

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple - Un But - Une Foi

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI ANNEE 1991

EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA MENINGITE A MENINGOCOQUE AU
MALI 1990. PARTIE I

n° 10

T H E S E

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 23 JUILLET 1991 DEVANT
L'ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

PAR AMADOU DIADIE TRAORE

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(DIPLOME D'ETAT)

EXAMINATEURS

PRESIDENT : Professeur Abdoulaye Ag Rhaly

MEMBRE Professeur Brehima Koumare
Professeur Mamadou Marouf Keita
Professeur Gaoussou Kanoute

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	Secrétaire Général

D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeur Mamadou Lamine TRAORE	Chef de D.E.R. Chirurgie
Professeur Aloiu BA	Ophtalmologie
Professeur Bocar SALL	Ortho. Traumat. Secourisme
Professeur Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Professeur Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Professeur Abdou Alassane TOURE	Ortho-Traumat
Professeur Amadou DOLO	Gynéco-Obstétrique

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Madame SY Aïda SOW	Gynéco-Obstétrique
Docteur Kalilou OUATTARA	Urologie
Docteur Mamadou L. DIOMBANA	Odonto-Stomatologie
Docteur Djibril SANGARE	Chirurgie Générale
Docteur Salif Diakité	Gynéco-Obstétrique
Docteur Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
Docteur Alhousséini Ag MOHAMED	D.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 D.E.R.)
Professeur Siné BAYO	Anatomie-Path.
Professeur Gaoussou KANDUTE	Chimie analytique

2. DOCTEURS D'ETAT

Professeur Yéya Tiémoko TOURE	Biologie
Professeur Amadou DIALLO	Biologie-Génétique

3. DOCTEURS 3° 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 Ogobara DOUMBO	Parasitologie
Docteur Abderhamane S. MAIGA	Parasitologie

Docteur Anatole TOUNKARA	Immunologie
Docteur Amadou TOURE	Histo-Embryologie

5. MAITRES ASSISTANTS

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

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeur Souleymane SANGARE	Pneumo-phtisio(chef de D.E.R.)
Professeur Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Professeur Aly GUINDO	Gastro-Enterologie
Professeur Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Professeur Mahamane MAIGA	Néphrologie
Professeur Ali Nouhoum DIALLO	Médecine Interne
Professeur Baba KOUMARE	Psychiatrie
Professeur Moussa TRAORE	Neurologie
Professeur Issa TRAORE	Radiologie
Professeur Mamamdou M. KEITA	Pédiatrie
Professeur Eric PICHARD	Médecine Interne
Professeur Toumani SIDIBE	Pédiatrie

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Balla COULIBAMY	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 D.E.R.)
---------------------------	---------------------------

2. MAITRES ASSISTANTS

Docteur Boukassoum HAIDARA	Législ. Gest. Pharm.
Docteur Elimane MARIKO	Pharmacodynamie
Docteur Arouna KEITA	Matieres Médicales
Docteur Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique

3. DOCTEURS 3° CYCLE

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

D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeur Sidi Yaya SIMAGA	Santé Publique (chef D.E.R.)
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 Souléymane TRAORE	Physiologie Générale
Professeur Salikou SANOGO	Physique
Professeur Daouda DIAALO	Chimie Générale et Min.
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 Souléymane GUINDO	Gestion
Docteur Mrs Sira DEMBELE	Maths
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mrs MAIGA Ftoumata SOKONA	Hygiène du Milieu

ASSISTANTS

Docteur Bah KEITA	Pneumo-Phtisiologie
Docteur Hamar A.TRAORE	Medecine Interne
Docteur Sékou SIDIBE	Ortho-Traumatologie
Docteur Abdoul K.TRAORE dit DIOP	Chirurgie Générale
Docteur Flabou BOUGODOGO	Microbiologie
Docteur Moussa Y.MAIGA	Gastro-Entérologie
Docteur Abdoul K.TRAORE	Medecine Interne
Docteur 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
Professeur Léopold TCHAKPE

Pharmacie Chimique
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.G.T.
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.Segoninko
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.

S O M M A I R E

PAGES

PARTIE THEORIQUE

Introduction.....	1
MENINGOCOQUE	5
- 1 = Definition	5
- 2 = Historique	5
- 3 = <u>CARACTERES BACTERIOLOGIQUES</u>	7
- 3 - 1 = Habitat	7
- 3 - 2 = Morphologie	7
- 3 - 3 = Caractères Culturels	7
- 3 - 4 = Caractères Biochimiques.....	7
- 3 - 5 = <u>CARACTERES ANTIIGENIQUES</u>	7
- 3 - 5 - 1 = Les C.P.S = (polysaccharides capsulaires)	9
- 3 - 5 - 2 = Les Pili.....	11
- 3 - 5 - 3 = Les L.P.S.....	11
- 3 - 5 - 4 = Les O.M.P = (proteines de la membrane externe).....	12
- 4 = <u>POUVOIR PATHOGENE</u>	15
- 4 - 1 = La Méningite à meningocoque	15
- 4 - 2 = Septicémie	16
- 5 = <u>DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE</u>	18
- 5 - 1 = Examen macroscopique	18
- 5 - 2 = Cytologie	22
- 5 - 3 = Bactériologie.....	22
- 5 - 4 = Technique immunologique.....	24

- 6 =	<u>TRAITEMENT</u>	25
	<u>TECHNIQUE D'ETUDE DES PROTEINES DE LA MEMBRE EXTERNE</u> .	27
- 1 =	<u>Le SDS - PAGE</u>	27
- 1 - 1 =	Principe	27
- 1 - 2 =	Methodes	28
- 1 - 3 =	Appareil utilisé	29
- 1 - 4 =	Produits chimiques et Reactifs.....	30
- 2 =	<u>Technique du Whole cell Elisa</u>	32
- 2 - 1 =	Principe	32
- 2 - 2 =	Methode	33
- 2 - 3 =	Appareil Utilisé	33
- 2 - 4 =	Produits chimiques et reactifs utilisés.....	34
- 3	<u>l'Analyse clonale</u>	35

Partie expérimentale

Etude des Meningites Purulentes Diagnostiquées de 1989 à 1990 à INRSP

=	<u>Sujets etudies et Methodes</u>	-----	38
- 1 =	<u>Sujets etudies</u>	-----	38
- 2 =	<u>Methodes</u>	-----	38
- 2 - 1	<u>Techniques Bacteriologiques</u>	-----	38
- 2 - 2	<u>Etude des Proteines de la membrane Externe</u>	-----	39
)	<u>Le SDS - PAGE</u>	-----	39
1 =	Extraction de la membrane pour le SDS-PAGE	-----	40
2 =	Mode operatoire	-----	40
)	<u>Le Whole cell ELISA : Elisa avec les cellules entieres)</u>	--	41
1 =	Les anticorps monoclonaux	-----	41
2 =	preparations des souches pour l'ELISA avec les cellules entieres	-----	41
3 =	Mode operatoire	-----	43
- 2 - 3	<u>Isolement des lymphocytes</u>	-----	43
- 2 - 4	<u>Prelèvement de Gorge</u>	-----	44
- 2 - 5	<u>Congelation des souches</u>	-----	45
I.	<u>Resultats</u>	-----	45
- 1 =	<u>Les prelevements effectues</u>	-----	45
- 1 - 1	<u>Provenance des prelevements de LCR</u>		
- 1 - 2	Repartitions des 155 LCR troubles en fonction de la periode de prelevement	-----	46
- 1 - 3	Repartition en fonction du sexe	-----	47

- 2	<u>Resultats Bacteriologiques</u>	-----	47
- 2 - 1	Repartition des LCR en fonction des germes identifies	-----	47
2- 2	Repartition des Neisseria en fonction des serogroupes	-----	48
- 2 - 3	Sensibilite aux antibiotiques	-----	49
- 3	<u>RESULTATS DES ETUDES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE</u>	-----	50
- 3 - 1	Resultats des tests effectues à Berlin	-----	50
- 3 - 2	Resultats des tests effectues à Bamako	-----	52
- 3 - 3	<u>Etude Comparative des meningocoques de serogroupe C et de serogroupe A par la technique du SDS-PAGE</u>		53
- 3 - 4	<u>Interpretation des resultats</u>	-----	53
I.	<u>Discussion</u>	-----	56
- 1	Repartition des LCR en fonction du mois	-----	56
- 2	Frequence des germes identifies	-----	56
- 3	Repartition des Neisseria suivant le serogroupe	-----	56
- 4	Repartition en fonction du sexe	-----	56
- 5	Sensibilite aux antibiotiques	-----	57
- 6	Le Whole cell ELISA des souches maliennes	-----	57
	<u>Conclusion</u>	-----	57
	<u>Bibliographie</u>	-----	

D E D I C A C E S

ette thèse est dédiée:

toutes les victimes de la meningite.

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.

Mon Père

Jamais nous ne saurons te rendre un hommage à la hauteur des efforts consentis pour nous.

Je t'en remercie d'avoir fait de nous ce que nous sommes aujourd'hui.

Tu seras toujours pour mes frères et moi un exemple. Les mots sont faibles pour te témoigner tout mon amour.

Ma Mère.

Pour ton dévouement ton courage, ton amour sans partage, ton esprit de sacrifice. Le tout puissant à en fin exaucé tes prières.

Puisse, il te donner longue vie pour goûter le fruit de ce travail.

Les mots ne peuvent exprimer mes sentiments pour toi.

Mamy Traoré

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

Que votre âme repose en paix et qu'il vous accorde le paradis éternel.

Adieu Niamoye, Mamadou Diadié, Moussa, Mariam, Djelika Ibrahim, Aïcha, Mahamed et Tata.

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

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

Adieu tous mes cousins, cousines

mon Ami Moustaphe Danté

Adieu fraternellement arraché à notre affection. Soyez assuré du fond des entrailles de notre fidèle attachement et de notre amour.

isse le "tout puissant " vous accorder le paradis éternel
tous mes Amis et Amies.

ur tout l'intérêt que je porte à l'amitié sincère.

Monsieur Djedani Coulibaly

e ceux que je n'ai pu citer dans ces espaces étroits
villent bien me pardonner.

mes tantes

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

mes Oncles.

Jamais je ne saurais suffisamment vous remercier pour ce que
vous avez témoigné à mon endroit.

es mots me manquent pour vous exprimer ma gratitude.

REMERCIEMENTS

Au corps professoral de l'ENMP pour la qualité de
enseignement dispensé et sa disponibilité, nous disons merci.

tout le personnel de L'ENMP.

tout le personnel du service de bactériologie de l'INRSP pour
l'accueil fraternel qui nous a été réservé.

monsieur Mamadou CISSE Asistant au projet meningite.

ewary Doumbia Technicien, Monika Bopp votre collaboration à été
déterminante dans l'élaboration de ce travail.
oute ma profonde reconnaissance.

onsieur Achtman Mark. Pour votre faite disponibilité à participer
ans l'élaboration de ce travail.

oyez assuré de l'expression de notre profonde gratitude.

tout le personnel du service de pédiatrie de l'Hôpital Gabriel
ouré.

Monsieur Bema, Natié, Mme Sangaré et Mme Coulibaly pour votre
déterminante collaboration durant la réalisation de ce travail.

Monsieur Karim Camara du lazaret des roches dont la gentillesse et le Devouement ne nous ont jamais fait défaut.

Ma collaboratrice Djéneba Sidibé, et à tous mes collègues de l'INRSP, Haba Traoré, Daouda Kone, Mama Konate en souvenir du temps passé.

Dorrine Sidibé pour votre sympathie

Melle Néné Sy pour votre parfaite disponibilité.

Toute la promotion 84-1990 courage et bonne chance

Tous les Etudiants de L'ENMP.

Tout le personnel de la pharmacie du 2ème pont pour le soutien indéfectible et leur chaleur humaine.

A nos Juges

notre président de jury : Le professeur Abdoulaye AG Rhaly :

Agrégé en Médecine interne, Directeur Général de l'INRSP, chargé de cours à ENMP.

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse.

Votre sollicitude permanente, la qualité de vos cours, vos qualités humaines, vos conseils nous ont profondément marqués.

professeur Mamadou Marouf KEITA Agrégé en pédiatrie, chef de service de la pédiatrie à l'Hôpital Gabriel Touré, chargé de cours à l'ENMP.

Vous nous faites un grand honneur en acceptant avec enthousiasme de siéger à notre Jury de thèse malgré vos nombreuses occupations, vos éminentes qualités professionnelles et humaines sont connues de tous.

Puisse donc accepter, l'expression de notre profonde gratitude.

Le Professeur Gaoussou Kanouté

Docteur en chimie Analytique chef de laboratoire de contrôle des médicaments à l'INRSP, chargé de cours à l'ENMP.

Nous avons pu apprécier vos qualités d'homme compétent, votre simplicité et votre amabilité qui ont suscité notre admiration, soyez assuré de notre reconnaissance pour avoir accepté d'être parmi nos juges, et cela malgré vos multiples occupations, de siéger parmi nos juges.

A Notre Directeur de these le professeur Bréhima Koumaré,
régé en microbiologie, chef de DER des sciences fondamentale,
ef de service de la bacteriologie, Directeur général adjoint de
INRSP.

Vous nous avez suggéré le sujet de cette these et vous avez
ivi pas à pas son elaboration.

Par vos qualités de pedagogue averti et la munitie de votre
atique, vous nous avez facilité dans une large mesure
apprentissage de la bacteriologie.

Vos immenses qualités de professeur methodique et d'homme de
iences ne souffrent aucun doute.

Trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude et de
tre fidèle attachement pour la sollicitude que vous nous avez
moigné.

ABBREVIATIONS

ENP	= Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie
INSP	= Institut National de la Recherche en Santé Publique.
H	= Hôpital Gabriël Touré.
C	= Neisseria meningitidis de Serogroupe C
A	= Neisseria meningitidis de Serogroupe A
X	= Neisseria meningitidis de Serogroupe X
	= Streptococcus Pneumoniae
	= Haemophilus influenzae b
	= Antibiogramme
ni G.	= Penicilline G
L	= Chloramphenicol
R	= Liquide céphalorachidien
S	= Organisation mondiale de la Santé
	= Jour
	= Kilogramme
	= Kilo Dalton
l	= Gramme par litre
	= Millimètre
	= Millimètre Cube
	= Molaire
S	= Lipopolysaccharide
MP	= Protéine de la membrane externe
PS	= Polysaccharide capsulaire

ITS	= Type électrophorétique
µg	= Milligramme
1°	= Numéro
%	= Pourcentage
♀	= Féminin
♂	= Masculin
µ	= Micron
S	= Sensible
R	= Résistant
T	= Total
UI	= Unité Internationale
IM	= Intra musculaire
IV	= Intra Veineuse
CFI	= concentration minimum inhibitrice
MnCSm	= Meningite Cerebrospinale à Meningocoque
SDS - PAGE	= Sodium dodecyl sulfate = Electrophorese sur Gel de polyacrylamide
Whole cell ELISA	= ELISA de la cellule entiere
AC	= anticorps
Ag	= antigene
Fc	= Fraction Cristalisables
E	= Enzyme
S	= Substrat
ES	= complexe enzyme substrat
Lug	= tampon pour le SDS -PAGE
PBS	= tampon phosphate
Tween	= detergent

I N T R O D U C T I O N

La meningite cerebrospinale à meningocoque sevit partout dans le monde avec cependant une implantation préférentielle dans certaines zones l'Afrique, d'Amérique latine et en Chine.

Sur un fond endémique permanent élevé se greffent des épidémies épidémiques d'une périodicité de 10 ans environ (21) bien décrites en Afrique au sud du Sahara dans la classique ceinture de meningite de Lapeyssonnie; cette zone s'étend de la façade méditerranéenne à la corne de l'Afrique. Au Mali les cas déclarés de meningites s'étendent tout le long de l'année avec un pic en avril.

Quatre vagues successives d'épidémies de meningite à meningocoque ont secoué l'Afrique de l'Ouest pendant ces vingt dernières années presque toutes étaient dues au meningocoque serogroupe A ; le nombre de cas dus aux autres serogroupes homologues B et C n'a pas été très important (21).

Depuis 1988 au Mali le serogroupe C prédomine et les dernières épidémies survenues en Avril 1990 à Kolokani et en Avril 1991 à Lakana étaient dues à ce serogroupe.

A partir de 1974 un vaccin polysaccharidique a été utilisé sur terrain. Ce vaccin confère une immunité de courte durée excédant pas 3 à 5 ans .

Etant donné le génie épidémiologique de la meningite à meningocoque (des épidémies importantes environ tous les 10 ans) la vaccination de toute la population s'impose tous les 5 à 10 ans pour entretenir un niveau d'immunité efficace au sein de la population et arrêter la progression de l'épidémie, le coût d'une telle campagne est très élevée.

De nombreuses équipes de chercheurs à travers le monde travaillent à mettre au point un vaccin de 2^{ème} génération susceptible d'immuniser les populations pendant une plus longue période; de tels vaccins devraient contenir en plus du polysaccharide capsulaire des protéines de la membrane externe du meningocoque.

Or il se trouve que les protéines de la membrane externe (OMP) sont le plus souvent variables pour les souches à l'intérieur d'un même serogroupe.

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.

Dans cette partie I de l'étude de la structure des meningocoques nous avons utilisés les techniques suivantes :

Technique du SDS - PAGE

Technique du whole cell Elisa

Technique de l'analyse clonale

Ce travail collaboratif entre l'INRSP et l'institut Max - Planck de Berlin a pour buts :

d'isoler et d'identifier à partir des LCR prélevés chez les malades des bactéries responsable de la méningite

Tester la sensibilité aux antibiotiques des souches de meningocoques isolées.

réaliser sur ces souches une étude des protéines de la membrane externe par des techniques de biologie moléculaire.

Prelever des échantillons sanguins chez les malades et les porteurs sains de meningocoque en vue d'un isolement de lymphocytes.

Ces lymphocytes seront soumis à la technique de fusion cellulaire à Berlin pour la production d'anticorps monoclonaux

PARTIE THEORIQUE

MENINGOCOQUE

GENERALITES

1 DEFINITION

La meningite bacterienne est une inflammation des méninges et espaces sous arachnoïdiens par des bacteries pyogenes.

Cette inflammation, quelque soit la nature du microbe ou du virus qui la provoque se traduit par des modifications du liquide cphalorachidien.

2 HISTORIQUE :

La meningite cérébrospinale fut decrite pour la première fois, avec précision en 1836, à l'occasion de l'epidemie qui avait frappé une garnison de Basses Pyrénées en France et avait gagné par des déplacements de cette garnison, toutes les villes aversées (20)

En 1887 weichselbaum decouvre un diplocoque en grain de café au Négatif dans le liquide cephalorachidien des sujets atteints de meningite.

L'intervention de la ponction lombaire par Quincke en 1890 presente aussi une etape importante dans la connaissance des meningites purulentes.

En 1903, Weichselbaum, albrecht et Ghon arrivent a établir avec certitude que le meningocoque est l'agent de la meningite cérébrospinal

En 1908 Flexner et Dopter preparerent un serum antimeningococcique et la serotherapie polyvalente fit baisser le taux de mortalité . Mais après quelques années les echecs de cette thérapeutique furent de plus en plus frequentes.

En 1933 Domagk decouvre la sulfamido chrysoïdine synthetisée en France sous le nom de rubiazol ou Prontosil

En 1940 la penicilline decouverte par flemming en 1925 est employée à oxford par florey; chain et collaborateurs dans le traitement des meningococcies. Son utilisation a amélioré le pronostic des formes severes.

Des 1949 le chloramphenicol s'est révélé comme un des antibiotiques les plus actifs.

Les vaccins dont on dispose actuellement sont dirigés contre les meningocoques A, C, Y, W135. Ce sont des vaccins polysaccharidiques efficaces contre le serogroupe de meningocoque à partir duquel le vaccin a été préparé. L'extraction du polysaccharide capsulaire se fait par des techniques physico-chimiques à partir de la culture de meningocoque.

Chaque dose vaccinante contient 50 µg de polysaccharide du type purifié. Sa durée de conservation sous forme lyophilisée est de 2 ans entre +4° et +8°C. Après reconstitution à l'aide de sérum physiologique préalablement rafraîchi, le vaccin mis à l'abri de la lumière et de la chaleur doit être utilisé rapidement par voie intracutanée.

On dispose de vaccin monovalent A et C, bivalent A + C et tétravalent A + C + Y + W135.

Ces vaccins polysaccharidiques monovalents ou polyvalents ont permis durant la dernière décennie de diminuer la morbidité et la mortalité dues à l'infection meningococcique.

- 3 Caractères Bactériologiques

Neisseria meningitidis a été découvert en 1887 par Weichselbaum dans le liquide céphalo-rachidien des sujets atteints de méningite que il l'appella Diplokokkus intracellularis meningitidis (21)

- 3 - 1 Habitus (34)

C'est un germe strictement humain, commensal des muqueuses du nasopharynx. on le retrouve chez le porteur sain et le malade

- 3 - 2 MORPHOLOGIE

Neisseria meningitidis a la forme d'un diplocoque gram négatif symétrique en grain de café chaque coque mesure 0,8 à 1 micron de diamètre.

- 2 - 3 Caractères cultureux (34)

C'est un germe aérobie strict, nécessitant pour sa culture des lieux enrichis. La culture se fait sur la gélose au sang cuit ou sur milieu synthétique dans une atmosphère enrichie à 10% de CO₂. La température optimum est de 36°C et le PH optimum = 7. En 24 heures à 36° - 37 °C les colonies sur gélose enrichie sont petites, rondes bombées, lisses.

- 3 - 4 Caractères Biochimiques

Neisseria meningitidis possède une oxydase, une catalase. Il oxydise par voie oxydative le glucose, et le maltose.

- 3 - 5 Caractères antigéniques

Neisseria meningitidis possède une enveloppe cellulaire typique des bactéries gram négatifs, qui consiste en une membrane cytoplasmique, une couche de peptidoglycane, une membrane externe contenant des LPS et des protéines; plusieurs meningocoques portent une capsule polysaccharidique et des pili (10)

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

Les C.P.S (Polysaccharides capsulaires) qui determinent les
sogroupes

Les O.M.P (Proteine de la membrane externe) qui definissent
ntiellement les serotypes

Les L.P.S (Lipopolysaccharides) definissent partiellement les
rotypes.

- 3 - 5 - 1 Les C.P.S : Polysaccharides capsulaires

Les capsules consistent en des polysaccharides anioniques de grandes masses moléculaires et sont retrouvées dans les souches isolées à partir du sang et du LCR des patients atteints de méningite, les souches dépourvues de capsule provoquent rarement ces maladies. Les déterminants antigéniques sur les antigènes des P.S sont à la base de la classification de Neisseria meningitidis en serogroupes (6,14). Actuellement on connaît 13 serogroupes qui sont A, B, C, D, X, Y, Z, W135 29 E, H, I, K, L. B, et C, Constituent plus de 90% des souches isolées chez les patients .

La nature des CPS de différents serogroupes sont indiqués dans le tableau N°1

Tous les CPS purifiés ayant une masse moléculaire supérieure à 100 kilo daltons sont immunogènes à l'exception de celui du groupe B (17,35). La structure du CPS du groupe B est identique à celle du CPS des Escherichia coli k1 qui est une des causes majeures de méningite neonatale en Europe. Le meningocoque présente des communautés antigéniques non seulement entre groupes mais aussi avec d'autres espèces.

L'acide Gamma 2,8 Nacetyl neuraminique est retrouvé au niveau du polysaccharide du groupe B et de l'antigène capsulaire Escherichia Colik1

L'acide gamma 2,9 Nacetyl neuraminique constitue l'antigène du groupe C mais il est associé à l'acide gamma 2,8 Nacetyl neuraminique pour donner un heteropolymère d'Escherichia colik92 (28)

bleau N°1 Nature des polysaccharides capsulaire des
ringocoques des serogroupes : A, B, C, Y et W135 (7,8)

<u>ROGROUPE</u>	<u>Structure du CPS</u>	<u>Liaison</u>
<u>N. meningitidis</u>		
A	Homopolymere lineaire de Nacetyl monosamine phosphate	alpha 1-6
B	Homopolymere lineaire de l'acide Nacetyl neuraminique	alpha 2-8
C	Homopolymere de l'acide Nacetyl, O acetyle Neuraminique	alpha 2-9
Y	Copolymere lineaire du Glucose et de l'acide Nacetyl O acetyl Neuraminique	alpha 2-6
W135	Copolymere lineaire du galactose et de l'acide Nacetyl Neuraminique	alpha 2-6

3 - 5 - 2 Les pili

Les pili sont des polymères filamenteux apparaissant à la surface du Meningocoque et responsables de l'adhésion des germes aux cellules hôtes (3) le pilus est constitué d'une répétition de sous-unités protéiques appelée piline. Sa masse moléculaire varie entre 17 750 - 26 600 KD.

- 3 - 5 - 3 - Les L.P.S : lipopolysaccharides

Les LPS des meningocoques se trouvent avant tout sur la membrane externe (10, 36). Les meningocoques de différents serogroupes selon Jennings et Al ont des L.P.S de type R.

Les sucres retrouvés dans les L.P.S de surface des meningocoques sont les suivants :

glucose, galactose, glucosamine, Heptose et D - 3 Deoxyoctamine (8). Le déterminant antigénique pour la spécificité du sérotype est situé sur la partie glycosidique (19).

Les sucres de surface des L.P.S sont identiques chez les meningocoques différents et peuvent être libérés par les enzymes. Ils peuvent être séparés sur la base de leur proportion. Galactose : glucose pour lesquels les sucres de surface des serogroupes A, C et 29 E sont typiques avec une proportion de

2 : 2, 2 : 2, 2 : 1 : respectivement. Les principaux acides gras dans la portion du lipide A des L.P.S de serogroupe A, B, X et Y sont l'acide Bétahydroxylaurique et l'acide Bétahydroxymyristique (18, 19)

Les L.P.S sont formés d'un lipide A et d'une fraction polysaccharidique. Ils sont également antigéniques et définissent partiellement les sérotypes leur rôle dans le pouvoir invasif du meningocoque de serogroupe A a été envisagé par Mc -Leod et Griffiths.

Ces L.P.S entrent dans la composition d'une endotoxine.

La capacité des germes à libérer l'endotoxine peut être en relation avec la gravité de l'affection meningococcique.

En fonction des différentes structures biochimiques parietales Rasch a proposé un nouveau système de nomenclature des souches de meningocoques B, C, Y, W135, ainsi une souche « B : 2a : L : 3,7 » correspond à Neisseria meningitidis du groupe B, sérotype L.P.S = 2a, sérotype L.P.S = 3,7 avec possibilité de sous type. Cette nomenclature a un intérêt certain en effet il donne des informations très précises sur la souche de meningocoque en question (carte d'identité).

- 3 - 5 - 4 Protéines de la membrane externe (O.M.P = outer membrane protéins)

La membrane externe des meningocoques contient 2 à 5 protéines principales que l'on peut séparer par le SDS-PAGE (26 ;).

Il s'agit des protéines de classe 1, 2, 3, 4, 5, 6.

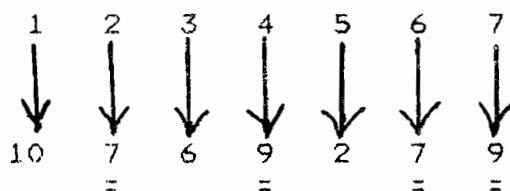
Les protéines de classe 1 de la membrane externe induisent des anticorps bactéricides spécifiques de type qui sont protecteurs dans un modèle expérimental utilisant le rat (26) cette protéine se retrouve chez tous les serogroupes.

Le sero sous-typage se fait essentiellement à partir des protéines de classe 1 et est utilisée pour la surveillance épidémiologique.

Il existe 7 variantes électrophorétiques des protéines de classe 1 qui correspondent à 5 sous-types serologiques. Elles sont :

VARIANTES ELECTROPHORETIQUES

SOUS-TYPES SEROLOGIQUES



Toutes les souches de meningocoques ont soit l'OMP de classe 1 soit l'OMP de classe 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 serotype observée.

Les protéines de classe 4 sont présentes dans toutes les souches en association avec les protéines de classe 2 ou 3; elles sont très constantes.

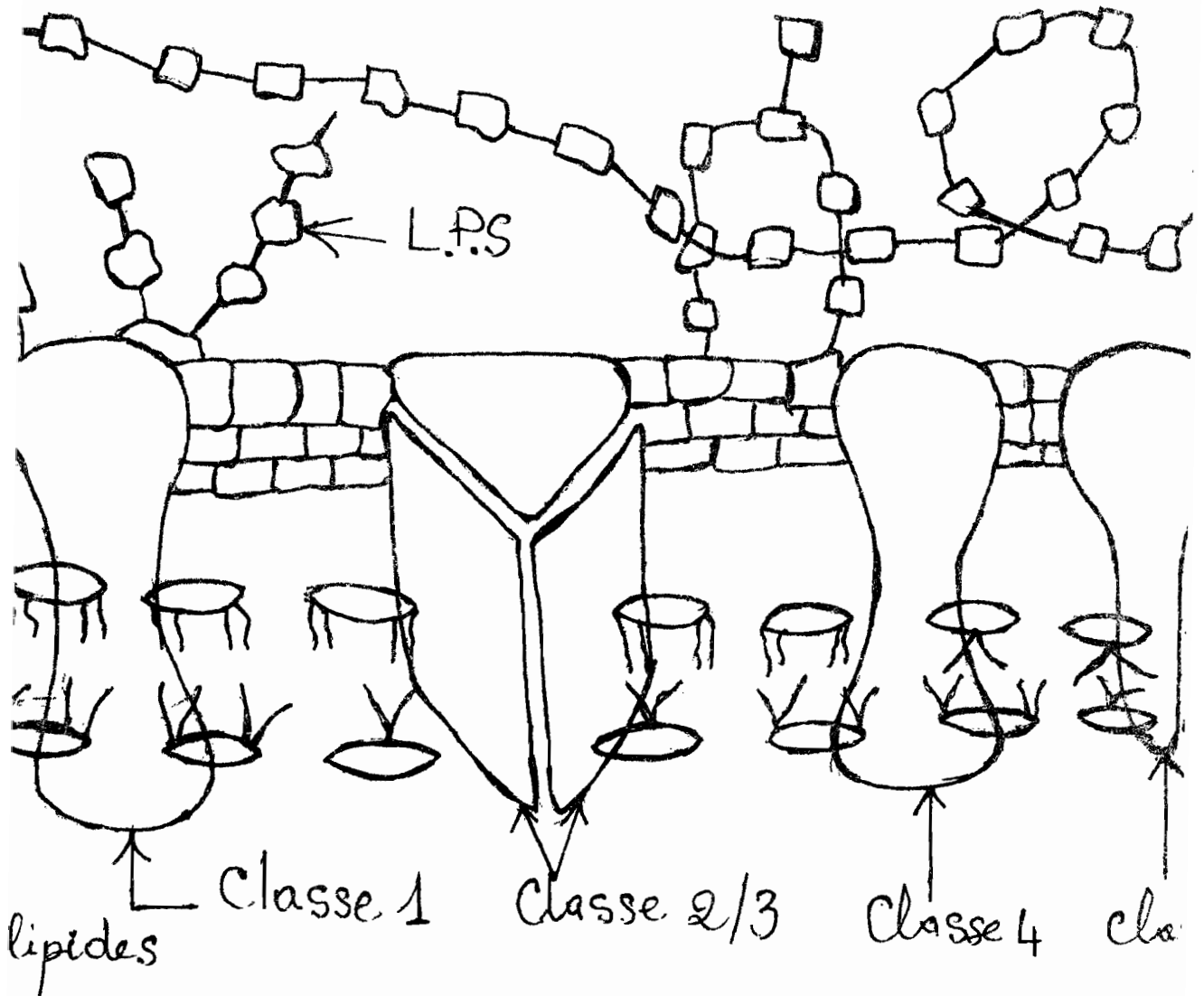
Les protéines de classe 5 montrent une hétérogénéité entre les souches et à l'intérieur des souches. Cette variabilité n'est pas seulement quantitative mais qualitative aussi, elles sont hautement immunogènes et peuvent induire la production d'anticorps bactéricides. Il y a des régions des protéines de classe 1 et de classe 5 presque identiques ; chez les souches de serotype différents ce qui explique les réactions croisées observées entre différents serotype et la présence apparent de plus d'un déterminant de serotype sur une seule souche démontrée par le "mapping" des peptides et les anticorps monoclonaux (11, 13, 23, 25).

Les protéines de classe 6 sont présentes uniquement chez certaines souches de serogroupe A (24)

Les résultats obtenus à partir des souches de meningocoque de serogroupe A ont montré que les anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines de classe 1 et les anticorps des volontaires sensibilisés avec les protéines de classe 1 ont une activité beaucoup plus élevée comparativement aux anticorps dirigés contre les protéines de classe 2 ou 3 d'où l'importance du sous-typage sérologique.

Le serotypage utilise les protéines de classe 2 ou de classe 3 qui s'excluent mutuellement ; toutes les bactéries de serogroupe A trouvées jusqu'à présent ont toutes la protéine de classe 3 de fait toutes les bactéries de ce serogroupe expriment l'une des deux variantes de cette protéine et appartient de ce fait à un seul type sérologique (24) appelé serotype 21 (15) ou serotype 4) selon les auteurs. Toutes les souches de meningocoques de serogroupe C sont de serotype 2a.

STRUCTURE DE LA MEMBRANE EXTERNE DU MENINGOCOQUE (14)



C.P.S : Polysaccharides capsulaires

L.P.S : Lipopolysaccharides

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

térêt Diagnostic des C.P.S

Ce sont des marqueurs épidémiologiques. Ils permettent de lier à l'insuffisance du diagnostic direct (germes rares).

térêt Vaccinal

Les vaccins polysaccharidiques jouent un rôle important dans la lutte contre des épidémies de meningite à meningocoque. Ils ont été préparés sous forme d'antigène monovalent, bivalents et trivalents. Les premières vaccinations de masse ont eu lieu en 1974 au Brésil.

- 4 Pouvoir Pathogène

L'homme est le seul réservoir de virus. La contamination est donc inter humaine. Le meningocoque se retrouve au niveau du nasopharynx. Il produit à ce niveau une rhinopharyngite mais sa présence peut passer inaperçue. Les porteurs de germes peuvent atteindre 80 % de la population en période d'épidémie; ils contribuent donc à la dissémination du germe.

Dans certains cas pour des raisons encore obscures le meningocoque manifeste son pouvoir pathogène et provoque deux infections d'ailleurs souvent associées :

la meningite et

la septicémie.

- 4 -1 LA MENINGITE A MENINGOCOQUE

Il s'agit d'une meningite purulente dont le début est brutal. Chez un sujet en bonne santé on note :

Syndrome meningé : comportant

cephalée violente

raideur meninge avec signe de Kerning et de Brudzinski

une photophobie

vomissement

hyperesthésie cutanée

syndrome infectieux

fièvre très élevée (39° 40°C)

herpes peribuccal

souvent Purpura et Arthrite

La meningite cerebrospinale du nourrisson est grave du fait de l'atypie des symptômes et de la fréquence des complications urologiques. Il faut évoquer le diagnostic devant un enfant brille, abattu somnolent ou au contraire agité.

Il existe des troubles digestifs, vomissement, diarrhées, l'apparition des signes neurologiques est évocatrice : crise convulsive, spasme du visage, paralysie oculomotrice.

La raideur de la nuque est souvent absente remplacée par une nuque molle, tombant en arrière lorsqu'on assoit l'enfant, on recherche une tension de la fontanelle en dehors des crânes, mais elles-ci peuvent manquer s'il existe une déshydratation.

La meningite cerebrospinale du veillard est rare, et est fréquemment compliquée par l'apparition de signes neurologiques : paralysie des nerfs crâniens, coma d'installation rapide, trouble du comportement, les manifestations articulaires, cardiaques, et atteinte pulmonaires.

- 4 - 2 - Septicémie

On regroupe dans ce cadre plusieurs dénominations : choc meningococcique, meningococcémie fulminante, septicémie à meningocoque, purpura fulminans et purpura infectieux sévère.

Quelque soit l'appellation employée, on retrouve dans tous ces cas un syndrome septicémique d'apparition brutale associé à un purpura vasculaire, rapidement évolutif et une défaillance circulatoire aiguë engageant le pronostic vital. L'enfant et le nourrisson sont concernés en priorité ; mais l'adolescent et l'adulte jeune peuvent être atteints.

5 Diagnostic bacteriologique

Le laboratoire joue un rôle essentiel; dans diagnostic biologique des meningites purulentes. L'utilisation courante des techniques rapides permet un diagnostic de presumption en un minimum de temps et avec un minimum de materiel.

Liquide cephalorachidien

Le prélevement requiert lors d'une ponction lombaire des précautions d'aseptise très strictes; afin d'éviter les germes de pollution le LCR recueilli dans 2 ou 3 tubes est très rapidement transporté au laboratoire, l'exposition au froid, à la chaleur et au transport est à éviter car le meningocoque y est très sensible.

Au laboratoire ce prelevement sera soumis aux différents examens suivants :

- 5 - 1 Examen macroscopique

- 5 - 1 - 1 Aspect

Le liquide cephalorachidien normal est limpide, incolore, comme " l'eau de roche "

liquide pathologique peut être :

Clair au debut de la maladie

trouble ou louche

Xanthochromique

Franchement purulent

Hemorragique

Le liquide hemorragique peut être dû à une ponction traumatique ou une hemorragie meningée.

L'aspect xanthochromique s'observe à la suite d'une hemorragie meningée évoluant depuis quelques temps ou au cours de certaines infections du nevraxe.

L'aspect trouble est provoqué par l'hypercytose. Dans tous les cas ; on effectue une culture systématique

- 5 - 1 - 2 CHIMIE DU LCR

L'examen biochimique concerne

protéine : hyper albuminorachie

Glucose : hypoglycorachie

Chlorure : normales ou abaissées

Acide lactique : élevé

PH : diminué

LEAU N°2 ASPECT ET COMPOSITION DU LCR CHEZ L'ADULTE (27)

LCR	NORMAL	PATHOLOGIQUE
ASPECT	LIMPIDE	LOUCHE - TROURIE
ROTEINE g/l	0,25 + 0,05 -	AUGMENTE
GLUCOSE g/l	0,50 + 0,05 -	TRES DIMUNIE
CHLORURE g/l	7,30 (NACL)	NORMALE OU ABAISSEE
ACIDE LACTIQUE g/l	0,15 + 0,08 -	ELEVATION IMPORTANTE
CYTOLOGIE	1 - 2 ELEMENTS/MM3	POLYNUCLEAIRES + ALTERES -
BACTERIOLOGIE	STERILE	PRESENCE DE GERMES

**TABLEAU N°3 = VALEUR NORMALE DES PROTEINES CHEZ LE NOURRISON
ET L'ENFANT**

	PROTEINES TOTALES LCR (g/L)	PROTEINE TOTALES PLASMA (g/L)
NAISSANCE	0,8 - 1,2	50 - 90
1 AN	0,1 - 0,2	50 - 90
3 ANS	0,15 - 0,35	55 - 85

Le dosage de la protéinorachie est importante dans la surveillance du traitement, sa normalisation reste capitale.

- 5 - 2 **Cytologie**

- 5 - 2 - 1 **Cytologie quantitative**

C'est la numération des éléments à la cellule de Malassez ou 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 leucocytaires par mm³ . une ou deux hématies.

- 5 - 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, coloré au May-Grünwald Giemsa ou au Bleu de Méthylène pour établir la formule leucocytaire.

Dans les meningites purulentes ; on retrouve une formule leucocytaire essentiellement constituée de 90 à 95 % de lymphocytaires, Neutrophiles pour 5 à 10 % de cellules mononuclées.

- 5 - 3 Bacteriologie

- 5 - 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

des diplocoques Gram négatif en forme de grain de café, les faces de regard étant légèrement bombées ; intra ou extracellulaires et très nombreux, notamment au début de la meningite. On ensemence rapidement le produit pathologique dès sa réception car les germes sont très fragiles.

- 5 - 3 - 2 Culture

Elle s'effectue sur les milieux enrichis : gelose au sang enrichie additionnée de mélange vitaminique tel le polyvitex, le ovitalex, supplément G etc... Les milieux ainsi ensemencés sont mis à incuber à l'étuve à 37° C dans une atmosphère enrichie à 10 % de CO₂.

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

- 5 - 3 - 3 Antibiogramme

Il est effectué selon la technique de Chabbert (méthode des disques) sur gelose au sang cuit. Après une incubation de 24 heures à 37° C la lecture est effectuée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des différents disques utilisés.

Le résultat est interprété à l'aide d'un abaque qui permet de voir si la souche est sensible ; intermédiaire, ou résistante à 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 quelque soit le type de traitement.

- 5 - 4 Techniques immunologiques

- 5 - 4 - 1 Agglutination au latex

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

On utilise des particules de latex sensibilisées par des anticorps monoclonaux de souris qui en présence d'antigènes dans le L.C.R. lors de centrifugation du liquide se fixe spécifiquement sur le dernier.

Une agglutination des particules de latex est visible alors à l'oeil nu. Il faut signaler que ces C.P.S. antigènes solubles correspondent aux polysaccharides capsulaires.

- 5 - 5 Sensibilité du meningocoque 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 meningeée et d'atteindre la CMI du germe dans le LCR.

Le cefotaxime, la penicilline, l'ampicilline, le chloramphenicol sont toujours actifs.

La penicilline et l'ampicilline sont parfois convulsivantes et allergisantes. L'antibiotique préconisé est le chloramphenicol en suspension huileuse dans les formations sanitaires décentralisées (4). Il faut signaler que les meningocoques sont souvent résistants aux sulfamides. Ainsi, on note que :

En Grande-Bretagne, en 1975 sur 266 souches étudiées 4 % de type B, 13 % de type C et 40 % de type A sont résistantes aux sulfamides (32).

20 % des souches étaient résistantes au Burkina-FASO en 1977 (27)

Au Mali en 1989, 88,88 % des souches étaient résistantes aux sulfamides (31).

La chimioprophylaxie par les sulfamides a été abandonnée à cause de l'efficacité temporaire, l'apparition de résistances et possibilité d'accident iatrogènes à la suite de prise répétées de sulfamide (22).

6 Traitement

Le traitement est basé sur l'emploi d'antibiotiques diffusant dans les meninges, peu coûteux, peu toxiques et actifs sur le meningocoque. Les sulfamides diffusant remarquablement, peu coûteux ont été jusqu'en 1969 le traitement de choix, surtout en Afrique ou la pépyssonie proposait le traitement par une injection unique de sulfamide retard. Mais l'apparition des souches sulfamido-résistantes a motivé son abandon dans tous les pays, seul ou en association (34). Actuellement on utilise les antibiotiques suivants :

Le chloramphenicol

Indications

Adultes }
Enfants } 2 injections de 100 mg/kg à 48 h d'intervalle

Le chloramphenicol en suspension huileuse en injection intramusculaire unique est une forme "retard" qui est particulièrement adaptée aux traitements de masse.

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 5 mg/l dans le LCR.

Inconvénients : toxicité hématologique, il doit être proscrit chez les prématurés et chez les nourrissons de 0 à 1 mois et même jusqu'à 6 mois.

L'ampicilline

Indications

Adultes 2 - 12g/j en perfusion

Enfants 0,1 à 0,3g/kg/jour
(0 - 15 ans)

La durée du traitement est égale à une semaine.

Avantage : assez bonne diffusion dans le L.C.R. où l'on obtient 50 % des taux sériques, la diffusion diminue au fur et à mesure que l'inflammation s'atténue.

Inconvénients : possibilité d'éruptions cutanées, au début du traitement coût assez onéreux

La Penicilline G

Indications

Doses 20 millions d'UI par jour en perfusion

Doses 500.000 à 1 millions d'UI/KG/jour

Préférence en perfusion en phase aigüe et en suite en injection IM.

La durée du traitement est également une semaine

Avantages : excellente tolérance, bonne diffusibilité dans les liquides en cas de formes septicémique.

Inconvénient : Mauvaise diffusibilité dans le LCR sauf à la phase aigüe quand les méninges sont inflammatoires ce qui oblige à administrer de fortes doses.

Le cefotaxime : qui est utilisé également en perfusions est l'antibiotique le plus actif dans le traitement de la méningite.

Pharmacologie

Il est utilisé en IV en raison de 50 mg /Kg/jour pendant 3 jours actuellement on expérimente la Rocephine à 75 mg /kg/jour pendant 48 heures.

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.

II - TECHNIQUES D'ETUDES DES OMP

- 1 LE SDS - PAGE

- 1 - 1 - Principe

C'est une electrophorese unidimensionnelle au cours de laquelle les proteines sont fractionnees sur la base des proprietés physiques.

Un detergent anionique le SDS, qui deplie la proteïne native lie a elle et lui confere une charge proportionnelle à la chaine polypeptidique est employé.

Pour cette electrophorese on se sert d'un systeme discontinu utilisant des tampons de composition et de PH differents pour créer une tension discontinue et un gradient de PH. Les deux zones de tampon differentes sont stabilisées par deux gels differents :

Le stacking gel ou passent les echantillons

Le running gel ou se fait la migration

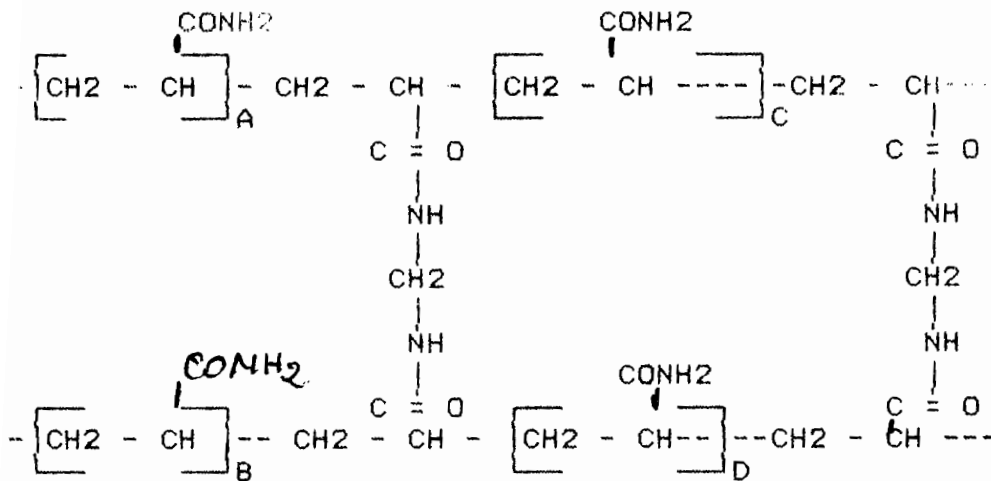
Les deux gels sont coulés dans un moule . Apres leur polymerisations ils doivent être enveloppés puis mis au refrigerateur pour une utilisation ulterieure. Les gels ainsi conçus seront utilisés et permettront une electrophorese en degre de gradient.

La separation des proteines denaturees par le SDS depend directement de la taille moleculaire.

1 - 2 METHODE DU SDS - PAGE

Elle utilise l'électrophorese des protéines sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodécyl sulfate).

Le gel de polyacrylamide est une macromolécule poreuse est utilisable comme support d'électrophorese. Ce gel est préparé simultanément et coulé en tube ou sur lame. C'est un copolymère d'acrylamide et de NN' - méthylène bis acrylamide qui assure le pontage entre les chaînes de polyacrylamide.



N' - méthylène bis- acrylamide

En changeant le taux de pontage il est possible de modifier la réticulation donc le diamètre des pores. Des lors, le Gel de polyacrylamide se comportera comme un tamis qui s'ajoute à la séparation électrophorétique.

- 1 - 3 Appareil utilisé pour le SDS PAGE

On utilise le ES. 250 (Mighty Small II) qui est une unité de 1 miniature Verticale qui permet l'électrophorese rapide, des échantillons de protéines et d'acides Nucleiques, avec un gel de polyacrylamide ou d'Agarose.

Les gels sandwichs ayant de chaque côté :

1 Verre

1 espaceur de 0,75 mm

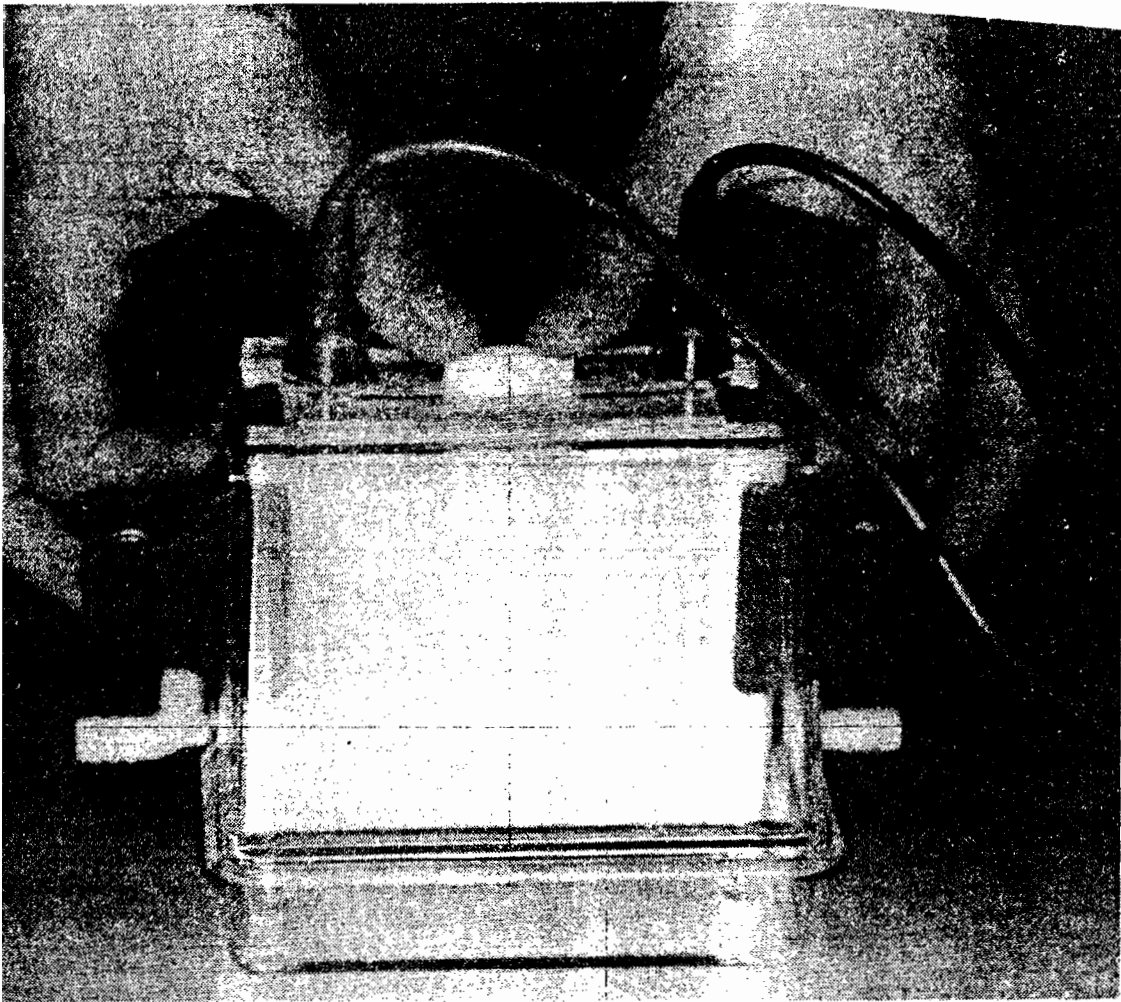
1 plaque d'aluminium

Les gels sont placés dans l'appareil contre une charpente verticale.

Deux chambres tampons superieures contenant chacune 75 ml d'électrolyte accolées à une face du gel distribuent la chaleur pendant la migration, entre les deux chambres tampons, la charpente du même sert de déchargeur de chaleur à travers lequel le réfrigérant (de l'eau à 12°) doit circuler.

Les deux electrodes superieures et inferieures ainsi que la cathode et l'anode sont situées sur la charpente. Le gel Sandwich est placé au milieu de la chambre tampon inferieure et le couvercle est mis par dessus.

Appareil utilisé pour le S.O.S.-PAGE.



- 1 - 4 Matériel de préparation des gels

ans un moule mettre :

Pour le Running gel

Pour 2 gels

-) 1,5 M tris PH8 ----- 5 ml
-) Acryl-bis a 40% ----- 5,1 ml
-) SDS à 10% ----- 0,2ml
-) Uree 8 Molaires ----- 10,5 ml
-) Brancher le "Vacum-pump" pendant 10 mn pour degazer
-) Temed = catalyseur ----- 17,5 y1
-) Ammonium Persulfate (APS) à 10% Sert d'initiateur à la polymerisation.

Melanger et verser rapidement, couvrir chaque gel avec 0,5 ml de SDS a 0,1%

laisser 20 à 30 mn pour qu'il se polymerise

Pour le Stacking gel

- A) Acryl-bis à 30 % ----- 0,83 ml
- B) SDS à 10% ----- 50 y1
- C) 0,25 Mtris PH 6,8 ----- 2,5 ml
- D) H2O ----- 1,61 ml
- E) Dégazer pendant 5 mn
- F) APS à 10%-----12 y1
- G) Temed-----10 y1

Reu de Coomassie :

0,4g de coomassie g 250

40 ml d'H₂O

agiter pendant 24 heures

ajouter 60 ml d'Acide perchlorique

P B S : phosphate buffer solution : solution Tampon
Phosphate

0,5g de NaCl

0,2g de KCl

0,2g de KH₂ PO₄

3,6g de Na₂ HPO₄, 2H₂O

1 000 ml d'H₂O

LE LUG c'est une solution tampon pour les souches

Tris 3, 025 g

Glycine 14,264g

Mercapto -ethanol 5 ml

2 - 2 La technique du Whole cell Elisa

C'est un test immuno-enzymatique

2 - 2 - 1 Principe :

C'est une technique de pointe pour la detection de la
classique reaction Antigene Anticorps.

- 2 - 2 - **Methode** : Elle utilise la bacterie entiere

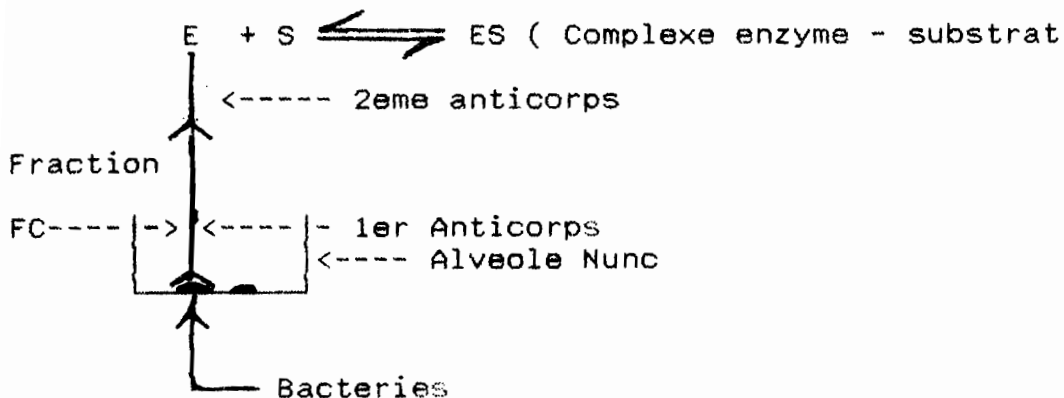
La suspension bacterienne prealablement realisee est distribuée dans les alveoles d'une plaque de Nunc et le tout est mis a secher a l'etuve. Sur cette suspension bacterienne sechee on ajoute.

Un premier anticorps monoclonal de souris qui va reconnaître ou pas une epitope de la bacterie, cette reaction antigene - anticorps si elle a eut lieu sera rendu visible grace.

Au deuxieme anticorps qui est une immunoglobuline de souris qui reconnaît la fraction F.C du 1er Anticorps et qui est couplé à une enzyme, qui en presence d'un substrat qui est toujours le même, le 4 Nitrophenylphosphate donne un complexe coloré, l'intensité de la coloration sera proportionnelle à la reaction antigene - anticorps.

2 - 2 - 3 **Appareil utilise**

La lecture de la reaction se fait grace un appareil appelé le micro Elisa Auto-Reader qui est incorporé à un ordinateur qui mesure la densité optique du complexe enzyme - substrat.



- 2 4 Produits Chimiques et Reactifs utilises

P.B.S

1 NaCl

2g KCl

, 2 g de KH_2PO_4

, 6g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$

1000 ml d' H_2O

FCS2%

FCS 10%

} Serum de veau foetal

Ween 80 : detergent

· Substrat : 4 Nitrophenylphosphate 1mg/ml de la solution tampon diethanolamine PH9,8

- Tampon de diethanolamine

97ml de Diethanolamine

0,1g de $\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$

0,2g de NaCl

1 000 ml d' H_2O

Ajuster le PH à 9,8
avec HCl (15 ml)

- 1ER ANTICORPS Anticorps = monoclonal de souris

- 2eme ANTICORPS = Immunoglobuline de souris Utilisé à la dilution 1/500

- NaOH 1N : NaOH normal

2 - 3 L'ANALYSE CLONALE

Les analyses clonales recentes ont divisé les souches de N. meningitidis en clone differents. Les epidemies ont été provoquées par un seul clone.

Les recents progres de l'analyse antigeniques ont permis une etude approfondie chez les meningocoques.

Les isoenzymes cytoplamiques ont une variation quand on les soumet à l'electrophorèse (et eventuellement des protcines de la membrane) si 2 proteines ont une même migration ont dit qu'elles ont le même type electrophorétique.

L'analyse clonale utilisant la caracterisation des variantes des enzymes metaboliques à offert un systeme de classification des souches qui apparaissent en differentes localisations et à différents moments.

Ce système à fourni des informations sur des changements genetiques, le remplacement, et l'evolution des souches.

LES DIFFERENTES EPIDEMIES ET CLONES DANS DIFFERENTS PAYS AFRICAINS DE LA CEINTURE MENINGITIDIQUE

1905-07 . 1920-22 . 1939-40 . 1943-45 . 1949-51 . 1960-62 . 1969-72 . 1981-84 . 1981-89

		+>							IV-1	
		+>		+	+			I-1	IV-1	
		+>		+	+	+	+	I-1	IV-1	
		+>		+	+				+	
		+>		+	+			I-1/IV-1	IV-1	
+	+			+	+	I-3/IV-1		I-1		
+	+			+	+	+		+		
+	+			+	+	+		+		
		+>		+	+			I-1	+	III-1
+		+	+	+	+	+		+	+	III-1
		+>							+	III-1

EPIDEMIES ET CLONES DE COIN

Année 1958 - 60.1965 - 68.1976 78.1983 - 84

+ = NP (non Précisé)

+	III-1	V-1	III-1
---	-------	-----	-------

PARTIE EXPERIMENTALE

ETUDES DES MENINGITES PURULENTES DIAGNOSTIQUEES DE 1989 A 1990
DANS LE LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE DE L'INRSP.

1 Sujets Etudiés et Methodes

1 - 1 Sujets Etudiés

155 Liquides cephalorachidiens ont été analysés au laboratoire de bacteriologie de l'institut National de la recherche en santé publique (INRSP) de Bamako et dans le Laboratoire de pediatrie de l'hopital Gabriel TOURE, de Novembre 1989 à Decembre 1990.

Les liquides proviennent du service de pediatrie de l'HGT et du service des maladies contagieuses du lazaret des Rôches, de Kolokani. Une fiche de renseignement est remplie pour chaque patient portant le nom, l'âge, le sexe, la date de prelevement, le germe en cause, le traitement entrepris avant la ponction, et eventuellement l'adresse du malade.

1 - 2 = Méthodes

1 - 2 - 1 = Technique Bacteriologique

Les liquides sont prelevés dans un tube sterile. Si le liquide est trouble on met 0,5 à 1 ml dans un cryotube qui est immediatement numeroté et mis dans une Bombonne contenant de l'azote liquide; l'échantillon est de ce fait congelé à - 160°C.

Un tube incliné contenant du sang cuit + VCN est également ensemené (par mesure de prudence pour preserver les souches de Meningocoques tres fragile)

Les liquides cephalorachidiens sont soumis à l'examen cytobacteriologique classique et à la technique d'agglutination des particules de latex sensibilisées

ainsi on pratique sur place dans le laboratoire de la pediatrie

- Un exament microscopique
- Une agglutination à l'aide d'immuno-Serum Specifique
- Un examen microscopique direct apres coloration de Gram
- Une culture sur gelose au Sang cuit + VCN
- Les premiers resultats sont communiés au medecin traitant

Les boîtes et les tubes inclinés sont acheminés au Labo de l'INRSP ou ils seront mis à incubés a 37 °C en atmosphères enrichie en CO₂ pendant 24 à 48H.

Les colonies sont identifiées par la methode classique caracteres cultureux, morphologiques, biochimique, et antigenique et par la methode du rapide NH) on teste la sensibilité aux antibiotiques par la methode de diffusion en milieu gelosé (antibiogramme par la methode des disques) selon les recommandations de l'OMS

Les antibiotiques utilisés sont :

La penicilline G (10 UI) l'ampicillure (10 yg) le chloramphenicol (30 yg) le cefotaxime (30 yg) les sulfamides (200yg) le trimethoprime - Sulfamethoxazole (S = 23,755 yg + T = 1,25 yg) pour chaque disque .

Les souches ainsi isolées sont congelées - 80°.

Si après l'agglutination au latex le germe est un meningocoque on realise un prelevement d'1 ml de sang dans un microtainer et on recupère le serum qui est mis à congeler = Appelé serum A c'est à dire le serum pendant la phase aigue de la maladie.

Un deuxième prélevement de 5 ml de sang à lieu au 15 ème jour (serum de convalescence) a partir duquel on realise le serum correspondant, appelé serum B; est également mis a congeler à - 80° C, A partir de ce prelevement on procede à un isolement des lymphocytes.

Nous avons également réalisé des prélèvements de gorge dans les familles des patients.

1 - 2 - 2 ETUDES DES PROTEINES DE LA MEMBRANE EXTERNE

A LE SDS - PAGE

Nous réalisons un réisolement des souches de meningocoques a partir d'un microbille sur un milieu synthétique le GC Medium base.

Après incubation a 37°C dans une atmosphère enrichie en CO₂ pendant 24H, on prend une colonie on realise une suspension dans l'eau physiologique. Une boîte du milieu synthétique est ensemencée en rateau après incubation à 37°C pendant 24 H. Les colonies seront raclées en vu de l'extraction de la membrane des bacteries.

EXTRACTION DE LA MEMBRANE POUR LE SDS - PAGE

- Dans un tube eppendorf mettre 700 μ l de tris 10 molaires PH : 8
- Ajouter 3/4 des colonies d'une boîte de petri dans cette solution et poser la suspension obtenue dans un recipient contenant des cristaux de glace.
- La suspension est soumise à l'action des ultra-sons pendant 15 secondes, pour cela on se sert d'un sonificateur
- Centrifuger dans une centrifugeuse eppendorf pendant 6 mn à 700 Rpm.
- Prendre le surnageant et jeter le culot (contenant les bacteries qui n'ont pas éclaté).
- Centrifuger le surnageant pendant 15 mn à 14.000 Rpm
- jeter le surnageant et conserver le culot (contenant les membranes).
- Ajoutée 100 μ l d'eau distillée et melanger à l'aide d'un agitateur.
- Diluer dans du lug qui est une solution tampon.
- Placer la suspension au refrigerateur à + 4° C en vue d'une utilisations ulterne.

2. MODE OPERATOIRE

- Chauffer les membranes pendant 2 mn à 95°C dans un thermostat eppendorf.
- Remplir les chambres avec l'electrolyte dont la composition est 1 x Lug + SDS à 0,15% (le SDS crée un champ electrique)
- A l'aide d'une micro seringue on depose 2 μ l ou 4 μ l d'extrait de membrane dans les differents compartiments.
- Fermer le couvercle
- Créer le champ electrique (electricité = 20 mA par gel + 800 volts la migration s'effectue pendant une heure le refrigerant faisant circuler de l'eau à 12°C
- Ouvrir les chambres et decoller les gels.
- Placer les gels dans 100 ml de Bleu de coomassie pendant 10 mn sur l'agitateur.

Decolorer les gels avec l'acide acetiques à 5% sur l'agitateur pendant au moins 2 heures

Faire secher les gels pendant deux heures à l'aide d'un secheur gel appellé "Gel Dryer".

WHOLE CELL ELISA : Elisa avec les cellules entières

LES ANTICORPS MONOCLONAUX

C'est en 1975 que l'utilisation des anticorps monoclonaux à démarré, pour nos experiences nous utilisons les MAbS de souris ou de rat cependant leur preparation demande des conditions de sterilité absolu, beaucoup de milieu de culture et du materiel a usage unique, ce qui en augmente le coût.

Prémière etape : inoculation par voie intraperitoniale à la souris blanche de suspension bacterienne préalablement chauffé; à 6 °C pendant 1 heure ; on realise ainssi 4 (quatre) inoculations en 30 jours.

Après on recupere la rate que l'on broie.

Deuxième etapes : on realise la fusion des cellules (cellusion) de la rate de souris avec des cellules cancreuses. Les cellules cancreuses à elles seule ne produisent pas d'anticorps et ne cultive pas dans le milieu de culture utilisé.

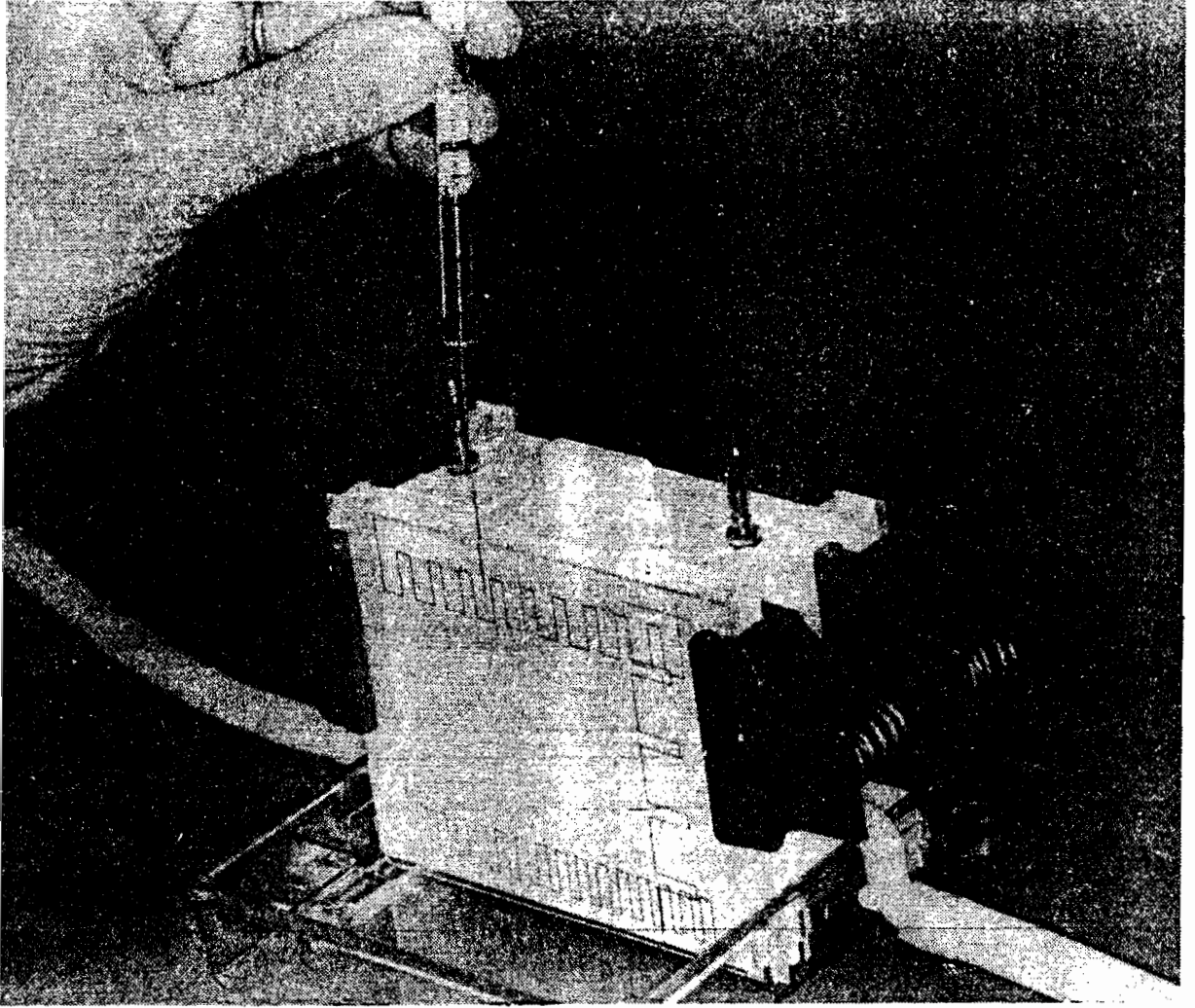
Troisième etapes : le produit de la fusion des cellutes de souris et des cellules cancreuses donnent des hybridones.

Quatrième etapes : dans un milieu, de culture liquide specifique certains hybridomes produisent les MAbS.

2 - PREPARATION DES SOUCHES POUR L'ELISA AVEC LA CELLULE ENTIERE

- Mettre dans un grand tube 10 ml de la solution de PBS sterile
- Ajouter 1/4 des colonies de la boite de petri du milieu synthetique GC medium Base.
- Placer cette suspension au bain - Marie à 56°C pendant 1 heure.
- Laisser refroidir pendant 30 mn à la temperature ambiante .
- Ajouter 20 yl de NaCN (cyanure de sodium) à 10%
- Placer au refrigerateur (4°C) au minimum pendant 24 h, et au maximum 1 mois.

Repartition des membranes dans les différents



3 - MODE OPERATOIRE

Dans chaque trou de la boite Nunc ELISA mettre 100 yl de la suspension prealablement preparée.

- Placer dans l'etuve pendant 48 heures pour le sechage.
- Lavez les boites avec du PBS 0,05% Tween (80) (1 litre de PBS + 2,5 ml de Tween 80).
- Bloquer les antigènes en ajoutant dans chaque trou 200 yl de la solution de PBS 0,05% Tween (80) dans du Fcs à 10% et agiter pendant 1 heure.
- Lavez 3 fois avec la solution de PBS 0, 5% Tween (80)
- Ajouter le 1er anticorps 100 yl par trou, l'anticorps est dilué dans le PBS 0,05% Tween (80).
- Ajouter le 2 eme anticorps (conjugate) 100 yl dilué à 1/500 dans une solution PBS 0,05% Twleen 80 dans du FCS à 2%
- Agiter pendant 1 heure.
- Lavez 5 fois avec la solution PBS 0,05% Tween (80)
- Ajouter le substrat (solution de 4 nitrophenylphosphate 1 mg par ml dans un tampon de diethanolamine PH9,8 à raison de 100 yl par trou.

(La solution de diethanolamine est incubée avant l'utilisation à 37° C pendant au moins 2 heures)

- mettre à l'etuve pendant 30 mn
- Enfin bloquer la reaction par NaOH 1N 50yl par trou
La lecture se fait à l'aide du micro Elisa Auto reader qui est relié à un ordinateur.

1 - 2 - 3 L'ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES

Elle se fait sur le prelevement de sang pendant la convalescence (15 ème jours de la maladie). Elle doit être realisée au maximum 4 heures après le prelevement pour concerver l'integrité cellulaire.

- 2 - 3 - 1 MODE OPERATOIRE

Prelever 5 ml de sang dans un vacutainer hepariné

Diluer le sang avec 3 ml de PBS sterile

Injecter doucement 2 ml de ficoll qui permet de créer un gradient de densité

Centrifuger pendant 40 mn à 1 600 tours/mn xg

Il y a séparation en 3 zones bien distincte (à la surface nous avons le plasma, à l'interface on a un anneau de lymphocytes au fond un culot d'hématies).

Prelever à l'aide d'une pipette sterile les lymphocytes à l'interface.

Ajouter le PBS

Centrifuger de nouveau à 1200 tours /mn x g.

Versé le surnageant, mettre le culot dans un cryotube contenant 5 ml de PBS Stérile.

Plonger puis dilué cette suspension dans la solution de conservation qu'est le DMSO (dimethyl sulfoxide).

Congeler très lentement pour, cela on utilise le liège pour éviter l'éclatement des cellules.

Les lymphocytes ainsi isolés seront envoyés à l'institut Max Planck de Berlin en vue d'isoler des nouvelles lignées Hybridomes.

Toutes ces manipulations ont lieu sous une hotte et demande une condition de stérilité totale.

- 2 - 4 PRELEVEMENT DE GORGE

Nous avons eu également à effectuer des prélèvements de gorge dans les familles des patients et dans les familles voisines en vue de dépister d'éventuels porteurs sains.

C'est ainsi que nous avons réalisé 253 prélèvements de gorge à Amako, Kolokani et Baraouélié.

Nous avons isolé 20 souches de Neisseria lactamica qui est une bactérie commensale du Rhinopharynx, une souche de Neisseria meningitidis qui est également une bactérie commensale du Rhinopharynx et ailleurs deux souches de Neisseria Gonorrhoeae ont été isolées chez deux enfants âgés, respectivement de 5 ans, et de 7 ans.

Nous avons poussé cette investigation en réalisant un frottis nasal chez la mère d'un des enfants sans parvenir à isoler le coccoque chez cette dernière.

Nous avons également isolé un meningocoque C dans la gorge du patient.

Lors de nos investigations nous n'avons pas eu un seul cas de porteur sain de Neisseria meningitidis.

Mais les prélèvements ultérieurs réalisés à Bamako (dans certaines écoles coraniques) et à Dalakana où a eu lieu une épidémie en 1991, des souches de Meningocoque C ont été isolées chez des porteurs sains.

2 - 5 CONGELATION DES SOUCHES

C'est une des étapes les plus importantes, toutes les souches isolées seront congelées dans un cryotube contenant des billes avec une suspension de lait en poudre à 10%

Les souches seront ainsi congelées indéfiniment dans le réfrigérateur à - 80° C ou dans l'azote liquide à - 160 °. Cela constitue donc une banque de souches, en cas de besoin il suffit de réaliser un ensemencement sur un milieu adéquat à l'aide d'une bille, pour retrouver le meningocoque après 24H d'incubation à 37°C.

Il faut signaler que cette congélation est réalisée à partir d'une seule colonie c'est à dire les bactéries provenant d'une seule cellule ancestrale.

= RESULTATS

- 1 = Les prélèvements effectués

155 LCR troubles ont été examinés sur une période s'étendant de Décembre 1989 à Novembre 1990 dans le laboratoire du service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel TOURE et dans le service de bactériologie de l'INRSP. Parmi eux 103 ont été étudiés et congelés et 52 LCR troubles ont été exclus car soit :

L'étiologie n'est pas connue

Le LCR était contaminé par d'autres bactéries

Le malade a reçu un traitement antibiotique avant la ponction.

1 - 1 PROVENANCE DES PRELEVEMENTS DES LIQUIDES
CEPHALORACHIDIENS.

BLEAU N°1 = REPARTITION DES LCR EN FONCTION DE LA PROVENANCE

Provenance	Nombre de Prelevements	Pourcentage
HGT	86	83,49
LAZARET	11	10,67
KOLOKANI	6	5,82
TOTAL	103	100

Sur les 103 LCR étudiés et congelés, 83,49% des prélèvements
proviennent du service de pédiatrie de l'H.G.1

1 - 2 REPARTITION DES 155 LCR TROUBLES EN FONCTION DE LA
PERIODE DE PRELEVEMENT

BLEAU N° 2 = REPARTITIONS DES LCR EN FONCTION DE LA PERIODE
DE PRELEVEMENT

MOIS	DEC 89	JAN 90	FEV	MA	AV	MAI	JUIN	JUIL	AOUT	SEP	OCT	NOV
BRE DE RE EVE ENT	6	20	17	29	36	19	9	2	4	2	8	3

Nous avons obtenu le chiffre le plus élevé en Avril soit
23,22 %.

1 - 3 REPARTITION EN FONCTION DU SEXE

TABLEAU N°3 : REPARTITION DES PRELEVEMENTS EN FONCTION DU SEXE DES PATIENTS

PRELEVEMENTS SEXE	EFFECTIF	POURCENTAGE
MASCULIN	84	54
FEMININ	71	46
TOTAL	155	100

Parmi nos sujets 84 (soit 54 %) sont du sexe masculin et 71 (soit 46 %) sont du sexe féminin cette différence n'est pas statistiquement significative ($X^2 = 0,48$).

- 2 RESULTATS - BACTERIOLOGIQUES

- 2 - 1 REPARTITION DES LCR EN FONCTION DES GERMES IDENTIFIES

TABLEAU N°4 : FREQUENCE DES GERMES IDENTIFIES

GERMES	NOMBRE	POURCENTAGE
HAEMOPHILUS INFLUENZAE b	26	25,24
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE	28	27,19
NEISSERIA MENINGITIDIS	45	43,69
NEISSERIA SICCA/SUBFLAVA	2	1,94
ESCHERICHIA COLI	1	0,97
STREPTOCOQUE	1	0,97
TOTAL	103	100

- 2 - 2 REPARTITION DES NEISSERIA EN FONCTION DU SEROGROUPE

TABLEAU : N°5 REPARTITION DES NEISSERIA EN FONCTION DU SEROGROUPE

SEROGROUPES	EFFECTIF	POURCENTAGE
A	4	8,51
C	40	85,10
X	1	2,12
AUTRES	2	4,25
TOTAL	47	100

Autres = Neisseria sicca/subflava

On nous trouvons une très nette prédominance de MnC soit 85,10 %.

NIVEAU DE RESISTANCE DES SOUCHES DE NEISSERIA MENINGITIDIS

De serogroupe C et A aux antibiotiques

Sensibilité des MnC et des MnA aux antibiotiques

Antibiogramme	PeniG/ Ampic	Cefotaxime	Sulfamide	Cotrimoxazole	Chloramphé
Nombre de souches étudiées	38	37	38	38	36
Nombre de souches sensibles	36	37	2	6	36
Nombre de souches résistantes	2	0	36	32	0
Pourcentage de souches résistantes	5,26	0	94,7	84,2	0
Nombre de souches étudiées	4	4	4	4	4
Nombre de souches sensibles	4	4	1	3	4
Nombre de souches résistantes	0	0	3	1	0
Pourcentage de souches résistantes	0	0	75	25	0

Cela montre que la pénicilline, l'ampicilline, la cefotaxime et le chloramphénicol ont une activité sur les méningocoques A et C.

En ce qui concerne les sulfamides et le cotrimoxazole la résistance atteint respectivement : 94,7% et 84,2% et chez les MnA 75% et 25%.

- 3 - LES RESULTATS DES ETUDES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

- 3 - 1 Résultats des tests effectués à Berlin

De nouveaux anticorps monoclonaux dirigés contre P1.Y, contre le serotype 2a, et contre les pili ont été obtenu à Berlin en 1990 à partir des souches maliennes. Sur les 40 souches de meningocoques isolées en période endémique au Mali entre Décembre 1989 et Juin 1990 et pendant la flambée de Kolokani 35 étaient du serogroupe C et seulement 4 étaient de serogroupe A et toutes ces souches étaient du clone IV.1.

Les analyses électrophorétiques et antigéniques des souches maliennes de serogroupe C, ont prouvé que les souches sont identiques pour les 13 isoenzymes, et qu'une (1) seule est différente au niveau d'une isoenzyme. Toutes ces souches sont apparentées, à la souche de référence du complexe ET37 qui présente selon Dominique CAUGHAN à un groupe de bactéries apparentées dont les types électrophorétiques ne diffèrent pas de plus d'une isoenzyme. Elles sont toutes en plus du serotype 2a et du sero soustype P1.Y à l'exception d'une souche qui n'exprime pas de protéines de classe 1.

L'origine épidémiologique de ces souches demeure inconnue pour l'instant.

Les souches de serogroupe C du Ghana, du Burkina FASO sont moins apparentées aux souches maliennes que celle d'Europe ou des USA (16).

Ainsi une souche de serogroupe C de Gambie est tout à fait différente d'une souche de serogroupe C du Mali vis à vis des différents anticorps monoclonaux utilisés.

L'anticorps S 3423 (P1.Y) semble être spécifique à la souche aliène de serogroupe C, car elle ne réagit avec aucune autre souches, l'extrême sensibilité et reproductibilité de cet anticorps ont permis de le fixer sous forme de latex permettant une identification rapide et précise des souches Maliennes de serogroupe C.

Le tableau suivant nous montre les autres caractéristiques antigéniques spécifiques des souches Maliennes de serogroupe C. L'anticorps P1.Y est un anticorps qui réagit avec la protéine de classe 1 et le sero soustype Y d'où son appellation P1.Y Les anticorps 4 B12/C11 ont réagit avec les 3 différentes protéines de classe 5 révélées par le SDS - PAGE.

Le 4 B12/C11 est un anticorps non spécifique.

'7 = Resultats obtenus a Berlin

ORIGINE	NOMBRE DE SOUCHES	SÉROGROUPE		SÉRO-TYPE	SÉRO-SOUS-TYPE		ANTICORPS CONTRE LES PROTÉINES DE CLASSE F					CLASSE DES PILI		
		C	B	2a	P1.2	P1.Y	P5.1	P5.4	H22	H21	P110	1	2a	2b
LI	16	16	0	16	0	15	0	7	12	12	0	0	0	16
PALIE	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
SA	22	12	10	22	21	4	10	13	15	5	0	0	0	21
SHANA PASSO	8	8	0	8	8	0	3	0	0	3	8	0	0	7
VERSES	19	19	0	1	5	0	0	1	2	0	1	0	2	2

- RESULTATS OBTENUS A BANAKO PAR LA TECHNIQUE DU WHOLE CELL ELISA

**- 3 - 3 ETUDE COMPARATIVE DES MENINGOCOQUES DE SEROGRUPE C
ET DE SEROGRUPE A PAR LA TECHNIQUE DU SDS - PAGE**

Les protéines de classe 1 se retrouvent chez tous les serogroupes, mais présentent une variabilité électrophoretique dans leur expression.

Les protéines de classe 2 sont stable, présentent chez le serogroupe C mais absente chez le serogroupe A.

Les protéines de classe 3 sont stable présentent chez le serogroupe A absente chez le serogroupe C.

Les protéines de classe 4 sont très stables et identiques chez toutes les souches de meningocoques.

Les protéines de classe 5 sont très instable.

Les protéines de classe 6 sont présentés uniquement chez certains meningocoque de serogroupe A.

- 3 - 4 INTERPRETATION DES RESULTAIS

- 3 - 4 - 1 Interprétation des Résultats du SDS - PAGE

La membrane externe des meningocoques contient 2 à 5 protéines principales quand ces complexes ont été examinés par le SDS - PAGE.

Chez toutes les souches de meningocoque nous avons :

La protéine de classe 1

La protéine de classe 4

La protéine de classe 5

Chez certaines souches nous trouvons en plus :

La protéine de classe 2

Ou la protéine de classe 3

Et parfois la protéine de classe 6

Les protéines de classe 1 et 4 sont les protéines de clonage car elles déterminent avec les isoenzymes le clone).

Les protéines de classe 2 et 3 sont les protéines de prototypage (avec également les LPS).

Il faut signaler que le SDS - PAGE permet de palier l'insuffisance du latex.

ETUDE Comparative des meningocoques
de serogroupe A et C au SDS-PAGE



3 - 4 - 2 INTERPRETATION DES RESULTATS DU WHOLE CELL ELISA

Les resultats du whole cell Elisa nous permettent de dire que toutes nos souches de meningocoques C ont reagis avec l'anticorps monoclonal S 3413 (100%) à l'exclusion des souches de MnA cela nous permet de conclure que tous les MnC sont du serotypes S3413 appelle serotypes 2a.

Nous avons utilisé le S3413 à une dilutions de 1 : 3000 .

Nous avons utilisé le P1.2 ou S3319 et le P1.Y ou S3423 respectivement aux dilutions de 1: 1000 et 1: 1500.

Avec l'anticorps P1.Y, 38 souches de MnC sur 40 ont reagi soit 95%, et 100 % de MnA non pas reagi avec P1 Y. Les anticorps contre les protéines de classe 5 furent utilisés.

Il s'agit du H22.1 qui est dilué à 1 : 6000 et du H21.1 dilué à 1 : 3000 avec le H22.1, 27 souches de MnC sur 40 ont réagi soit 67 % des souches de MnC et aucune souche de MnA n'a pas réagi avec le H22.1.

Avec le H21.1, 25 souches de meningocoque C sur 40 soit 62 % ont réagi cependant aucune souche de MnA n'a réagi.

Avec le S 3412 anticorps anti pili utilisée à 1 : 500 toutes les 40 souches (100 %) de meningocoque C ont réagi aucune souche de MnA n'a réagi.

Avec l'anticorps P1.7 toutes les 4 souches de meningocoque A ont réagi, cela permet de dire que tous nos meningocoques de serogroupe A sont de sero soustype P1.7, aucune souche de meningocoque C n'a réagi avec cet anticorps.

Les anticorps contre les protéines de classe 1 furent testés avec le P1.2 = S3318 dilué à 1 : 1000, le P1.16 à 1 :1000, le P1.X à 1 : 500, P1.10 à 1 :1000, P1.9 a 1:50000, et le P1.1 à 1 : 500.

Avec tous ces 9 anticorps de classe 1 aucune souche de meningocoque A ou C n'a réagi.

Par contre avec le P1.7 dilué à 1 : 2000, 100 % des MnA ont réagi mais aucune souche de meningocoque C n'a réagi.

Toutes nos souches de MnC sont de serotype 2a

Les anticorps S3423 (P1.Y), H22.1, H21.1, S3412 (Pili) sont des anticorps spécifiques des souches Maliennes. Le nouveau vaccin à l'étude doit nécessairement tenir compte de cet antigène, c'est-à-dire la protéine P1.Y, en ce qui concerne les souches maliennes.

Cette spécificité des souches maliennes fut également établi par SIDIBE DJENERA par la technique du Western Blot.

III DISCUSSION

3 - 1 - REPARTITION DES LCR EN FONCTION DU MOIS

Nous avons obtenu les taux les plus élevés en Avril soit 36/155 soit 23,22%. Thera. D. (31), Sokona H (28) trouvent également le taux le plus élevé en avril. SANDGO (33) signale à Dakar en 1974 que le pic se situe en Mars Avril suivant les années et que la fréquence est diminuée par la saison des pluies (Juin - Septembre).

3 - 2 - FREQUENCE DES GERMES IDENTIFIES

Dans notre échantillon Neisseria meningitidis est l'étiologie dominante soit 43,68%

La prédominance de ce germe pourrait s'expliquer par le fait que lors de la flambée de Kolokani ou tous étaient des Neisseria meningitidis et que sur les 11 souches isolées aux lazaret 8 souches étaient des Neisseria meningitidis soit 72,72% Streptococcus pneumoniae et Hemophilus influenzae b viennent ensuite en fréquence.

La prédominance du Neisseria meningitidis a été également constatée par Aubert et Col (5) qui trouve 2,2% contrairement à notre résultat Atime (4) trouve l'Hemophilus influenzae b comme étiologie dominante 81 souches sur 194 soit 41,8%.

- 3 - REPARTITION DES NEISSERIA SUIVANT LE SEROGROUPE

Nous trouvons une nette prédominance de Neisseria meningitidis de serogroupe C, 40 soit 85,10% vient le N. meningitidis de serogroupe = 4, en suite le Neisseria sicca /subflava et 1 Neisseria meningitidis de serogroupe X sur 46 souches de Neisseria meningitidis

Depuis 1970 une augmentation de l'incidence de Neisseria meningitidis de serogroupe C a été signalée en Afrique (32)

Au Mali c'est à partir de 1988 qu'une brusque augmentation de la fréquence de N. meningitidis de serogroupe C a été constatée (12).

- 4 - REPARTITION EN FONCTION DU SEXE

Nous trouvons 54% de sexe Masculin comme Berthé (9) ,Atime (4) et Thera (34)

Nous ne trouvons aucune prédominance statistiquement significative dans notre échantillon Berthé, Atime, et Thera, trouvent respectivement 53, 6%, 54% et 57% de sujets de sexe masculin dans leurs échantillons.

5 - 5 - SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

Nous avons trouvé que :

La penicilline, l'ampicilline, le cefotaxime, et le chloramphenicol ont une excellente activité sur le MnC et le MnA.

Le taux de résistance des MnC aux sulfamides et au cotrimoxazole sont respectivement de 94,7% et 84,2% et les taux de résistance du MnA aux sulfaundes et aux cotrimoxazole sont respectivement de 75% et de 25%

Nos resultats sont tres proches de ceux de Thera (31) qui trouve 81,81% comme taux de résistance du MnC au cotrimoxazole, Berthe (9) trouve en 1979 83,33% des meningocoques resistants au cotrimoxazole sur 39 souches testées.

5 - 6 - WHOPE CELL ELISA des souches Maliennes

Avec l'anticorps S 3413 = serotype 2a

Nous avons trouvé sur 40 souches de MnC testées à l'anticorps S3413 40 MnC positifs soit 100%

A Berlin ils ont trouvé sur 16 souches contenus dans nos 40 souches étudiées ici à Bamako le même resultat avec l'AC S3413 c'est à dire 100% positif.

Nos deux resultats avec l'anticorps S3413 sont identiques

Avec l'anticorps S3423 = P1.Y

Nous avons testée 40 souches de MnC parmi lesquelles 38 étaient positives au S3423 soit 95%.

A Berlin (16) ils ont testé 16 souches et 15 souches sont positives à l'anticorps P1.Y soit 73%.

Il faut signaler que le MnC n'ayant pas reagie avec le P1.Y à Berlin n'a pas reagie non plus à Bamako. Par ailleurs nous avons solé à Bamako une souche de MnC qui n'a pas reagie avec le P1.Y mais qui n'a pas été testé à Berlin.

Avec l'anticorps S3422 = H21.1

Sur 40 souches testées 25 étaient positives soit 62%

A Berlin (16) sur 16 souches testées 12 étaient positives soit 75% Nos resultats sont legerements differents et cela pourrait certainement s'expliquer par la taille de l'échantillon utilisé.

Il faut signaler que nous avons obtenue les même resultats avec les souches étudiées à Berlin, avec tous les anticorps utilisés.

CONCLUSION

L'épidémiologie moléculaire des méningites à meningocoques nous a donné les résultats suivant au Mali :

Neisseria meningitidis de serogroupe C est l'étiologie la plus dominante des méningites à meningocoques suivi du MnA.

La fréquence la plus élevée de la méningite à meningocoque se situe au mois d'Avril .

La prédominance est Masculine mais statistiquement insignifiant dans notre échantillon.

Malgré l'existence de rares souches résistantes, la pénicilline G, l'ampicilline, le chloramphenicol et le cefotaxime, gardent une excellente activité dans le traitement de la méningite méningospinale.

Les résultats obtenus par la technique du Whole cell ELISA nous permet d'affirmer que :

Toutes les souches de MnC isolées au Mali de 1989 à 1991.

Sont toute de serotype 2a et de serosous-type P1. Y.

L'anticorps monoclonal P1.Y semble être spécifique des souches étrangères de MnC.

Toutes les souches de MnA isolées au Mali de 1989 à 1991 sont toutes de serotype 4 ou serotype 21 et du serosous-type P1.7

Toutes les MnC provenant de la petite flambée de Kolokani en avril 1990 sont tous identiques aux MnC récoltés pendant la période épidémique.

Le nouveau vaccin antimeningococcique devrait contenir des protéines de classe 1.

B I B L I O G R A P H I E

- Achtman M.
Molecular epidemiology of epidemic bacterial meningitidis
Dev. Med Microbiol 1990, 1 : 29 - 38
- Achtman M. pluschke G.
Phylogenetic analysis descent and virulence among selected Escherichia coli
Ann Rev Microbiol 1986 : 40: 185 -210
- Abdillahi H. Achtman M; Poolman.J.T
Development of monoclonal antibodies specific for serotype 4 antigen of Neisseria meningitidis
Jur I. clin Microbiol 1988; 7 : 293 - 296
- Atimé D.
Étude Bacteriologique des meningites purulentes en milieu pédiatriques (Ampicilline - Chloramphenicol)
These Pharmacie- Bamako 1989
- Aubert. G, Barthelemy P. et Col
Étude Bacteriologique et epidemiologique de 456 meningites bacteriennes
Med. mal inf. 1986 N°2 65-71
- Branham SE.
The meningococcus. (Neisseria meningitidis).
J. bacterio 1940 : Rev 4 59 - 96
- Bhattachargée A.K, H.J, Jennigs, Martin A.
Structural determination of the sialic and polysaccharides antigens of Neisseria meningitidis serogroupe B and C With carbon 13 Nuclear magnetic resonance.
J. Biod chem 1975-250 : 1926-1932
- Bhattachargée A.K, Jennigs H.J, Martin A.
Structural determination of the polysaccharide antigens of Neisseria meningitidis serogroupes Y.W135
J. Biochem. 1976. 54 : 1 - 8

- Berthé A.N.

spects cliniques et Bactériologiques des meningites purulentes en milieu pédiatrique.

Med mal infect 1979 N°9 514 -520

0 - De voe, I.W and Gilchrist J.E.

Ultrastructure of pili and annular structure on the cell wall surface of Neisseria meningitidis

J. exp. Med. 1974. 138 : 1156 - 1167

1 - De voe; IW. and Gilchrist J.E.

Release of endotoxin in form of cell wall blebs during in vitro growth of Neisseria meningitidis.

J. exp. Med. 1973. 138 : 1156 - 1167

2 - Division épidémiologique et préventive (MALI)
"Meningite"

Données épidémiologiques de morbidité et mortalité de 20 maladies transmissibles.

1979 volume 2, 70-88

3 - Frash C.E, and Mocca L.F.

Five structural classes of major outer membrane proteins in Neisseria meningitidis

J. Bacteriol. 1981 146 : 69 - 78

4 - Frash C.E; Zollinger W.D. and Poolman J.T.

Serotype antigens of Neisseria meningitidis and proposed scheme for designation of serotypes.

Rev. infect. Dis 1985.7 : 504 - 510

5 - Frash C.E; Zollinger W.D. and Poolman J.T.

Serotype antigens of Neisseria meningitidis and proposed scheme for designation of serotypes.

Rev. infect. Dis 1985.7 : 504 - 510

6 - J. F.wang, G. Morelli, Bopp.M, Kusecek B. Achtman M; Caugant D.A; Koumaré B.

Clonal and antigenic analyses of Neisseria meningitidis bacteria belonging to the Et 37 complex isolated from Mali and elsewhere

Rev. infect. Dis Berlin juin 1990

- Jennings H.J. and Lugowski C.

biochemistry of Groups A, B, and C meningococcal polysaccharide
antigen toxoid Conjugates.

Immunol. 1981 137 : 1011-1018

- Jennings H.J; Bhattachargée A.K. and Celver G.

Chemical structure of R type lipopolysaccharides of Neisseria meningitidis

Biochem. 1980. 138 : 128-136

- Jennings H.J, and Kenny C.P.

Chemical composition and serological of lipopolysaccharides
from serogroupes A,B,X and Y Neisseria meningitis

Biochem. 1973. 51 : 1347-1354

- Kyelen T.

Les meningites cerebrospinales en Haute - Volta

Revue Medecine Dakar. 1984.N°2. 99

- Le Minor L; Veron M.

Microbiologie Medicale

L'Annuaire ED.1982. 232 - 347

1 - Lecamus J.L, Touze J.E et Col

Les infections à meningocoques

Ann. Medico. chir. (PARIS) 8013 A 10. 9. 1989

3 - Macca L.F, and Frash C.E.

SDS. Gel typing system for characterizations of Neisseria
meningitidis isolates.

J. Clin Microbiol. 1982. 16 : 240

4 - Olyhockt, Crowe B.A, Achtman M.

Clonal population structure of Neisseria meningitidis serogroupe A
isolated from epidemics and pandemics Between 1915 and 1983.

Rev. infect. Dis. 1987. 9 : 665 - 692

- Poolman J.T, C.T. ; Hopman and Zanen H.C.2

Immunochemical characterization of Neisseria meningitidis serotype 14 by immunodiffusion and SDS. PAGE immunoperoxidase technique and the distribution of serotype among cases and carriers.

Gen Microbiol. 1983. 116 : 465 - 473

2 - Poolman J.T, Hopman C.T. and Zanen H.C
Immunogenicity of meningococcal antigens and antibodies detected in patients and carriers.

Infect Immun 1983. 40 : 398 - 406

3 - Sanou A.

Étude des formes comateuses des méningites purulentes (sur 10 années, 1961 - 1970)

These Med Dakar 1974 N°4

3 - Sokona H.

Étude épidémiologique et bactériologique des méningites purulentes dans le district de Bamako (A propos de 360 prélèvements)

These Pharmacie Bamako, 1988 N°14

9 - Selander R.K, Caugant D.A, Ochman H.

Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics

10 - Sanogo (Zimogo Zie)

Contribution à l'étude de la méningite cérébrospinale au MALI

These Medecine Bamako, 1974 N°4

11 - Thera D.

Étude épidémiologique et Bactériologique des méningites à méningocoques dans le district de Bamako.
(A propos de 1295 cas recensés de 1979 à 1989)

These Pharmacie Bamako 1989

- Tikhimirov E.

Global overview of meningococcal meningitidis inter country
status on preparedness and response to meningococcal meningitidis
"break"

W.H.O./ Geneva Switzerland 4 - 7 septembre 1987.

- Tikhomirove

Meningococcal meningitidis global situation and control measures

D. H.I.H. Statist. quart. 1987. N°2 98 - 109

- Veyssier P.
Infections à meningocoques

C. Medico chir (PARI) 9.197.6 8013 A

- Wyle F.A; Artenstein M.S, And Lowenthal J.P.
Immunological response of man to group B meningococcal
lysaccharide Vaccines.

Infect. Dis 1972 - 126 - : 514 - 522

- Zollinger F.E; Hebel B.H; and Wong W.
Mechanism of action of autolysin (S) of Neisseria gonorrhoeae
in the gonococcus.

J. B. New York, 1977. PP.197 - 212.

n = TRAORE

nom = Amadou Diadié

titre de la Thèse = Epidémiologie Moléculaire des Meningites à Meningocoque au Mali 1990 partie 1.

année : 1989 - 1990

Lieu de Soutenance = Bamako

Lieu d'origine : Mali

objet d'intérêt : Etude des Protéines de la membrane du Meningocoque par des techniques de la Biologie Moléculaire.

résumé : Pendant une période de 12 mois, de Novembre 1989 à Décembre 1990, 103 Lcr ont été étudiés dans le laboratoire de Bactériologie de l'INRSP, et à l'institut Max planck de Berlin. Au Mali, le Meningocoque de serogroupe C prédomine. En outre, suite, le meningocoque de serogroupe A, 2 souches de N. meningitidis/subflava ont été isolés et congelés et une souche de meningitidis de serogroupe X fut également isolée.

Nouveaux anticorps monoclonaux réalisés à partir des souches maliennes furent testés.

l'anticorps P1.y semble être spécifique de la souche Malienne MnC et est très immunogène et protecteur dans un modèle expérimental utilisant le rat.

Le nouveau vaccin doit contenir en plus des polysaccharides conjugués des protéines de classe 1.

IMMENT DE GALIEN

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

honoré ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon
; et de leur témoignage; ma reconnaissance en restant fidèle
leur enseignement :

exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession
de conscience et de respecter non seulement la législation
vigoureuse, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et
désintéressement .

ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le
l'ade et sa dignité humaine .

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

se les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes
promesses, que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes
frères si j'y manque.