

### **SIGLES ET ABREVIATIONS :**

**ANC** : Acide Nalidixique, Colimicine ou Colistine

**APSA** : Anti-polysaccharides A

**ASLO** : Antistreptolysine O

**BEA** : Bile Esculine Azide, **BEAA** : Bile Esculine Azide Agar

**BGAS2000** : Groupe A Streptococcique Bamako 2000

(Streptocoque du Groupe A Bamako 2000)

**CMS** : Capitaine Mamady Sylla

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

**CSCOM** : Centres de Santé Communautaires

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

**Dnase B** : Les streptodornases B

**EDTA** : Ethylène Diamine Tétra Acétique

**GNA** : Glomérulonéphrite Aiguë

**GO** : Gélose Ordinaire

**GrAS** : «Group A Streptococcus» (Streptocoque bêta hémolytique du groupe A)

**GS** : Gélose au Sang

**ID** : numéro d'identification

**LAP** : Leucine Aminopeptidase

**PCR**: «Polymerase Chain Reaction» ou

(ACP : Amplification en Chaîne par Polymérase)

**PMA** : Paquet Minimum d'Activité

**PYR** : Pyrrolidonyl arylamidase

**QC**: «Quality Control» (Control de Qualité)

**RAA** : Rhumatisme Articulaire Aigu

**SOP**: «Standard Operating Procedure» (Modes Opératoires Normalisés )

**TAE** : Tris Acétate d'EDTA

**TSA**: Tryptic Soy Agar

**PLAN :**

**INTRODUCTION**

**OBJECTIFS**

**GENERALITES SUR LES STREPTOCOQUES**

**METHODOLOGIE**

**PRESENTATION DES RESULTATS**

**COMMENTAIRES ET DISCUSSION**

**CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

## TABLE DES MATIERES :

1. Introduction.....	1
2. Objectifs.....	3
2. 1. Objectif général.....	3
2. 2. Objectifs spécifiques.....	3
3. Généralités.....	4
3. 1. Rappel sur les streptocoques.....	4
3. 1. 1. Morphologie et classification.....	4
3. 1. 2. Habitat.....	8
3. 1. 3. Pouvoir pathogène.....	8
3. 1. 4. Isolement.....	8
3. 1. 5. Identification.....	9
3. 2. <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	10
3. 2. 1. Définition.....	10
3. 2. 2. Historique.....	11
3. 2. 3. Caractères morphologiques et culturels du streptocoque A.....	11
3. 2. 4. Caractères antigéniques.....	12
3. 2. 5. Epidémiologie.....	15
3. 2. 6. Identification génétique des streptocoques.....	17
3. 2. 7. Point sur la fabrication d'un vaccin.....	17
3. 2. 8. Pathogénie.....	18
a. Angine.....	18
b. Complications.....	18
4. Méthodologie.....	21
4. 1. Cadre d'étude.....	21
4. 1. 1. Présentation du Centre pour le Développement des Vaccins (CVD)-Mali.....	21
4. 1. 2. Laboratoire de recherche.....	22
4. 1. 3. Les sites de prélèvement.....	23

4. 2. Type d'étude.....	23
4. 3. Période d'étude.....	24
4. 4. Population d'étude.....	24
4. 4. 1. Critères d'inclusion.....	24
4. 4. 2. Critères de non inclusion.....	24
4. 5. Echantillonnage.....	24
4. 6. Prélèvement.....	25
4. 7. Technique d'identification.....	25
4. 7. 1. Matériels et réactifs.....	25
4. 7. 2. Identification du GrAS.....	26
4. 7. 3. Test d'agglutination anti-A.....	28
4. 7. 4. Catalase.....	29
4. 7. 5. PYR test.....	30
4. 7. 6. Coloration de Gram.....	32
4. 8. Extraction de l'ADN, Réaction de PCR pour rechercher le gène emm...35	
4. 8. 1. Procédure d'extraction de l'ADN.....	35
4. 8. 2. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	36
a. Introduction.....	36
b. Cycles de la PCR.....	37
c. Technique de la PCR .....	38
d. Migration sur gel .....	40
e. Purification du produit de PCR.....	43
f. Préparation du séquençage.....	43
g. Principe.....	44
5. Ethique et protection des sujets humains.....	45
5. 1. Comité d'Ethique Institutionnel.....	45
5. 2. Consentement éclairé.....	45
5. 3. Compensation.....	46
5. 4. Traitement des enfants.....	46

6. Résultats.....	47
6. 1. Résultats sociodémographiques.....	47
6. 2. Résultats analytiques.....	51
7. Commentaires et Discussions.....	56
7. 1. Méthodologie.....	56
7. 2. Difficultés et limites de l'étude.....	56
7. 3. Caractéristiques sociodémographiques.....	56
7. 4. Résultats de biologie moléculaire.....	58
8. Conclusions.....	59
9. Recommandations.....	60
10. Références.....	61
11. Résumé.....	65

**TABLEAUX :**

<b>TABLEAU I :</b> Classification des streptocoques humain et animal sérologiquement groupables selon Lancefield.....	6
<b>TABLEAU II :</b> Classification des streptocoques humain et animal sérologiquement non groupables selon Lancefield.....	7
<b>TABLEAU III :</b> Taille approximative des différentes écoles (Sites de prélèvements).....	47
<b>TABLEAU IV :</b> Répartition des participants en fonction de la tranche d'âge.	47
<b>TABLEAU V :</b> Répartition des participants en fonction du sexe.....	48
<b>TABLEAU VI :</b> Répartition des participants en fonction de la provenance...	49
<b>TABLEAU VII :</b> Répartition des participants en fonction du germe .....	50
<b>TABLEAU VIII :</b> Répartition des participants en fonction de la saisonnalité..	50
<b>TABLEAU IX :</b> Fréquence GrAS – Sexe.....	51
<b>TABLEAU X :</b> Fréquence GrAS - Tranches d'âge.....	51
<b>TABLEAU XI :</b> Fréquence GrAS – Provenance.....	52
<b>TABLEAU XII :</b> Fréquence GrAS – Saison.....	52
<b>TABLEAU XIII :</b> Proportion du gène emm sur les 100 premiers cas de GrAS analysés par PCR.....	53, 54

## FIGURES ET GRAPHIQUES:

<b>Figure 1</b> : Schéma d'une coupe de <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	10
<b>Figure 2</b> : Aspect microscopique de <i>Streptococcus pyogenes</i> disposé en paires et/ou en chaînettes .....	11
<b>Figure 3</b> : Prélèvement de gorge avec de nombreuses colonies beta hémolytiques (gélose au sang frais) .....	12
<b>Figure 4</b> : Image d'un test d'agglutination (Négatif et Positif) .....	29
<b>Figure 5</b> : Image d'une réaction de catalase sur lame (Négative et Positive) .....	30
<b>Figure 6</b> : Réactifs de PYR Test .....	31
<b>Figure 7</b> : PYR test positif .....	31
<b>Figure 8</b> : PYR test négatif .....	31
<b>Figure 9</b> : Aspect de <i>Streptococcus pyogenes</i> au microscope après coloration de Gram .....	34
<b>Figure 10</b> : Cuve remplie de tampon et transformateur utilisés pour l'électrophorèse en gel d'agarose .....	40
<b>Figure 11</b> : Mise en place du peigne et des joints de coulage (mini cuve pour gel 8 x 6,5 cm) .....	41
<b>Figure 12</b> : Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose 15 x 10 cm (15 puits) Noter la migration du colorant de charge de la cathode vers l'anode .....	41
<b>Figure 13</b> : Image du gel après migration .....	42
<b>Graphique 1</b> : Représentation graphique des participants selon les tranches d'âge.....	48
<b>Graphique 2</b> : Représentation graphique des participants selon le sexe .....	49
<b>Graphique 3</b> : Représentation graphique des résultats de la PCR .....	55

## **1. Introduction:**

Le streptocoque hémolytique du groupe "A" ou *Streptococcus pyogenes* ou Group A Streptococcus (GrAS) est un germe très pathogène strictement humain, il occupe une place importante dans les infections streptococciques. Il se transmet exclusivement d'Homme à Homme. Il est responsable d'infections fréquentes bénignes et non invasives, telles que l'angine et l'impétigo, et également d'infections invasives graves comme les bactériémies, les infections cutanées nécrosantes, le rhumatisme articulaire aigu (RAA), les pleuro-pneumopathies, les septicémies et les méningites.

Le taux de mortalité des infections invasives à streptocoque du groupe A est estimé entre 10 et 16% toutes pathologies confondues (les taux de mortalité sont respectivement de 35 à 75% en cas de choc toxique streptococcique, 20 à 45% pour les dermo-hypodermes nécrosantes et de 27% pour les méningites). [1 ; 2] Aux Etats-Unis, selon certaines estimations il y aurait eu 30 millions d'infections par an [3], 1000 décès de maladies invasives à GrAS et 0,5 cas de rhumatisme articulaire aigu sur 100.000 habitants. [4]

Selon certaines publications, 5 à 40% des angines sont dues au streptocoque bêta hémolytique du groupe A. [5]

L'ampleur est présumée être à son maximum dans les pays en voie de développement, mais les données sur l'épidémiologie des infections à streptocoque du groupe A ne sont pas complètement élucidées dans beaucoup de régions pauvres du monde. Les mesures de lutte contre le *Streptococcus pyogenes* telles que l'utilisation empirique d'antibiotiques, n'ont pas eu d'impact majeur sur l'ampleur globale de la maladie, laissant des espérances sur un vaccin très efficace.

Cependant quelques instituts de recherche comme le Centre pour les Vaccins en Développement (CVD) de l'Université de Maryland ont fait quelques études sur le premier vaccin moderne contre le GrAS. [6]



Ce seul vaccin contient des sections de multiples protéines M et il est supposé protéger seulement contre des souches exprimant des protéines M particulièrement retrouvées dans le vaccin. Bien qu'il y existe maintenant plus de 125 gènes différents de protéine M (emm types), le vaccin sur le quel les travaux sont assez avancés contient des épitopes de seulement 26 de ces 125 types de gènes. Les types inclus dans ce vaccin ont été choisis sur la base de leur importance dans la structure du gène. Ces différents travaux sur le vaccin ont été faits aux Etats Unis et dans d'autres pays développés. Malheureusement, en Afrique la distribution de ces emm types reste peu connue d'où l'intérêt pour le CVD-Mali de conduire cette présente étude afin de pouvoir discuter de ce phénomène.

## **2. Objectifs :**

### **2. 1. Objectif général :**

Décrire l'épidémiologie de Streptocoque du groupe A chez les jeunes enfants et adolescent âgés de 5 à 16 ans vivant au Mali.

### **2. 2. Objectifs spécifiques :**

**2. 2. 1.** Identifier les streptocoques du groupe A dans les prélèvements de gorge par les méthodes de bactériologie clinique.

**2. 2. 2.** Déterminer la prévalence des streptocoques du groupe A par sexe, par tranche d'âge, par site de prélèvement et par saisonnalité.

**2. 2. 3.** Rechercher le gène emm codant pour la protéine M par la méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction) sur tous les prélèvements positifs.

**2. 2. 4.** Déterminer la prévalence du gène emm prédominant chez les streptocoques du groupe A qui code pour la protéine M.

### **3. Généralités :**

#### **3. 1. Rappel sur les streptocoques :**

Le manuel de Bergey sur la bactériologie systématique décrit les streptocoques comme des bactéries Gram positif, catalase négative, anaérobie facultative formant des cellules ovoïdes ou sphériques de moins de 2µm de diamètre. L'ADN du génome contient 34 à 46% molaire de nucléotides C et G (C = Cytosine ; G = Guanine).

Cependant les streptocoques poussent en présence d'oxygène (O<sub>2</sub>) et sont incapables de synthétiser le composé hème et sont ainsi incapables de métabolisme respiratoire.

Certaines souches de *Streptococcus pneumoniae* et certains *Streptococcus viridans* demandent un taux élevé de CO<sub>2</sub> (5%) pour la croissance ; la croissance de beaucoup de souches de streptocoques est stimulée dans un milieu atmosphérique enrichi de CO<sub>2</sub>. Les streptocoques sont nutritionnellement fastidieux avec une demande de variabilité nutritionnelle ; et poussent sur milieu complexe additionné de sang ou de sérum.

Le glucose et autre carbohydrate sont métabolisés par fermentation avec production d'acide lactique comme produit final majeur.

Le gaz n'est pas produit comme résultat du métabolisme du glucose. Les souches de streptocoques produisent une enzyme : la leucine aminopeptidase (LAP), mais la production du pyrrolidonyl arylamidase (PYR) est rare chez les streptocoques. Elle existe seulement chez les souches de *Streptococcus pyogenes* et certaines souches de pneumocoques. [7]

#### **3. 1. 1. Morphologie et Classification :**

Ce sont des diplocoques Gram positif dont la culture se fait en anaérobiose. Ils ne possèdent pas de catalase, ni d'oxydase, et sont toujours ou presque immobiles. Les *Streptococcus* sont souvent disposés en paire (diplocoque) et/ou en chaînettes plus ou moins longues.

Leur classification est fondée sur des critères immunologiques et les caractères antigéniques du polysaccharide présent sur les parois des bactéries (Classification de Lancefield : voir TABLEAU I et II). Ces aspects permettent de définir 18 groupes sérologiques dont les plus importants sont :

Le groupe A comportant la grande majorité des streptocoques pathogènes pour l'Homme de même que les groupes C et G, tous bêtas hémolytiques.

Le groupe B comportant des hôtes habituels des voies digestives ainsi que le groupe D qui comprend des entérocoques et le streptocoque sanguin, le streptocoque mutule, le streptocoque mitans que l'on retrouve dans la plaque dentaire et le pneumocoque. [8]

**TABLEAU I :** Classification des streptocoques humain et animal sérologiquement groupables selon Lancefield. [9]

GROUPES	ESPECES	HABITAT
A	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Homme: rhino-pharynx, peau, intestin
B	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Vache: mamelles Homme: intestin, voies génitales, rhino-pharynx
C	<i>Streptococcus equissimilis</i> <i>Streptococcus zooepidemicus</i> <i>Streptococcus equi</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Homme: rhino-pharynx, peau Animaux divers Cheval Vache
D	<i>Streptococcus faecalis</i> <i>Streptococcus faecium</i> <i>Streptococcus durans</i> <i>Streptococcus avium</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Streptococcus equinus</i>	Homme: intestin, voies génitales Volaille et autres animaux Vache, Homme Cheval et autres animaux
E	<i>Streptococcus uberis</i>	Vache
F	<i>Streptococcus anginosus</i>	Homme: rhino-pharynx, intestins
GHKLM	<i>Streptococcus sp</i>	Homme: rhino-pharynx, intestins
N	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i>	Lait et produits divers
R	<i>Streptococcus suis</i>	Intestins (porcs)

**TABLEAU II :** Classification des streptocoques humain et animal sérologiquement non groupables selon Lancefield. [9]

Groupes	Espèces	Habitats
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Salive – intestins
	<i>Streptococcus mitor</i> ( <i>mitus</i> )	Rhino-pharynx
	<i>Streptococcus sanguis I</i>	Rhino-pharynx
	<i>Streptococcus sanguis II</i>	Peau, intestin
	<i>Streptococcus milleri</i>	Rhino-pharynx, Intestin, dents
	<i>Streptococcus mutans</i>	Rhino-pharynx, dents
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Rhino-pharynx
	<i>Streptococcus morbillorium</i>	Homme – Animaux
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Lait – yaourt

### **3. 1. 2. Habitat :**

Ce sont des bactéries fragiles, très généralement parasites des muqueuses en particulier buccales, digestives et rhinopharyngées.

### **3. 1. 3. Pouvoir pathogène :**

Les *Streptococcus* et *Enterococcus* sont des pathogènes opportunistes, ils peuvent parfois être strictement pathogènes, provoquant de nombreuses maladies.

### **3. 1. 4. Isolement :**

Les *Streptococcus pyogenes*, *pneumoniae*, non groupables et bien d'autres poussent difficilement sur gélose ordinaire voire pas du tout, et cela pour des raisons nutritionnelles et des conditions de culture. Le milieu d'isolement doit donc être riche : une gélose au sang frais ou au chocolat enrichi (au sang cuit) sera le milieu de choix.

Les Streptococcaceae, catalase négative préfèrent particulièrement la gélose au sang frais parce qu'elle apporte la catalase grâce à l'hémoglobine. C'est cette catalase qui facilitera la culture en éliminant le peroxyde d'hydrogène produit en aérobiose.

Le milieu peut être rendu sélectif par :

- Addition d'azide de sodium ( $\text{Na}_3\text{N}$ ) qui inhibe les bactéries respirant en aérobiose comme les Entérobactéries, les *Pseudomonas*, les *Staphylococcus*.
- Addition d'un mélange ANC (Acide Nalidixique, Colimicine ou Colistine) qui inhibe de nombreuses bactéries.

Les *Enterococcus* sont des bactéries moins exigeantes qui peuvent être isolés sur gélose ordinaire. Le milieu habituel des agents sélectifs est l'azide de sodium et la bile qui inhibent de nombreux Gram positif. La gélose sélective habituelle est le milieu BEA (Bile Esculine Azide) ou BEAA (Bile Esculine Azide Agar).

Le streptocoque du groupe B peut être cultivé sur gélose ordinaire comme les Enterococcus. Le milieu de choix sera donc la gélose au sang frais incubée en anaérobiose ou en atmosphère enrichie en dioxyde de carbone.

### **3. 1. 5. Identification :**

Les moyens utilisés pour l'identification sont :

- Hémolysé de type bêta
- Hémolysé de type alpha
- Galerie biochimique : on pourra utiliser entre autre la galerie de Sherman ancestrale et une galerie miniaturisée.
- Tests immunologiques :
  - Agglutination sur lame des pneumocoques (Pneumo Kit)
  - Agglutination sur lame du streptocoque bêta hémolytique A, B, C, D et F, G. On tiendra compte particulièrement du milieu de départ.

Les *Streptococcus pyogenes* et *pneumoniae* ne poussent pas ou très mal sur gélose ordinaire. Seuls les Enterococcus poussent sur BEA (parfois Streptococcus B). On distinguera donc deux cas : l'isolement sur gélose au sang frais (GS) et l'isolement sur gélose ordinaire (GO) ou autre gélose ordinaire.

L'isolement sur gélose au sang (frais) de mouton : l'identification des Streptococcus se fera en tenant compte du résultat de l'hémolyse :

- Bêta hémolytique ou hémolyse bêta, on soupçonne un *Streptococcus pyogenes*, ou *Streptococcus agalactiae* (Groupe B): ces streptocoques sont prétraités par l'hémolysine bêta des Staphylococcus. Ils possèdent aussi une hippuricase et portent une capsule permettant de distinguer des sérovars.
- Alpha hémolytique ou hémolyse alpha, on soupçonne un *Streptococcus pneumoniae* (Pneumocoque). [8]



### 3. 2. *Streptococcus pyogenes* :

#### 3. 2. 1. Définition :

Ce sont des cocci à Gram positif associés en paire et/ou en chaînettes. Dénommé aussi «streptocoques du groupe A», «streptocoque bêta hémolytique du groupe A», ils sont responsables d'angines, de suppurations, d'infections localisées ou invasives (cellulites gangreneuses ou fasciites nécrosantes et septicémies) qui peuvent être accompagné d'un choc toxique. Des complications inflammatoires sévères, comme la cardite rhumatismale, peuvent se manifester quelques semaines après une infection bénigne, voire inapparente. Très sensible à la pénicilline G. [10]

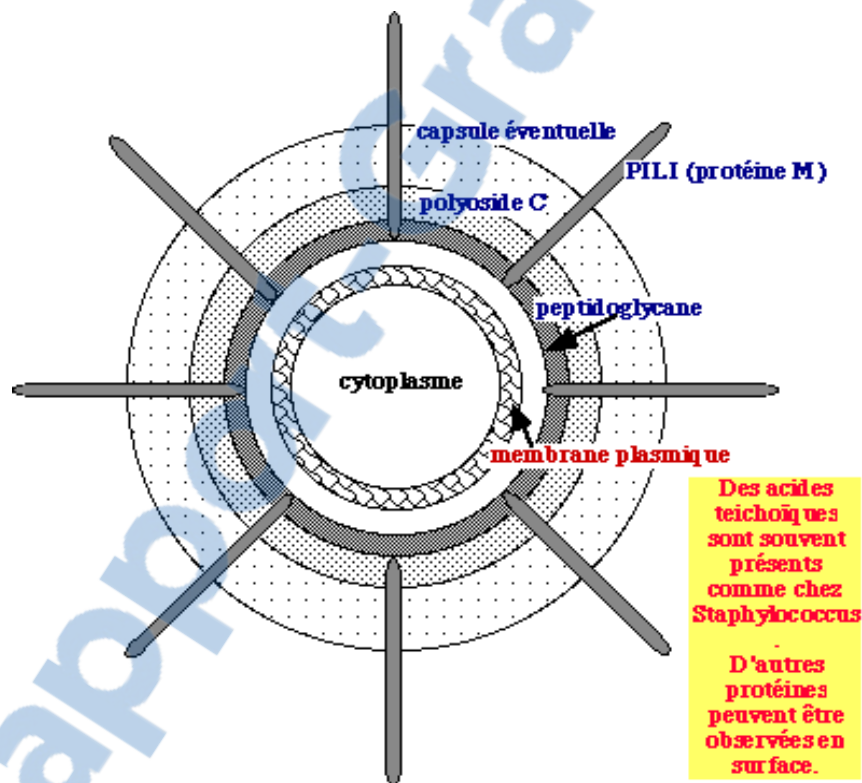


Figure 1 : Schéma d'une coupe de *Streptococcus pyogenes*. [11]

### **3. 2. 2. Historique :**

Les Fièvres puerpérales sont connues avant même que leurs étiologies bactériennes soient confirmées par Pasteur entre 1822 à 1895, par Koch de 1843 à 1910.

Rébecca Lancefield caractérise l'antigène du groupe A et le facteur majeur de pathogénicité : la protéine M (1928).

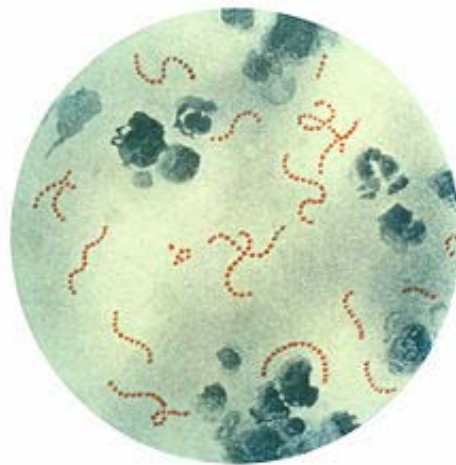
La scarlatine maligne : est associée à un syndrome toxique en 1873.

Le Syndrome de Meleney : cellulite gangreneuse en 1924.

### **3. 2. 3. Caractères morphologiques et cultureux du streptocoque A :**

#### **➤ Morphologie :**

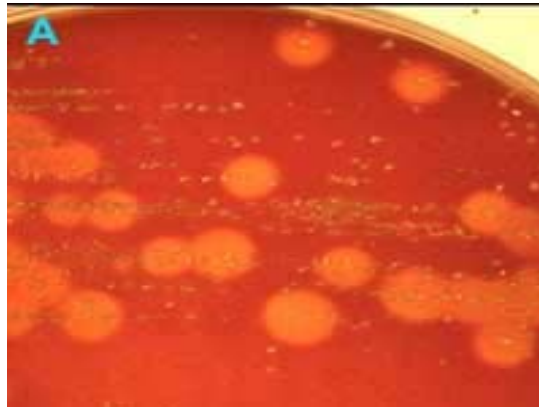
Le *Streptococcus pyogenes* est un coccus Gram positif, sphérique disposé en paire et/ou en chaînettes.



**Figure 2 :** Aspect microscopique de *Streptococcus pyogenes* disposé en paire et en chaînettes. [12]

➤ **Culture :**

La mise en culture de cette bactérie nécessite un milieu au sang frais et une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>. Après 24 à 48 heures d'incubation, les colonies apparaissent entourées d'un halo clair qui correspond à une hémolyse complète appelée hémolyse bêta.



**Figure 3 :** De nombreuses colonies bêta hémolytiques (gélose au sang frais). [13]

**3. 2. 4. Caractères antigéniques :**

➤ **Description des antigènes de structure :**

**La capsule :** elle est constituée d'acide hyaluronique ; c'est un facteur de virulence qui permet à la bactérie d'échapper à la phagocytose. Des souches mucoïdes, riches en acide hyaluronique sont associées à la virulence et au risque rhumatogène. [1, 2]

**La protéine T :** elle est située à la surface de la bactérie, elle permet la fixation de la bactérie aux cellules épithéliales de l'oropharynx.

**La protéine M :** elle est l'élément de virulence le plus important du GrAS, les streptocoques riches en protéine M résistent à la phagocytose et possèdent un pouvoir invasif plus important. [2]

Cette protéine est le support des sérotypes, qui sont au nombre de 80 ; on a décrit des sérotypes rhumatogènes et d'autres néphritogènes. [3, 4]

La technique classique de typage de la protéine M reste la méthode de référence bien que près de 60% de ces protéines soient non typables. [14]

Les anticorps dirigés contre la protéine M sont protecteurs contre une réinfection par une souche exprimant la même spécificité antigénique. Le retard d'apparition de ces anticorps limite leur intérêt dans le diagnostic d'une infection aiguë à GrAS. [1]

**Le polysaccharide :** appelé aussi carbohydrate, il a été un support antigénique important de la classification de R. Lancefield en 1934, qui a permis de déterminer 19 groupes de streptocoques, dont les groupes A, C et G sont impliqués dans l'angine. Les différents groupes de streptocoques se différencient par la spécificité de leur polysaccharide A à l'exception des streptocoques du groupe D chez lesquels l'antigène de groupe est défini par l'acide téichoïques pariétal. Certains dépourvus de polysaccharides (carbohydrate) spécifiques sont dits non groupables, ils se différencient par des critères biochimiques. Les anticorps anti-polysaccharides A sont produits après des infections pharyngées et cutanées répétées à GrAS. Le taux de ces anticorps est élevé au cours du RAA et de la GNA (Glomérulonéphrite aiguë). Ils atteignent un pic maximum trois semaines après une pharyngite puis diminuent progressivement entre 6 et 12 mois. Si le patient présente une cardiopathie valvulaire rhumatismale, telle qu'une insuffisance mitrale, ils persistent alors pendant plusieurs années. [15]

La présence d'une lésion valvulaire est associée à la libération de glycoprotéines à partir des valves altérées. Ces glycoprotéines ont une communauté antigénique avec le polysaccharide A. [4]

Ces anticorps anti-polysaccharides A persistent avec un taux élevé dans le sérum de ces patients. Le dosage des anti-polysaccharides A (APSA) fait appel à une technique immuno-enzymatique assez lourde. En plus sa réalisation nécessite la production de l'antigène polysaccharide qui est longue et coûteuse ce qui rend le dosage des APSA non réalisable en routine. Au début des années 90 comme un marqueur prometteur pour le diagnostic différentiel des cardiopathies

rhumatismales, le dosage des APSA a vu son intérêt diagnostique relégué au second plan car de nombreux travaux ont montré ses limites du fait qu'il ne permettait de l'identifier qu'après des dosages sériques étalés sur plusieurs années. [4]

➤ **Caractéristiques des substances antigéniques :**

Le streptocoque élabore des substances antigéniques. Les anticorps dirigés contre ces antigènes sont un indicateur de la présence d'une infection streptococcique.

**Toxines érythrogènes ou pyrogènes :** Il s'agit des toxines A, B, C qui sont en particulier responsables de l'éruption scarlatinoforme.

Les toxines A et C ont des propriétés de superantigènes. Elles peuvent se lier directement aux régions V bêta de sous populations de lymphocytes T (LT) et aux molécules de la classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'activité des lymphocytes par un super antigène entraîne de nombreuses réactions cellulaires en particulier la prolifération ou parfois l'accélération de l'apoptose de certains LT, la production de cytokines. Les conséquences physiopathologiques en sont l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la fièvre, l'hypotension. Le choc toxique streptococcique est le plus souvent associé aux souches productrices d'endotoxines, surtout la toxine A. La toxine B n'a pas d'activité de super antigène. Elle a une activité cystéine protéase qui, en clivant un précurseur de l'interleukine 1 bêta (IL1 bêta) pourrait participer à la virulence.[34]

**La streptolysine O :** élaborée par le GrAS et quelques streptocoques du groupe C et G, produit un effet cytolytique sur les globules rouges (GR). Sa principale propriété est sa cardiotoxicité. Cette substance induit la formation des anticorps antistreptolysine O (ASLO) qui apparaissent vers le 10<sup>ième</sup> jour, atteignent un maximum vers la 3<sup>ième</sup> et la 4<sup>ième</sup> semaine et chutent à partir de la 6<sup>ième</sup> ou la 8<sup>ième</sup> semaine avec un taux faible (taux résiduel) et stable. Les titres seuils de

ces anticorps varient avec les régions géographiques, les saisons et les conditions socio-économiques. On admet que 20% des malades qui font une crise de RAA puissent avoir un taux d'ASLO normal au cours des deux premiers mois de la maladie. [16]

Par ailleurs des réactions faussement positives peuvent être observées dans les sérums au cours de l'hyperlipidémie.

**Les streptodornases B (Dnase B) :** appelées aussi désoxyribonucléases, sont des substances qui existent sous quatre formes antigéniques A, B, C et D. Elles sont élaborées principalement par le GrAS et une partie des streptocoques du groupe C et G. Ces substances ne sont pas impliquées dans la cytotoxicité mais elles ont pour fonction la dépolymérisation des acides nucléiques. Les anticorps induits (anti-Dnase) apparaissent plus tardivement que les ASLO (4<sup>ème</sup> semaine). Ils atteignent leur maximum en 6 semaines et le retour à la valeur normale est plus lent que celui des ASLO qui est d'environ un an. Ces anti-streptodornases ont un intérêt certain pour confirmer une infection streptococcique, ils se positivent plus couramment au cours des infections cutanées et dans les cas de GNA. Les ASLO ainsi que l'anti-Dnase sont de bons marqueurs pour un diagnostic sérologique du RAA mais ils ne confèrent pas l'immunité antistreptococcique.

### **3. 2. 5. Epidémiologie :**

L'épidémiologie du GrAS a subi une évolution dans les pays développés où les infections invasives telles que la fasciite nécrosante, le «syndrome de choc toxique» et les septicémies sont de plus en plus fréquentes. [17]

Dans les pays en voie de développement le RAA et la GNA demeurent un réel problème de santé publique. [18]

### **Influence des sérotypes de la protéine M sur l'incidence de la maladie :**

La virulence du GrAS est liée d'une part à l'hyper production de la capsule et d'autre part aux sérotypes de la protéine M. Aux USA, le sérotype M1 est l'un

des sérotypes le plus prévalant qui a été isolé chez des patients qui faisaient une infection sévère. [19]

Les types M1, 3, 5, 6, 14, 18, 19 et 24 sont souvent responsables de cas de RAA; les sérotypes M1, 4, 12 sont impliqués dans la GNA au décours d'une angine et les sérotypes M49, 55, 57 et 60 au cours d'une infection cutanée. [2]

La distribution des sérotypes est variable selon les régions géographiques. Le M18 a été à l'origine d'épidémies de RAA au cours de la deuxième moitié des années 80 aux USA. [4] Depuis cette époque des flambés épidémiques de RAA en îlots ont été décrites dans des populations peu ou mal immunisées contre le sérotypes M18. [20]

En Angleterre le sérotype M18 est rarement à l'origine du RAA et le sérotype M49 est rarement retrouvé au cours d'une GNA. [21]

Une limite au sérotype M est constituée par le taux élevé de protéine M non sérotypable dans les pays où le GrAS est endémique notamment en Thaïlande, en Malaisie, et en Australie du Nord. Dans cette région, 60% des GrAS isolés à partir des cas d'impétigo retrouvés dans les communautés aborigènes sont non typables. [14]

En Algérie, deux études séro-épidémiologiques ont été réalisées à Alger en 1993/94 et en 1996/97. La première qui concernait 1141 sujets présentant une infection pharyngée a montré que le sérotype M1, reconnu comme hautement virulent, représentait 6,6% des GrAS circulants alors que le sérotype M18 était absent. Au cours de la deuxième étude faite sur 361 sujets sains qui avaient des manifestations cliniques évocatrices d'infection streptococcique récente ou tardive, on a retrouvé une nette augmentation des profils T à tropisme infectieux cutané. Ces profils T sont représentés par T8, T2, T22, alors que le sérotype M1 n'a pas été isolé. [22]

### **3. 2. 6. Identification génétique des streptocoques : Apport des techniques de biologie moléculaire :**

Les progrès considérables des techniques de clonage de l'ADN bactérien ont permis de décrire l'épidémiologie moléculaire du GrAS. L'analyse des séquences d'ADN codant pour la protéine M (emm) a mis en évidence des protéines M spécifiques à une région géographique donnée. Ces protéines sont essentiellement clonales, définissant ainsi des souches de GrAS épidémiogènes et d'autres non épidémiogènes. [14, 21]

Nous avons pu montrer, dans les régions où l'infection à GrAS était endémique, l'existence chez un même individu de plusieurs souches de GrAS génétiquement distinctes, offrant un milieu favorable pour les échanges de gènes entre les souches. Ce phénomène de variations antigéniques mineures des gènes codant pour les antigènes de la protéine M, appelé le «Drift» survient de manière cyclique, tous les six ans et il serait à l'origine de l'apparition de nouveaux sérotypes. [18, 19]

### **3. 2. 7. Le point sur la fabrication d'un vaccin :**

La compréhension de la réponse immune a contribué au développement des recherches dans le but de la fabrication d'un vaccin contre le GrAS. Ces travaux portent sur la structure fine de la protéine, plus particulièrement sur les régions N terminales qui sont les plus immunogènes. Malgré ces travaux, deux étapes restent encore à franchir avant d'arriver à la mise au point d'un vaccin efficace :

La première est de rechercher des zones antigéniques stables qui ne subissent pas de variations, ceci afin d'assurer une immunisation par les différents épitopes.

La seconde se rapporte au type des anticorps induits qui doivent non seulement être protecteurs mais aussi ne pas réagir avec les tissus de l'hôte. [5]

Dans le cas des infections sévères où le GrAS synthétise une toxine responsable du choc toxique, on s'oriente vers la fabrication d'un vaccin à base d'anatoxine.



### **3. 2. 8. Pathogénie :**

#### **a. Angine :**

L'angine est la plus fréquente des infections à streptocoque, prédominante chez l'enfant et l'adulte jeune. Elle donne lieu à 8 millions de prescriptions d'antibiotiques en France chaque année. Aux USA, 75% des angines aiguës de l'adulte sont traitées par l'antibiotique. Elle est à l'origine du grand nombre de complications.

Les angines à GrAS : ils concernent 25 à 40% des angines chez les enfants, 5 à 25% des angines des adultes. Mais un test positif ne peut affirmer l'origine streptococcique de l'angine car il existe un portage chez des sujets asymptomatiques (environ 5%) et la coexistence de plusieurs virus et bactéries.

Les infections à streptocoque : Manifestations généralisées (septicémie, choc septique, fasciite nécrosante), manifestations localisées (angine, scarlatine, érysipèle, impétigo, pyodermite), manifestations immunologiques à distance (RAA, GNA, Chorée, Erythème noueux).

#### **b. Complications :**

##### **➤ Les complications locorégionales :**

Elles sont diverses, il s'agit entre autres des sinusites, otites moyennes suppurées, mastoïdite, phlegmon amygdalien, adénophlegmon exceptionnellement en terrain débilite, septicémie à streptocoque.

##### **➤ Les complications à distance :**

Il s'agit des complications de mécanisme immunologiques, apparaissant de façon retardée par rapport à l'angine initiale. Elles sont de deux types : le RAA et la GNA.

##### **- Le rhumatisme articulaire aigu (RAA) :**

Il suit obligatoirement une angine chez des personnes prédisposées pour certaines souches de *Streptococcus pyogenes*. C'est une affection auto-immune et on considère que les principales cibles, articulaires et cardiaques résultent

d'une analogie de structure entre le streptocoque bêta hémolytique du groupe A et ces tissus. Le type de protéine M du *Streptococcus* joue un rôle important dans le déterminisme des réactions.

L'incidence du RAA est liée à l'épidémiologie des infections streptococciques de la sphère ORL (Oto- Rhino- Laryngologie). Le RAA survient généralement entre 5 et 10 ans avec un pic à 6 - 8 ans. Il est exceptionnel en dessous de 3 ans. [23]

### **Traitement du RAA :**

Il doit être curatif et prophylactique.

Traitement curatif de la crise :

Il associe le repos au lit, l'antibiothérapie et les anti-inflammatoires.

Le repos au lit est indispensable et le mouvement est autorisé progressivement c'est-à-dire à partir de 3 semaines. En cas d'atteinte cardiaque, il est strict et maintenu pendant 3 mois.

Les antibiotiques : La pénicilline est le meilleur antibiotique contre le streptocoque.

Elle est donnée à forte dose les 10 premiers jours en intraveineux à la dose 1 à 2 millions UI/24 heures. Elle est poursuivie ensuite pour empêcher les rechutes et les récurrences.

Les anti-inflammatoires : la corticothérapie est prescrite à la dose de 2 à 2,5 mg/kg/24 heures pendant 4 semaines.

Si l'examen clinique et la vitesse de sédimentation (VS) sont redevenus normaux depuis au moins une semaine, la posologie est lentement diminuée. Cette diminution s'étale sur 2 semaines, pour diminuer le risque de rebond à l'arrêt de la corticothérapie. A ce stade du traitement, la surveillance ne doit pas être relâchée afin de dépister une nouvelle poussée éventuelle.

On procédera alors au traitement d'une éventuelle défaillance cardiaque initiale.

Traitement prophylactique :

La prophylaxie antimicrobienne continue pour éviter les rechutes.

Elle consiste à l'administration continue de pénicilline retard (Benzathine pénicilline) toutes les 2 à 3 semaines en IM (Intra- Musculaire) (600.000 UI chez l'enfant et 1.200.000 UI chez l'adolescent), ou des prises orales quotidiennes de pénicilline V (Phénoxy-méthyl pénicilline). Ce traitement doit être poursuivie pendant au moins 5 ans et de toute façon couvrir la période pubertaire. Il est recommandé de traiter les adultes jeunes particulièrement exposés : service militaire, enseignants.

Eradication des foyers infectieux streptococciques :

Cette éradication comporte l'amygdalectomie, les soins dentaires et le traitement des sinusites. En cas de persistance de streptocoque bêta hémolytique dans la gorge, il faut procéder à une recherche dans l'entourage. La prévention de la première attaque constitue en fait la véritable prophylaxie du RAA. Elle consiste à traiter toutes les angines et les pharyngites de l'enfant de plus de 3 ans par la pénicilline orale (Phénoxy-méthyl pénicilline) pendant 10 jours.

- **La glomérulonéphrite aiguë (GNA) :**

C'est une maladie à complexes immuns (hyper production d'immunoglobuline G : IgG) qui se manifeste par des dépôts sur le glomérule d'IgG, de complément d'origine infectieuse (dus à un streptocoque), le plus souvent consécutives à une angine non traitée, plus rarement à une infection cutanée comme l'impétigo. Le tableau clinique est dominé par un syndrome néphrétique caractérisé par une atteinte rénale qui survient de 10 à 15 jours après l'angine. Des œdèmes se développent très rapidement aux paupières, dans la région lombaire et aux chevilles. Les urines sont foncées et peu abondantes contenant du sang et des protéines tandis qu'apparaît une hypertension artérielle. Il existe parfois une insuffisance rénale modérée.

Le traitement est symptomatique : restriction d'eau et de sodium, prise de diurétiques pour faire disparaître les œdèmes. Si ces mesures demeurent insuffisantes on a recours à un traitement par des médicaments hypotenseurs. La guérison intervient presque toujours en 10 à 15 jours sans laisser de séquelles.

#### **4. Méthodologie :**

##### **4. 1. Cadre d'étude :**

##### **4. 1. 1. Présentation du Centre pour le Développement des Vaccins (CVD) au Mali et ses activités :**

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

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

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

Le centre est composé actuellement de deux blocs :

- Un bloc administratif composé de :
  - Un laboratoire de recherche au rez-de-chaussée.
  - L'administration organisée comme suite :
    - Un (1) secrétariat principal,
    - Un (1) bureau du coordinateur,
    - Un (1) bureau du gestionnaire,
    - Un (1) bureau du comptable,
    - Deux (2) bureaux des médecins,
    - Une (1) salle de conférence,
    - Un (1) bureau du chef informaticien,
    - Un (1) bureau du chef adjoint informaticien,
    - Une (1) salle informatique,
    - Une salle (1) d'attente,
    - Un (1) magasin et
    - Deux (2) toilettes (Hommes et femmes).
- Une unité clinique composée de :

Cinq (5) boxes de consultation,

Trois (3) bureaux,

Une (1) salle d'attente.

➤ Les personnels :

Vingt quatre (24) Médecins,

Huit (8) pharmaciens,

Des étudiants stagiaires,

Des infirmiers d'état,

Des techniciens de laboratoire,

Treize (13) agents sociaux,

Des informaticiens,

Deux (2) gestionnaires,

Deux (2) secrétaires,

Sept (7) manœuvres.

#### **4. 1. 2. Le laboratoire de recherche :**

- Mise en activité le 17 Décembre 2004 est composé de :

Un (1) laboratoire de microbiologie,

Un (1) laboratoire d'immunologie,

Un (1) laboratoire pour l'étude de la grippe (Laboratoire FLU)

Un (1) bureau du microbiologiste,

Un (1) bureau de l'immunologiste,

Un (1) bureau des techniciens,

Une (1) chambre noire (lecture sous UV = Ultra Violet),

Une (1) salle de préparation des milieux de travail,

Une (1) salle de stérilisation, et

Une (1) toilette.

- Les personnels sont :

- Un (1) Pharmacien microbiologiste,
- Un (1) Pharmacien immunologiste,
- Cinq (5) Pharmaciens généralistes,
- Quatre (4) internes (pharmaciens et médecin),
- Deux (2) techniciens de laboratoire,
- Un (1) technicien supérieur et
- Un (1) manœuvre.

#### **4. 1. 3. Les sites de prélèvement :**

Au cours de notre étude quatre (4) écoles ont été retenues comme site de prélèvement : l'école Capitaine Mamadi Sylla (CMS), Dontémè, Fleuve à Djicoroni Para et l'école publique de Sébénikoro.

La superficie de Djicoroni Para et de Sébénikoro est de moins de 10km<sup>2</sup> dans la circonscription administrative nommée commune IV, situés à l'ouest de Bamako au Mali. Le climat est de type soudanais avec trois saisons (Saison froide, saison sèche et saison pluvieuse).

La population de Djicoroni Para et de Sébénikoro selon les estimations de 2004 s'élevait respectivement à 63.998 et 31.238 habitants, ce qui donne un total de 95.236 habitants. Par rapport aux installations sanitaires, en plus des structures sanitaires privées, il existe deux centres de santé communautaire (CSCOM) qui offrent le paquet minimum d'activité (PMA) incluant les activités préventives et curatives.

#### **4. 2. Type d'étude :**

Notre étude est une étude d'investigation prospective basée sur la surveillance du GrAS chez les enfants scolarisés de 5 à 16 ans dans quatre établissements scolaires publics de Djicoroni Para et de Sébénikoro.

#### **4. 3. Période d'étude :**

L'étude s'est déroulée durant une période allant de mai 2005 à juin 2008.

#### **4. 4. Population d'étude :**

Sélection de la population d'étude : La liste des écoles a été obtenue auprès des Directeurs des écoles participantes.

Les participants étaient composés d'enfants de sexe féminin et masculin inscrits dans l'un des quatre établissements publics primaires dans deux quartiers adjacents de Bamako (Djicoroni Para et Sébénikoro).

##### **4. 4. 1. Critères d'inclusion :**

Agé de 5 à 16 ans (lors de l'inscription scolaire/début de l'année scolaire).

Inscription à l'une des quatre écoles élémentaires participantes à l'étude à Djicoroni Para et Sébénikoro.

Souffrant de pharyngite (Angine).

Consentement éclairé par écrit, en toute connaissance de cause, d'un parent ou du tuteur.

Assentiment éclairé des enfants de plus de 13 ans (lors de l'inscription scolaire/début de l'année scolaire).

##### **4. 4. 2. Critères de non inclusion :**

Enfant ayant quitté l'école par passage en classe supérieur (au-delà de la 6<sup>ième</sup> année) ou par exclusion.

Enfant ayant fait un épisode de pharyngite dans les trente jours précédents.

Refus parental.

Enfant de moins de 5 ans et de plus de 16ans.

#### **4. 5. Echantillonnage :**

L'étude a concerné tous les enfants âgés de 5 à 16 ans (Sexe masculin et féminin) et qui sont inscrits sur la liste des effectifs dans les quatre établissements scolaires mentionnés ci-dessus et qui sont atteints de pharyngite.

#### **4. 6. Le prélèvement :**

Le mode de prélèvement effectué au cours de notre étude a été l'écouvillonnage de la gorge. Le prélèvement était fait au niveau des différents sites par des médecins et des infirmiers. Après prélèvement les écouvillons étaient directement acheminés au laboratoire dans les 4 heures qui suivent le prélèvement.

#### **4. 7. Technique d'identification :**

##### **4. 7. 1. Matériels et réactifs :**

Anse stérile,

Lame stérile,

Tube stérile,

Gélose au sang de mouton 5%,

Incubateur,

Hôte,

Incinérateur,

Pince,

Feutre,

Crayon de papier,

Kit PathoDx (Agglutination GrAS): Ref # R62076; REMEL,

Catalase: Ref #ID-ASE) REF 55 561, BioMerieux,

Bacitracine 0,04UI: Ref# 231552; Becton, Dickinson and Company,

Eau distillée,

Kit de colorant de Gram : Ref# 55542 ; BioMerieux,

Bac de coloration,

Huile à immersion,

Papier buvard,

Microscope binoculaire,

Glycérol 5%,



PYR test : Ref # 62037, REMEL,  
Cryotubes et boîte à souche.

**Documentation de laboratoire :**

Un Registre SOP (Standard Operating Procedure) : Modes Opératoires Normalisés,

Un Registre d'accueil et de report des résultats,

Des Fiches techniques à remplir de la réception de l'échantillon, aux différentes étapes d'identification et au résultat final,

Un Registre de conservation des souches,

Un Registre de QC (Quality Control) : Control de Qualité.

**4. 7. 2. Identification du GrAS :**

- L'écouvillon de gorge reçu au laboratoire est vérifié et enregistré dans le registre d'accueil, de report des résultats et sur la fiche technique.
- Etiqueter une gélose au sang de mouton 5% portant le numéro d'identification (ID) et l'initial du participant.
- Retirer soigneusement l'écouvillon du matériel de transport (milieu de transport) et ensemer la gélose sur une dimension environ 3x2cm près du bord de la gélose.
- Avec une anse stérile faire des stries en ensemençant sur quatre quadrants :  
Avec l'anse, ensemer le premier quadrant tout en revenant dans le premier inoculum une à deux fois.  
Stériliser l'anse à l'incinérateur (lorsque l'anse n'est pas un usage unique), refroidir complètement et insérer dans une partie non souillée de la gélose.  
Ensemencer le deuxième quadrant en revenant dans le précédant seulement une fois.  
Reprendre l'étape de la stérilisation pour ensemer le troisième et quatrième quadrant comme précédemment.
- Incuber la gélose entre 35 - 37°C pendant 18 à 24 heures.

- En cas d'absence de croissance après les premières 24 heures d'incubation, réincuber pour 24 heures supplémentaires.

S'il n'y a toujours pas de croissance, il est considéré comme négatif.

- En cas de croissance, examiner la gélose pour la recherche de colonies bêta hémolytiques qui sont réisolées sur une nouvelle gélose au sang et déposer un disque de bacitracine A (0,04 UI) pour 24 heures.

**NB :** Le disque A est placé sur la gélose dans une zone supposée à forte croissance bactérienne. Il est placé fermement sur la gélose à l'aide d'une pince ou à l'aide d'un autre matériel stérile.

Après 24 heures d'incubation, toute zone d'inhibition au tour du disque A de toute dimension ayant un diamètre supérieur à celui du disque A (0,6cm) indique une sensibilité à la bacitracine.

Ces colonies présumées GrAS sont confirmées par agglutination grâce au latex sensible à l'antigène des streptocoques du groupe A.

- Pour toute colonie bêta hémolytique avec une zone d'inhibition autour du disque A, faire un test de catalase.

Résultat : GrAS est catalase négative.

- Si la catalase est négative, faire le Gram

Les GrAS sont des cocci Gram positif en paire et/ou en chaînettes.

- Sont confirmées GrAS les colonies :

Bêta hémolytique

Bacitracine sensible

Catalase négative

Coloration de Gram: cocci Gram positif en paire et/ou en chaînettes

Test d'agglutination positif

PYR test positif.

- Sont confirmées tout simplement bêta hémolytiques non GrAS les colonies :

Bêta hémolytique

Bacitracine résistante

Catalase négative

Coloration de Gram: cocci Gram positif en paire et/ou en chaînettes

Test d'agglutination négatif

#### **4. 7. 3. Test d'agglutination anti-A :**

##### **Procédure :**

Identifier un tube à essai (tube stérile) pour chaque échantillon et les deux contrôles (Antigènes témoins pour streptocoques des groupes A, B, C, et F, G).

Ajouter deux gouttes du réactif 1 (R1) et deux gouttes du réactif 2 (R2) dans chaque tube.

Transférer dans le tube à l'aide d'une anse stérile une (1) ou quatre (4) colonies bêta hémolytiques bien isolées.

Réaliser une suspension homogène (bouillon pour agglutination).

Laisser les tubes à l'incubation pendant 60 secondes à la température ambiante (15 - 28°C).

Ajouter quatre (4) gouttes du réactif 3 (R3) dans chaque tube, mélanger les réactifs en tapotant le tube du doigt, s'il n'est pas testé immédiatement, conserver le tube hermétiquement fermé entre 2 et 8°C et effectué le test dans les 24 heures.

Designier une zone de test cerclé sur la lame PathoDx pour chaque échantillon ou témoin à tester.

Homogénéiser les réactifs en retournant les flacons ou en les agitant délicatement. Mettre une (1) goutte de latex dans chaque cercle.

Ajouter cinquante microlitre (50µl) [une (1) ou deux (2) gouttes avec une pipette Pasteur] d'extrait dans chaque cercle de test.

Mélanger la suspension bactérienne et le latex avec un agitateur, en utilisant un sticker propre pour chaque cercle d'agglutination.

Maintenir la lame sous une source lumineuse adaptée et agiter légèrement de façon circulaire. Une réaction d'agglutination positive avec le latex se produit

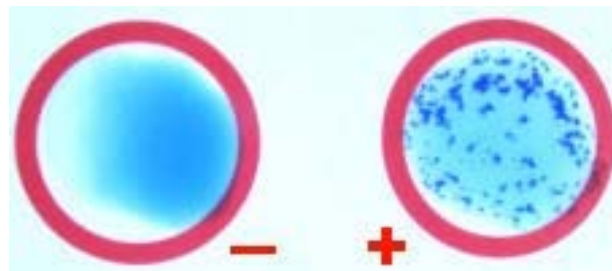
généralement entre 15 et 60 secondes. Cesser d'agiter la lame dès observation d'une réaction positive clairement discernable et noter le résultat.

**NB :** Ne pas manipuler la lame pendant plus de 60 secondes.

**Interprétation :**

Résultat positif : présence d'agglutination.

Résultat négatif : absence d'agglutination.



**Figure 4 :** Image d'un test d'agglutination (Négatif et Positif). [24]

**4. 7. 4. Catalase :**

Ce réactif permet de mettre en évidence la présence d'une catalase. Il permet ainsi la différenciation présomptive des bactéries possédant ce caractère.

**Principe :**

La présence de catalase est détectée chez les micro-organismes par une libération d'oxygène à partir d'eau oxygénée.

La présence d'un agent épaississant et d'un colorant facilite l'observation du dégagement gazeux.

**Procédure :**

Laisser les flacons revenir à la température ambiante.

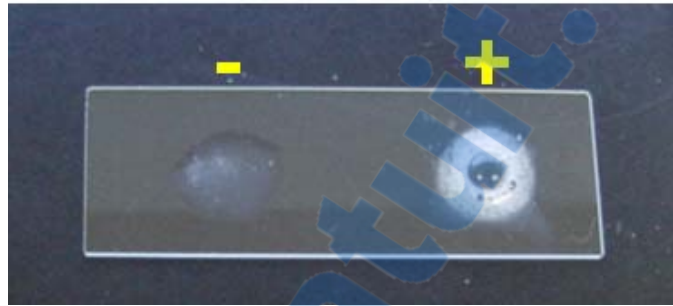
- Test sur lame :  
Déposer sur la lame une (1) goutte d'ID color Catalase,  
Disperser une (1) à deux (2) colonies sur la goutte.
- Test direct sur le milieu de culture :  
Déposer une (1) goutte d'ID color Catalase directement sur la colonie.

### Interprétation :

La présence d'une catalase se traduit par le dégagement immédiat de bulbes d'oxygène.

Résultat positive : Dégagement immédiat de bulbes d'oxygène.

Résultat négative : Pas de dégagement de bulbes d'oxygène.



**Figure 5 :** Image d'une réaction de catalase sur lame (Négative et Positive). [25]

#### 4. 7. 5. Le PYR test :

Le PYR test est un test rapide utilisé pour l'identification du GrAS, Enterococcus et d'autres bactéries sélectives. Il traduit la présence de l'enzyme pyrrolidonyl arylamidase (pyrrolidone aminopeptidase).

D'autres microorganismes autres que le GrAS peuvent être positifs à ce test, il est important de vérifier que les germes ressemblent au streptocoque au Gram et qu'ils sont bêta hémolytique.

Ce test sera utilisé pour confirmer des germes qui sont suspectés comme GrAS (germe à PYR test positif) et de prévenir la mauvaise classification de *Streptococcus anginosus* comme GrAS.

#### Principe :

Il consiste à l'imprégnation de L-acide bêta-pyroglutamique naphthylamide dans le disque de test et qui servira de substrat pour la détection d'arylamidase pyrrolidonyl. L'hydrolyse du substrat rendements bêta-naphthylamide se combine avec le réactif cinnamaldéhyde pour former un rose vif à la couleur rouge cerise.



**Figure 6 :** Les réactifs de PYR Test. [26]

**Procédure :**

Confirmer que le microorganisme est un streptocoque bêta hémolytique ou qu'il ressemble à un entérocoque (petites colonies grises alpha hémolytiques, qui se présentent au Gram comme des cocci Gram positifs en paire et/ou en chaînettes) A l'aide d'une pince stérile, placer le PYR test disque sur la colonie à tester ou placer le disque autour de trois (3) ou quatre (4) colonies.

Transférer le disque sur une lame.

Après 5 minutes ajouter le réactif de PYR test sur le disque.

Observer une coloration rouge se développée sur une durée de 30 à 60 secondes.

**Interprétation :**

Réaction positive : coloration rouge observée avant 60 secondes.

Réaction négative : pas de coloration durant les 60 secondes.

**NB :** Lorsqu'il n'y a pas de coloration au terme des 60 secondes, jeter le disque car il est possible d'observer une coloration après 60 secondes (qui est une fausse réaction positive).



**Figure 7 :** PYR test positif. [26]



**Figure 8 :** PYR test négatif. [26]

#### **4. 7. 6. Coloration de Gram :**

**Principe :** La coloration de Gram est la coloration la plus importante dans le laboratoire de microbiologie. Les bactéries peuvent être divisées en microorganismes Gram positif et en microorganismes Gram négatif.

Les bactéries Gram positif retiennent la coloration violette du Violet de Gentiane (ou du Cristal Violet) et ont une teinte bleue au microscope.

Les bactéries Gram négatif peuvent être décolorées, leur enlevant ainsi la coloration violette du Violet de Gentiane avec une solution alcool - acétone. Les bactéries sont ensuite colorées en rouge avec la safranine (ou la fuchsine basique).

La coloration de Gram est très importante, et elle doit être accomplie avec le plus grand soin.

#### **Matériels et réactifs utilisés :**

Microscope binoculaire avec objectifs 10 et 100

Huile à immersion

Coffret de colorant de Gram contenant :

Le violet de gentiane ou cristal violet (Réactif 1)

La solution de Lugol (Réactif 2)

La solution de décolorant alcool - acétone (Réactif 3)

La safranine ou fuchsine basique (Réactif 4)

#### **Procédure de la coloration :**

Utiliser une lame propre, identifier la lame à l'aide d'un crayon de papier en mettant le numéro d'identification (ID), l'initiale du participant et la date. (Ne pas utiliser de stylo à bille).

Confectionner un frottis mince sur la lame. Et sécher la lame à l'air libre (la lame ne doit pas être chauffée pour un séchage rapide du frottis).

Lorsque la lame est complètement séchée, la tenir contre l'incinérateur en oscillant jusqu'à ce qu'elle soit tiède sans être brûlante au toucher.

Mettre le Violet de Gentiane sur le frottis pendant 30 à 40 secondes.

Verser le surplus de la solution de Violet de Gentiane et rincer la lame avec un jet d'eau faible (Eau distillée). Egoutter l'excès d'eau à l'aide d'un papier buvard. (Il faut utiliser un faible jet d'eau pour laver la lame, sinon le spécimen se détachera de la lame).

Mettre la solution iode - iodure (Solution de Lugol) pendant 30 à 40 secondes.

Verser la solution de Lugol et rincer la lame avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau avec un papier buvard.

Verser goutte par goutte la solution de décolorant alcool - acétone sur la lame de manière à recouvrir entièrement le frottis.

Rincer Immédiatement la lame avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau.

**NB :** Si la solution alcool - acétone reste trop longtemps sur la lame, les micro-organismes Gram positif pourraient apparaître comme Gram négatif.

Mettre la solution de safranine (ou la fuchsine basique) sur le frottis pendant 60 secondes (2 fois plus longtemps que les deux premières étapes)

Verser la safranine et rincer la lame en le tenant sous un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau.

Sécher prudemment la lame avec un papier buvard. Ne pas surtout froter la lame pour la faire sécher.

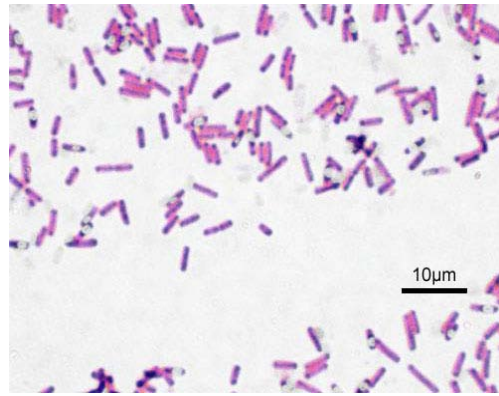
### **Interprétation :**

La clé dans l'interprétation de la coloration de Gram est d'identifier la morphologie des micro-organismes (exemple : cocci, bacilles) ainsi que leur relation les uns par rapport aux autres (exemple : cellules isolées, en paires, en chaînettes et en grappes). La reconnaissance de ces caractéristiques peut aider à l'interprétation de la coloration de Gram.

*Streptococcus pyogenes* : Cocci Gram positif en paire et/ou en chaînettes

**NB :** Il n'existe pas de cocci Gram négatif en chaînettes.





**Figure 9:** Aspect de *Streptococcus pyogenes* au microscope après coloration au Gram. [27]

#### **4. 8. Extraction de l'ADN, Réaction de PCR pour rechercher le gène emm :**

**But :** C'est de décrire une procédure d'amplification de l'ADN (Acide Désoxyribonucléase) du GrAS par PCR (Polymerase Chain Reaction). Le gène emm est amplifié et envoyé à l'Université de Maryland à Baltimore aux Etats-Unis pour la séquence et la détermination du type emm.

**Le gène emm :** C'est le gène qui code pour la production de la protéine M.

##### **4. 8. 1. Procédure d'extraction de l'ADN :**

Elle comporte plusieurs étapes :

- Préparation de la suspension bactérienne (bouillon pour extraction) :

Prendre avec une anse stérile une colonie pure de GrAS sur la gélose au sang de mouton, mettre dans un tube stérile contenant 5ml de la solution Todd Hewitt Broth, ré-suspendre la colonie et incubé pendant 24 heures.

- Après incubation, constaté une turbidité de la suspension.
- Passer la solution au vortex pendant 10 secondes pour homogénéiser.
- Pipeter 1ml du bouillon et transférer dans un tube d'ependorf 1,5ml.
- Centrifuger à grande vitesse 10000 – 12000g pendant 2 à 3 minutes.
- Au terme de la centrifugation, retirer le surnageant.

**Remarque :** changer d'embout pour chaque échantillon.

- Ajouter 200µl du réactif d'Insta Gène Matrix au pellette (culot) et incubé à 56°C au Heat block (Plaque chauffante) pendant 15 à 30 minutes.

**Remarque :** Bien agiter le réactif d'Insta Gène Matrix avant le pipetage et après chaque 3 pipetages.

- Au terme de l'incubation, homogénéiser par vortex pendant 10 secondes et incubé au microwave à 100°C pendant 8 minutes.
- Mixer par vortex pendant 10 secondes et centrifuger à grande vitesse 10000 – 12000g pendant 2 à 3 minutes.

Utiliser 3µl du surnageant comme ADN pour une réaction de PCR de 20µl.

**Remarque :** Pour tout usage ultérieur de l'ADN conserver à -20°C et au moment de l'utilisation reprendre la dernière étape de l'extraction.

#### **4. 8. 2. La PCR (Polymerase Chain Reaction) :**

##### **a. Introduction :**

La «Polymerase Chain Reaction» ou PCR (ou encore ACP pour Amplification en Chaîne par Polymérase), est une technique de répllication ciblée in vitro.

Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie.

L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures.

Le principe et les conditions expérimentales qui en découlent sont très simples.

Il s'agit de réaliser une succession de réactions de répllication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou «primers» en anglais définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier.

L'astuce consiste à utiliser les produits de chaque étape de synthèse comme matrices pour les étapes suivantes, au lieu de les séparer afin de ne réutiliser que la matrice originale. Au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle.

Imaginée par **K. Mullis** en 1985 (Prix Nobel dès 1993), la technique connaît un essor considérable à partir de la commercialisation (vers 1988), d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la *Taq* polymérase), qui permet une automatisation de la technique.

La séquence cible représente le segment d'ADN qui sera amplifié (recopié de nombreuses fois). Elle est déterminée lors du choix du couple d'amorces.

Cette étape est déterminante. Le choix des amorces doit tenir compte de plusieurs paramètres en même temps. Des règles basées sur ces paramètres permettent de définir le couple d'amorces le mieux adapté, mais ce n'est pas toujours simple. La PCR se déroule de façon générale en cycles.

### **b. Les cycles de la PCR :**

Chaque cycle de PCR est constitué de trois phases différentes à trois températures différentes : la dénaturation, l'hybridation (ou anelage) et l'élongation (ou extension des amorces).

#### **Dénaturation :**

A cette température (95°C), les liaisons faibles qui assurent la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN.

#### **Hybridation (anelage) :**

L'hybridation des amorces sur l'ADN repose sur le principe de l'appariement des bases complémentaires.

Le choix de la température d'hybridation résulte d'un compromis entre plusieurs paramètres. Elle est calculée en fonction de la longueur et de la séquence des amorces.

La température d'hybridation (45 à 65°C) est inférieure à la température de dénaturation.

#### **Elongation (extension des amorces) :**

La température est de 72°C. Les amorces hybridées à l'ADN servent de point de départ (comme leur nom l'indique), à la polymérisation du brin d'ADN complémentaire de l'ADN matrice. La polymérisation se fait par ajout successif des désoxyribonucléotides (présents dans le mélange en large excès). Chaque base ajoutée est complémentaire de la base correspondante du brin matrice.

Les ADN polymérases sont des enzymes qui synthétisent l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. Les polymérases utilisées en PCR sont extraites de bactéries vivant naturellement à des températures élevées comme les sources hydrothermales du fond des océans. Ces polymérases ne sont pas dénaturées par la chaleur. La plus connue est la *Taq* polymérase. [28]

### c. Technique de la PCR :

#### ➤ Matériels et Réactifs :

- 10% buffer contenant 15mM MgCl<sub>2</sub>
- dNTP mixte (10mM)
- Les amorces (20 picomoles/μl) :  
Amorce 1 : tatt (c/g) gcttagaaaattaa  
Amorce 2 : gcaagttcttcagcttggtt
- *Taq* polymérase (3U/μl)
- Eau distillée
- Tube eppendorf 1,5 ml
- Tube eppendorf 0,5 ml
- Pipettes 0,5 à 10μl ; 20 à 200μl
- Gel d'agarose 1%
- Solution de bromure d'éthidium
- Marqueur 1kb (kilo de base)
- Loading buffer (Bleu de migration)
- ADN

#### ➤ Préparation du mélange Mixte :

- Pipeter les volumes si dessous
- 10xPCR buffer                    10μl
- MgCl<sub>2</sub>                                2,5μl
- dNTP                                    2μl
- Primer 1                                2μl
- Primer 2                                2μl
- *Taq* polymérase                    0,5μl
- Eau distillée                        79,5μl

➤ **Préparation de 20µl de la réaction PCR :**

- Numérotter les tubes à PCR (tube eppendorf 0,5µl) par les numéros d'identification des patients.
- Distribuer 17µl du mélange mixte dans chaque tube à PCR et placer dans la glace.
- Additionner 3µl de l'extrait d'ADN de chaque échantillon.
- Mettre les échantillons dans le thermocycleur et bien fermer.
- Adopter le programme ci-dessous.

➤ **Programme de la PCR :**

- 94°C      1mn

Faire suivre une séquence de 10 cycles du programme suivant :

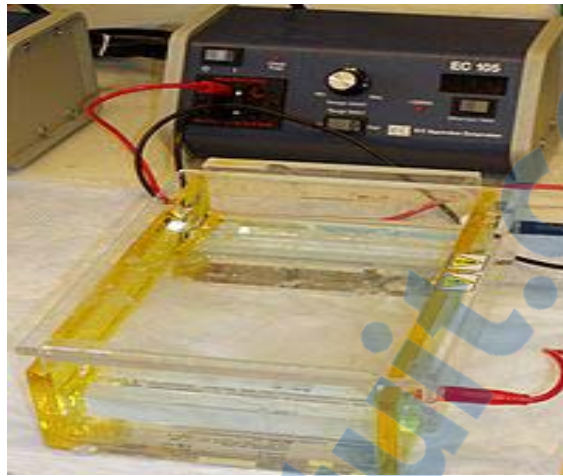
- 94°C      15s
- 46.5°C    30s
- 72°C      1mn 15s

Faire suivre une séquence de 20 cycles

- 94°C      15s
- 46.5°C    30s
- 72°C      1mn 15s avec 10s d'extraction pour chaque 19 cycles.
- 72°C      10mn
- 4°C      pour le stockage

Les produits de PCR sont conservés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

#### d. Migration sur gel :

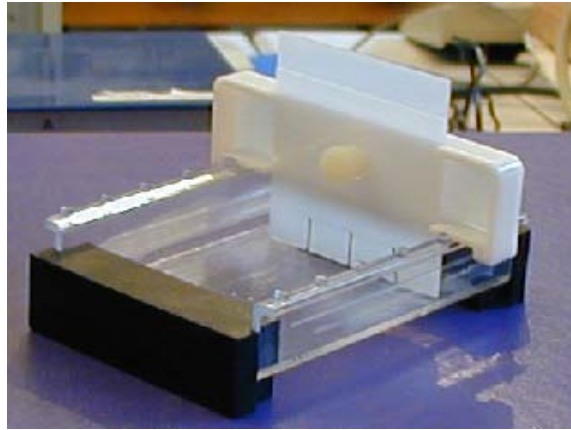


**Figure 10:** Cuve remplie de tampon et électrodes contenant un gel et connectée à un voltmètre. [29]

- Préparation de 1% de gel d'agarose :

Identifier sur un flask (Erlenmeyer) le pourcentage du gel préparé (1%)

- Mettre un agitateur magnétique stérile dans le flask
- Peser 1g de gel d'agarose, mettre dans le flask
- Mesurer 100ml de TAE et mettre dans le flask contenant la poudre
- Fermer le flask avec un papier aluminium stérile
- Bouillir au microwave pendant 3 à 5mn
- Homogénéiser le gel pendant 5mn
- Couler le gel dans la plaque à électrophorèse
- Accrocher le peigne selon le nombre de trou utilisé
- Attendre 15 à 20mn pour la solidification du gel.



**Figure 11:** Mise en place du peigne et des joints de coulage (mini cuve pour gel 8 x 6,5 cm). [30]

- Charge des trous :

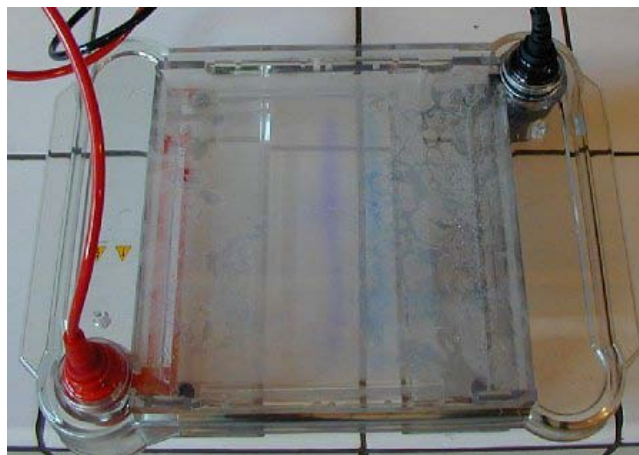
Mettre 4 - 5 $\mu$ l du produit PCR (Incluant le bleu de migration) dans les puits.

Faire migrer à 100Volts pendant 45 minutes.

Au terme de la migration, déposer le gel dans un bain de bromure d'éthidium pendant 20 - 30 minutes.

- Faire la lecture sous une lampe Ultra Violet (UV)

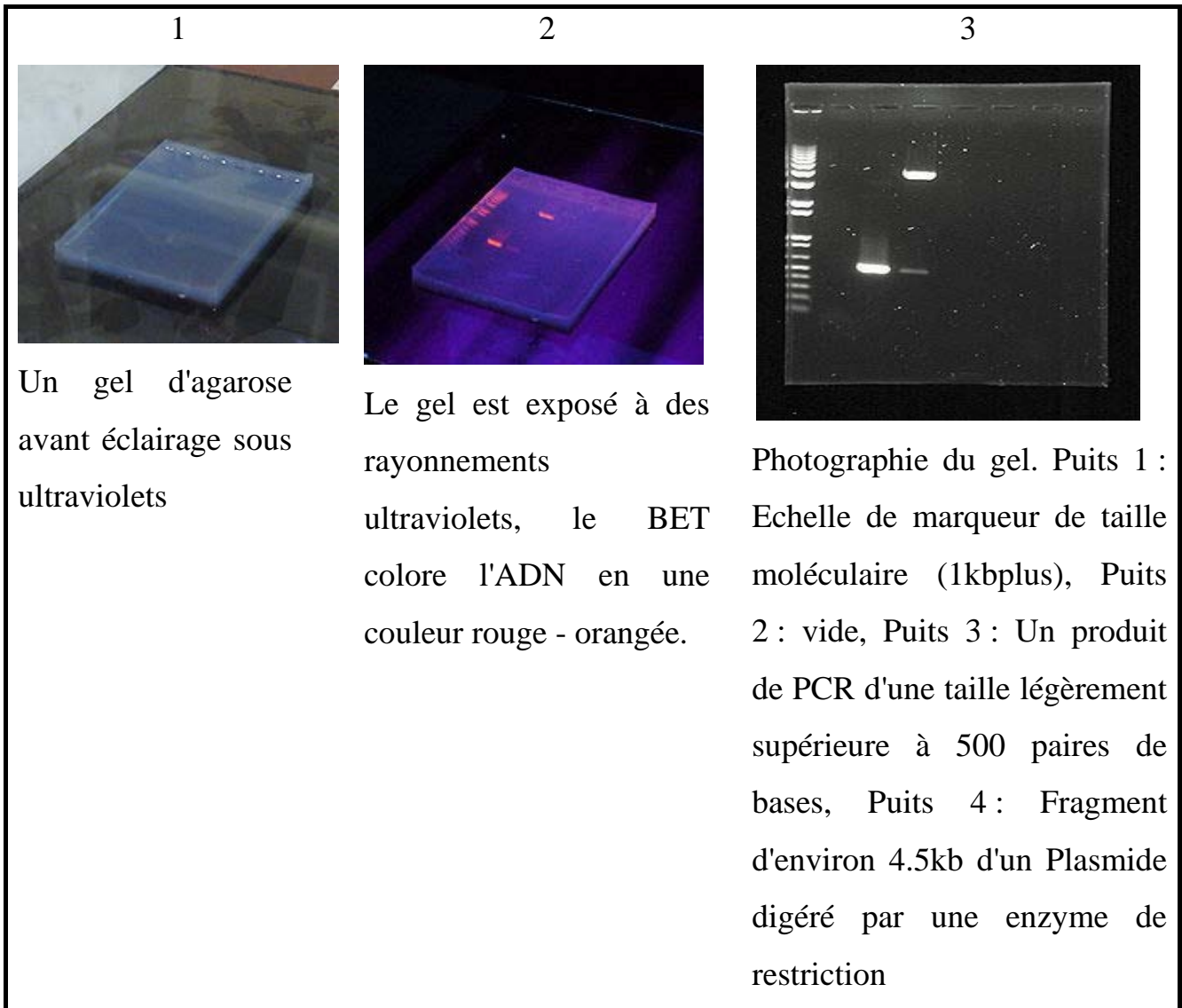
Les dimensions des produits sont variables : 825bp ; 950bp ; 1075bp.



**Figure 12:** Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose 15 x 10 cm (15 puits)

Noter la migration du colorant de charge de la cathode vers l'anode. [30]





**Figure 13:** Image du gel après migration. [29]

### **e. Purification du produit de PCR :**

Faire la purification en utilisant le Kit Qiagen de purification.

#### **Procédure :**

- Ajouter 3 volumes du QG Buffer à 1 volume du gel
- Incuber à 50°C pour 10 minutes. (Pour faciliter la dilution du gel, mixer par vortex le tube chaque 2 à 3 minutes durant l'incubation.
- Après la dissolution complète, vérifier que la couleur du mélange mixte est jaune ressemblant au QG Buffer.
- Transférer le liquide dans le tube de QIAquick (Tube Qiagen 2ml) et centrifuger pour 1 minute.
- Verser le liquide collecté après centrifugation et replacer le tube à filtre dans le tube de collecte.
- Relaver le substrat avec 0,5ml soit 500µl de QG Buffer et centrifuger pour 1 minute.
- Laver par addition de 750µl de PE Buffer et centrifuger pour 1 minute.
- Verser le liquide de lavage, replacer le filtre dans le tube de collecte et centrifuger pour 1 minute supplémentaire.
- Verser le liquide de lavage.
- Numéroter les tubes eppendorf (Numéro correspondant au tube QIAquick).
- Placer le filtre dans le tube eppendorf.
- Ajouter 50µl de EB Buffer (ou eau stérile), centrifuger pour 1 minute.
- Jeter le filtre à la fin de la centrifugation.
- Conserver le liquide dans le tube eppendorf à -20°C.

### **f. Préparation du séquençage :**

Pipeter 15µl de chaque produit PCR et mettre dans un tube de 0,5ml stérile.

Laisser sécher sous une hotte stérile.

Envoyer les produits séchés à la température ambiante au laboratoire Bio polymère de l'Université de Maryland à Baltimore.

**g. Principe :**

Le principe est du blasting, basé sur les souches originelles utilisées pour la caractérisation des serotypes de Lancefield. La séquence obtenue est comparée à une base de données de séquence emm générées par CDC. Chaque type de séquence emm inclue la portion 5' qui code 15-23 résidus de la membrane et 60 à 250 amino acides de la portion terminale N de la protéine M. CDC aide aussi à l'identification de nouveau emm type.

Le principe de blasting a connu une révolution les années passées conduisant à identifier dans certains cas les sous types emm.

## **5. Ethique et protection des sujets humains :**

### **5. 1. Comité d’Ethique Institutionnel :**

Au préalable du démarrage de l’étude, le protocole et les documents annexes de consentement éclairer ont été examinés et approuvés par le comité d’éthique approprié ou conseil d’éthique institutionnel (IRB) des institutions participantes. Tout amendement au protocole ou aux documents de consentement éclairé a été également approuvé, avant la mise en œuvre. Aux Etats-Unis et dans d’autres pays, seules les institutions détenant à l’heure actuelle une Assurance Fédérale Américaine (FWA), accordée par l’Office for Human Research Protections (OHRP), ont pu prendre part à cet examen et approbation des études de recherche financées par les Etats-Unis et portant sur des sujets humains.

### **5. 2. Consentement éclairé :**

Au préalable de l’obtention d’un consentement éclairé pour chaque enfant, les experts cliniques ont détaillé l’étude auprès de toutes les associations scolaires et communautaire appropriées, le cas échéant, pour obtenir la permission de pressentir les parents des participants éventuels. Un consentement éclairé par écrit, en toute connaissance de cause, pour prendre part à l’étude, a été obtenue par les expertè-cliniques, auprès de chaque participant. Les formulaires de consentement éclairé ont été rédigés en français, langue officielle du Mali, et ont été traduits en Bambara, qui est la langue locale la plus courante et ils ont été également enregistrés sur cassette. Les expert-cliniques ont expliqué aux parents et, lorsque applicable, à l’enfant, les buts, les risques et les avantages potentiels de leur participation. Les parents se sont vus alors remettre le formulaire de consentement éclairé pour signature (ou signature d’un témoin si le parent est illettré). Pour les enfants de 5 à 12 ans, seul le consentement parental a été demandé. Pour les enfants de 13 à 16 ans, l’enfant a dû également signer, donnant ainsi son assentiment éclairé. Les formulaires de consentement et

d'assentiment ont été placés dans le dossier de l'étude, au titre de documents-sources.

### **5. 3. Compensation :**

Les parents individuels n'ont reçu aucune compensation pour leur participation à cette étude. Toutefois, chaque école et le centre d'animation pédagogique (le bureau du surintendant des écoles) ont reçu un seul don du CVD-Mali. La valeur monétaire de ce don n'a pas été supérieure à 200 dollars américains, pour chaque école, pour toute la durée de l'étude (3 ans) et a été sous forme de fournitures scolaires (tableau noir, craie, cahiers, etc.) ou de matériel d'éducation physique (ballon, filets, etc.).

### **5. 4. Traitement des enfants :**

Tout enfant participant à l'étude et faisant une angine était traité.

Les antibiotiques utilisés étaient : Erythromycine et Pénicilline.

Le paracétamol était l'antalgique antipyrétique utilisé dans le traitement.

## 6. Résultats :

Notre étude a porté sur 865 participants. Sur les 865 enfants prélevés 235 ont été positifs au GrAS soit 27,2% de l'échantillon.

**TABLEAU III :** La taille approximative des différentes écoles (Sites de prélèvement).

Ecoles	Quartiers	Nombres d'élèves
CMS	Djicoroni Para	128
Dontémè	Djicoroni Para	179
Fleuve	Djicoroni Para	238
Sébénikoro	Sébénikoro	320
<b>Total</b>		<b>865</b>

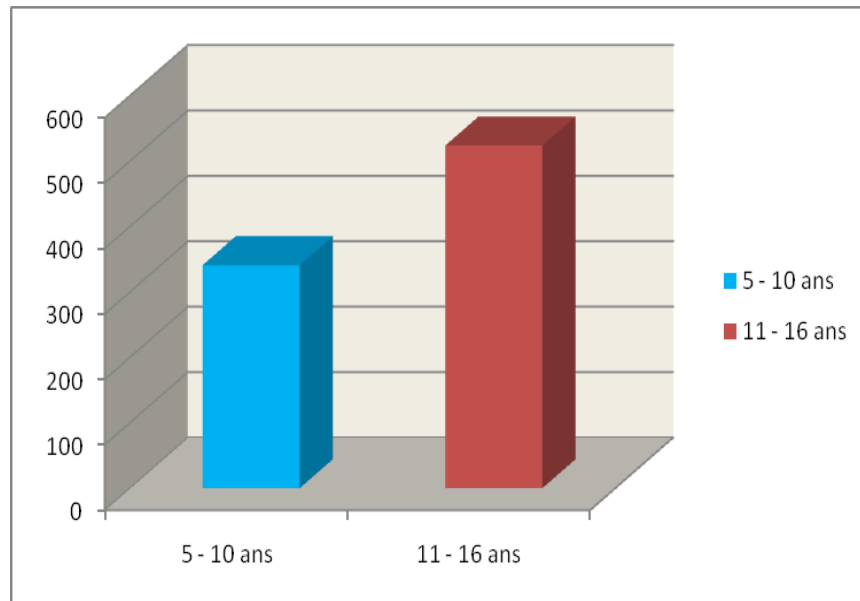
Nous avons fait une évaluation des caractéristiques socio - démographiques et analytiques.

### 6. 1. Résultats socio – démographiques :

**TABLEAU IV :** Répartition des participants en fonction de la tranche d'âge.

Tranche d'âge	Fréquence	Pourcentage
5 - 10 ans	341	39,4
11 - 16 ans	524	60,6
<b>Total</b>	<b>865</b>	<b>100,0</b>

La tranche d'âge 11 - 16 ans a été la plus représentative avec 60,6%

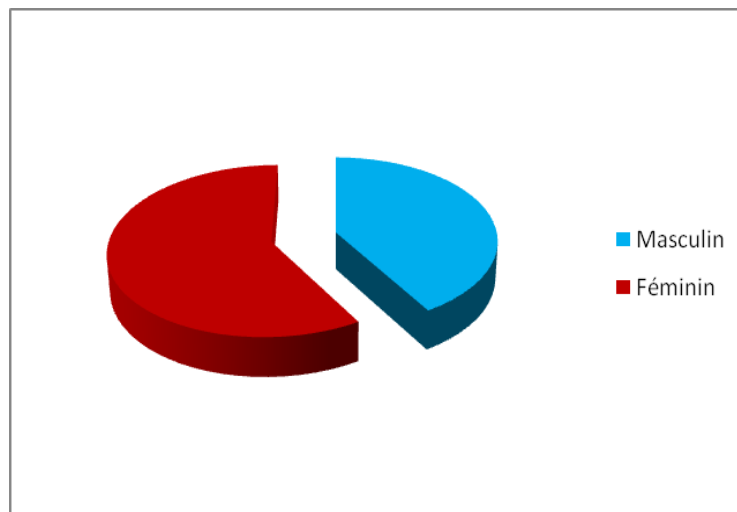


**Graphique 1 :** Représentation graphique des participants selon la tranche d'âge.

**TABLEAU V :** Répartition des participants en fonction du sexe.

Sexe	Fréquence	Pourcentage
Masculin	357	41,3
Féminin	508	58,7
<b>Total</b>	<b>865</b>	<b>100,0</b>

Le sexe féminin a été prédominant avec un pourcentage de 58,7%



**Graphique 2 :** Représentation graphique des participants selon le sexe.

Le sexe ratio a été de : 0,70

**TABLEAU VI :** Répartition des participants en fonction de la provenance.

Provenance	Effectif	Pourcentage
CMS	128	14,8
Dontémè	179	20,7
Fleuve	238	27,5
Sébénikoro	320	37,0
<b>Total</b>	<b>865</b>	<b>100,0</b>

Sébénikoro a eu le plus de prélèvement avec un pourcentage de 37,0%



**TABLEAU VII** : Répartition des participants en fonction du germe.

Germes	Fréquence	Pourcentage
Bêta hémolytique non GrAS	82	9,4
GrAS	235	27,2
Absence de Streptocoques	548	63,4
<b>Total</b>	<b>865</b>	<b>100,0</b>

Sur les 865 prélèvements 235 ont été positifs au GrAS (27,2%), 82 bêtas hémolytiques non GrAS (9,4%) et 548 négatifs (63,4%).

**TABLEAU VIII** : Répartition des participants en fonction de la saisonnalité.

Saisons	Fréquence	Pourcentage
Saison Pluvieuse	192	22,2
Saison Froide	411	47,5
Saison Sèche	262	30,3
<b>Total</b>	<b>865</b>	<b>100,0</b>

47,5% (411 prélèvements) de nos prélèvements ont été faits en saison froide.

## 6. 2. Résultats analytiques :

TABLEAU IX : Fréquence GrAS – Sexe.

Sexe	Résultats			Total	% GrAS
	Bêta hémolytique non GrAS	GrAS	Absence de Streptocoques		
Féminin	53	147	308	508	28,93
Masculin	29	88	240	357	24,64
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>235</b>	<b>548</b>	<b>865</b>	

$$\text{Chi}^2 = 1,4004$$

$$p = 0,16 > 0,05$$

Ce tableau nous montre qu'il n'y a pas d'association significative entre la fréquence de GrAS et le sexe.

TABLEAU X : Fréquence GrAS - Tranches d'âge.

Tranche d'âge	Résultats			Total	% GrAS
	Bêta hémolytique non GrAS	GrAS	Absence de Streptocoques		
5 - 10 ans	31	92	218	341	26,97
11 - 16 ans	51	143	330	524	27,29
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>235</b>	<b>548</b>	<b>865</b>	

$$\text{Chi}^2 = -0,0970286$$

$$p = 0,92 > 0,05$$

Nous remarquons qu'il n'y a pas d'association significative entre la fréquence de GrAS et la tranche d'âge.

**TABLEAU XI : Fréquence GrAS – Provenance.**

Provenance	Résultats			Total	% GrAS
	Bêta hémolytique non GrAS	GrAS	Absence de Streptocoques		
CMS	4	36	88	128	28,12
Dontémè	12	46	121	179	25,69
Fleuve	27	69	142	238	28,99
Sébénikoro	39	84	197	320	26,25
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>235</b>	<b>548</b>	<b>865</b>	

Chi2 = 0,79

p = 0,85 > 0,05

Il n'y a pas d'association entre la fréquence de GrAS et la provenance.

**TABLEAU XII : Fréquence GrAS – Saison.**

Saison	Résultats			Total	% GrAS
	Bêta hémolytique non GrAS	GrAS	Absence de Streptocoques		
Saison Pluvieuse	21	54	117	192	28,12
Saison Froide	36	132	243	411	32,11
Saison Sèche	25	49	188	262	18,70
<b>Total</b>	<b>82</b>	<b>235</b>	<b>548</b>	<b>865</b>	

Chi2 = 14,67

p = 0,0007 < 0,05

Notre rapport nous montre qu'il y a une association de la fréquence de GrAS et la saisonnalité.

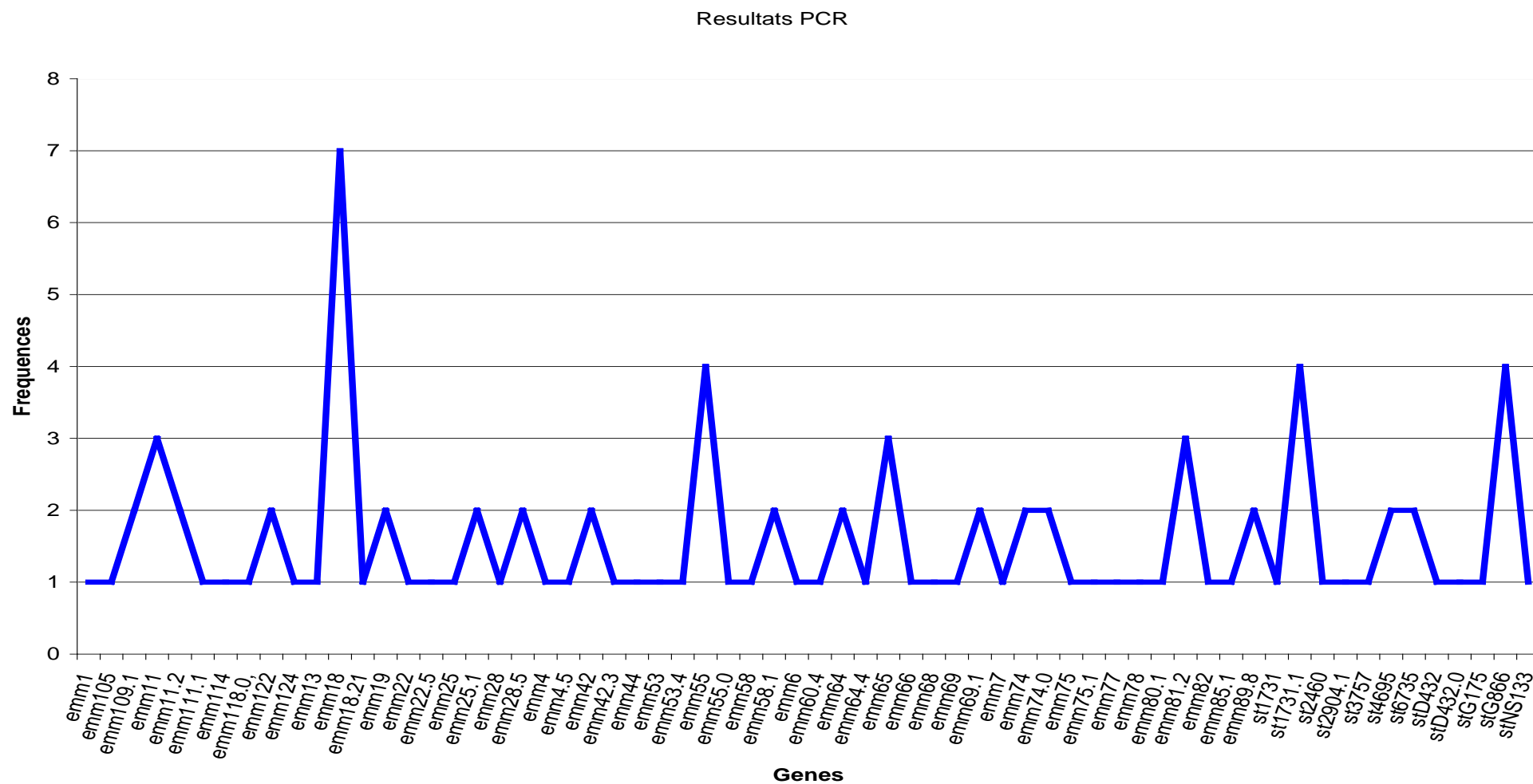
**TABLEAU XIII :** Proportion du gène emm sur les 100 premiers cas de GrAS analysés sur les 235 cas de GrAS isolés, analysés par PCR, soumis à une séquence et au blasting.

<b>Gène</b>	<b>Proportion</b>	<b>Pourcentage</b>
emm1	1	1,0
emm105	1	1,0
emm109.1	2	2,0
emm11	3	3,0
emm11.2	2	2,0
emm111.1	1	1,0
emm114	1	1,0
emm118.0	1	1,0
emm122	2	2,0
emm124	1	1,0
emm13	1	1,0
<b>emm18</b>	<b>7</b>	<b>7,0</b>
emm18.21	1	1,0
emm19	2	2,0
emm22	1	1,0
emm22.5	1	1,0
emm25	1	1,0
emm25.1	2	2,0
emm28	1	1,0
emm28.5	2	2,0
emm4	1	1,0
emm4.5	1	1,0
emm42	2	2,0
emm42.3	1	1,0
emm44	1	1,0
emm53	1	1,0
emm53.4	1	1,0
emm55	4	4,0
emm55.0	1	1,0
emm58	1	1,0
emm58.1	2	2,0
emm6	1	1,0
emm60.4	1	1,0
emm64	2	2,0
emm64.4	1	1,0

emm65	3	3,0
emm66	1	1,0
emm68	1	1,0
emm69	1	1,0
emm69.1	2	2,0
emm7	1	1,0
emm74	2	2,0
emm74.0	2	2,0
emm75	1	1,0
emm75.1	1	1,0
emm77	1	1,0
emm78	1	1,0
emm80.1	1	1,0
emm81.2	3	3,0
emm82	1	1,0
emm85.1	1	1,0
emm89.8	2	2,0
st1731	1	1,0
st1731.1	4	4,0
st2460	1	1,0
st2904.1	1	1,0
st3757	1	1,0
st4695	2	2,0
st6735	2	2,0
stD432	1	1,0
stD432.0	1	1,0
stG175	1	1,0
stG866	4	4,0
stNS133	1	1,0
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100,0</b>

Sur les 100 cas analysés par la PCR, le gène emm18 a été le gène le plus fréquent avec un pourcentage de 7.0% sur un total de 64 gènes isolés.

Graphique 3 : Représentation graphique des résultats de la PCR.



## **7. Commentaires et Discussions :**

### **7. 1. Méthodologie :**

Notre étude s'intègre dans le cadre des travaux du CVD-Mali et vise à surveiller la prévalence du GrAS chez les enfants âgés de 5 à 16 ans en commune IV du district de Bamako. L'étude a concerné 865 enfants souffrants de pharyngite. Les prélèvements ont été effectués au niveau des différents sites. Ont été prélevé au cours de notre étude des enfants âgés de 5 à 16 ans souffrants de pharyngites et inscrits dans l'une des quatre écoles citées. Le mode de prélèvement a été l'écouvillonnage de la gorge. Le prélèvement était fait par des médecins et des infirmiers qualifiés dans le domaine. Après prélèvement, les échantillons étaient directement transportés vers le laboratoire.

La gélose au sang de mouton 5% était utilisée pour l'ensemencement. La méthode de travail utilisée a été établie en collaboration avec nos partenaires de Baltimore et approuvée par chacune des deux parties. Les travaux ont été effectués dans le laboratoire de microbiologie du CVD-Mali, dans les conditions scientifiques rigoureuses.

### **7. 2. Difficultés et limites de l'étude :**

Au cours de notre étude, nous avons souvent rencontré des difficultés ; elles ont été entre autre :

- Dédoublément des bandes générées après PCR observé l'or de la lecture sous UV, dû à la préparation inadéquate des extraits d'ADN.

### **7. 3. Les caractéristiques sociodémographiques :**

A cause de données similaires disponible dans la sous région vous aurez remarqué que notre thèse n'a bénéficié de comparaison qu'à deux thèses.

Les données biologie moléculaire n'ont pas bénéficié de comparaison.

➤ **Le sexe :**

Au cours de notre étude le sexe féminin a été le plus représenté avec un pourcentage de 58,7% contre 41,3% pour le sexe masculin (**TABLEAU V**).

Contrairement à nos résultats, **A. TOURE** [31] et **A. ARAMA** [32] ont trouvé respectivement 55,67% et 53,4% en faveur du sexe masculin. Cette légère différence entre ces études et la notre peut être certainement due au choix de la population et/ou à la taille d'échantillon.

➤ **L'âge :**

Le choix de la tranche d'âge 5 à 16 ans n'est pas un hasard car chez les enfants jusqu'à l'âge de 3 ans, les pharyngites sont dues à des virus comme le clinovirus, adénovirus, virus respiratoire para influenza A et B et le virus de l'herpès.

A partir de 5 ans jusqu'à 16ans, l'étiologie est généralement bactérienne et le streptocoque bêta hémolytique du groupe "A" est fréquemment en cause.

La tranche d'âge 11 à 16 ans a été majoritairement représenté avec un pourcentage de 60,6% contre 39,4% pour celle de 5 à 10 ans (**TABLEAU IV**).

**A. Benouda, S. Sibile, Y. Ziane, M. Elouennass, K. Dahani, A. Hassani** [33] ont trouvé 45 cas sur 494 soit 9,1 % et deux pics d'angines à *Streptococcus pyogenes* chez les enfants de 12 à 15 ans.

Contrairement à nos résultats, **A. TOURE** [31] et **A. ARAMA** [32] ont trouvé respectivement 69,07% et 60,30% pour la tranche d'âge 5 à 10 ans contre 30,93% et 39,70% pour la tranche d'âge 11 à 15 ans.

➤ **La saison :**

Nous savons que le climat pourrait être un facteur favorisant les pharyngites. Nous avons donc tenté de déterminer la fréquence du GrAS dans les différentes saisons. Ainsi, pendant la saison froide nous avons effectué 411 prélèvements, 192 dans la saison pluvieuse et 262 dans la saison sèche soit respectivement 32,12%, 28,13% et 18,70% de portage GrAS (**TABLEAU XII**).



#### **7. 4. Les résultats de biologie moléculaire :**

Au cours de notre étude nous avons pu isoler 235 cas de GrAS, et réaliser une PCR sur les 235.

Après une analyse des résultats de PCR, nous avons eu une prédominance du gène emm18 (M18) avec un pourcentage de 7,00% (**TABLEAU XIII**).

Comparativement à nos résultats, le M18 a été à l'origine d'épidémies de RAA au cours de la deuxième moitié des années 80 aux USA. [4]

En Angleterre M18 est rarement à l'origine du RAA. [21]

Il s'est également trouvé absent au cours de deux études faites en Alger en 1993/94 et en 1996/97. [22]

Ainsi nous constatons que la distribution des sérotypes M est différente en fonction des régions géographiques.

## **8. Conclusions :**

Notre étude réalisée au CVD-Mali sur une période allant de Mai 2005 à Juin 2008 (soit 37 mois) a porté sur 865 enfants âgés de 5 à 15 ans atteints de pharyngite.

Sur les 865 enfants prélevés 235 portaient le GrAS soit 27,2% des participants.

La tranche d'âge 11 à 16 ans a été la plus infectée avec 143 cas sur 524 soit 27,29%.

Le sexe féminin a été le plus représentatif 58,7% avec un taux d'infection de 28,93% soit 147 cas.

La taille d'échantillon était plus représentative pendant la saison froide 47,5% avec 132 cas d'infection à GrAS chez les enfants prélevés pendant cette période soit 32,11%.

Sur 235 cas de GrAS isolés nous avons effectué une réaction de PCR et analysés 100 résultats de séquence. Le gène emm18 a été le plus dominant avec un pourcentage de 7,0%.

Notre étude nous montre que le *Streptococcus pyogenes* est l'un des agents pathogènes le plus fréquemment en cause des pharyngites chez les enfants. Et les résultats obtenus nous montrent l'importance de la pathogénicité de ce germe.

Connaissant les différentes complications qu'il peut entraîner comme le RAA, la GNA, les infections cutanées nécrosantes, les bactériémies, etc. il doit être prévenu dans toutes ses formes surtout chez les enfants âgés de 5 à 16 ans qui sont les principales cibles vulnérables.

Au terme de notre étude nous avons formulé quelques recommandations.

## 9. Recommandations :

Nos recommandations ont été les suivantes :

### ➤ **Ministère de la santé :**

Investir dans la recherche scientifique en formant des agents socio-sanitaires dans les différentes spécialités pour les études d'investigations et de recherche dans le développement de vaccins dans notre pays.

Entreprendre une surveillance élargie du *Streptococcus pyogenes* au Mali.

### ➤ **Agents socio sanitaires :**

Examiner bien les enfants qui se plaignent de symptômes O.R.L et plus particulièrement les pharyngites afin de bien instituer un traitement adéquat à base de pénicilline.

Insister sur le respect de la posologie et la durée du traitement.

Expliquer aux parents les complications à cours et à long terme si l'enfant est mal suivi, l'indication et l'avantage de l'amygdalectomie.

### ➤ **Population :**

Faire comprendre que les pharyngites sont des maladies rencontrées fréquemment chez l'enfant jusqu'à 15 à 16 ans, qui peuvent entraîner des complications redoutables immédiates si elles ne sont pas prises en compte par les parents.

Bannir les écrasements amygdaliens aux doigts pratiqués de nos jours par certaines vieilles personnes comme un remède de l'angine en répétition. Cette pratique met très souvent la vie de l'enfant en danger par suite d'hémorragie et/ou d'infections.

## **10. Références:**

- (1) **BESSEN R S, VEASY L G, HILL H R ET Coll.** 1995. Serologic evidence for a class I group A streptococcal infection among rheumatic fever patients. *The Journal of Infection Diseases*; 172: p 1608-11.
- (2) **BISNO A L.** 1991. Group A streptococcal infections and acute rheumatic fever. *The New England Journal of Medicine*; 11: p 783-93.
- (3) **GERBER M A, MARKOWITZ M.** 1985. Management of streptococcal pharyngitis reconsidered. *Pediatric Infect Dis*; 4(5): p 518-26.
- (4) **APPELTON R S, VICTORIA B E, TAMER D AND AYOUBE M.** 1985. Specificity of persistence of antibody to the streptococcal group A carbohydrate in rheumatic valvular heart disease. *J. Lab. Clin. Med*; 105: 114-19.
- (5) **SOCIETE DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE DE LA LANGUE FRANÇAISE.** Juin 1996. 10<sup>e</sup> conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse : les infections O.R.L. Lyon, *Med Mal Infect* ; 26 (suppl. Juin) : p1-7
- (6) <http://www.paris-nord-sftg.com/cr.inf.orl.91.htm>
- (7) **RUOFF K L, WHILEY R A AND BEIGHTON D.** *Streptococcus in* **MURRAY P R, BARON E J, JORGENSEN J H, PFALLER M A, YOLKEN R H.** 2003. *Manual of clinical microbiology*, vol 1, 8th Edition; p 406
- (8) **GARDINER D L, SRIPRAKASH K S.** 1996. Molecular epidemiology of impetiginous groups A streptococcal infections in aboriginal communities of Northern Australia. *The Journal of Clinical Microbiology*; 34: p1448-52.
- (9) **DUCA E, DUCA M, FURTUNESCU G.** 1979. *Microbiologie médicale*. 2e Ed. Didactique et pédagogique. Bucarest, p 320 (classification de R. Lancefield)
- (10) **FLANDROIS J.P.** 1997. *Bactériologie médicale*, collection Azay, édition Presses Universitaires de Lyon, p 119-22
- (11) <http://membres.multimania.fr/microbio/systematique/Strepto.html>  
(Dimanche 2 mars 2003)

(12)

[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Streptococcus\\_pyogenes\\_01.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Streptococcus_pyogenes_01.jpg)

(11 October 2009, at 16:46)

(13) <http://www.microbes-edu.org/etudiant/diag2.html>

(14) **GARDINER D L AND SRIPRAKASH K S.** 1996. Molecular epidemiology of Impetiginous groups A streptococcal infections in aboriginal communities of Northern Australia. *The Journal of Clinical Microbiology*; 34:1448-52.

(15) **DE MONTCLOS H.** 1994. Progress and problems in the immune response to Streptococci. *Pathogenic Streptococci Present and future.* Lancer Publication, St Peters burg, Russia; p 157-59.

(16) **GAASH W A.** 1992. Guidelines for the diagnosis of rheumatic fever. Jones criteria, 1992 update. *JAMA*; 268: p 2069-73.

(17) **STEVENS D L.** 1992. Invasive group A streptococcal infection. *Clinical Infectious Diseases*; 14: p 2-13.

(18) **SNITCOWSKY R.** 1996. Rheumatic fever prevention in industrializing Countries: Problems and approaches. *Pediatrics supplement*; 97: p 950-57.

(19) **KAPLAN E L.** 1996. Recent epidemiology of group A streptococcal infections in North America and abroad: an overview. *Pediatrics Supplement* 97: p 945-48.

(20) **OLIVIER C.** 1996. Epidémiologie et pathogénie du rhumatisme articulaire aigu. *Medicine tropicale*; 56: p 17s-20s.

(21) **STANLEY J, DESAI M, XERRY J, TANNA A ET COLL.** 1996. High resolution Genotyping elucidates the epidemiology of group A streptococcus Outbreaks. *The Journal of Infectious Diseases*; 174: p 500-06.

(22) **MERAD B, BERRAH H, ISSAD M D, DE MONTCLOS H.** 1997. Improvement of bacteriological support for the community control of rheumatic fever in Algeria. Edited by Plenum Publishing Corporation. New York; in *Adv. Exp. Med. Biol.*; 418 (1): 339-42.



(23) **WALD E R, DASHEFSKY B, FEIDT C, CIPONIS D, and Al.** 1971. Acute Rheumatic fever in western Pennsylvania and the tristate area. *Pediatric*; 80(3): p 371-74.

(24) <http://www.microbes-edu.org/etudiant/staph.html>

(25) [http://iws2.ccccd.edu/dcain/CCCCD%20Micro/catalase\\_test.htm](http://iws2.ccccd.edu/dcain/CCCCD%20Micro/catalase_test.htm)

(26) <https://www.hardydiagnostics.com/catalog2/hugo/PYRTestKit.htm>

(27)

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b9/Bacillus\\_subtilis\\_Gram.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b9/Bacillus_subtilis_Gram.jpg)

(28) <http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/accueil/but.htm>

(29)

[http://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89lectrophor%C3%A8se\\_en\\_gel\\_d'agarose](http://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89lectrophor%C3%A8se_en_gel_d'agarose)

(30) <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/bioch1.htm>

(31) **Aliou TOURE.** 2005. Place de *Streptococcus pyogenes* dans les infections de peau et de gorge chez les enfants à Bamako. Aout 2003 à Avril 2004. Bamako n°

(32) **Abdoulaye ARAMA.** 2005. Prévalence du streptocoque beta hémolytique du groupe A chez les enfants de 5 – 15 dans le service O.R.L. de l'hôpital Gabriel Touré. Bamako n°

(33) <http://www.em-consulte.com/article/200759#AFF2>. **A. Benouda, S. Sibile, Y. Ziane, M. Elouennass, K. Dahani, A. Hassani.** Place de *Streptococcus pyogenes* dans les angines au Maroc et état actuel de sa sensibilité aux antibiotiques

Place of *Streptococcus pyogenes* in the throat infections and overview of its susceptibility to antibiotics. *Pathologie Biologie*. Volume 57, numéro 1 pages 76-80 (février 2009).

(34) **SCHLEGEL L, BOUVET A.** Streptococcaceae, streptococcus, albiotrophia, Enterococcus, lactococcus, aerococcus et autres

genres apparentés In. Freney Renaud F, Hansen W Bollet C Ed.

Précis de bactériologie clinique Paris Esta : 835-890.

**FICHE SIGNALÉTIQUE :**

**Nom :** DIALLO

**Prénom :** Chaca dit Tédié

**Tel :** (00223) 76 31 70 25

**E-mail :** tediediallo@yahoo.fr

**Titre de la thèse :** Typage et prévalence du gène emm de la protéine M de *Streptococcus pyogenes* : Etude BGAS2000 à Bamako au Mali.

**Année Universitaire :** 2009 – 2010

**Ville de soutenance :** Bamako

**Pays :** Mali

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

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

**11. Résumé :**

Le *Streptococcus pyogenes*, germe très pathogène et strictement humain, occupe une place importante dans les infections streptococciques. Il est responsable d'infections fréquentes bénignes et non invasives, telles que l'angine et l'impétigo, et également d'infections invasives graves comme les bactériémies, les infections cutanées nécrosantes, le RAA, les septicémies et les méningites.

Le taux de mortalité des infections invasives est estimé entre 10 et 16% toutes pathologies confondues.

Nous avons fait une étude rétrospective de type transversale dont l'objectif était basé sur l'identification des streptocoques du groupe A dans les prélèvements de gorge effectués chez les enfants de 5 à 16 ans.

L'étude a porté sur 865 participants dont 508 filles et 357 garçons. Elle a été réalisée dans le laboratoire de microbiologie du CVD-Mali. Les sites de prélèvements étaient les établissements scolaires de Djikoroni- Para (CMS, Dontémè et Fleuve) et de Sébénikoro (Ecole publique de Sébénikoro).



Sur les 865 enfants prélevés 235 portaient le GrAS soit 27,2%, la tranche d'âge 11 à 16 ans a été la plus touchée avec 27,29% de portage. Le sexe féminin a été le plus représenté avec un sexe ratio de 1,42 en sa faveur. Nous avons eu plus de cas en saison froide qu'aux deux autres saisons (Soit 32,11%).

Le gène emm18 a été le plus dominant avec 7,00%.

Notre étude nous montre que le *Streptococcus pyogenes* est l'un des agents pathogènes le plus fréquemment en cause des pharyngites chez les enfants. Les résultats obtenus nous montrent l'importance de la pathogénicité de ce germe.

**Mots clés :** gène emm, protéine M, *Streptococcus pyogenes*, étude BGAS2000, Bamako, Mali.

**SHEET:**

**Last Name:** DIALLO

**First name:** Chaca dit Tédié

**Tel:** (00223) 76 31 70 25

**E-mail:** tediediallo@yahoo.fr

**Thesis title:** Typing and prevalence of emm gene of the M protein of *Streptococcus pyogenes*: Study BGAS2000 in Bamako, Mali.

**Academic Year:** 2009 – 2010

**City of defense:** Bamako

**Country:** Mali

**Place of deposit:** Faculty of Medicine, Pharmacy and Dentistry

**Area:** Bacteriology, virology, public health.

**Summary:**

The *Streptococcus pyogenes*, very pathogenic and strictly human germ, occupy an important place in the streptococci infections. It is responsible for benign and no invasive frequent infections, such as the angina, impetigo, and also of serious invasive infections like the bacteriemias, the cutaneous infections necrosing, the RAA, septiemias, meningitis.

The rate of mortality is estimated between 10 and 16% all confused pathologies. We made a retrospective study of transversal type whose objective was based on the identification of *Streptococcus group A* in the taking swab of throat carried out in the children from 5 to 16 years.

The study related to 865 participants including 508 girls and 357 boys. Samples have processed at CVD-Mali Microbiology Laboratory. The sites of taking were the schools of Djicoroni-Para (CMS, Dontémè and Sébénikoro).

On the 865 taken children 235 carried the strptococcus group A, fat is 27, 29%, the age range 11 to 16 years are most vulnérable wih 27, 29% of carriage.

Female is most represented with a ratio of 1, 42. We had more case in cold season than at the two other seasons 32, 11%).

The gene emm18 was the most dominant with 7.00%.

Our study shows us that *Streptococcus pyogenes* is the most frequently one of the disease causing agents of pharyngitidis in children.

Result shows the importance of pathogenicity of the germ.

**Key words:** gene emm, protein M, *Streptococcus pyogenes*, study BGAS2000, Bamako, Mali

# SERMENT DE GALIEN



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

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

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

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

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

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

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

**Je le jure !**