aussi.

B.4.4. Mode opératoire :

Le SDS-Page est effectué à l'aide d'un dispositif appelé "ES 250 Mighty Small II" (voir photo en annexe).

Il s'agit d'une charpente verticale pouvant posséder de part et d'autre 2 gels sandwiches bien fixés donnant ainsi 2 chambres supérieures.

Les souches testées sont au nombre de 46 dont :

- + 41 méningocoques de sérogroupe C
- + 4 méningocoques de sérogroupe A
- + 1 souche de référence de Gambie qui est un Neisseria meningitidis A

- Remplir les 2 chambres supérieures et la partie inférieure de l'appareil avec l'électrolyte.
- Laisser en contact avec les gels pendant 1 heure environ.
- Chauffer les solutions de membranes pendant 2 minutes à 95°C sur thermostat marque "ependorf".

- Ensuite, à l'aide d'une microséringue stérile déposer 2,5 µl d'échantillons de membranes dans les différents puits.
- Fermer à l'aide d'un couvercle.
- Créer un champ électrique (Electricité : 20 mA par gel et 500 volts environ).

Relier les deux bouts de la charpente à un bain-marie refroidi à +12°C servant ainsi de réfrigérant.

- Laisser migrer les protéines pendant 1 heure.
- Ouvrir les chambres, décoller les gels et les placer dans 100 ml d'une solution de bleu de Coumassie pendant 2 heures sur agitateur.
- Décolorer ensuite les gels avec de l'acide acétique à 5 % sur agitateur au moins pendant 24 heures.

L'identification des différentes classes de protéines est effectuée après séchage des gels à l'aide d'un appareil appelé "Gel Dryer" et cela pendant 3 heures.

Cette identification des protéines dépend de la position des différentes classes de protéines et de leurs masses moléculaires exprimées en kilodaltons.

B.5. Technique du Western Blot

. Définition :

C'est une technique qui permet d'identifier les classes de protéines les plus immunogènes à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques.

Elle est réalisée directement après la migration électrophorétique mais au lieu de la coloration des gels au bleu de coumassie effectuée à la fin du SDS-Page, nous passons directement au transfert des protéines sur papier de nitro-cellulose.

. Transfert des protéines :

Nous disposons :

- d'une cellule de transfert nommée "SEMY-DRY Transfer cell".

un peu supérieures à celles du gel

- d'une solution tampon servant de réservoir d'ions dont la composition est la suivante :

- + 3 g de Tris (hydrométhyl) aminométhane
- + 14,4g de glycine
- + q.s.p. 1000 ml d'eau distillée.

- et 2 papiers buvards.

Sur la cellule de transfert, placer à tour de rôle un papier buvard, le papier de nitrocellulose, le gel et le 2^e papier buvard tous déjà trempés dans la solution tampon.

Le gel est déposé sur le papier de nitrocellulose de façon à éviter tout courant d'air, les deux (gel et papier de nitrocellulose) étant en sandwich entre les deux papiers buvards.

Fermer la cellule et créer un champ électrique.

Courant : 500 mA
Tension : 8 à 9 volts

Laisser en contact pendant 2 heures environ, temps nécessaire pour faire transférer toutes les classes de protéines sur papier de nitrocellulose.

Récupérer ensuite les papiers et procéder aux opérations suivantes :

- . Mettre les papiers dans une solution contenant :

- le PBS (Phosphate Buffer Solution) 20 fois concentré
- le Tween 20 (détergent)
- BSA (Bovin Serum Albumin) à 2 %.

Laisser en contact pendant 1 heure.

(composition du PBS, voir annexe).

Cette solution permet le blocage du papier afin d'éviter la fixation d'autres protéines et cela grâce au BSA qui se fixe sur toutes les parties du papier de nitrocellulose où il n'existe pas de protéines membranaires.

. Laver ensuite les papiers 3 fois 5 minutes sur agitateur à l'aide d'une solution de PBS 20 fois concentrée et du Tween 20.

. Mettre le 1er Anticorps qui est un anticorps de souris (Anticorps monoclonal) pendant 1 heure 30 minutes.

Cet anticorps doit être dilué au préalable dans une solution PBS 20 fois concentré + Tween 20 + BSA à 1%, et se fixe sur une classe de protéines qu'il reconnaît.

Les anticorps monoclonaux testés sont au nombre de 6 :

- Anticorps anti P1.2 dirigé contre les protéines de classe 1 et de sous type 2.
- Anticorps anti P1.7 dirigé contre les protéines de classe 1 et de sous type 7.
- Anticorps anti P1.Y
- Le Milian Blake (MB) dirigé contre les protéines de classe 5.
- Le T2a dirigé contre les protéines de classe 2 (pour les méningocoques de séro groupe C).
- L'anticorps 2b dirigé contre certaines classes de protéines des pili.

. Laver encore les papiers 3 fois 5 minutes sur agitateur à l'aide de la solution PBS 20 fois concentré et du Tween 20 permettant d'éliminer le surplus d'anticorps n'ayant pas réagi.

. Mettre le 2è Anticorps qui est une immunoglobuline de lapin dirigée contre le 1er anticorps (anticorps de souris).

Sur ce 2è anticorps se trouve fixer un enzyme (phosphatase alcaline) favorisant la réaction. Sa dilution est de 1/1000 dans la solution de PBS 20 fois concentré + Tween+BSA à 1%.

Dilution 1:1000 ----- 10 µl d'anticorps pour 10 ml de solution.

Ces proportions sont valables pour un seul papier de nitrocellulose. La réaction doit durer 1 heure de temps.

- . Laver encore 5 fois 5 minutes avec la solution PBS + Tween
- . Laver ensuite 1 fois 5 minutes avec un tampon de diéthanolamine préalablement conservé à l'étuve à 37°C.
- . Préparer un substrat composé de :
 - NBT (Bleu de Nitro trétrazolium Chloride) :
 - BCIP (5 Bromo - 4 Chloro - 3 Indolyl phosphate) ou sel de paratoluidine
 - DMF (N, N' diméthyl formamide)
 - Diéthanolamine à 37°C.

Dissoudre les poudres de NBT (10 mg) et du BCIP (5 mg) dans le DMF (10 ml), puis ajouter cette solution à 50 ml de diéthanolamine, l'ensemble forme ainsi un substrat.

Plaçons ensuite les papiers de nitrocellulose dans ce substrat à l'abri de la lumière, sur agitateur jusqu'à apparition de bandes violettes traduisant une réaction positive (la réaction nécessite aussi une température variant entre 36° et 37°C).

. Récupérer enfin les papiers et les conserver à l'abri de la lumière pendant 24 heures environ.

B.6. Technique de l'Elisa :

Elle est réalisée sur plaque stérile portant des trous numérotés horizontalement de 1 à 12 et verticalement de A à H.

Elle s'effectue en présence :

- d'une solution de membranes externes de méningocoques
- de FSC (Sérum du Veau Foetal) assurant le blocage
- de détergent (PBS + Tween)
- d'un 1er anticorps = anticorps monoclonal
- d'un 2è anticorps = immunoglobuline de lapin
- d'un substrat = 4 nitro phényl phosphate.

- Il s'agit d'une réaction immuno enzymatique permettant de détecter les antigènes de protéines membranaires à l'aide d'anticorps spécifique qui, en présence du substrat et du 2^e anticorps donne la réaction.

La réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration jaune au niveau des trous.

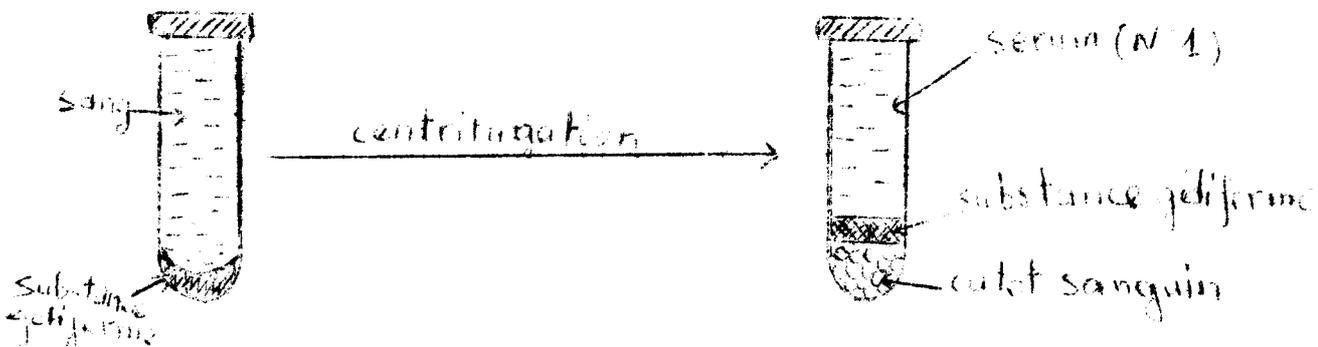
B.7. Prélèvements de sang

Deux prélèvements de sang ont été effectués chez les patients porteurs de Neisseria meningitidis A ou C (l'un le jour même de la ponction lombaire et l'autre 15 jours après la ponction).

• Premier prélèvement

On prélève 2 ml de sang dans un petit tube appelé "microtainer" marque "ependorf". Ce tube contient une substance gélatineuse qui servira à la séparation du sérum et du culot sanguin lors de la centrifugation.

La centrifugation est effectuée à 10000 tours/minute pendant 10 minutes.



Le sérum sera récupéré ensuite dans un cryotube stérile à l'aide d'une pipette stérile, puis placé au congélateur à -80°C .

• Deuxième prélèvement

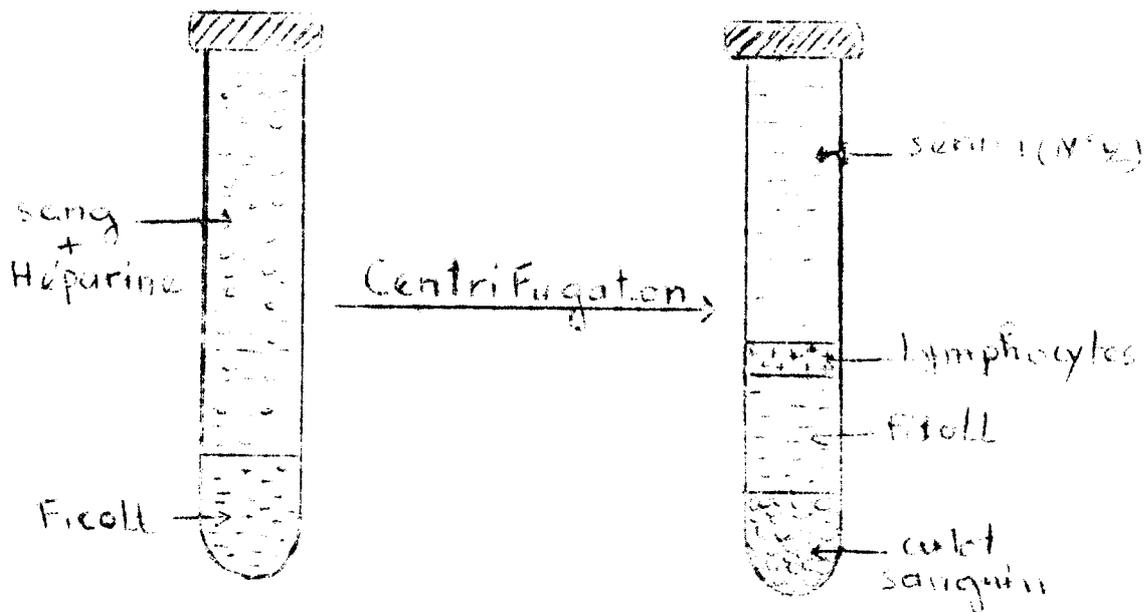
Il est réalisé 15 jours après la ponction au lit du malade ou à domicile (si le patient est sorti de l'hôpital). Donc la connaissance de l'adresse complète du malade est nécessaire dès le 1^{er} jour de son hospitalisation.

On prélève cette fois-ci 5 ml de sang dans un grand tube appelé "vacutainer" marque "ependorf" contenant un anticoagulant (héparine).

Ce prélèvement de sang servira à l'isolement des lymphocytes.

• Isolément des lymphocytes : Technique

- A 5ml de sang prélevé sur héparine, ajouter 5 ml de PBS (solution tampon phosphate)
- Bien fermer le tube et mélanger.
- Ajouter très doucement jusqu'au fond du tube 2 ml de Ficoll (milieu inactif avec une forte densité) à l'aide d'une seringue stérile.
- Fermer le tube (ne pas mélanger).
- Centrifuger pendant 40 minutes à la vitesse de 1600 tours/minute.



- Prendre avec prudence les lymphocytes à l'aide d'une pipette stérile et mettre dans un tube conique stérile
- Ajouter quelques millilitres de PBS (pour le lavage des cellules), mélanger et centrifuger pendant 10 minutes à la vitesse de 1300 tours/minute.
- Verser le surnageant et récupérer les lymphocytes dans 0,5 ml de PBS.

0

- Mettre ensuite le mélange dans un tube contenant un conservateur le DMSO (Diméthyl Sulfoxyde).

- Bien mélanger et procéder à une congélation à -80°C .

Le sérum (n°2) est également congelé à -80°C .

Les séra (sérum N°1 et sérum n°2) et les lymphocytes seront ensuite envoyés à l'Institut Max Planck de Berlin pour des études immunologiques.

RESULTATS

II/- RESULTATS

II.1. Nombre de prélèvements :

169 liquides céphalorachidiens ont été examinés sur une période s'étendant de Décembre 1989 à Décembre 1990 dans le Service de Bactériologie de l'INRSP.

II.1.1. Provenance des 169 LCR en fonction de leur provenance

Tableau 4 / Répartition des 169 LCR en fonction de leur provenance

Provenance	Nombre de prélèvements	Provenance
Hôpital Gabriel TOURE	128	75,74 %
Lazaret	29	17,16 %
Kolokani	11	6,51 %
Hôpital de Kati	1	0,59 %
TOTAL	169	100 %

75,74 % des prélèvements proviennent du Service de Pédiatrie de l'Hôpital Gabriel TOURE.

II.1.2. Répartition en fonction de l'aspect du liquide céphalorachidien

Tableau 5 : Répartition du LCR en fonction de leur aspect

Aspect	Nombre	Pourcentage
Clair	4	2,37 %
Trouble	158	93,49 %
Hématique	6	3,55 %
Xanthochromique	1	0,59 %
Total	169	100 %

Les liquides troubles 93,49 % représentent la majorité de nos prélèvements, les Hématiques 3,55 %, les liquides clairs ne représentent que 2,37 % et les xanthochromiques 0,59 %.

II.1.3. Répartition des LCR en fonction de la période de prélèvements

Tableau 6 : Répartition des LCR en fonction des périodes

Mois	Déc 89	Jan 90	Fév 90	Mar 90	Avr 90	Mai 90	Juin 90	Juil 90	Août 90	Sept 90	Oct 90	Nov 90	Déc 90	Total
Nombre de prélèvements	6	20	17	29	28	22	10	2	4	3	8	3	8	169

Nous avons obtenus le plus de prélèvements au mois d'Avril suivi du mois de mars et mai.

II.1.4. Répartition des prélèvements selon la tranche d'âge et le sexe :

Tableau 7 : Répartition des malades étudiés en fonction de l'âge et du sexe

Age	Masculin	Féminin	Total	Pourcentage sur 169 patients
1-28 jours	5 (62,50%)	3, (37,50%)	8	4,73 %
1-11 mois	41 (56,94%)	31 (43,05%)	72	42,60 %
1-6 ans	20 (52,63%)	18 (47,37%)	38	22,48 %
7-14 ans	13 (39,39%)	20 (60,60%)	33	19,52 %
15-29 ans	10 (66,66%)	5 (33,33%)	13	8,87 %
30-56 ans	2 ((66,66%)	1 (33,33%)	3	1,77 %
Total	91 (53,84%)	78 (46,15%)	169	100 %

L'âge varie de 3 jours à 56 ans avec une nette prédominance de la tranche comprise entre 1 et 11 mois (soit 42,60 %). On constate globalement une prédominance du sexe masculin (91 soit 53,84 %) par rapport au sexe féminin (78 soit 46,15 %).

II.2. Germe

II.2.1. Répartition des LCR positifs en fonction des germes en cause

Nous avons trouvé au total 116 LCR positifs sur 169 étudiés soit 68,63 %. Ces 116 LCR se répartissent de la façon suivante

Tableau 8 : Répartition des différents germes identifiés

Germe	Nombre	Pourcentage
Escherichia coli	1	0,86%
Streptocoque	1	0,86%
Haemophilus influenzaeb	31	26,73%
Streptococcus pneumoniae	35	30,17%
Neisseria meningitidis A	4	3,45%)
Neisseira meningitidis C	41	35,35%)
Neisseria meningitidis X	1	0,86%)
Neisseria sicca/sub-flova	2	1,72%
Total	116	100 %

Dans ce tableau, on observe que Neisseria meningitidis occupe la première place avec une fréquence d'isolement de 39,66 %. Il est suivi de Streptococcus pneumoniae soit 30,17 % et de Haemophilus influenzaeb soit 26,73 %.

II.2.2. Répartition des LCR positifs en fonction de leur provenance et du germe :

Tableau 9 : Répartition des LCR positifs en fonction de leur provenance et du germe

Germes	Provenance				
	HGT	Lazaret	Kolokani	H.Kati	Total
Escherichia coli	1	0	0	0	1
Streptocoque	1	0	0	0	1
Haemophilus influenzae	29	1	0	1	31
Streptococcus pneumoniae	29	6	0	0	35
Neisseria meningitidis A	1	3	0	0	4
Neisseria meningitidis C	30	6	5	0	41
Neisseria meningitidis X	1	0	0	0	1
Neisseria sicca\subflava	1	0	1	0	2
TOTAL	93 (80,17%)	16 (13,79%)	6 (5,17%)	1 (0,86%)	116

80,17 % des LCR positifs proviennent du service de pédiatrie de l'Hôpital (Lazaret soit 13,79 % et de Kolokani soit 5,17 %).

II.2.3 Répartition des LCR positifs en fonction de leur aspect et du germe

TABEAF 10 : REPARTITION DES LCR POSITIFS EN FONCTION DE LEUR ASPECT ET DU GERME

Aspect	Total	Positif	GERMES							N°sicc/ subflava
			E. Coli	Strepto- coque	HI	Pn	MnA	MnC	MnX	
Clair	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trouble	158	113 (71,52%)	1 (0,88%)	1 (0,88%)	31 (27,43%)	32 (28,31%)	4 (3,53%)	41 (36,88%)	1 (0,88%)	2 (1,76%)
Hémorragique	6	2 (33,33%)	0	0	0	2 (33,33%)	0	0	0	0
Xanthocloromique	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
TOTAL	169	116	1 (0,86%)	1 (0,86%)	31 (26,72%)	35 (30,17%)	4 (3,44%)	41 (35,34%)	1 (0,86%)	2 (1,76%)

HI = Haemophilus influenzae

Pn = Streptococcus pneumoniae

Mn = Neisseria meningitidis (A, C, X)
(A, C, X)

N° = Neisseria

Les résultats montrent que 71,52 % des LCR troubles sont positifs. Bien qu'ils soient les plus fréquemment positifs, les autres types de liquide (Hémorragique, Xanthochromique) comportent des chances de positivité et doivent être systématiquement examinés par le Bactériologiste dès lors qu'ils ont été prélevés dans un contexte de syndrome méningé. Dans les liquides clairs, aucun germe n'a été isolé. Un seul cas de liquide Xanthochromique a été examiné et a donné lieu à l'isolement d'une souche de pneumocoque. Dans les liquides troubles, 8 germes ont été isolés mais en proportions inégales. Tandis que dans les liquides hémorragiques, seulement 2 souches de Pneumocoques ont été identifiées.

II.2.4. Répartition des LCR positifs en fonction de la période et du germe isolé

TABLAU 11 : REPARTITION DES LCR POSITIFS EN FONCTION DE LA PERIODE

Mois	Nombre de pré-lèvement	Positifs	GERMES									
			E. coli	Strep-tocoque	HI	Pn	MNA	MNC	MnX	N. sicca/ subflava		
Déc. 89	6	5 (83,33%)	0	0	0	5	0	0	0	0	0	
Janv. 90	20	16 (80%)	0	0	5	5	1	4	1	0		
Fév. 90	17	11 (64,70%)	0	1 (9,09%)	2	5	0	3	0	0		
Mars 90	29	17 (58,62%)	0	0	1	6	1	9	0	0		
Avril 90	37	25 (67,56%)	0	0	3	2	1	17	0	2 (8%)		
Mai 90	22	15 (68,18%)	0	0	5	5	1	17	0	0		
Jun 90	10	6 (60%)	1 (16,66%)	0	3	1	0	1	0	0		
Jullet 90	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0		
Août 90	4	3 (75%)	0	0	1	1	0	1	0	0		
Sept. 90	3	3	0	0	2	1	0	0	0	0		

TABEAV 11 (suite) : REPARTITION DES LCR POSITIFS EN FONCTION DE LA PERIODE

Mois	Nombre de prélèvements	Positifs	GERMES							
			E. coli	Strep-tocoque	HI	Pn	MnA	MnC	MnX	N. sicca/subflava
Oct. 90	8	5 (62,50%)	0	0	3 (60%)	2 (40%)	0	0	0	0
Nov. 90	3	2 (66,66%)	0	0	0	1 (50%)	0	1 (50%)	0	0
Déc. 90	8	6 (75%)	0	0	4 (66,66%)	1 (16,66%)	0	1 (16,66%)	0	0
TOTAL	169	116	1	1	31	35	4	41	1	2

HI = Haemophilus influenzae

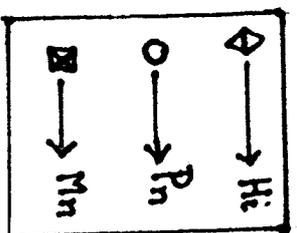
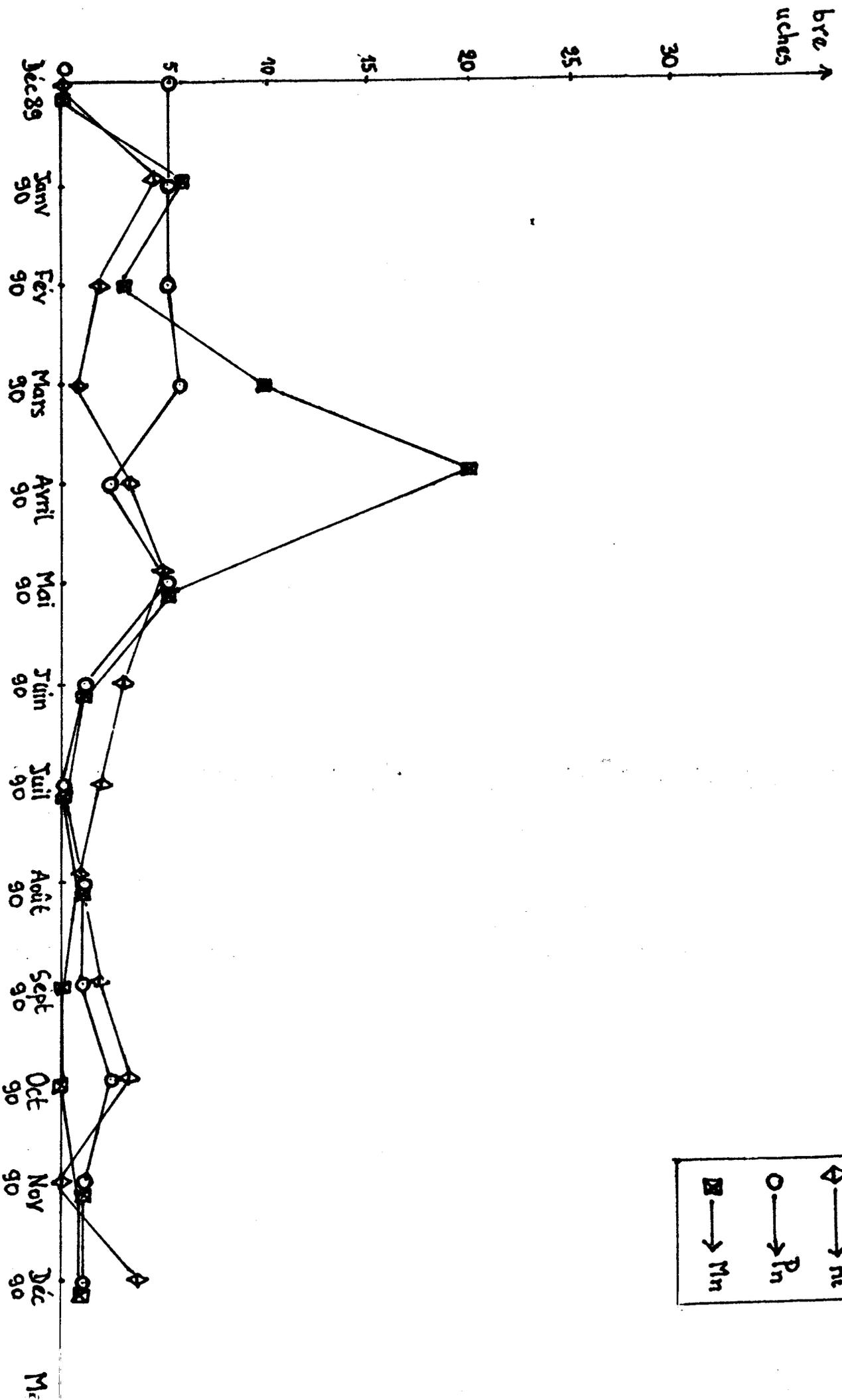
Mn = Neisseria meningitidis (A,C,X)
(A,C,X)

N. sicca/subflava = Neisseria

sicca/subflava

Pn = Streptococcus pneumoniae

en Fonction du temps.



L'examen de la courbe montre qu'au mois de :

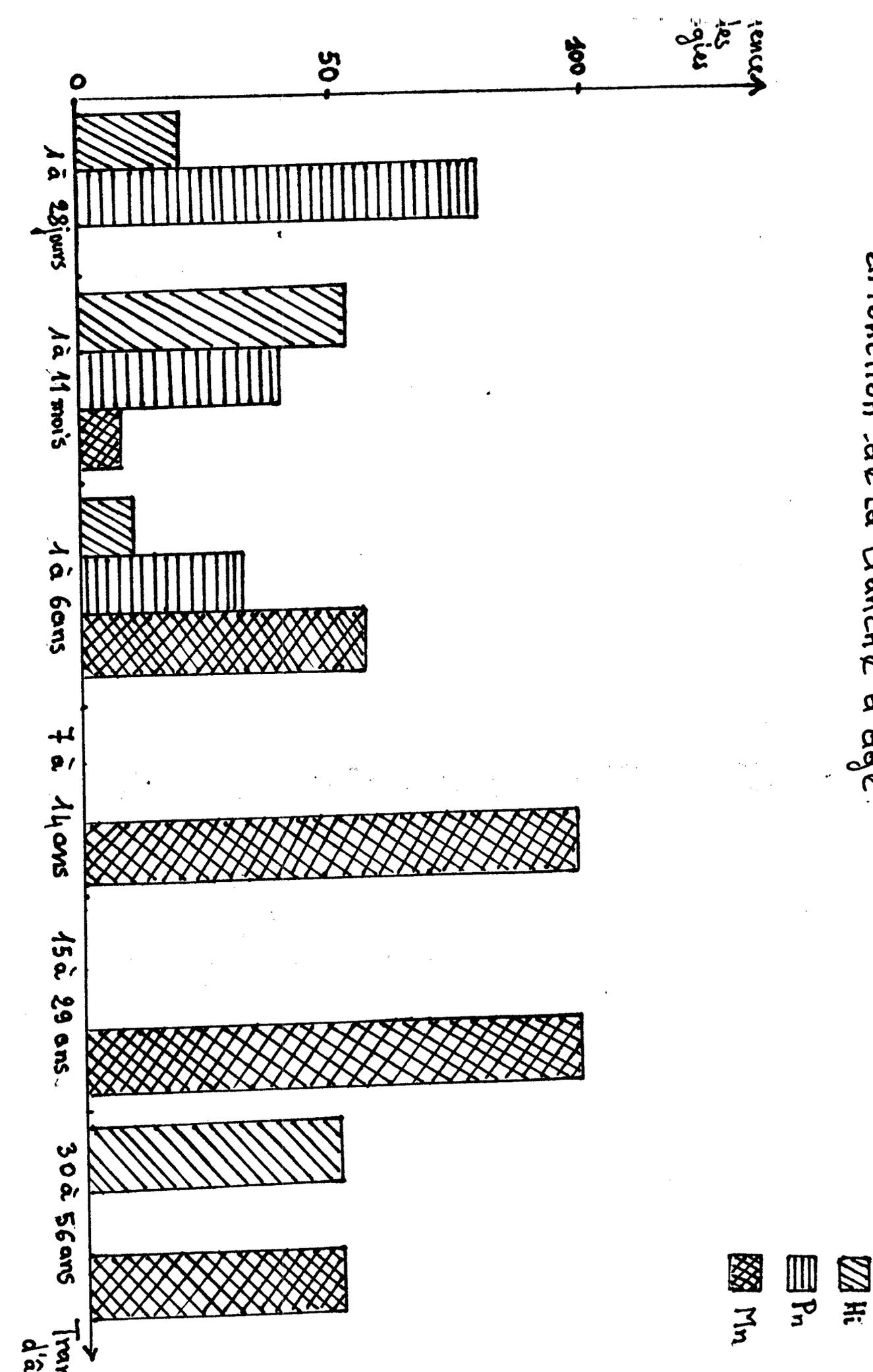
- Décembre 1989, les 5 cas de méningite bactériologiquement confirmées sont dûs au Pneumocoque.
- Janvier 1990 : Les 3 germes (Hi, Pn et Mn) ont été isolés en proportions égales soit 31,25 % chacun.
- Février 1990 : Le Méningocoque est largement prédominant soit au total 58,82 %.
- Avril 1990 : Le Méningocoque continue à pointer avec l'apparition d'un pic (soit 20 cas au total sur 25 souches obtenues).
- Mai 1990 : Les 3 germes sont isolés en proportions égales.
- Juin 1990 : Haemophilus influenzaeb prédomine soit 50 % des souches isolées.
- Juillet, Août, Septembre 1990, le nombre de prélèvement est faible. Ceci s'explique par l'arrivée de la saison des pluies.
- Octobre 1990 à Décembre 1990, le nombre de cas recensé est faible avec un faible participation du Pneumocoque et de Haemophilus influenzaeb ; et une légère prédominance du méningocoque.

II.2.5. Répartition des LCR positifs en fonction de la tranche d'âge et des germes isolés

TAB. 12 : REPARTITION DES MENINGITES BACTERIOLOGIQUEMENT CONFIRMES : EN FONCTION DE L'ETIOLOGIE ET DE L'AGE

Age	Nombre de prélèvements	Positifs	GERMES							
			E. Coli	Streptocoque	Hi	Pn	MnA	MnC	MnX	N. sicca/ subflava
1 à 28 jours	8	5 (62,50%)	0	0	1 (20%)	4 (80%)	0	0	0	0
1 à 11 mois	72	69 (95,84%)	1 (2%)	0	27 (54%)	29 (40%)	0	2 (4%)	0	0
1 à 6 ans	38	33 (86,84%)	0	1 (3,03%)	2 (6,06%)	11 (33,33%)	2 (6,06%)	15 (45,45%)	1 (3,03%)	1 (3,03%)
7 à 14 ans	33	19 (57,57%)	0	0	0	0	0	18 (94,73%)	0	1 (5,26%)
15 à 29 ans	13	7 (53,84%)	0	0	0	0	2 (28,57%)	5 (71,42%)	0	0
30 à 56 ans	3	2 (66,66%)	0	0	1 (50%)	0	0	1 (50%)	0	0
total	169	116	1 (0,86%)	1 (0,86%)	31 (26,72%)	35 (30,17%)	4 (3,44%)	41 (35,34%)	1 (0,86%)	2 (1,72%)

Figure N° 4. Distribution de la fréquence des conjoints sur différentes tranches d'âge.



Cette figure nous montre que :

- la Méningocoque affecte tous les âges (sauf les enfants de 1 à 28 jours) avec une fréquence maximale dans les tranches d'âge de 7 à 14 ans et de 15 à 29 ans ;
- Haemophilus influenzaeb est responsable de méningite surtout dans la tranche d'âge de 1 à 11 mois. Les tranches d'âges comprises entre 1 à 28 jours, 1 à 6 ans, 30 à 56 ans n'enregistrent que 1 à 2 cas ;
- le Pneumocoque (Streptococcus pneumoniae) a été retrouvé seulement chez les patients âgés de 1 jour à 6 ans avec une fréquence maximum dans la tranche d'âge de 1 à 28 jours.

II.2.6. Répartition des LCR positifs en fonction du sexe et des germes en cause

TABLÉAU 13 : REPARTITION DES LCR POSITIFS EN FONCTION DU SEXE ET DES GERMES EN CAUSE

Sexe	Nombre de prélèvements	Positifs	GERMES							
			E. coli	Strep-tocoque	Hi	Pn	MnA	MnC	MnX	Neisseria sicca / subflava
Masculin	91	65 (71,42%)	1 (1,53%)	1 (1,53%)	18 (27,69%)	20 (30,76%)	4 (6,15%)	21 (32,30%)	0	0
Féminin	78	51 (65,38%)	0	0	13 (25,49%)	15 (29,41%)	0	20 (39,21%)	1 (1,96%)	2 (3,92%)
TOTAL	169	116	1	1	31	35	4	41	1	2

Il ressort de ce tableau que :

- 1°)- il n'y a pas de différence significative dans la proportion des LCR positifs
- 2°)- il n'y a pas de différence significative dans la fréquence des 3 principales étiologies en fonction du sexe ($\chi^2 = 0,69$)
- 3°)- pour Escherichia coli et le streptocoque nous n'avons enregistré qu'un cas chacun.

II.3. Niveaux de sensibilité et de résistance des souches testées aux Antibiotiques

Tableau 14 : Niveaux de sensibilité et de résistance des souches testées aux différents antibiotiques.

TABLÉAU 14 : NIVEAUX DE SENSIBILITÉ ET DE RÉSISTANCE DES SOUCHES TESTÉES AUX DIFFÉRENTS ANTIBIOTIQUES.

Antibiotiques	Souches testées	HI		Pn		MnA		MnC		MnX		N. sicca/subflava	
		S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
Pénicilline G	15	0	0	23	2	4	0	37	1	1	0	1	0
				(92%)	(8%)	(100%)		(97, 37%)					
Ampicilline	15	0	0	0	0	4	0	37	1	1	0	1	0
				(100%)		(100%)		(97, 37%)					
Céfotaxime	15	0	24	1	4	0	37	1	1	0	1	0	0
			(100%)	(96%)	(100%)		(97, 37%)	(2, 63%)					
Chloéomphénicol	14	1	21	4	4	0	38	0	1	0	1	0	0
				(100%)		(100%)		(100%)					
Sulfamides	6	9	7	18	4	0	0	38	0	1	0	1	1
						(100%)		(100%)					
Cotrimoxazole	6	9	12	13	3	1	1	37	1	0	0	0	1

S = Nombre de souches sensibles

R = Nombre de souches résistantes

Il ressort de ce tableau que les antibiotiques comme l'Ampicilline, la Pénicilline G, la Céfotaxime et le Chloramphénicol ont une excellente activité sur les souches testées.

Concernant les sulfamides et la Cotrimoxazole, la résistance est assez élevée surtout chez les souches de Neisseria meningitidis C.

II.4 Résultats des Techniques de SDS Page et du Western Blot

Les techniques du SDS Page et du Western Blot ont été effectuées uniquement sur des souches de méningocoques de séro groupe A et C. Ces souches testées sont au nombre de 46 dont :

- 41 méningocoques de séro groupe C
- 4 méningocoques de séro groupe A
- 1 souche de référence qui est un Neisseria meningitidis A

II.4.1. SDS Page

Toutes les souches de Neisseria meningitidis A et C comportent des protéines de classe 1 et de classe 5. Par contre les protéines de classe 2 ont été retrouvées uniquement chez les sérogroupe C ; et les protéines de classe 3 uniquement chez les sérogroupe A.

Les protéines de classe 4 sont très difficiles à distinguer des autres classes de protéines, tandis que les protéines de classe 6 sont rares et sont absentes chez les souches testées.

RESULTATS DU SDS PAGE

II.4.2. Western Blot

Six différents anticorps ont été testés sur les différentes classes de protéines membranaires. Ce sont :

- l'anticorps anti-P1.2.
- l'anticorps anti-P1.7
- l'anticorps anti-P1.Y
- le MB (Milian Blake)
- le T2a
- et l'anticorps dirigé contre les protéines de pili.

. Avec l'anticorps anti-P.1.2, la réaction est négative c'est à dire qu'aucune souche ne possède la variante 2 de la protéine de membrane externe de classe 1.

. Avec l'anticorps anti-P.1.7, la réaction est positive uniquement avec les méningocoques de séro groupe A c'est à dire que seules les souches de MnA possèdent la variante 7 de la protéine de membrane externe de classe 1.

. Avec l'anticorps anti-P.1.Y, la réaction est positive uniquement avec les Méningocoques de Séro groupe C possédant la variante Y de la protéine de membrane externe de classe 1.

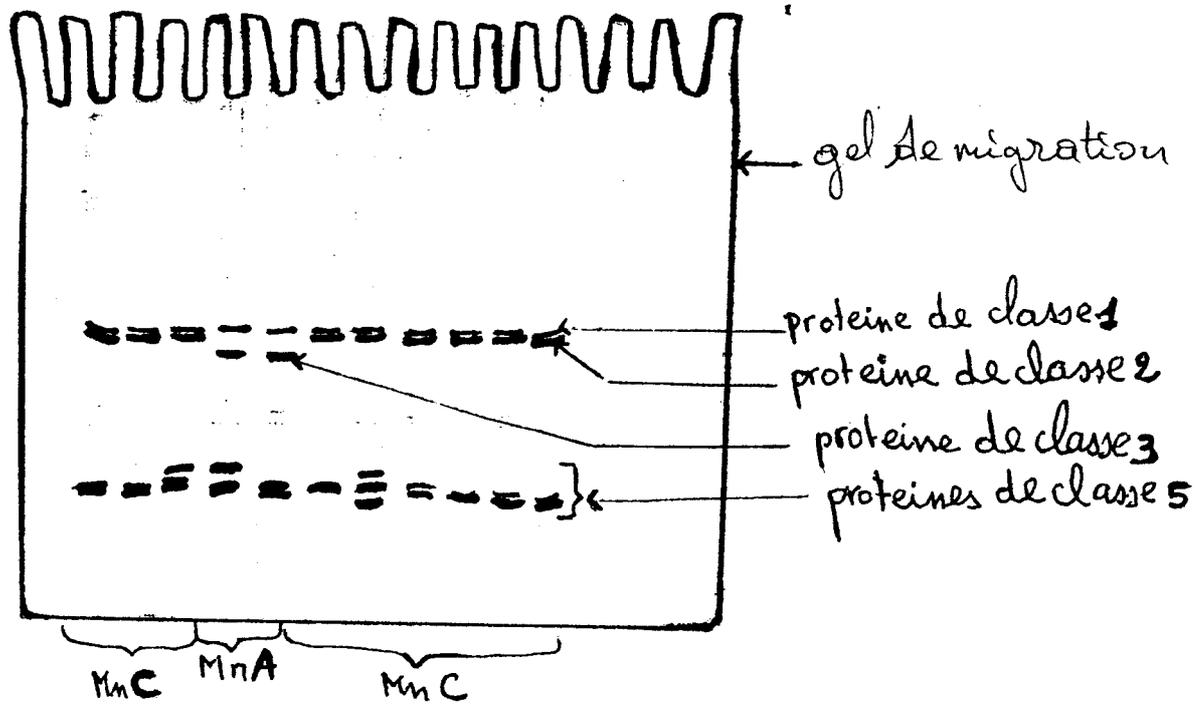
. Avec le MB (Milian Blake), nous avons obtenu 93,47 % de réactions franchement positives soit (43 souches sur 46 testées) et 6,52% de réactions plus ou moins positives (soit 3 sur 46 souches testées).

Ce Milian Blake reconnaît les protéines de classe 5 dont il existe plusieurs sous classes (5a, 5b, 5c, 5d, 5e, 5f, 5h, 5i,).

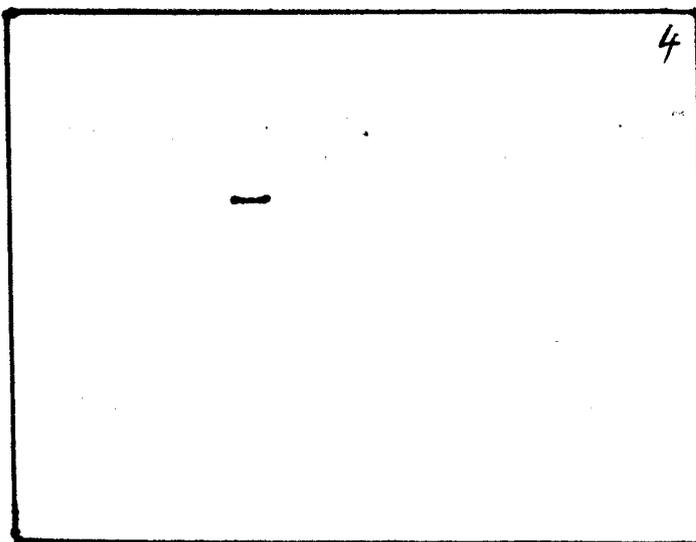
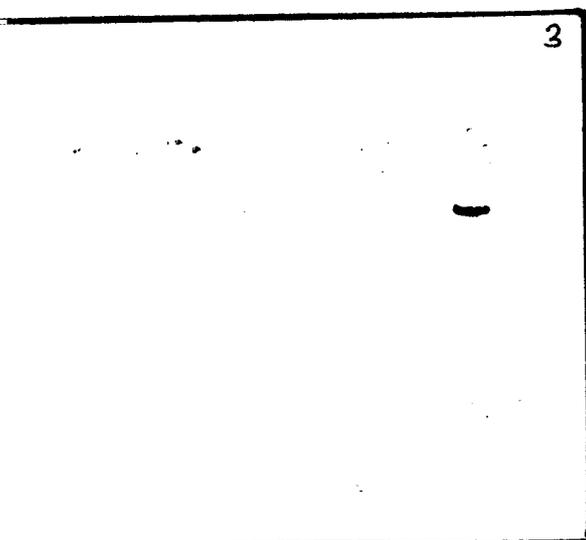
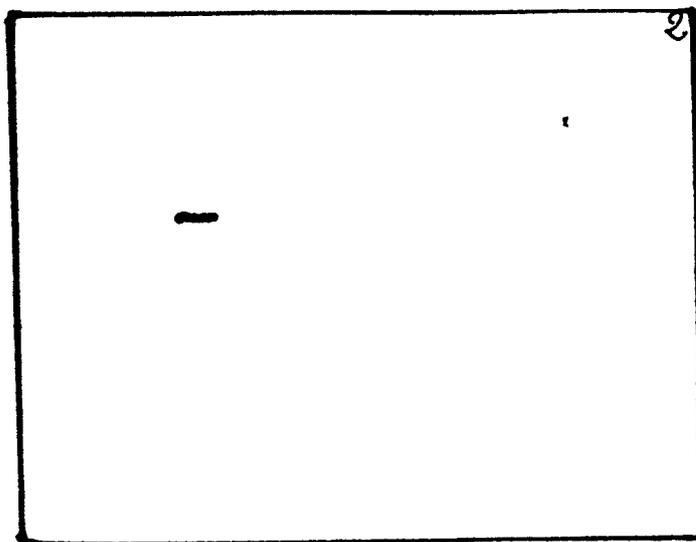
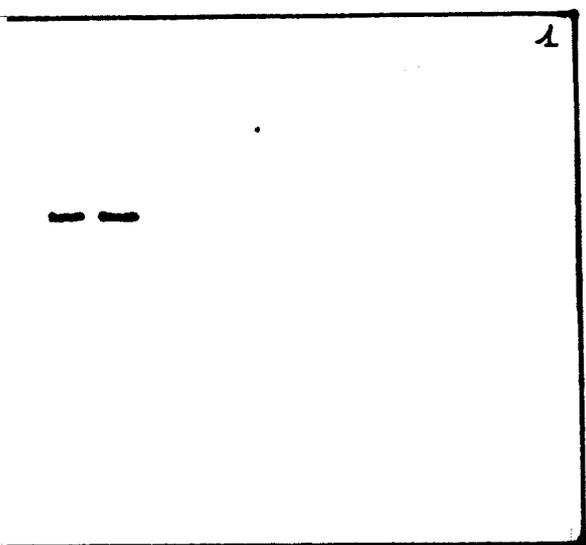
. Le T2a reconnaît uniquement les protéines de classe 2 des MnC

. L'anticorps dirigé contre les protéines de Pili reconnaît uniquement les méningocoques de séro groupe C.

Résultat du SDS-Page

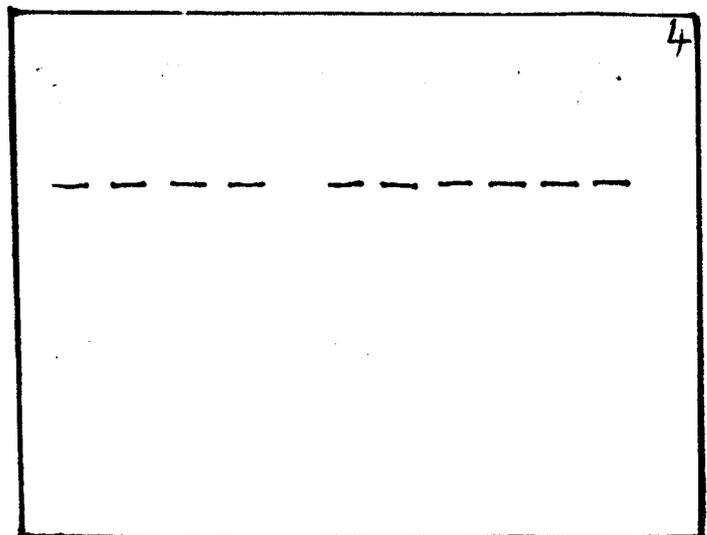
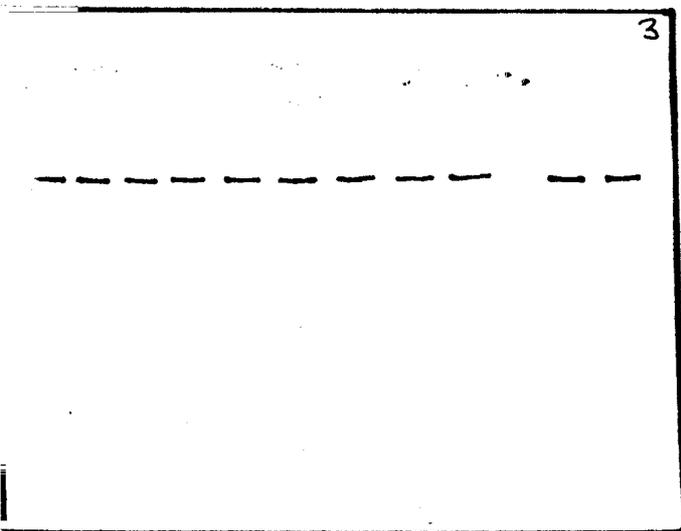
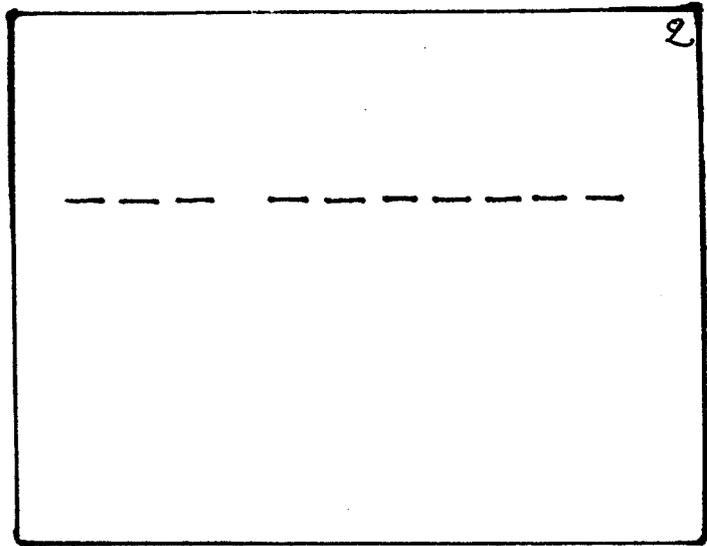
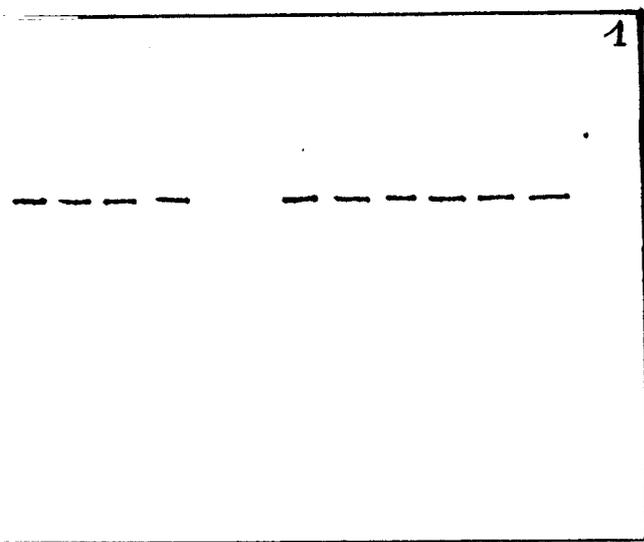


Résultat du Western Blot avec l'anticorps monoclonal anti P1.7



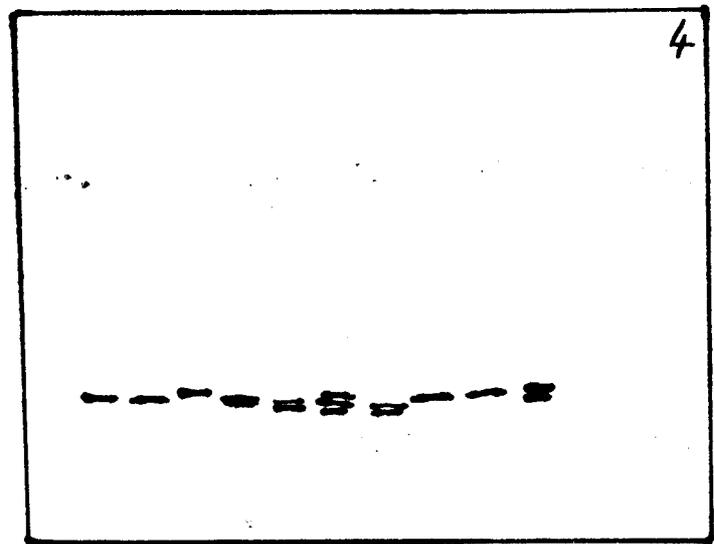
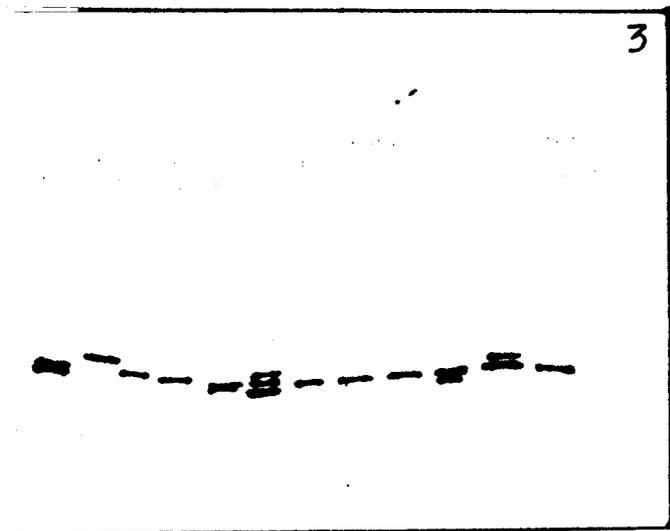
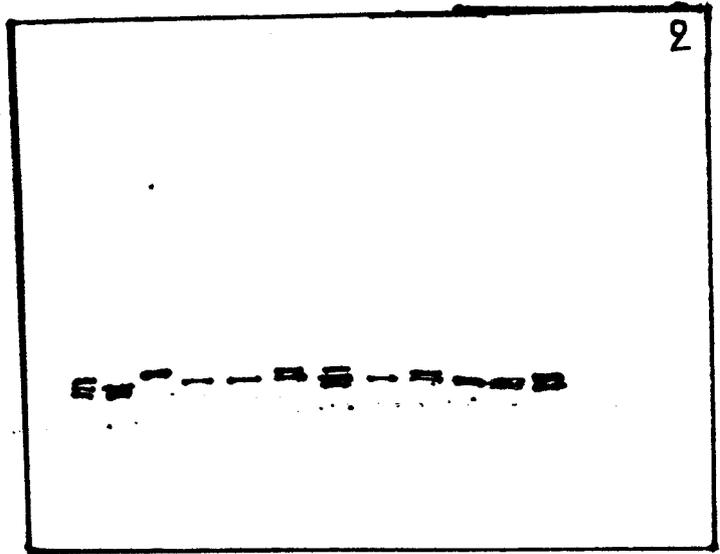
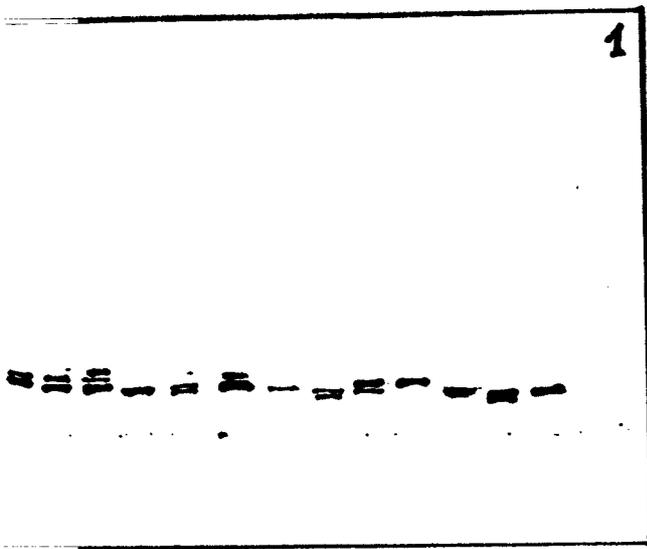
Seules les 5 souches de MxA réagissent avec cet anticorps.

Résultat du Western Blot avec l'anticorps monoclonal anti - P1. Y



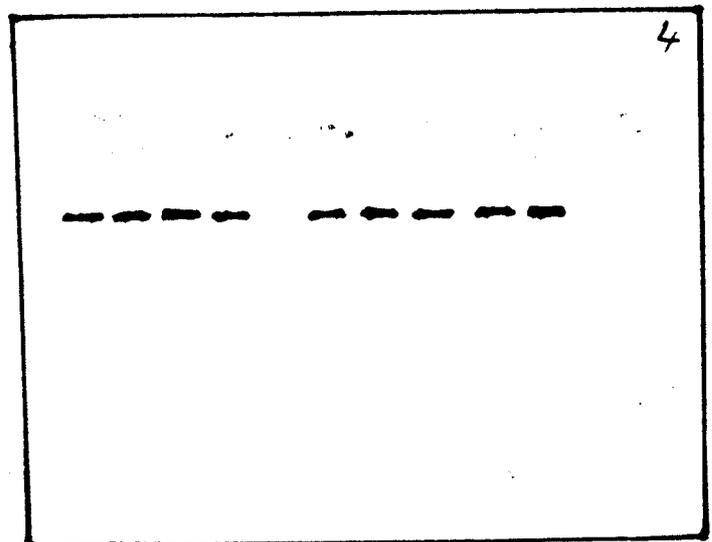
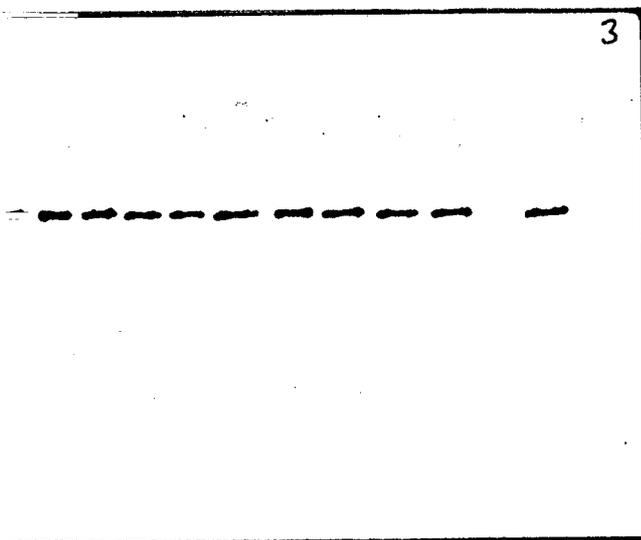
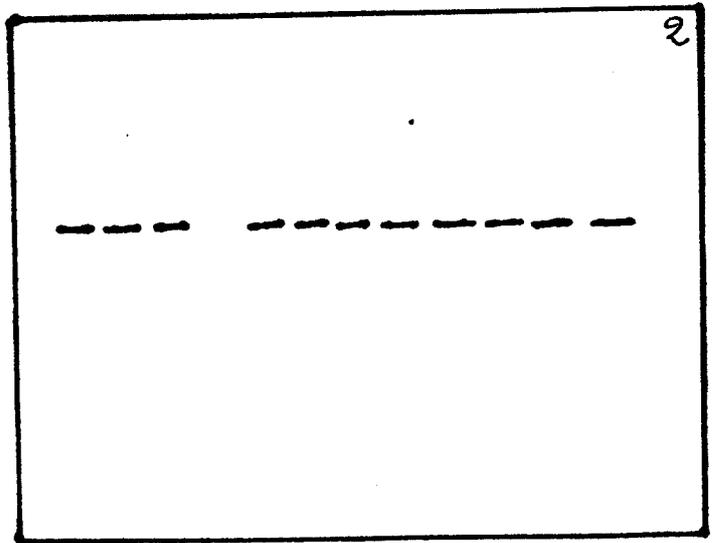
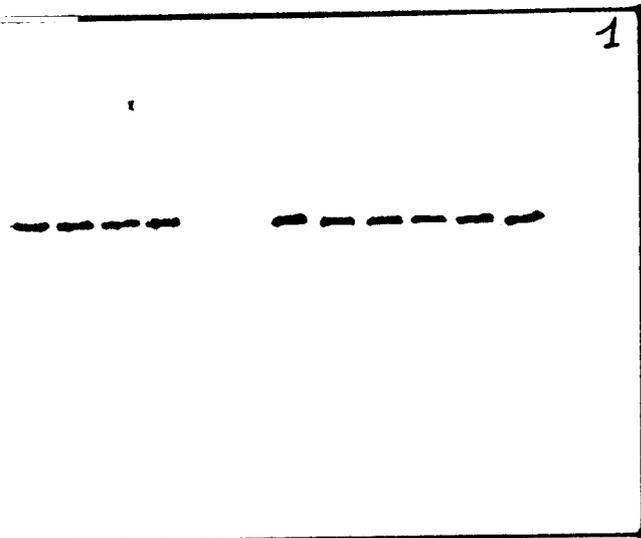
Seules les souches de M₁C réagissent avec cet anticorps

Résultat du Western Blot avec le Miligan Blake



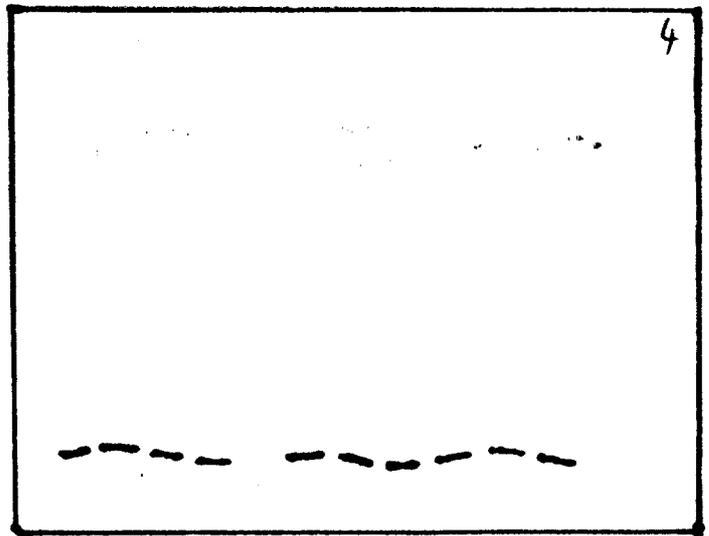
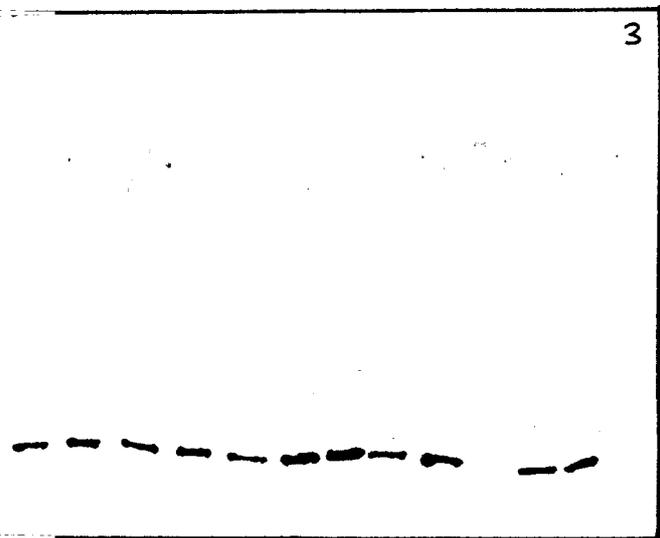
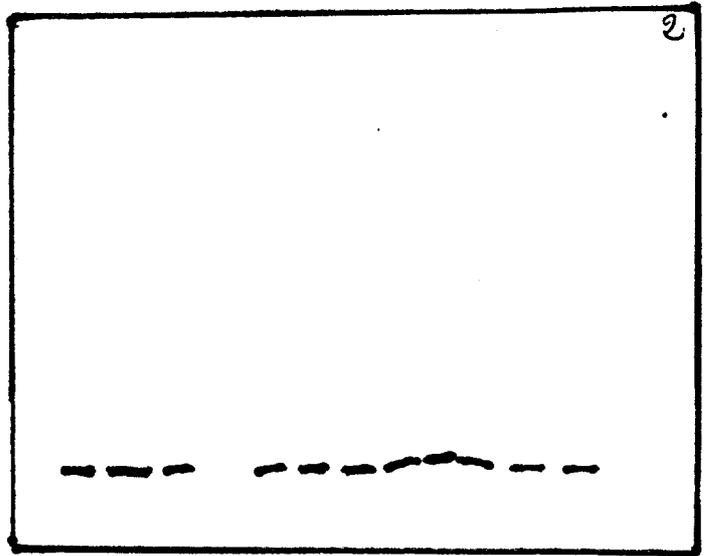
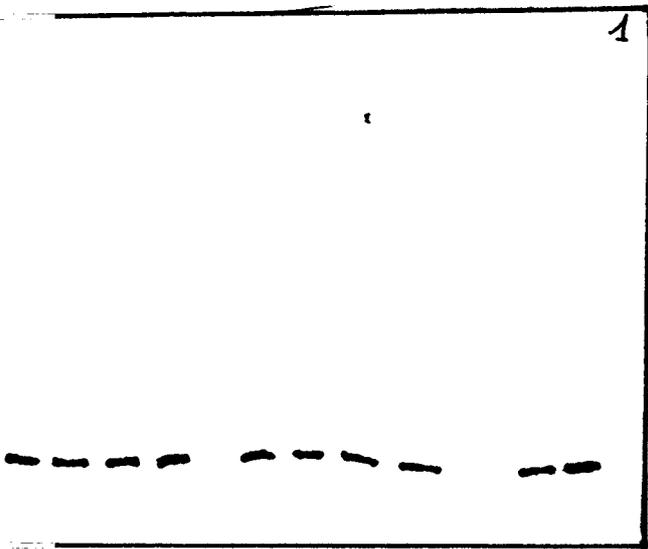
43 sur 46 souches testées sont franchement positives tandis que 3 sur 46 sont plus ou moins positives.

Résultat du Western Blot avec l'anticorps monoclonal T2a



La réaction est positive ^{uniquement} avec les protéines de classe 2 des MnC

Résultat du Western Blot avec l'anticorps dirigé contre les protéines de Pili



La réaction est positive uniquement avec les **MnC**

DISCUSSION

III.1. Positivité en fonction de l'aspect du LCR

Sur 169 LCR nous avons trouvé :

- 158 LCR troubles dont 113 positifs (71,52 %)
- 6 LCR hématiques dont 2 positifs (33,33%)
- 1 LCR Xanthochromique.

Bien que les LCR troubles soient les plus fréquemment positifs, les autres comportent également des chances de positivité et doivent être examinés par le bactériologiste dès lorsqu'ils sont prélevés dans un contexte clinique de méningite.

Selon Halima (43) sur :

- 116 LCR clairs 21 étaient positifs (18,11 %)
- 14 LCR hématiques 5 étaient positifs (28 %)
- 5 LCR xanthochromiques 2 étaient positifs (25 %)

Selon Djénèba (48) sur :

- 12 clairs 5 étaient positifs (41,66 %)
- 4 hématiques 3 étaient positifs
- 1 xanthochromique et positif.

III.2. Répartition des LCR positifs en fonction du mois

On observe les taux les plus élevés en Mars, Avril, Mai ; les plus bas en Juin, Juillet, Août.

Dans notre étude, en Mars Avril le Méningocoque est prédominant.

Sanou (46) signale le même phénomène au Mali en 1981.

D'après Halima (43) en 1988, le méningocoque est dominant au mois de Mars.

Ces résultats sont comparables avec ceux de Keylen (23) qui trouve une fréquence maximale des méningites à méningocoque en Haute-Volta pendant la période de chaleur.

III.3. Fréquence du germe isolé

Dans notre étude, nous avons trouvé que le Méningocoque occupe la 1ère place soit 38,78 % dans la fréquence d'isolement avant Streptococcus pneumoniae (30,17 %) et Haemophilus influenzaeb (26,72 %).

Berthé (8) trouve aussi en 1979 au Mali une récrudescence des méningites à Neisseria meningitidis 64% suivi du pneumocoque 24% ET DU Haemophilus influenzaeb 6,4 %.

Sanogo (45) en 1981, signale qu'en dehors des épidémies, le méningocoque ne représente qu'environ la moitié des germes responsables de méningites purulentes au Mali, viennent ensuite le Pn (40%) et Hi (5%). En période épidémique, il représente un pourcentage plus élevé des méningites purulentes atteignant 90-95 %.

Ainsi la haute fréquence du méningocoque se situe en Mars-Avril qui est, par définition la période de chaleur où la méningite à méningocoque est fréquente.

Cependant on observe une prédominance du séro groupe C sur le séro groupe A (soit 91,11 % dans notre série).

Selon Tikhomirov (49), Neisseria meningitidis du groupe C a été identifié au cours de ces dernières années comme l'agent étiologique des poussées survenues en Argentine, au Pérou et Uruguay. Une présence importante du groupe C a été signalée également au Brésil malgré la prédominance des poussées dues au groupe A.

En Tchécoslovaquie, on a constaté une augmentation sensible de la fréquence d'isolement des méningocoques du groupe C depuis 1980 soit 34% des Mn C observés dans les cas de méningite cérébrospinale.

Pendant les années 1970, plusieurs poussées de méningites cérébrospinales dues aux MnC ont été signalées au Nigeria Septentrional (1975) et au Burkina Faso (1979).

Au Tchad, 3 isolats de LCR sur 35 et une hémoculture positive ont permis d'authentifier en 1976 le groupe C (27).

III.4. Répartition selon l'âge

Nous constatons que le méningocoque est une affection de tous les âges. Ceci est confirmé par la plupart des auteurs.

Selon Assimadi K. et Col (5), le méningocoque est exceptionnel chez le nouveau-né. Mais nous avons trouvé dans notre étude de 1989 à 1990 : 2 cas sur 55 bactériologiquement confirmés.

Halima (43) trouve 2 cas sur 11 chez le nouveau-né en 1988.

Le même phénomène a été signalé également par Berthé (8) dans sa thèse et par Djénèba (48) soit 6 cas sur 20 en 1979-1989.

III.5. Répartition selon le sexe

Dans notre étude, on retrouve une prédominance du sexe masculin dans les tranches d'âges d'1 à 11 mois et d'1 à 6 ans mais pas dans les autres tranches d'âges.

Djénéba (40) signale le même phénomène dans sa thèse avec une prédominance du sexe masculin uniquement dans la tranche d'âge d'1 à 11 mois.

Cependant plusieurs auteurs ont signalé la prédominance masculine.

Halima (43) trouve 230 sujets masculins contre 130 sujets féminins dans 360 cas de méningites purulentes.

Berthé (8) enregistre une incidence masculine de 53,6 % sur 125 cas de méningites.

Ailleurs à Ouagadougou en 1978, Perreve (39) rapporte une prédominance masculine de 63 % dans une série de 949 cas.

III.6. Sensibilité aux Antibiotiques

Au cours de notre étude, nous avons enregistré :

- une résistance d'une souche de MnC sur 42 méningocoques à la Pénicilline G, 38 sur 42 au cotrimoxazole et aux sulfamides.

Presque 99% de nos souches de méningocoques sont sensibles à l'Ampicilline, au Céfotaxime et au Chloramphénicol.

- Une sensibilité anormale des souches de Pn à la Pénicilline G (taux de résistance 8%). Quant au céfotaxime, nous avons eu une sensibilité de 96% et de 84% pour le chloramphénicol.

- Avec Haemophilus influenzae, la sensibilité est assez élevée surtout avec l'Ampicilline (100%), le chloramphénicol (93,33 %) et le céfotaxime (100%) mais un peu faible avec le cotrimoxazole et les sulfamides (soit 40 %).

Djénéba (48) signale aussi :

- une souche de méningocoque sur 13 testées, résistante à la Pénicilline G, 8 sur 11 au Cotrimoxazole, 8 sur 9 aux sulfamides ; et une sensibilité de 100% au céfotaxime et au chloramphénicol.

Coulibaly (49) montre dans sa thèse qu'aucune souche testée de Hi et de Pn n'était résistante au céfotaxime.

Ceci est confirmée par Halima (43) en 1988 que Hi présente 3,22% de résistance au chloramphénicol, 17,64% pour l'Ampicilline, 38,46% au cotrimoxazole et 65% aux sulfamides.

Malgré ces quelques cas de résistances signalées, les antibiotiques tels que :

- l'Ampicilline, le Céfotaxime et le Chloramphénicol reste les AB les plus actifs sur Hi.
- la Pénicilline G, le Céfotaxime et le Chloramphénicol restent les AB les plus actifs sur les Pn
- la Pénicilline G, l'Ampicilline, le Céfotaxime et le Chloramphénicol restent les AB les plus actifs sur les souches de méningocoques.

III.7. Commentaire de la technique du SDS-Page

Au cours de notre étude nous nous sommes rendus compte que toutes les souches de MnA et MnC comportent les protéines de classe 1 et de classe 5. Tandis que les protéines de classe 2 ont été retrouvées chez les MnC et les protéines de classe 3 chez les MnA uniquement.

Ceci a été confirmé par Achtman M. en 1990 à l'Institut Max Planck de Berlin.

Les protéines de classe 1 et de classe 5 sont les protéines les plus immunogènes suscitant des anticorps protecteurs.

III.8. Commentaire du Werstern Blot

Nous avons trouvé que :

- toutes les souches MnA portaient le P1.7
- toutes les souches de MnC portaient le variant Y de la protéine de classe 1 qui est spécifique aux souches maliennes. Car l'anticorps correspondant ne réagit avec aucune autre souche ; d'où l'intérêt d'introduire le P1.Y dans la composition d'un nouveau vaccin de 2^e génération.

CONCLUSION

La présente étude nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- quelque soit l'aspect macroscopique du liquide céphalorachidien, il doit être soumis à un examen bactériologique s'il est prélevé dans un contexte clinique de syndrome méningé ;

- il découle de nos résultats bactériologiques que le méningocoque occupe la 1ère place avant Streptococcus pneumoniae et Haemophilus influenzae dans l'étiologie des méningites purulentes.

Il demeure cependant la seule espèce épidémiogène parmi les 3.

- La fréquence la plus élevée de la méningite à méningocoque se situe aux mois de Mars-Avril.

- Le méningocoque est présent à tous les âges avec une fréquence maximale entre 6 et 29 ans.

- Dans la répartition des méningites bactériologiquement confirmées, nous ne trouvons aucune prédominance de sexe excepté les tranches d'âge d'1 à 11 mois et d'1 à 6 ans où le sexe masculin est prédominant.

- Malgré l'existence de quelques souches résistantes aux différents antibiotiques testés : la Pénicilline G, l'Ampicilline, le Céfotaxime et le Chloramphénicol gardent une excellente activité dans le traitement de la méningite cérébrospinale.

- La prédominance du sérogroupe C ces deux dernières années semble un fait épidémiologique important. Ceci est à rapprocher des deux épidémies à méningocoque du sérogroupe C au Nigeria Septentrional en 1975 et au Burkina Faso en 1979.

- Toutes les souches de Neisseria meningitidis isolées ont fait l'objet d'études approfondies par les méthodes de biologie moléculaire (SDS-Page, Western Blot et Elisa).

Le SDS-Page a permis d'identifier les différentes classes de protéines membranaires.

La présence des protéines de classe 2 ou 3 s'excluant mutuellement permet de confirmer l'appartenance de ces souches au sérogroupe A ou C.

Les anticorps tels que anti-P1.2, anti-P1.7, T2a, Milian Blake et ceux dirigés contre les pili, qui ont été utilisés par la technique du Western Blot sont produits à partir des souches isolées en Europe. Ces souches sont pour la plupart des sérogroupes A et B d'où leur utilisation limitée au Mali où les souches de séro groupe C sont prédominantes.

A partir des souches maliennes de séro groupe C, le variant Y de la protéine de classe 1 a été mis en évidence grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Ce variant est purement spécifique aux souches maliennes. Etant donné le rôle protecteur des anticorps dirigés contre la protéine de classe 1 la mise en évidence d'un variant Y de cette protéine dans les souches maliennes de séro groupe C indique la nécessité de prendre ce résultat en compte dans la confection d'un vaccin conjugué de 2^e génération (Protéines + Polysaccharides capsulaires) destiné à protéger contre les infections à méningocoque C dans notre Pays.

BIBLIOGRAPHIE

1. Achtman M.
Molecular epidemiology of epidemic bacterial meningitis.
Reviews in medical Microbiology - 1990 - Vol.1 : 29-38
2. Achtman M, Plusch Ke G.
Clonal analysis of descent and virulence among selected
Escherichia coli.
Annual Review of microbiology - 1986 - Vol 40 : 185-210
3. Atimé D.
"Etude Bactériologique des Méningites Purulentes en milieu
pédiatrique avec comparaison de l'efficacité de deux
schémas thérapeutiques (Ampicilline - Chloramphénicol)".
Thèse Pharmacie Bamako - 1990
4. Adanho G.
Méningites purulentes du nouveau-né et du nourrisson à
propos de 688 cas observés en 10 ans.
Thèse Méd. Dakar 1975 - N°4
5. Assimadi K. et col
La méningite purulente du nouveau-né ; étude sur 43
observations au CHU de Lomé.
Rev. Méd. de Côte d'Ivoire, 1987, N°68, 23-32
6. Abdillahi H, Poolman JT.
Whole cell Elisa for typing Neisseria meningitidis with
monoclonal antibodies.
FEMS Lett. 1987 Vol 48, 367-371
7. Abdillahi H, Poolman JT.
Définition of meningococcal Class 1 OMP subtyping antigens
by monoclonal antibodies.
FEMS Microbiol - Immunol - 1988 ; in press
8. BERTHE A.N.
"Aspects cliniques et bactériologiques des méningites
purulentes en milieu pédiatrique".
Thèse Médecine 1979 N°35 - Bamako (MALI)
9. COULIBALY M.B.
"Etude épidémiologique et Bactériologique des Méningites à
Streptococcus pneumoniae et à Haemophilus influenzae dans
le district de Bamako (à propos de 1308 cas).
Thèse - Pharmacie Bko (Mali 1990)
10. Grove B.A., Kusecek B. et al
Clonal and variable properties of Neisseria meningitidis
isolated from cases and carriers during and after an epidemic
in the Gambia, West africa.
J. infect. dis. 1989 - Vol 159 : 686-700

11. Grove B.A., Abdillahi H, Poolman J.T., Achtman M.
Correlation of serological typing and clonal typing methods
for Neisseria meningitidis serogroupe A
J. Med. microbiol - 1988 - Vol 26 : 183 - 184

12. Dravé M.
Les formes comateuses des méningites purulentes
(A propos de 200 cas).
Thèse, Méd. Abidjan 1980 n°243

13. Duerden B.I.
Méningococcal infection
J. Méd. Microbiol. Vol 26 - 1988 - 161 - 187

14. Etienne S, Picq SS et Col
Méningocoque et Spiramycine : Etude de la sensibilité
de 6152 souches réunies en 10 ans.
Méd. Mal. Inf. 1987 N°1 : 9-14

15. Ferron A.
Bactériologie Médicale
12è Edit. 1984 - 103-115

16. Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT
Serotype antigens of Neisseria meningitidis and a
proposed scheme for designation of serotypes.
Rev. Infect Dis 1985 - Vol 7 : 504-510

17. Gastinel P.
Precis de bactériologie Médicale
2è Ed. Refondue - Masson et Cie

18. Gotschlich EC.
Development of polysaccharide vaccines for the prevention
of meningococcal disease
Monograph Allergy 1975 - Vol 9 ; 245-258

19. Iknane Akory Ag.
Tolérance et Efficacité du vaccin combiné contre la Fièvre
jaune et la Méningite cérébrospinale.
Thèse Méd. Bko 1988

20. KEITA et COL
Quelques aspects bactériologiques des méningites purulentes
à Bamako.
Mali, Méd. 1981 n°2

21. KOUMARE B.
Méthodes de diagnostic biologique rapide des méningites
purulentes.
Mali, Méd. 1981 N°2

22. KOUMARE B.
Les antibiotiques utilisés dans le traitement des méningites
Mali, Méd. 1981, N°2, 81-82
23. Keylen Thérèse (Epouse Ouedraogo)
Les Méningites Cérébrospinales en Haute Volta
Thèses, Méd. DAKAR, 1984, N°2, 99
24. Kil JJ, Mandrell RE, Hu Z, Westerink MA, Poolman JT,
Griffiss J Mcl.
Electromorphic characterization and description of conserved
epitopes of the lipooligo saccharides of groupe A Neisseria
meningitidis.
Inf. immun. 1988 Vol 56 - 2631 - 2638
25. Le Minor L., Véron M.
Bactériologie Médicale
Flammarion ED, 1982, 232-347
26. Lecamus JL, Touzé JE et col.
Les Infection à méningocoques
Enc.Médico - Chir. (Paris), 8013A 10,9 - 1989
27. Lapeyssonnie L.
Les méningites à méningocoques
Méd. d'Af. Noire, 1979, Vol 26 : 545-559
28. Lapeyssonnie L.
La méningite cérébrospinale en Afrique
Bull W.H.O. - Vol 28 - 1963, 3-114.
29. Margairaz A.
Abrégé de pathologie infectieuse
Masson Ed. 1975
30. Meyrau M., Thabaut A.
Neisseria et Antibiotiques
Antibiogramme 1ère Ed., mpc Vidéon, 73-79 : 1985
31. Niantao A.I.
"Méningite cérébro-spinale - Etude prospective sur
l'épidémiologie de la Méningite cérébrospinale au Mali".
Thèse Méd. N°10 Eko 1977
32. OMS
Manuel des techniques de base pour le Laboratoire médical.
1982 Genève
33. OMS
Surveillance des maladies à méningocoque
Rélévés épidémi. Hebd. 1978, N°35

34. OMS
Vaccins antiméningococciques polysidiques
Rélevés épidém. Hebd. 1978 - N°43
35. OMS
Surveillance des affections méningococciques
Rélevés épidém. Hebd. 1981 - N°29
36. OMS
Surveillance de la méningite à méningocoque
Rélevés épidém. Hebd 1980 - N° 30
37. OMS
Surveillance de la méningite bactérienne
Rélevés épidém. Hebd. 1980 - N°30
38. Picq SS, S. Etienne (J)
Prophylaxie de la méningite cérébrospinale dans les armées et vaccination anti-méningococcique
Méd. Mal. inf. 1984 N° spécial - 97-103.
39. Perreve Ch. C
Les méningites purulentes en Haute Volta.
Thèse Méd. Clermont-Fernand 1978
40. Pilly E.
Infections à Pneumocoque et à Méningocoque in Maladies infectieuses.
8è édition - 1984 - 136-138.
41. Peltier D.
La méningite cérébrospinale en Afrique Occidentale Française et au Togo au cours des dernières années.
Off. Inst. Hyg. Publ. Bull 1946 - Vol 38 : 935-953.
42. Raymond EJ, Cluzel R. et Col
Les nouveaux antibiotiques utilisés dans le traitement des méningites purulentes de l'Enfant
Méd. Mal. inf. 1972, N°10 - 329-338
43. SOKONA H.
"Etude épidémiologique et bactériologique des méningites purulentes dans le district de Bamako (à propos de 360 prélèvements).
Thèse - Pharmacie Bko - 1988 N°14 Mali
44. Senghor (G), Fall (M) et Col.
Les méningites néonatales
Méd. d'Afrique Noire, 1979 - N°11, 854-857
45. SANOGO (Zimogo ZIE)
Contribution à l'étude de la méningite cérébrospinale au Mali.
Thèse Méd. Bko, 1981 - N°5

46. Sanou

Les formes comateuses de méningites purulentes
(sur 10 années : 1961-1970).

Thèse Méd. Dakar 1974, N°4

47. SOW A., Denis F

Les formes non méningococciques

Méd. d'Af. Noire 1979, Vol 26, 561-577

48. THERA D.

"Etude Epidémiologique et Bactériologique des méningites
à méningocoque dans le district de Bamako, à propos de
1295 cas recensés de 1979 à 1989".

Thèse - Pharmacie Bko 1989 N°11 Mali

49. Tikhomirov E.

Meningococcal meningitidis : global situation and control
measures

Wld. Hlth. Statist. Quart. 1987, N°2 98-109

50. Traoré S.A.

Evolution de la résistance de bactéries aux antibiotiques
au Mali de 1980 à 1988

Thèse Pharmacie - Bko 1988

51. Triaou (R), Roum McInt Zeff (M)

La vaccination anti-méningococcique

Méd. Mal. Inf. 1984, N° hors série, 85-94

52. Tsai CM, Frasch CE, Mocca LF

"Five structural classes of major outer membran proteins
in Neisseria meningitidis"

J. of Bacteriology 1981. Vol 46 : 69-78

53. Tinsley CR, Heckels JE.

"Variation in the express of pili and outer membran
preteins by Neisseria meningitidis during the course of
meningococcal infection".

J. of General Microbiology 1986 - Vol 132 : 1483-2490

54. Veyssier (P)

Affections à méningocoques

Enc. Méd. chir. (Paris) 9 - 1976 - Mal Inf 8013 à 10

55. Zarouf. M.B.M

Traitement des méningites Purulentes

Thèse Méd. Dakar 1971 - N°18

ANNEXES

ANNEXES

+ Composition des solutions lug :

2 x Lug : Utilisé pour la dissolution des protéines membranaires

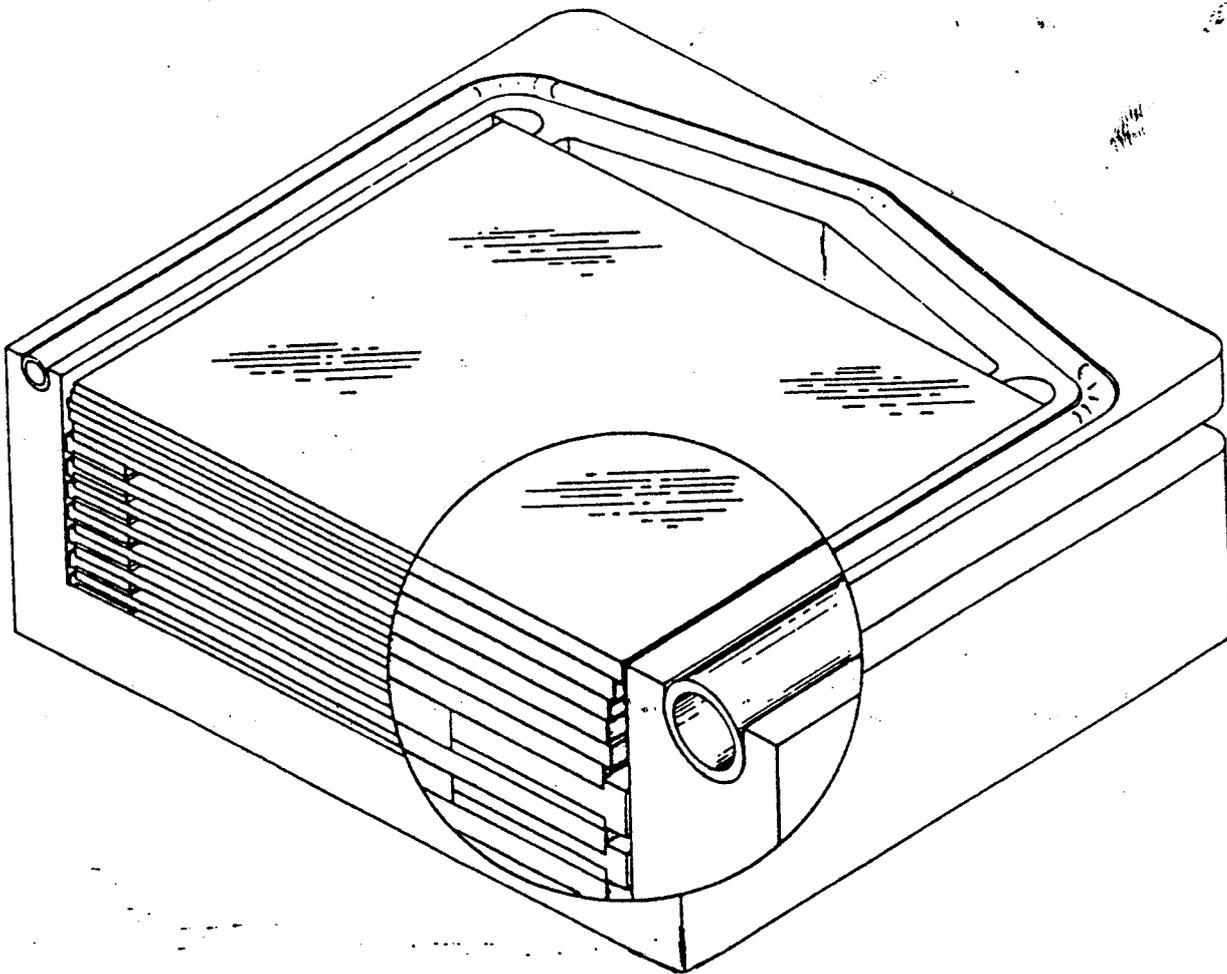
0,25M Tris pH6,8.....	25 ml
SDS.....	2 g
Glycérol.....	10 ml
B- Mercaptoéthanol.....	5 ml
Bleu de Bromophénol à 0,1%.....	2 ml
q.s.p.....	50 ml d'eau distillée.

5 x Lug : Utilisé comme tampon au moment de l'électrophorèse

Tris (hydroxyméthyl) aminométhane....	15,125 g
Glycine.....	71,32 g
q.s.p.....	1000 ml d'eau distillée

+ Composition du PBS

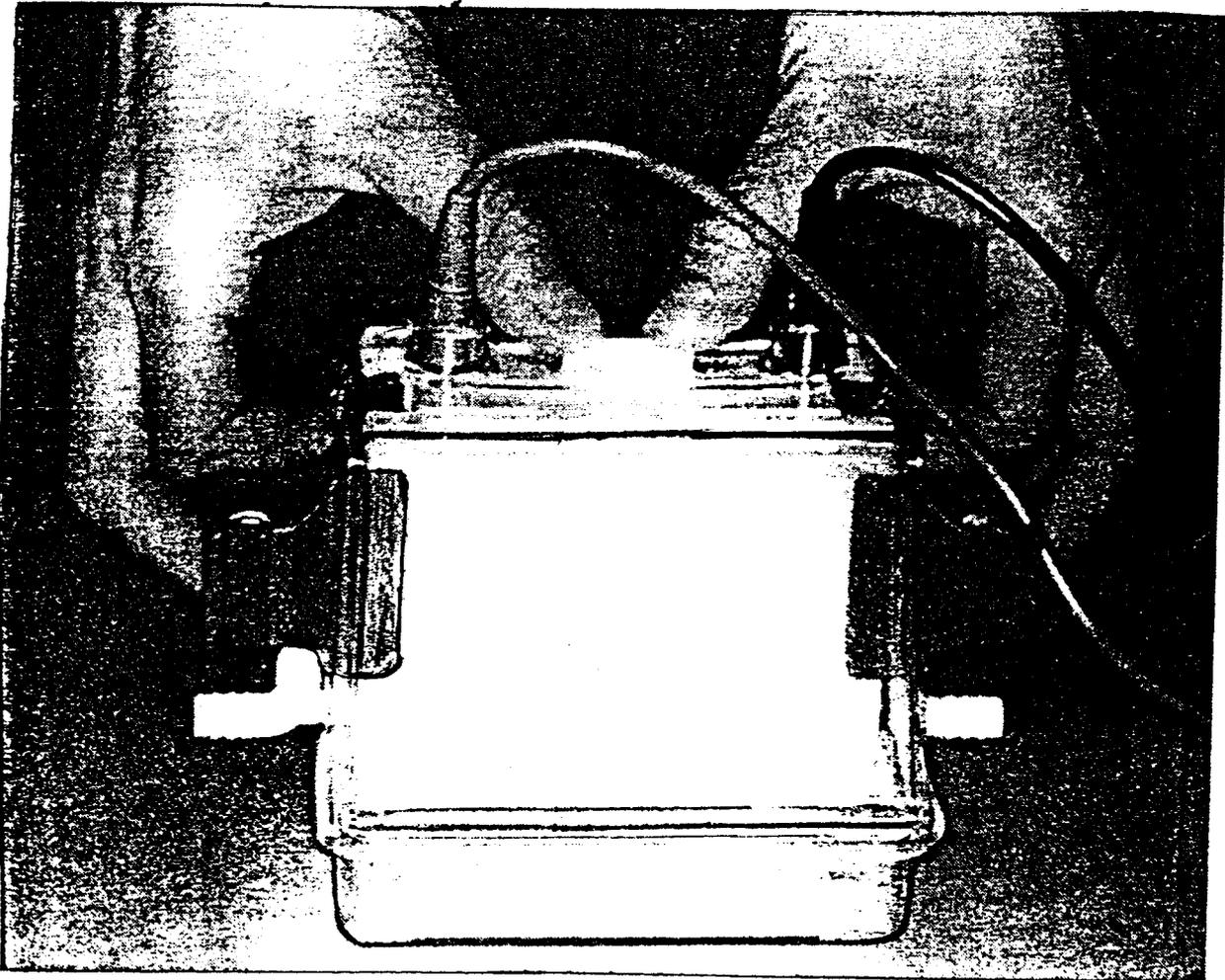
Na cl.....	8 g
Kcl.....	0,2 g
KH PO	0,2 g
Na H PO , 2H O.....	3,6 g
q.s.p.....	1000 ml d'eau distillée



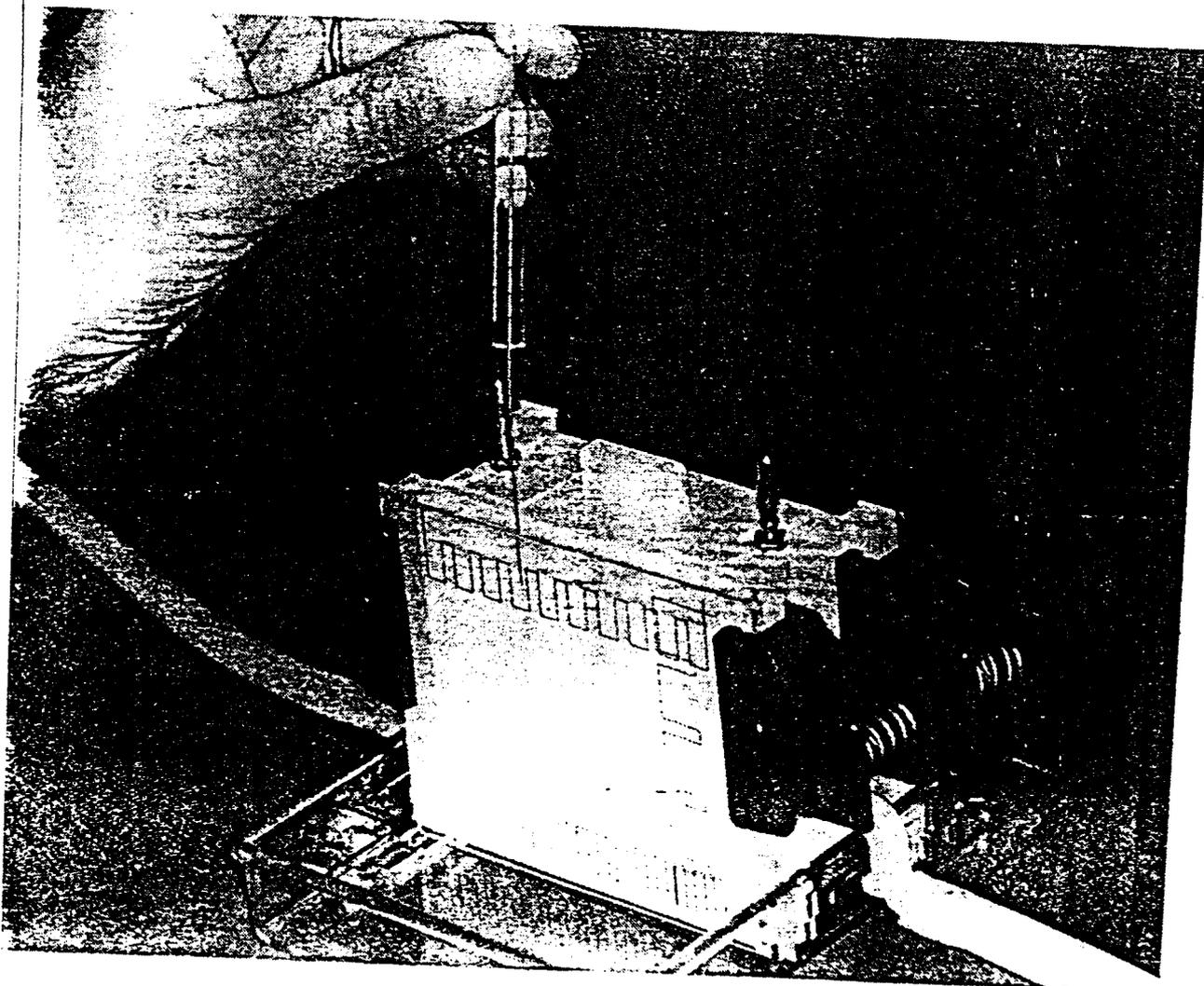
"Multiple gel caster"

Appareil utilise' pour le SDS-Page

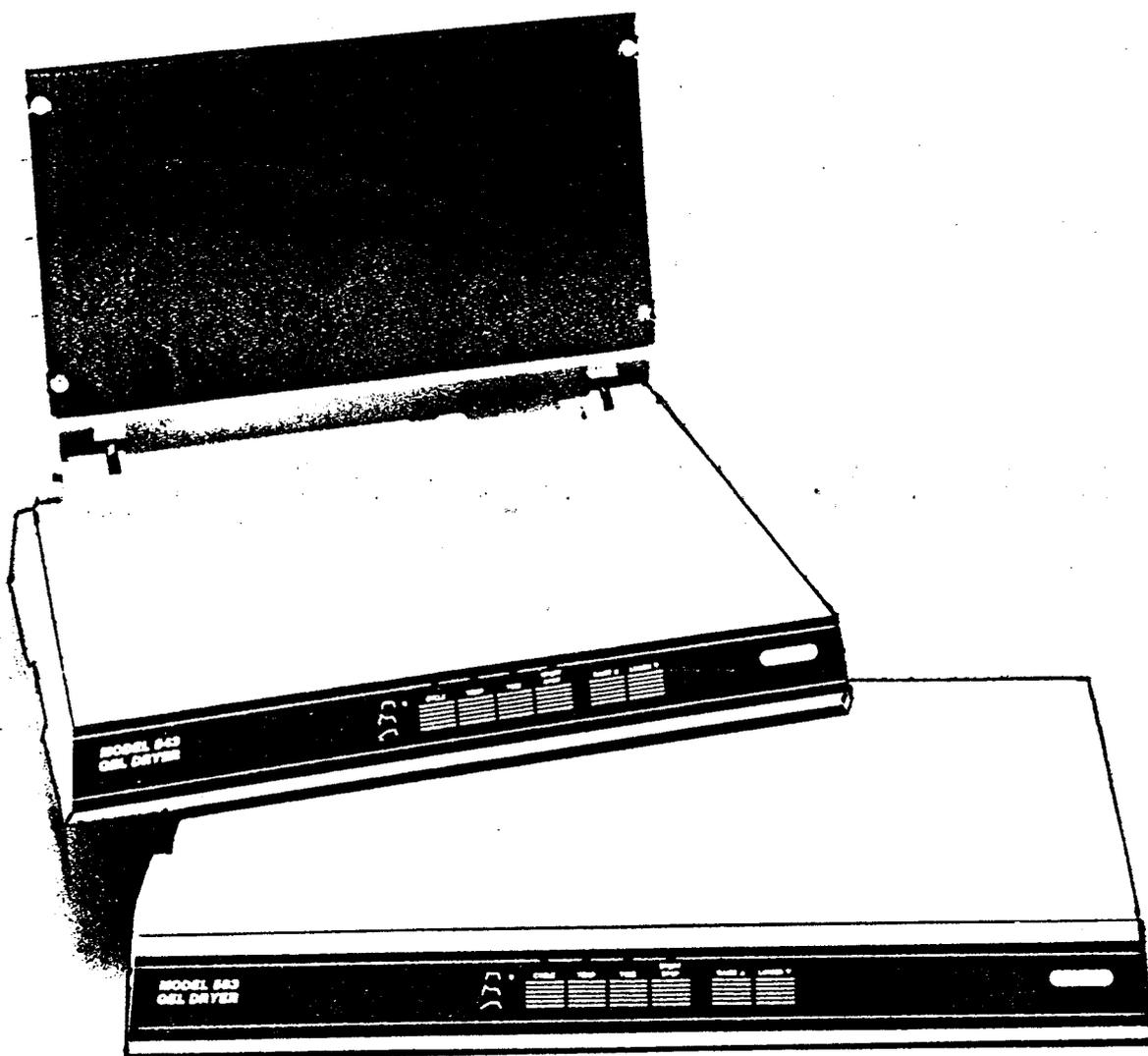
"ES 250 Mighty Small II"



Dépôt des échantillons de membranes au niveau
des différents puits

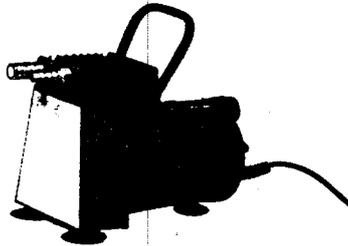


"Gel Dryer"

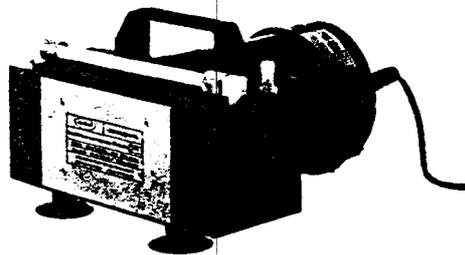


Different types of "Vacuum pump"

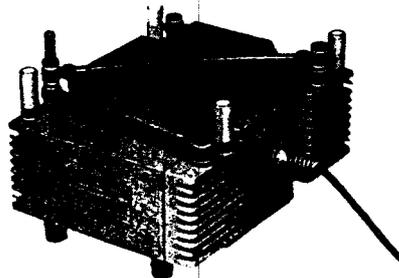
①



②



③



Nom : SIDIBE

Prénom : Djénèba

Titre de la Thèse : Epidémiologie moléculaire de la méningite à Méningocoque au Mali en 1990. (Partie II)

Année : 1989-1990

Ville de Soutenance : Bamako

Pays d'origine : Mali

Lieu de dépôt : Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie

Secteur d'intérêt : Identifier les classes de protéines de la membrane externe du méningocoque les plus immunogènes et, déterminer leur réactivité aux différents anticorps monoclonaux afin d'élaborer un vaccin de 2ème génération susceptible d'immuniser les populations pendant une longue période.

RESUME

Pendant une période de 12 mois, de Décembre 1989 à Décembre 1990, 169 prélèvements de liquides céphalorachidiens ont été analysés au Laboratoire de Bactériologie de l'Institut National de Recherche en Santé Publique dont 116 positifs.

Les liquides sont prélevés chez les sujets âgés de 3 jours à 56 ans.

Le Méningocoque (38,78 %) occupe la 1ère place dans la fréquence d'isolement avant Streptococcus pneumoniae (30,17 %) et Haemophilus influenzae (26,72 %).

L'évolution des cas de méningites à méningocoque recensés de 1989 à 1991 dans le Laboratoire de l'INRSP, montre une prédominance de séro groupe C sur le séro groupe A ces dernières années.

L'application des techniques de biologie moléculaire a montré que toutes les souches de méningocoques A et C comportent les protéines de classe 1 et 5 qui sont les plus immunogènes.

Avec le variant Y de la protéine de classe 1 des souches de séro groupe C, l'anticorps monoclonal correspondant a donné de bon résultat. Cet anticorps anti-P1.Y semble être spécifique aux souches maliennes.

Mots clés : Méningite - Méningocoque - Epidémiologie moléculaire

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et des Condisciples :

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

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

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

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

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.