

MINISTRE DE L'EDUCATION  
NATIONALE

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple Un But Une Foi



UNIVERSITE DE BAMAKO

Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-  
Stomatologie



ANNEE ACADEMIQUE 2004-2005

THESE N° .....

Mise au point et évaluation d'une technique Dot  
Blot pour le diagnostic et le sérogroupage de  
*Neisseria meningitidis* A et W135

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le...../ 07/2005

devant

La Faculté de Médecine, de Pharmacie et  
d'Odonto-Stomatologie de Bamako

par

**MAMADOU M. AOUAMI Souleymane**

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'état)

**Président du jury :** Professeur Elimane MARIKO

**Membres :** Docteur Daouda K. MINTA  
Docteur Benoît KOUMARE

**Codirecteur :** Docteur Suzanne CHANTEAU

**Directeur de Thèse :** Professeur Ibrahim I. MAÏGA

# FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

## ADMINISTRATION

DOYEN: MOUSSA TRAORE – PROFESSEUR

1<sup>er</sup> ASSESSEUR: MASSA SANOGO – MAÎTRE DE CONFERENCES

2<sup>ème</sup> ASSESSEUR: GANGALY DIALLO – MAÎTRE DE CONFERENCE AGREGÉ

SECRETARE PRINCIPAL: YENIMEGUE ALBERT DEMBELE – MAÎTRE DE CONFERENCE AGREGÉ

AGENT COMPTABLE: MADAME COULIBALY FATOUMATA TALL- CONTROLEUR DES FINANCES

## PROFESSEURS HONORAIRES

Mr Alou BA	Ophtalmologie
Mr Bocar SALL	Orthopédie Traumatologie – Secourisme
Mr Souleymane SANGARE	Pneumo-phtisiologie
Mr Yaya FOFANA	Hématologie
Mr Mamadou L. TRAORE	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE	Pharmacognosie
Mr Mohamed TOURE	Pédiatrie
Mr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine interne
Mr Aly GUINDO	Gastro-entérologie

## LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR GRADE

### D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

#### PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alassane TOURE	Orthopédie-Traumatologie <b>Chef de D.E.R.</b>
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco-Obstétrique
Mr Alhousseini Ag MOHAMED	ORL

#### MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale
Mr Abdel Kader TRAORE dit DIOP	Chirurgie Générale
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie – Réanimation
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale
Mr Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique

#### MAITRES DE CONFERENCES

Mme SY Aïda SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-Obstétrique

#### MAÎTRES ASSISTANTS

Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE  
Mr Sadio YENA  
Mr Filifing SISSOKO  
Mr Issa DIARRA

Gynéco-Obstétrique  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Gynéco-Obstétrique

#### **ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE**

Mr Mamadou L. DIOMBANA  
Mr Sékou SIDIBE  
Mr Abdoulaye DIALLO  
Mr Tiéman COULIBALY  
Mme TRAORE J. THOMAS  
Mr Nouhoum ONGOÏBA  
Mr Zanafon OUATTARA  
Mr Zimogo Zié SANOGO  
Mr Adama SANGARE  
Mr Youssouf COULIBALY  
Mr Samba Karim TIMBO  
Mme TOGOLA Fanta KONIPO  
Mr Sanoussi BAMANI  
Mr Doulaye SACKO  
Mr Ibrahim ALWATA  
Mr Lamine TRAORE  
Mr Mady MAKALOU  
Mr Aly TEMBELY  
Mr Niani MOUNKORO  
Mme Djénéba DOUMBIA  
Mr Tiémoko D. COULIBALY  
Mr Souleymane TOGORA  
Mr Mohamed KEITA

Stomatologie  
Orthopédie - Traumatologie  
Anesthésie - Réanimation  
Orthopédie - Traumatologie  
Ophtalmologue  
Anatomie & Chirurgie Générale  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Orthopédie - Traumatologie  
Anesthésie - Réanimation  
O.R.L.  
O.R.L.  
Ophtalmologie  
Ophtalmologie  
Orthopédie - Traumatologie  
Ophtalmologie  
Orthopédie/ Traumatologie  
Urologie  
Gynécologie/ Obstétrique  
Anesthésie / Réanimation  
Odontologie  
Odontologie  
ORL

#### **D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES**

##### **PROFESSEURS**

Mr Daouda DIALLO  
Mr Bréhima KOUMARE  
Mr Siné BAYO  
Mr Yéya T. TOURE  
Mr Amadou DIALLO  
Mr Moussa HARAMA  
Mr Ogobara DOUMBO

Chimie Générale & Minérale  
Bactériologie - Virologie  
Anatomie-Pathologie-Histoembryologie  
Biologie  
Biologie  
Chimie Organique  
Parasitologie-Mycologie

## 2. MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Yénimégué Albert DEMBELE	Chimie Organique
Mr Anatole TOUNKARA	Immunologie- <b>Chef de D.E.R.</b>
Mr Amadou TOURE	Histoembryologie
Mr Flabou BOUGOUDOGO	Bactériologie – Virologie
Mr Amagana DOLO	Parasitologie

## 3. MAÎTRES DE CONFERENCES

Mr Bakary M. CISSE	Biochimie
Mr Abdrahamane S. MAÏGA	Parasitologie
Mr Adama DIARRA	Physiologie
Mr Mamadou KONE	Physiologie
Mr Massa SANOGO	Chimie Analytique

## 4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Mahamadou CISSE	Biologie
Mr Sékou F. M. TRAORE	Entomologie médicale
Mr Abdoulaye DABO	Malacologie – Biologie Animale
Mr Abdrahamane TOUNKARA	Biochimie
Mr Ibrahim I. MAÏGA	Bactériologie – Virologie
Mr Amagana DOLO	Parasitologie
Mr Moussa Issa DIARRA	Biophysique
Mr Kaourou DOUCOURE	Biologie
Mr Bouréma KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane DIALLO	Bactériologie/ Virologie
Mr Cheick Bougadari TRAORE	Anatomie pathologie

## 5. ASSISTANTS

Mr Mounirou BABY	Hématologie
Mr Mahamadou A. THERA	Parasitologie
Mr Mangara M. BAGAYOKO	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Guimogo DOLO	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Djbril SANGARE	Entomologie-Moléculaire Médicale
Mr Mouctar DIALLO	Biologie/ Parasitologie
Mr Boubacar TRAORE	Immunologie

## **D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES**

### 1. PROFESSEURS

Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Mr Mamadou K. TOURE	Cardiologie
Mr Mahamane MAÏGA	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie- <b>Chef de D.E.R.</b>
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Mamadou M. KEITA	Pédiatrie
Mr Hamar A. TRAORE	Médecine Interne
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie
Mr Moussa Y. MAIGA	Gastro-entérologie-Hépatologie

### 2. MAÎTRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Toumani SIDIBE	Pédiatrie
Mr Bah KEITA	Pneumo-Phtisiologie
Mr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Mr Somita KEITA	Dermato-Léprologie
Mr Abdel Kader TRAORE	Médecine Interne
Mr Siaka SIDIBE	Radiologie
Mr Mamadou DEMBELE	Médecine Interne

### 3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mamadou DEMBELE	Médecine Interne
Mr Mamady KANE	Radiologie
Mr Tatiana KEITA	Pédiatrie
Mr Diankiné KAYENTAO†	Pneumo-Phtisiologie
Mme TRAORE Mariam SYLLA	Pédiatrie
Mr Adama D. KEITA	Radiologie
Mme SIDIBE Assa TRAORE	Endocrinologie
Mme Habibatou DIAWARA	Dermatologie

### 4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mr Bou DIAKITE	Psychiatrie
Mr Bougouzié SANOGO	Gastro-entérologie
Mr Saharé FONGORO	Néphrologie
Mr Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie
Mr Kassoum SANOGO	Cardiologie
Mr Seydou DIAKITE	Cardiologie
Mr Mahamadou B. CISSE	Pédiatrie
Mr Arouna TOGORA	Psychiatrie
Mme Diarra Assétou SOUCKO	Médecine interne
Mr Boubacar TOGO	Pédiatrie
Mr Mahamadou B. TOURE	Radiologie
Mr Idrissa A. CISSE	Dermatologie
Mr Mamadou B. DIARRA	Cardiologie
Mr Anselme KONATE	Hépto-gastro-entérologie
Mr Moussa T. DIARRA	Hépto-gastro-entérologie
Mr Souleymane DIALLO	Pneumologie

Mr Souleymane COULIBALY  
Mr Daouda MINTA  
Mr Sounkalo DAO

Psychologie  
Maladies infectieuses  
Maladies infectieuses

5. ASSISTANT

Mr Cheick Oumar GUINTO

Neurologie

**D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

1. PROFESSEUR

Mr Boubacar Sidiki CISSE  
Mr Gaoussou KANOUTE

Toxicologie  
Chimie Analytique

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Arouna KEITA †  
Mr Ousmane DOUMBIA

Matières médicales  
Pharmacie Chimique

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Boulkassoum Haidara  
Mr Eliman MARIKO  
Mr Drissa DIALLO

Législation  
Pharmacologie-**Chef de DER**  
Matières Médicales

4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Benoît KOUMARE  
Mr Alou KEITA  
Mr Ababacar I. MAÏGA  
Mr Yaya KANE

Chimie analytique  
Galénique  
Toxicologie  
Galénique

5. ASSISTANTS

Mme Rokia SANOGO  
Mr Saibou MAIGA  
Mr Ousmane KOITA

Pharmacognosie  
Législation  
Parasitologie Moléculaire

## **D.E.R. SANTE PUBLIQUE**

### 1. PROFESSEUR

Mr Sidi Yaya SIMAGA Santé-Publique-**Chef de D.E.R**

### 2. MAÎTRE DE CONFERENCES AGREGE

Mr Moussa A. MAÏGA Santé Publique

### 3. MAÎTRE DE CONFERENCES

Mr Sanoussi KONATE Santé Publique

### 4. MAÎTRES ASSISTANTS

Mr Bocar G. TOURE Santé Publique

Mr Adama DIAWARA Santé Publique

Mr Hamadoun SANGHO Santé Publique

Mr Massambou SACKO Santé Publique

Mr Moussa A. DICKO Santé Publique

### 5. ASSISTANTS

Mr Samba DIOP Anthropologie Médicale

Mr Seydou DOUMBIA Epidémiologie

## **CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES**

Mr N'Golo DIARRA Botanique

Mr Bouba DIARRA Bactériologie

Mr Salikou SANOGO Physique

Mr Bocary Y. SACKO Biochimie

Mr Boubacar KANTE Galénique

Mr Souleymane GUINDO Gestion

Mme DEMBELE Sira DIARRA Mathématiques

Mr Modibo DIARRA Nutrition

Mme MAÏGA Fatoumata SOKONA Hygiène du Milieu

Mr Mahamadou TRAORE Génétique

Mr Souleymane COULIBALY Psychologie Médicale

Mr Yaya COULIBALY Législation

## **ENSEIGNANTS EN MISSION**

Pr. Doudou BA Bromatologie

Pr. Babacar FAYE Pharmacodynamie

Pr. Eric PICHARD Pathologie Infectieuse

Pr. Mounirou CISS Hydrologie

# DEDICACES ET REMERCIEMENTS

*A ALLAH le Tout Puissant, le Clément, le Miséricordieux*

**A mes parents et amis**

Et à tous ceux qui de près ou de loin, moralement et matériellement  
ont contribué à la réalisation de ce travail

# HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

➤ *A notre maître et président de jury :*

**Pr Elimane MARIKO**

**Maître de conférence des Universités,  
Chargé de Mission du Ministère de la Défense Nationale, des Forces  
Armées et des Anciens Combattants**

Nous avons été touché par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de présider cette thèse malgré vos multiples occupations. Nous admirons votre disponibilité, votre esprit de collaboration et surtout votre modestie.

Nous retenons de vous l'image d'un enseignant chevronné, ne ménageant aucun effort pour transmettre son savoir aux étudiants. Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites.

➤ *A notre maître et juge :*

**Dr Daouda K. MINTA**

**Assistant chef clinique en Maladies Infectieuses,  
Chercheur au Département d'Epidémiologie et des Affections Parasitaires  
de la FMPOS,  
Chargé de cours de parasitologie et de pathologie infectieuse à la FMPOS,**

Cher Maître malgré vos multiples activités, vous avez accepté de juger ce travail. Votre abord facile et sans protocole ne nous a pas laissé indifférent. Trouvez ici le témoignage de notre sincère reconnaissance.

➤ *A notre maître et juge :*

**Dr Benoît Y. KOUMARE**

**Maître assistant de chimie analytique,**

**Chef de service de la pharmacie de l'hôpital du point G,**

Vous nous faites honneur en acceptant de juger ce travail. Nous retenons votre disponibilité ne nous laisse pas indifférent. Votre présence au sein de ce jury nous fait grand plaisir.

➤ *A notre Maître et codirecteur de thèse :*

**Docteur Suzanne CHANTEAU**

**Docteur en Biologie,**

**Directrice du Centre de Recherches Médicale et Sanitaire**

En m'autorisant à faire ce travail dans ce centre et en me donnant toutes les facilités pour son bon déroulement, vous me faites un grand honneur.

Vos conseil, votre vivacité votre promptitude à partager votre savoir nous ont marqué. Votre rigueur a été pour nous une source d'inspiration. Nous avons beaucoup appris à vos cotés. Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

➤ *A notre maître et directeur de thèse*

**Professeur Ibrahim I. MAÏGA**

**Maître de conférence des Universités,**

**Chef de service du Laboratoire de Biologie Médicale et hygiène  
hospitalière à L'HNPG,**

Vous nous avez accueilli dans votre service les bras ouverts et avez accepté de diriger ce travail.

Pendant notre séjour dans votre service, nous avons apprécié vos qualités aussi bien scientifiques que sociales.

Votre dévouement à la cause du travail bien fait et votre perspicacité font de vous un scientifique apprécié de tous.

Cher maître, votre ardeur à la tâche et votre opiniâtreté constituent pour nous un exemple dont nous efforcerons de nous inspirer.

Nous vous prions de trouver ici le témoignage de notre immense gratitude.

## ABREVIATIONS

- : Négatif

+ : Positif

< : Inférieur à

> : Supérieur à

$\mu$ l : Microlitre

**Ac** : Anticorps

**ADN ; DNA** : Acide Désoxyribonucléique

**Ag** : Antigène

**CCOMS** : Centre Collaborateur de L'Organisation Mondiale de la Santé

**CERMES** : Centre de Recherches Médicale et Sanitaire

**ELISA** : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

**g** : Gramme

**g/l** : Gramme par litre

**Hi ; *H.influenzae*** : *Haemophilus influenzae*

**IgG** : Immunoglobuline G

**IgM** : Immunoglobuline M

**IMTSSA** : Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées

**IPP** : Institut Pasteur de Paris

**LCR** : Liquide Céphalorachidien

**Mac ; Mab** : Anticorps monoclonal

**MCS** : Méningite Cérébrospinale

**mg** : Milligramme

**ml** : Millilitre

**mn** : Minute

**n** : Nombre

**N.m ; *N.meningitidis*** : *Neisseria meningitidis*

**NC** : Nitrocellulose

**Neg.** : Négatif

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PBS** : Phosphate Buffered Saline

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**pH** : Potentiel Hydrogène

**PL** : Ponction Lombaire

**PSM II** : Poste de Sécurité Microbiologique de classe II

**RGP** : Recensement Général de la Population

**Sp ; S.pneumoniae** : *Streptococcus pneumoniae*

**ST** : Séquence Type

**TPHA** : *Treponema pallidum* haemagglutination assay

**VDRL** : Veneral disease reaserch Laboratory

**VPN** : Valeur Prédictive Négative

**VPP** : Valeur Prédictive Positive

# TABLE DES MATIERES

	Pages
I. Introduction et objectifs.....	21
II. Généralités sur les méningites.....	25
2.1. Définition .....	25
2.2. Historique .....	26
2.3. Physiopathologie .....	27
2.4. Epidémiologie .....	29
2.5. Etiologies .....	33
2.5.1. Méningites à liquide clair .....	33
2.5.2. Méningites purulentes.....	35
2.6. Diagnostic.....	41
2.6.1. Diagnostic clinique .....	41
2.6.2. Diagnostic biologique .....	42
2.7. Prévention .....	47
2.8. Traitement .....	49
2.8.1. Traitement antibiotique .....	32
2.8.2. Traitement symptomatique.....	33
2.9. Surveillance microbiologique.....	50
III- Méthodologie.....	53
3.1. Caractéristiques de la zone de l'étude.....	53
3.1.1. Le pays de l'étude : le Niger.....	53
3.2. Matériels et méthode.....	60
3.2.1. Matériels .....	60
3.2.2. Méthode .....	62
3.2.3. Diagnostic de la méningite par PCR au CERMES .....	68
IV. RESULTATS .....	70
4.1. Calibrage des suspensions bactériennes .....	70
4.2. Dot blot .....	71
4.2.1. Optimisation de la méthode .....	71
4.2.2. Détermination des concentrations de travail des anticorps monoclonaux et du conjugué.....	72
4.2.3. Tests de spécificité des anticorps monoclonaux de souris .....	73
4.2.4. Test de sensibilité des anticorps monoclonaux.....	75

4.2.5. Etablissement d'une gamme étalon de polysaccharides A, W et de suspensions bactériennes .....	78
4.2.6. Dot blot des échantillons de LCR .....	80
<b>V. DISCUSSION.....</b>	<b>87</b>
5.1. Optimisation de la méthode .....	88
5.2. Dot blot .....	89
5.3. Evaluation de la qualité intrinsèque .....	90
<b>VI. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>94</b>
6.1. Conclusion.....	94
6.2. Recommandations.....	95
<b>VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>97</b>

# INTRODUCTION

# **I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS**

## **1.1. Introduction**

Les épidémies de méningite à méningocoque (méningite cérébro-spinale) demeurent un défi pour la santé publique au plan mondial et particulièrement en Afrique dans la ceinture de la méningite, espace géographique ayant une population estimée à environ 300 millions d'habitants. Le nombre de cas de méningite à méningocoque au cours de ces 10 dernières années est estimé à plus de 700.000 parmi lesquels plus de 10% furent décédés [49].

Malgré les mesures prophylactiques et thérapeutiques efficaces mises en place par l'OMS depuis quelques décennies, cette région du continent africain est périodiquement sujette à des flambées épidémiques de grande ampleur.

Bien que les épidémies dans la ceinture méningitique soient dues à *Neisseria meningitidis* du sérotype A, la survenue en 2001-2002 d'une épidémie de méningite à *N. meningitidis* W135 a permis de mettre en évidence le pouvoir épidémiogène de ce sérotype [55]. La survenue d'une situation analogue aurait un impact désastreux sur la santé publique. De plus, on a observé au Niger, entre 1995 et 2002, une augmentation des cas de méningite à méningocoque du sérotype X [19].

Contenir les épidémies et prendre en charge les cas dépendent d'un diagnostic rapide et d'une identification précoce de l'agent pathogène en cause par les laboratoires. Une surveillance épidémiologique active avec renforcement des capacités des laboratoires permet une détection rapide des épidémies, une identification du sérotype en cause, un choix de traitement adéquat et une sélection appropriée des vaccins afin de protéger les populations et limiter la propagation de la maladie et la survenue des séquelles [52].

Du fait de l'inaccessibilité financière des Etats et de la disponibilité limitée du vaccin protégeant contre le sérotype W135, la réponse aux épidémies au cours des saisons à venir reposera sur une surveillance renforcée et une gestion rapide et efficace des cas [52].

Dans les pays de la ceinture africaine de la méningite, exception faite de quelques centres de référence, seuls de rares laboratoires disposent du plateau technique nécessaire au diagnostic étiologique des méningites bactériennes.

Les méthodes de laboratoire actuellement utilisées pour l'identification et le sérotypage des méningocoques sont soit difficiles à réaliser et nécessitant un matériel lourd, soit lents à réaliser (24-48 heures pour la culture) et limités par la fragilité des germes ou alors difficilement réalisables du fait de leur prix exorbitant [34,40, 50].

Devant ce tableau, la clé de la surveillance épidémiologique des méningites bactériennes réside dans le développement de nouvelles techniques peu onéreuses, rapides et reproductibles.

Notre étude portera sur le développement et l'évaluation d'une technique "Dot blot" pour le diagnostic et le sérogroupage des méningocoques.

## **1.2. Objectifs de l'étude**

### **Objectif général**

Mettre au point et évaluer une technique "Dot blot" pour le diagnostic et le sérogroupage des *N. meningitidis* A et W135.

### **Objectifs spécifiques**

- Optimiser la méthode
- Evaluer la méthode par la détermination de la sensibilité et de la spécificité
- Déterminer les capacités de passer des LCR en série pour le sérogroupage en période épidémique

# GENERALITES

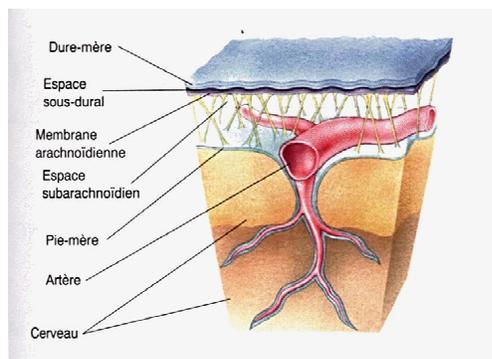
## **II .GENERALITES SUR LES MENINGITES**

### **2.1. Définition**

La méningite est un terme caractérisant toutes les inflammations aiguës ou chroniques des méninges cérébrales (du cerveau) et médullaires (la moelle épinière) et ceci indépendamment de la cause.

Terme issu du grec « mêninx », les méninges sont des membranes constituées de trois enveloppes recouvrant le système nerveux central (cerveau, moelle épinière) dans lesquelles circulent le liquide céphalorachidien (LCR). Ce sont de l'extérieur vers l'intérieur :

- La dure-mère ou parenchyméninge, épaisse et fibreuse dont le rôle est de protéger l'encéphale (partie du système nerveux contenu dans la boîte crânienne).
- L'arachnoïde fait partie des méninges molles ou leptoméninges. Elle est séparée de la pie-mère par l'espace sous-arachnoïdien et est située entre la dure-mère et la pie-mère.
- L'espace sous-arachnoïdien contient le liquide céphalorachidien. Cet espace présente quelquefois un volume très important à certains endroits appelés citerne ou base du crâne. Ils contiennent également des éléments veineux : les sinus veineux.
- La pie-mère appelée leptoméninge est constituée d'une membrane très fine qui adhère à la surface du système nerveux directement.



**Figure 1 : Anatomie des méninges**

## 2.2. Historique [3, 62]

La méningite est connue depuis fort longtemps; HIPPOCRATE la citait déjà en la nommant « frénésies » et, au XVIII<sup>e</sup> et XIX<sup>e</sup> siècle, elle entraîna des épidémies meurtrières.

Les idées sur la maladie commencent à se faire claires à partir de 1805 avec les travaux de VIEUSSEUX et MATHEY. A ce moment, des épidémies étaient signalées en Europe et aux Etats-Unis.

Au cours d'une épidémie dans les garnisons militaires de Bayonne et de Dax, TOURDES, se basant uniquement sur les données de la clinique et de l'épidémiologie, avait mis l'accent sur l'unité des symptômes et avait évoqué l'existence d'un seul et même agent causal.

De 1837 à 1849, une vague d'épidémies sévit en Europe (France, Italie, Grèce, Irlande, Danemark), au Maghreb, et aux Etats-Unis. De 1854 à 1861, ce fut le tour des pays scandinaves (Suède, Norvège) puis l'épidémie passa en Allemagne et en Europe centrale pendant la période allant de 1862 à 1868.

De 1885 à 1895, la méningite sévit sous sa forme épidémique en Europe, au Maghreb, aux Etats-Unis et même aux Iles Fidji, dans le pacifique Sud.

En 1887, WEICHSELBAUM (Autrichien), découvre l'agent causal de la méningite cérébro-spinale, le méningocoque qui fut plus tard nommé *Neisseria meningitidis*.

L'introduction de la pratique de la ponction lombaire par QUINCKE en 1889 va offrir de nouvelles perspectives à la recherche sur la méningite. Dès cet instant, FLEXNER et JOBLING d'une part et DOPTER à l'Institut Pasteur d'autre part, s'efforceront de mettre au point un sérum anti-méningococcique. L'avènement de la thérapie par les sulfamides (DOMAG et TREFOMEL, 1935) va considérablement améliorer le pronostic de la méningite. Mais, ce sont la découverte de la pénicilline par FLEMMING en 1945 et la mise au point de vaccins polysaccharidiques en 1969 [29] qui révolutionneront la thérapeutique de la méningite en abaissant fortement le taux de mortalité de la maladie.

### **2.3. Physiopathologie [2, 79]**

Un pré requis nécessaire au déclenchement d'une méningite est la pénétration des bactéries dans le LCR.

Différents arguments plaident en faveur d'un ensemencement du LCR par voie hématogène, avec franchissement secondaire de la barrière hémato-méningée (DE VOE, 1982). La mise en évidence de la bactérie dans les hémocultures avant son apparition dans le LCR appuie cette hypothèse. Les arguments les plus convaincants en faveur d'une origine hématogène des méningites proviennent d'infections expérimentales chez le rat nouveau-né et le singe Macaque.

Dans tous les cas, il n'existe pas d'autre voie crédible à l'ensemencement méningé que celle du franchissement de la barrière hémato-méningée. Ces données supposent que les bactéries responsables de méningite sont capables de s'affranchir de certains obstacles.

Une fois entrée dans le LCR, la bactérie rencontre peu d'obstacles à son développement. En effet, les éléments responsables de la bactéricidie sérique font défaut dans le LCR car le complément y est quasiment absent même en cas de réaction inflammatoire méningée importante (dégradation in situ par des protéases leucocytaires). La concentration en immunoglobulines y est très basse, par comparaison au sang. Ce déficit en anticorps et en complément contribue au faible pouvoir bactéricide du LCR.

La pénétration des bactéries dans le LCR provoque la production de cytokines qui conditionnent l'ensemble de la cascade physiologique.

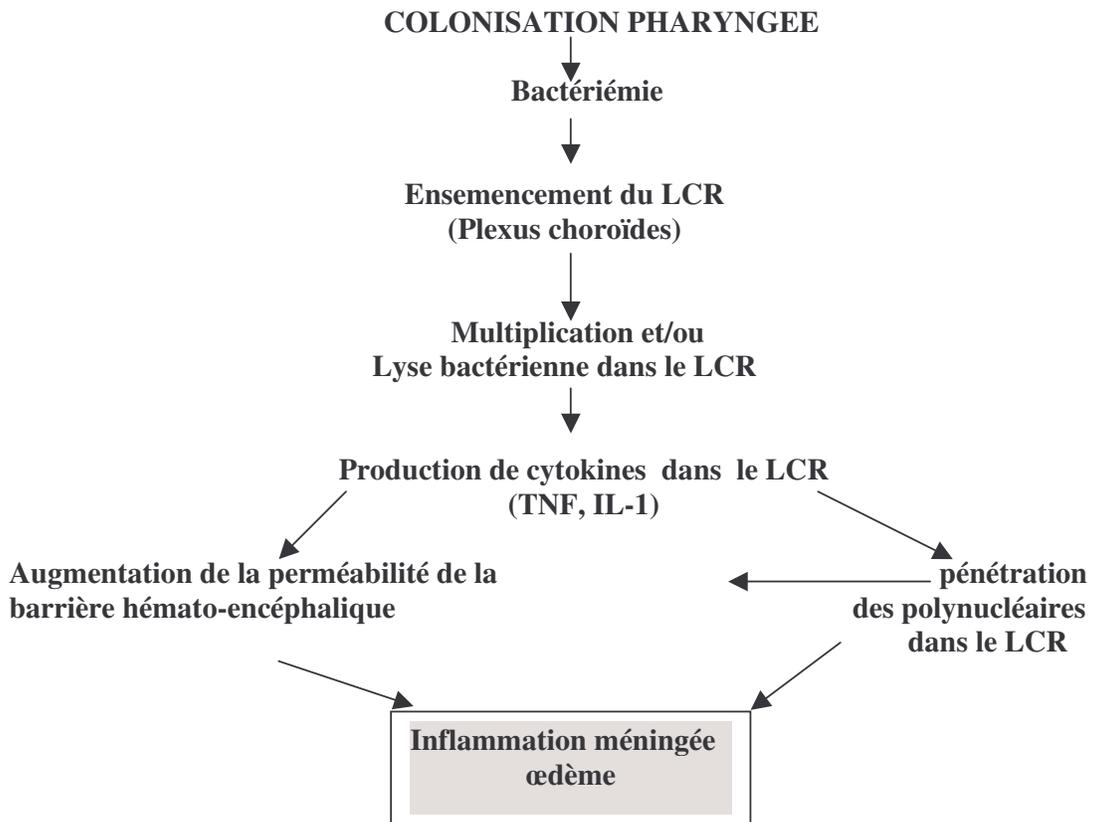
Cette production de cytokines précède l'apparition de l'exsudat inflammatoire. Des constatations expérimentales montrent que la production de ces cytokines dans le LCR est nécessaire au déclenchement de la méningite. L'injection intracisternale de LPS ou de certains composants de la paroi de bactéries Gram positif (peptidoglycane et acide téichoïque) a les mêmes effets que l'administration des bactéries vivantes. Ainsi donc la pauvreté en nutriments du LCR entraîne l'arrêt de la croissance bactérienne, expliquant la lyse bactérienne qui libère les composants bactériens nécessaires au déclenchement de l'exsudat inflammatoire.

L'afflux de polynucléaires dans le LCR est la première conséquence de la libération de cytokines.

La deuxième grande conséquence de la production des cytokines est une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (QUAGLIARELLO et coll, 1986).

L'ensemble des évènements survenant au cours d'une méningite bactérienne résulte d'une part de l'afflux des polynucléaires, et d'autre part de l'altération de la barrière hémato-

encéphalique (TUNKEL et SCHELD, 1993). L'œdème cérébral qui se constitue progressivement au cours des méningites bactériennes est mixte : vasogénique (augmentation de perméabilité de la barrière) et interstitiel (diminution de la résorption du LCR au niveau des villosités arachnoïdiennes). Cette diminution de la résorption du LCR a été étudiée lors de méningites expérimentales à pneumocoque chez le lapin. En effet, elle persiste même après stérilisation du LCR. La conséquence de cet œdème cérébral est une hypertension intracrânienne qui rend compte d'une bonne partie de la symptomatologie des méningites. De même, l'inflammation méningée peut aboutir à de profondes altérations des vaisseaux méningés. Cette vascularité s'accompagne de thrombose qui, avec l'hypertension intracrânienne, participe à l'anoxie cérébrale et à de profondes altérations du débit sanguin cérébral.



### Principales étapes de la physiopathologie des méningites bactériennes

## 2.4. Epidémiologie [9, 12, 13, 49, 67]

La méningite est une affection cosmopolite qui sévit sur l'ensemble du globe sur un mode endémo-sporadique avec parfois des poussées épidémiques imprévisibles. Sur le plan épidémiologique on distingue la méningite à méningocoque épidémique et les méningites endémo-sporadiques notamment les méningites, à *Haemophilus influenzae* b, à pneumocoque et autres. Les données épidémiologiques sur les méningites sont évolutives. Tous les ans, on estime à environ 1 million le nombre de cas de méningite survenant dans le monde, dont 200.000 sont fatals [49]. Les deux tiers de ces méningites surviennent chez des enfants âgés de moins de 5 ans.

L'incidence des méningites varie considérablement d'un pays à l'autre selon le degré de développement, les conditions socio-économiques, l'âge et de nombreux autres facteurs.

Dans les pays industrialisés les méningites affectent la population à un taux moyen de 5-10/100.000 habitants. La tranche d'âge la plus atteinte est la période néonatale, avec un taux d'incidence de 0,4/100.000 naissances, soit 2 à 10 % des infections néonatales [67].

Dans les pays en voie de développement, l'incidence des méningites est très différente de celle des pays industrialisés, puisque le taux d'incidence global peut-être estimé à 50/100.000 habitants soit 10 fois plus que dans les pays industrialisés et peut atteindre 800 à 1000/100.000 habitants pendant les épidémies [49, 67]. Le taux de létalité est fonction de l'âge et de la bactérie en cause, oscillant classiquement entre 3-19 % dans les pays développés. Une létalité plus élevée, 37-60 % a été rapportée dans les pays en développement. Des séquelles, incluant surdité, retard mental et autres séquelles neurologiques, intéressent jusqu'à 54 % des survivants.

De même, les sérogroupes en cause dans les épidémies varient en fonction des régions géographiques ; en Europe et en Amérique du Nord on rencontre les sérogroupes B et C; les sérogroupes A, C et W135 en Afrique; les sérogroupes A et C en Amérique du Sud et en Asie [67].

En Afrique, les caractéristiques épidémiologiques des méningites cérébro-spinales (MCS) ont été décrites par LAPEYSSONNIE [38] et révisées par GREENWOOD en 1987 [30]. La zone concernée s'étend entre les isohyètes 300 et 1100 mm de pluies (8<sup>e</sup> et 16<sup>e</sup> degré de latitude Nord). C'est " la ceinture africaine de la méningite" qui s'étend du Sénégal à l'ouest à l'Ethiopie à l'Est. Dans cette zone, les épidémies surviennent de décembre à mai et reviennent 2 ou 3 années de suite avec une période d'interruption pendant la saison pluvieuse. Les épidémies éclatent généralement en cycles irréguliers, tous les 5 à 12 ans

mais elles peuvent être plus fréquentes et plus régulières là où les communications sont plus développées et les brassages de populations plus prononcés.

Dès la fin des années 80, d'autres pays africains en dehors de la ceinture classique de LAPEYSSONNIE ont été touchés par la MCS ; ce sont le Burundi, la République centrafricaine, le Kenya, l'Ouganda, le Rwanda, la Tanzanie et la Zambie [29, 49].

Les différentes épidémies africaines survenues depuis 1988 sont dues à l'introduction à partir de l'Asie via la Mecque d'une nouvelle souche de *N. meningitidis* séro groupe A correspondant au clone III-1 [48]. Ainsi, au Niger, durant l'épidémie de 1995, 43.203 cas furent déclarés dont 3.800 décès et durant celle de 1996, 16.745 cas dont 1.573 décès [49]. En 2002, le Niger a enregistré 5761 cas dont 576 décès. Dans la même année le Burkina Faso a connu une flambée de méningite à méningocoque dont environ 80 % des cas étaient dus au séro groupe W135 [56].

Le clone de *N. meningitidis* W135 ST11 serait à l'origine de l'épidémie de méningite au Burkina Faso en 2002. Le méningocoque W135 ST11 circule également au Niger sur un mode de portage asymptomatique mais n'a encore été associé à aucune épidémie [55, 56, 77].

**Tableau I : Evolution des cas de méningite notifiés dans les pays de la sous-région :**

PAYS	Cas de méningite notifiés dans les pays du bloc de l'Afrique de l'ouest							
	Année	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
<b>Benin</b>		165	699	442	1156*	380	1150*	8995*
<b>Burkina Faso</b>		1320	42967*	22305	5649*	3215*	3178*	13039**
<b>Côte d'Ivoire</b>		0	0	5	46	94	22	ND
<b>Gambie</b>		0	0	913*	42	ND	ND	ND
<b>Ghana</b>		26	479	19055*	1049	527	676	ND
<b>Guinée</b>		238	89	51	58	507*	325	ND
<b>Mali</b>		1199	7254*	11228*	2704	1040	766	ND
<b>Niger</b>		43203*	16145*	4910	2328*	5576*	13233*	7906*
<b>Nigeria</b>		7376	108068*	39973	5948	1906	711	ND
<b>Sénégal</b>		0	0	13	2709*	6870*	454	ND
<b>Togo</b>		0	517	3256*	382	171	213	ND
<b>TOTAL</b>		53427	176646	102326	22608	22009	20996	29940

Sources: OMS/AFRO/HQ ; ICP-EMC/ABIDJAN - ND : données non disponibles

\* : épidémies de méningite à *N. meningitidis* A

\*\* : épidémies de méningite à *N. meningitidis* W135

## African Meningitis Belt

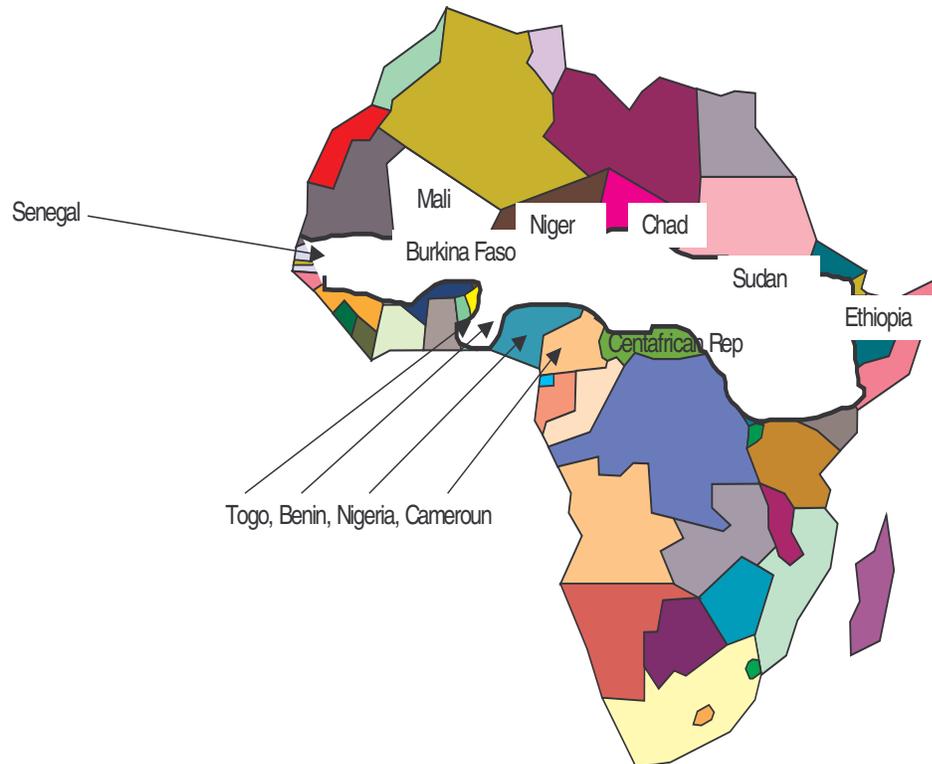


Figure 2 : Ceinture africaine de la méningite [38]

## **2.5. Etiologies [23, 27, 40, 81]**

### **2.5.1. Méningites à liquide clair**

Aiguës et bénignes lorsqu'elles sont causées par des virus, les méningites à liquide clair peuvent être mortelles quand elles sont dues aux bactéries. Elles peuvent exceptionnellement être causées par des champignons, des parasites ou par un processus néoplasique.

#### **2.5.1.1. Méningites virales**

Plus de 80 % des méningites virales identifiées sont dues aux *Entérovirus* (*Echovirus*, *Coxsackievirus*). Depuis la généralisation de la vaccination, on a observé une nette diminution de la fréquence du virus des oreillons.

Les *Herpesviridae* comme l'*Herpes simplex virus* type 2, le Cytomégalovirus, le virus de la varicelle et du zona sont surtout responsables d'encéphalites.

Le VIH peut aussi être à l'origine de méningite non purulente lors de la primo-infection.

D'autres virus plus rares comme les *Arbovirus*, les *Poliovirus*, les *Adénovirus* sont aussi susceptibles de causer les méningites à liquide clair.

#### **2.5.1.2. Méningites bactériennes**

##### **2.5.1.2.1. Méningites dues à *Mycobacterium tuberculosis***

Une méningite à liquide clair doit toujours faire craindre une tuberculose méningée. C'est une maladie dont l'installation est progressive, associant des troubles neuropsychiques (paralysie des paires crâniennes). Une coloration de Ziehl et une culture sur le milieu Löwenstein-Jensen permettent de poser le diagnostic.

##### **2.5.1.2.2. Méningite à *Listeria monocytogenes***

Germe ubiquitaire, *Listeria monocytogenes* est un petit bacille Gram positif, non capsulé, responsable de méningites lymphocytaires. Les antigènes somatiques (O) et flagellaires (H) permettent une classification en 16 sérotypes.

Le milieu extérieur est un réservoir de germes où l'Homme et l'animal se contaminent. L'infection se développe après inhalation ou ingestion de produits animaux ou de nourriture contaminés. La maladie peut aussi se transmettre de la mère à l'enfant, au moment de l'accouchement, du fait du portage du germe dans les voies génitales de la femme.

*Listeria monocytogenes* est en cause dans de nombreuses séries de méningites de l'adulte.

En dehors de la période de gestation et de la période néonatale, la listériose est plus fréquente chez les immunodéprimés et les sujets de plus de 65 ans.

##### **2.5.1.2.3. Méningite brucellienne**

Il se passe toujours un long temps d'incubation entre la contamination et le début de la méningite; les signes caractéristiques de la maladie sont absents.

C'est surtout la notion d'un possible contagio professionnel qui oriente le diagnostic vers un test ELISA sanguin et sur LCR.

#### **2.5.1.2.4. Méningite à Leptospire**

Elle est très fréquente l'été en zone rurale. L'interrogatoire recherche un contact infectant avec les rongeurs (la plupart du temps), mais aussi avec un chien malade, fébrile et ictérique, avec un porc, un hérisson, un séjour en terrain inondé ou un bain en eaux dormantes. Chaque contact infectant est caractérisé par une espèce de Leptospires.

Les éléments cliniques du diagnostic sont : un début fébrile avec myalgies suivi d'un ictère même léger et une créatininémie élevée avec une récurrence thermique au 12<sup>ème</sup> jour. Une forme ictéro-hémorragique grave est possible avec certains sérotypes.

#### **2.5.1.2.5. Méningite syphilitique**

Elle est une découverte de ponction lombaire systématique au cours d'une syphilis secondaire connue et suivie. La notion d'une syphilis ancienne et même traitée doit attirer l'attention. Les tests TPHA et VDRL dans le sang et le LCR permettent le diagnostic.

#### **2.5.1.2.6. Méningite au cours de la maladie de Lyme**

Elle survient loin de la contamination par une morsure de tique qui doit être cependant recherchée par un interrogatoire. L'atteinte encéphalique est caractéristique quand elle comporte une paralysie faciale centrale bilatérale ou à bascule, régressive en 1 à 2 mois. Le diagnostic se fait par sérologie et sur LCR.

#### **2.5.1.2.7. Méningite à Streptocoque G**

C'est une étiologie rencontrée presque exclusivement chez les bouchers. La culture du LCR permet de poser le diagnostic.

#### **2.5.1.2.8. Méningites bactériennes décapitées par une antibiothérapie**

Devant toute méningite à liquide clair il est nécessaire de rechercher les antigènes solubles car les antibiothérapies empiriques antérieures à la ponction du LCR peuvent induire une erreur de diagnostic.

#### **2.5.1.2.9. Méningites fongiques**

Elles s'observent en général chez les immunodéprimés et sont le plus souvent dues à *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans*. L'utilisation de techniques appropriées

(examen direct avec l'encre de Chine ou la lumière de Wood) et la culture sur milieu approprié permettent de poser le diagnostic.

#### **2.5.1.2.10. Méningites parasitaires**

Ce sont souvent des méningo-encéphalites. Les parasites généralement incriminés sont les toxoplasmes (sur terrain immunodéprimé), les plasmodies, les trypanosomes, les amibes.

#### **2.5.2. Méningites purulentes**

Egalement appelées méningites suppurées, elles constituent une urgence médicale imposant une hospitalisation. Elles sont généralement le fait de bactéries : méningocoques, pneumocoques, bacille de Pfeiffer, staphylocoques, entérobactéries, salmonelles,....

##### **2.5.2.1. Méningites à *Haemophilus influenzae***

*Haemophilus influenzae*, découvert par PFEIFFER, est un coccobacille polymorphe, à Gram négatif, immobile, non sporulé, capsulé ou non.

Les méningites à *Haemophilus influenzae* surviennent presque exclusivement chez l'enfant de moins de 5 ans. *Haemophilus influenzae* de type b est le plus fréquent. C'est une bactérie appartenant à la flore commensale des voies respiratoires de l'enfant et de l'adulte.

La colonisation débute très tôt après la naissance et plus de 80 % des enfants deviennent ainsi porteurs du germe. La bactérie est transmise par voie respiratoire.

##### **2.5.2.2. Méningites à *Streptococcus pneumoniae***

Deuxième agent responsable de méningite purulente après le méningocoque, le pneumocoque est transmis par voie respiratoire. Il est généralement responsable des méningites des âges extrêmes de la vie.

Décrit en 1881 par PASTEUR et découvert en 1883 par TALAMAN, *Streptococcus pneumoniae* se présente sous l'aspect d'un diplocoque Gram positif, lancéolé, encapsulé en forme de 8.

##### **2.5.2.3. Méningites à *Neisseria meningitidis***

###### **2.5.2.3.1. *Neisseria meningitidis***

Bactérie de la famille des NEISSERIACEAE, *Neisseria meningitidis* (également appelé méningocoque) fut isolé du LCR par WEICHSELBAUM en 1887. C'est l'agent causal de la méningite cérébro-spinale.

Les *Neisseriaceae* comprennent essentiellement 2 genres bactériens : les genres *Neisseria* et *Kingella*. Le genre *Neisseria* comprend plusieurs espèces dont 2 sont pathogènes pour l'homme : *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*.

Le méningocoque est une bactérie fragile, craignant le froid et le chaud, les variations de pH, la dessiccation. Il ne survit que très peu de temps dans le milieu extérieur. C'est pourquoi le prélèvement doit se faire avec une asepsie rigoureuse par un personnel expérimenté.

Classification de *Neisseria meningitidis* selon le Bergey's manual :

**Classe :** *Betaproteobacterie*

**Ordre :** *Neisseriale*

**Famille :** *Neisseriaceae*

**Genre :** *Neisseria*

**Espèce :** *meningitidis*

#### **2.5.2.3.2. Caractères morphologiques et structuraux [5, 23]**

➤ Morphologie :

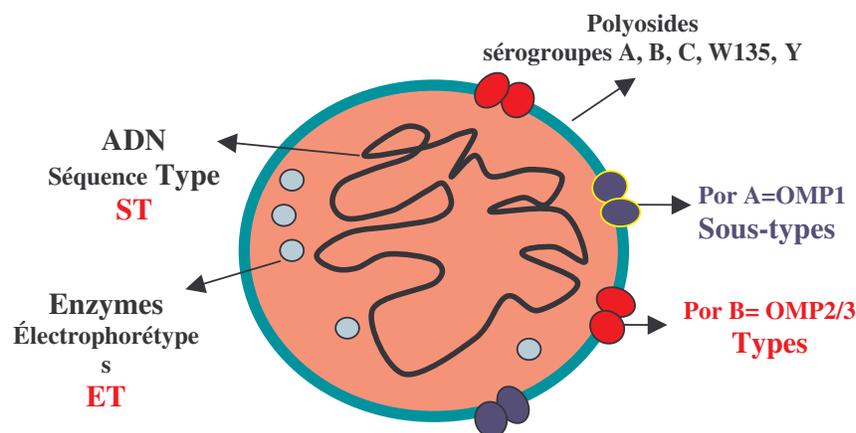
*Neisseria meningitidis* ou méningocoque est un germe exclusivement humain, commensal des muqueuses du rhinopharynx. On ne le rencontre chez aucune autre espèce animale. C'est un germe fragile et on ne le trouve pas à l'état saprophyte dans la nature. Après coloration de Gram, les méningocoques apparaissent sous forme de diplocoques à Gram négatif de 0,6 à 0,8 micromètres disposés en "grain de café", parfois encapsulés et en situation intra-leucocytaire dans le liquide céphalo-rachidien purulent. Ils sont immobiles et non sporulés [34].

La réactivité immunologique du polyside capsulaire permet de classer *Neisseria meningitidis* en sérogroupes : 13 sérogroupes ont été identifiés mais les sérogroupes A, C, B et W135 (qui est un séro groupe émergent) sont responsables de plus de 90 % des cas de méningococcie [41].

➤ Structures antigéniques [21, 47]

La paroi est l'élément intéressant de la structure du méningocoque. Elle porte des pili (ou fimbriae) qui interviennent dans l'adhésion aux cellules du rhinopharynx. Elle présente surtout les constituants majeurs suivants :

- La capsule polysaccharidique : elle est plus ou moins développée selon les souches. Ses antigènes sont le support de la classification en sérogroupes. Parmi les 13 sérogroupes reconnus actuellement (A, B, C, X, Y, Z, 29E, W135, H, I, K, L et M), les plus souvent rencontrés dans les méningococcies sont les sérogroupes A, B et C. Les sérogroupes A et C sont les plus épidémiogènes et le séro groupe B provoque les infections les plus graves.
- Le lipopolysaccharide (LPS) : c'est l'endotoxine des bactéries à Gram négatif, située sur la face extérieure de la membrane externe et pouvant être libérée dans le milieu extérieur. Cette endotoxine est responsable du choc méningococcémique (action vasculaire, action sur l'hémostase, action hématologique...)
- Les protéines de la membrane externe (PME) : sont au nombre de 5 ou 6. Elles sont le support antigénique du sérotypage. Les PME de classe 2 et 3 définissent le sérotype et celles de classe 1, le séro sous-type. Ces protéines joueraient un rôle dans le franchissement de la barrière pharyngée et méningée.



**Figure 3 : Structures antigéniques du méningocoque (P. NICOLAS, IMTSSA Le Pharo Marseille)**

### **2.5.2.3.3. Caractères cultureux [5, 50, 58, 64, 81]**

En culture, *N. meningitidis* se multiplie sur milieu ordinaire mais, en primo-culture, il est préférable d'utiliser des milieux enrichis tels que MUELLER HINTON, les géloses au sang frais (ou sang cuit) de mouton. L'adjonction d'antibiotique permet l'obtention de cultures sélectives.

a) Conditions de culture :

La croissance des cultures de *N. meningitidis* est optimale dans les conditions suivantes :

- Température optimale : 35-37 °C
- pH optimum : 7
- Atmosphère enrichie à 5-10 % de CO<sub>2</sub>
- Milieux de culture : Gélose au sang de mouton ; Gélose chocolat + supplément polyvitaminique ; Milieu de MUELLER HINTON.
- Humidité.

b) Aspect des cultures :

- *N. meningitidis* pousse mal sur milieu liquide, préfère les milieux solides.
- Sur gélose chocolat, les colonies ont environ 1 mm de diamètre au bout de 24 heures à l'étuve à 37 °C ; elles sont arrondies, grisâtres, à bords réguliers, ont une surface lisse et brillante.
- Sur milieu de MUELLER HINTON, les colonies sont lisses et transparentes.
- Pousse mal sur gélose ordinaire

### **2.5.2.3.4. Caractères biochimiques**

Le méningocoque possède les caractères biochimiques suivants :

- ✓ Oxydase (+)
- ✓ Glucose (+)
- ✓ Maltose (+)
- ✓ Fructose (-)
- ✓ Saccharose (-)
- ✓ Gammaglutamyltransférase (+)

### **2.5.2.3.5. Physiopathologie de la méningite à méningocoque [75]**

Le méningocoque est un parasite strict de l'homme et la contamination est inter humaine. La transmission est aérogène à courte distance (< 1m) du fait de la fragilité du germe dans l'atmosphère [75].

Son habitat est le rhinopharynx où il vit à l'état de portage. Sa présence à ce niveau peut être asymptomatique (porteur sain) ou au contraire se manifester par une rhinopharyngite. Cependant, dans certain cas et pour des raisons qu'on ignore, il manifeste son pouvoir pathogène en provoquant les deux manifestations suivantes (souvent associées d'ailleurs) : la méningite et la septicémie.

#### **2.5.2.3.5.1. Les aspects cliniques [2, 28, 39]**

##### **2.5.2.3.5.1.1. La méningite de l'adulte**

La méningite de l'adulte ne pose pas de véritable problème de diagnostic.

La période d'invasion est insidieuse, brève, quelquefois on retrouve une rhino-pharyngite banale.

Le début de la méningite chez l'adulte est brutal. Ce début est marqué par un malaise général accompagné de fièvre à 39-40 °C, de céphalées intenses avec parfois des nausées et des vomissements.

L'examen du malade à ce début va montrer une raideur de la nuque, une ébauche du signe de Kernig.

La ponction lombaire pratiquée devant ce tableau clinique oriente le diagnostic. Le liquide céphalo-rachidien (LCR) est louche, hypertendu ou quelquefois limpide.

A la période d'état, c'est-à-dire au deuxième ou troisième jour de la maladie, le diagnostic de la méningite est évident.

Le syndrome méningé est franc et se caractérise par des céphalées violentes, frontales ou occipitales, arrachant le plus souvent des gémissements au malade. Les vomissements deviennent moins fréquents, l'examen clinique est difficile à réaliser du fait de l'hyperesthésie cutanée. On constate une raideur de la nuque, le signe de Kernig (impossibilité d'obtenir l'extension de la jambe sur la cuisse chez le malade assis ou couché) et le signe de Brudzinsky (flexion passive du genou lors de la flexion forcée de la nuque).

Les réflexes ostéotendineux (ROT) sont normaux ou vifs, le réflexe cutané plantaire est en flexion.

Le syndrome infectieux se traduit par une fièvre élevée variable et instable. L'herpès est fréquent et siège le plus souvent à la face.

La numération des éléments figurés du sang montrera une hyperleucocytose avec polynucléose à neutrophiles.

Les autres signes cutanés (purpura, érythème), les arthrites indiquent une association septicémie, infection méningée.

La ponction lombaire pratiquée à cette période ramène un LCR trouble, hypertendu et confirme ainsi le diagnostic de méningite purulente dont la nature étiologique sera précisée par les examens biologiques.

#### **2.5.2.3.5.1.2. La méningite du nourrisson**

La méningite du nourrisson revêt un tableau clinique différent de celui qu'on peut retrouver chez l'adulte ou le grand enfant, avec des signes souvent atypiques.

Le début est parfois brutal mais peut être insidieux. Ce début est marqué par une fièvre 38-39°C et un tableau clinique résumé par une altération de l'état général, des vomissements, une diarrhée évoquant une gastro-entérite.

Des convulsions ou un déficit moteur peuvent marquer le début de la maladie. Le plafonnement du regard est évocateur de la méningite du nourrisson mais c'est un signe inconstant. Le bombement de la fontanelle est également très évocateur mais peut manquer en cas de déshydratation.

L'examen clinique mettra en évidence soit une raideur de la nuque soit, au contraire, une nuque molle.

La méningite doit être évoquée au moindre doute chez tout nourrisson fébrile présentant des manifestations neurologiques. Seule la ponction lombaire orientera le diagnostic.

#### **2.5.2.3.5.1.3. Les méningococcémies**

La méningococcémie est une septicémie méningococcique à évolution brutale. OSLER est le 1<sup>er</sup> en 1898 à déceler le méningocoque dans le sang d'un malade atteint de méningite. WARFIELD et WARKER en 1903 publièrent le 1<sup>er</sup> cas de septicémie à méningocoque.

En 1916 Mac LAGAN et COKE signalèrent la présence de méningocoque dans le sang de deux malades atteints de purpura fulminans.

La méningococcémie a un début toujours brutal. Ce début est marqué par une fièvre à 39-40°C continue ou intermittente, associant un malaise général, des céphalées, des troubles digestifs, des douleurs abdominales.

L'éruption purpurique est un signe évocateur d'une méningococcémie. Elle apparaît sur tout le corps, de forme irrégulière et souvent étoilée et dure au toucher.

Le pouls est rapide, un collapsus s'installe rapidement, le malade est anxieux, agité ou comateux.

A ce stade la ponction lombaire ramène un LCR clair ou légèrement trouble dont l'examen direct retrouve très souvent le méningocoque. L'hémoculture, à ce stade, est rarement positive.

L'évolution des méningococcémies est mauvaise. En l'absence de traitement, le malade meurt dans un tableau de détresse respiratoire et de choc cardiogénique. Une forme clinique particulière des méningococcémies due à un choc toxi-infectieux est le syndrome de Waterhouse-Friderichsen.

## **2.6. Diagnostic [5, 11, 34, 49, 50, 58, 64, 65]**

Le diagnostic de la méningite est fondé sur les données cliniques et les résultats des examens de laboratoire.

### **2.6.1. Diagnostic clinique**

Dans sa forme typique, la méningite réalise un syndrome méningé associant céphalées violentes généralisées, vomissements, raideur de la nuque, signe de Kernig et signe de Brudzinsky. L'existence de fièvre et de frissons oriente vers une origine infectieuse.

Ce syndrome méningé est la présentation la plus classique, il faut savoir évoquer le diagnostic de méningite devant bien d'autres tableaux cliniques, purpura survenant dans un contexte fébrile faisant redouter un *purpura fulminans*, qui bien que typique des méningococcémies, peut également être observé avec d'autres germes chez les sujets immunodéficients, splénectomisés, drépanocytaires ; troubles de la conscience ou syndrome confusionnel survenant en contexte fébrile; diarrhées fébriles, surtout chez le nouveau-né et le nourrisson.

Chez le nourrisson fébrile, algique, geignard et supportant mal les manipulations on recherchera un bombement de la fontanelle antérieure et une hypotonie axiale qui remplace souvent à cet âge la raideur rachidienne.

Enfin certaines méningites font suite à des infections locales de la sphère ORL, notamment les méningites à pneumocoque qui dans 30 % des cas sont associées à une otite.

## **2.6.2. Diagnostic biologique**

Il s'agit d'un diagnostic direct par la mise en évidence du germe ou consistant en la recherche de substances produites par le méningocoque dans le LCR (obtenu par ponction lombaire (PL)) ou dans tout autre prélèvement biologique.

### **2.6.2.1. La ponction lombaire**

La ponction lombaire (PL) est nécessaire pour confirmer le diagnostic de méningite purulente et pour mettre en évidence le méningocoque (et exclure les autres agents étiologiques communs, tels que le pneumocoque et *H. influenzae*).

La ponction lombaire doit être pratiquée dès qu'une méningite est suspectée. Ce geste ne requiert qu'une expertise minimale, mais une asepsie stricte est nécessaire. L'examen du fond d'œil pour détecter un éventuel oedème papillaire devrait précéder la ponction lombaire quand il est possible, sans pour autant constituer un préalable indispensable. La seule contre indication à sa réalisation est l'existence de signes de localisation neurologique importants, témoignant d'un processus expansif intracrânien. Cette situation très rare est bien connue et facilement identifiée. La ponction lombaire peut parfois être compliquée de quelques céphalées dans les heures qui suivent le prélèvement, mais une bonne hydratation et un repos au lit associés à des antalgiques simples suffisent à vaincre ces douleurs.

Le LCR est recueilli dans un tube stérile bouché et adressé au laboratoire le plus rapidement possible pour éviter la lyse des bactéries.

Si le prélèvement ne peut arriver au laboratoire dans l'heure suivant la collecte, il doit être ensemencé dans le milieu de culture Trans-Isolate (TI) et acheminé au laboratoire dans une boîte à température ambiante (jamais dans la glace) et toujours à l'abri de la lumière.

### **2.6.2.2. Le liquide céphalo-rachidien**

Le liquide céphalorachidien (LCR) est un liquide très pauvre qui ne comporte que 0,3 à 0,5 g/l de protéides et dont la concentration en glucose est égale à la moitié de la glycémie, soit environ 0,5 g/l. D'autre part, la cellularité (nombre de cellules par mm<sup>3</sup>) du LCR normal est classiquement inférieure à 5 chez l'adulte. Lorsqu'un processus inflammatoire bactérien se développe au sein des méninges, des modifications de la composition biochimique sont observées. Une cellularité importante permet de suspecter le diagnostic de méningite dès le prélèvement, puisque le LCR, normalement limpide, peut alors devenir trouble ou purulent. Plusieurs types d'examens sont pratiqués sur le LCR pour le diagnostic.

### **2.6.2.3. Examen biochimique**

Il comporte une mesure du taux de glucose (glycorachie) et d'albumine (albuminorachie), la première étant typiquement abaissée au cours des méningites bactériennes et la seconde classiquement supérieure à 1 g/l, contre des valeurs normales comprises entre 0,3 et 0,5 g/l.

### **2.6.2.4. Examen macroscopique**

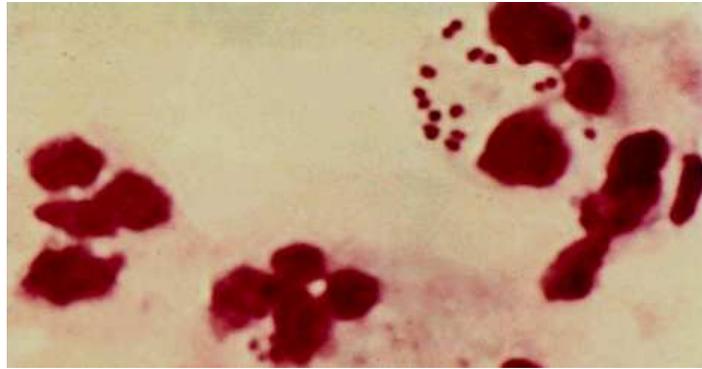
Il s'agit d'apprécier l'aspect du LCR à l'œil nu. Le LCR normal est clair et limpide comme de « l'eau de roche ». Il est louche ou trouble en cas de méningite purulente.

**NB** : le LCR peut être clair au début de la méningite, ou après un traitement antibiotique précoce (méningite décapitée) ou dans le cas d'une septicémie à méningocoque.

### **2.6.2.5. Examen microscopique**

Il comprend plusieurs étapes :

- La numération des éléments à la cellule de MALLASSEZ ou de NAGEOTTE. Le LCR normal contient moins de 2 à 3 leucocytes par  $\text{mm}^3$  ; en cas de méningite purulente, il peut en contenir  $1000/\text{mm}^3$  et même plus.
- La formule leucocytaire : elle est faite sur le culot de centrifugation d'environ 1 ml de LCR à 2000 tours/min pendant 5 à 10 min. Le surnageant est conservé pour la recherche d'antigènes solubles par agglutination au latex. A partir du culot de centrifugation, on réalise un frottis sur lame qui, après séchage et fixation, sera coloré au MAY GRUNWALD-GIEMSA ou au bleu de méthylène. La formule leucocytaire montre 90 à 95 % de polynucléaires neutrophiles et 5 à 10 % de lymphocytes.
- L'examen après coloration de Gram : comme dans le cas de la formule leucocytaire, on réalise à partir du culot de centrifugation, un frottis sur lame qui après séchage et fixation sera coloré par la méthode de GRAM. Dans le cas d'une méningite à méningocoque, l'examen de ce frottis au microscope montre la présence de diplocoques Gram négatif intra et extracellulaires.



*N.meningitidis* après coloration de Gram

**Figure 4 :** [58]

#### **2.6.2.6. Culture**

Une à deux gouttes de LCR total est ensemencée sur gélose chocolat enrichie de supplément vitaminique (ou sur gélose MUELLER HINTON) coulée en boîtes de Pétri ou en tubes à essai.

Les milieux ainsi ensemencés sont mis à incuber à l'étuve à 36-37 °C dans une atmosphère enrichie à 5-10 % de CO<sub>2</sub>. Au bout de 18-24 heures, apparaissent sur les milieux de culture, des colonies caractéristiques du méningocoque. Ces colonies sont ensuite soumises à une identification.



Ensemencement en stries et aspect des colonies de *N. m.* sur gélose au sang

**Figure 5 :** [58]

### **2.6.2.7. Identification et sérogroupage**

Un grand nombre de germes présentant les mêmes caractéristiques pouvant causer les méningites purulentes, il est nécessaire de procéder à une identification précise du germe responsable.

L'identification est fondée sur les caractères morphologiques (aspect des colonies, morphologie au GRAM), biochimiques (oxydase +, catalase +, glucose +, maltose +, saccharose -, lactose -, nitrates -) et sur les caractères antigéniques des bactéries.

Plusieurs tests sont utilisés pour l'identification de *Neisseria meningitidis*.

Dans les laboratoires spécialisés, on complète l'identification par la détermination du sérotype et du séro sous-type.

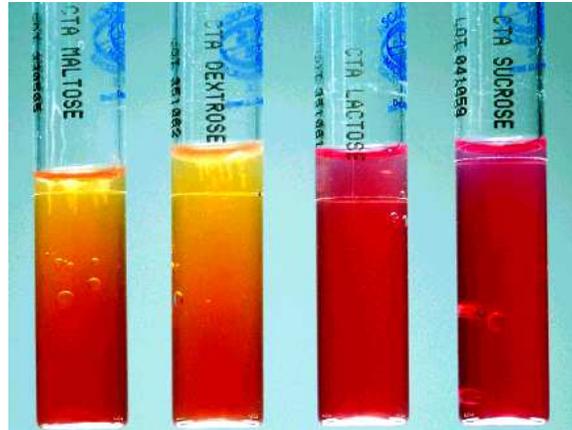
#### Test de l'oxydase de Kovac :

Il permet de mettre en évidence une cytochrome oxydase. Le chlorhydrate de tétraméthyl-p-phénylène diamine est oxydé en un composé violet par les bactéries possédant le système cytochrome C dans leur chaîne respiratoire.

Une coloration violette apparaissant dans les 10 secondes indique une réaction positive. Ce test d'identification de *N. meningitidis* peut aussi être positif avec d'autres espèces du genre *Neisseria* mais aussi, rarement, avec certaines espèces bactériennes non apparentées (phénomène rare).

#### Utilisation des glucides méthode sur gélose CTA :

L'étude de l'utilisation des sucres sert à valider l'identification d'une souche de *N. meningitidis*. Différents sucres sont ajoutés à une base gélosée CTA (cystine trypticase agar) en présence de rouge de phénol (indicateur de variation de pH). On utilise une série de 4 tubes dont chacun contient un sucre (glucose, maltose, saccharose, lactose) pour confirmer l'identification de *N. meningitidis*. Comme les bactéries du genre *Neisseria* produisent les acides par oxydation des sucres, la variation de l'indicateur du rouge au jaune indique donc une utilisation des sucres.



**Figure 6 : [58]**

Réaction d'acidification à partir des glucides en gélose CTA

#### Test latex :

Des particules de latex sont sensibilisées avec des anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques pour un antigène donné. En présence d'antigènes solubles libérés par les bactéries dans le liquide biologique testé, il se forme des agrégats qui sont visibles à l'œil nu. La réaction se déroule sur lame ou sur une carte prévue à cet effet.

Ce test détecte les antigènes présents dans le LCR, le sérum, les urines. Plusieurs kits sont commercialisés et permettent l'identification de plusieurs sérogroupes de méningocoque : Wellcogen® (Abbott-Murex), Pastorex® (Bio-Rad), Directigen® (Becton Dickinson), Biomérieux. Seul le Pastorex® permet l'identification du *N. meningitidis* de séro groupe W135. Certaines souches sont toutefois ingroupables ou polyagglutinables.

#### PCR :

C'est une technique biomoléculaire permettant un diagnostic quasi certain et sans culture. Elle est basée sur l'amplification génique. Elle permet d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN dans un prélèvement biologique donné (sang, LCR, urine, liquide articulaire...). Le produit de cette amplification (l'amplicon) peut être visualisé après électrophorèse sur gel.

La PCR permet de détecter de l'ADN bactérien même lorsque les bactéries sont mortes.

Les difficultés de cette technique sont : une contamination exogène des prélèvements (donnant des faux positifs) et la présence de Dnases, enzymes détruisant l'ADN (donnant des faux négatifs).

Pour l'identification de *N. meningitidis* par PCR, la séquence d'ADN cible est une séquence qui est conservée chez toutes les souches de l'espèce. Plusieurs gènes peuvent être utilisés et certains présentent même l'avantage de permettre la prédiction du séro groupe, du sérotype et même du séro sous-type.

Typage de *Neisseria meningitidis* :

*N. meningitidis* est une espèce bactérienne possédant un grand pouvoir de transformation spontanée et une fréquence élevée de recombinaison induisant un nombre élevé de types.

Les souches isolées peuvent être :

- hétérogènes (cas des porteurs asymptomatiques)
- polyclonales (cas des infections invasives ou endémiques)
- clonales (cas des infections épidémiques)

Il existe un nombre limité de clones épidémiques, d'où l'intérêt du typage pour le suivi épidémiologique.

Deux systèmes de typages sont utilisés ; l'un employant des méthodes immunologiques et l'autre des méthodes de typage génétique avec comme technique de référence, l'électrophorèse des iso-enzymes ou "Multilocus Enzyme Electrophoresis" (MLEE) basée sur l'analyse des différences de migration électrophorétique d'enzymes codées par différents allèles d'un gène donné. Les souches sont caractérisées par la combinaison des allèles aux loci étudiés, ce qui permet de définir des Electrotypes (ET). Il existe aussi d'autres techniques comme celles de l'électrophorèse en champ pulsé "Pulsed-Field Gel Electrophoresis" (PFGE) et la "Randomly Amplified Polymorphic DNA" (RAPD).

Actuellement, la technique la plus appropriée pour le typage moléculaire est le "Multilocus Sequence Typing" (MLST).

## **2.7. Prévention [6, 25, 57, 59, 61]**

Les méningococcies sont potentiellement évitables par la vaccination et/ou dans certaines circonstances, par la chimioprophylaxie.

### **La vaccination**

L'idée de vacciner contre la MCS s'est imposée lorsque l'on a constaté, d'une part, l'existence d'une immunité naturelle prouvée par le cycle épidémique de la maladie (environ 14 semaines) et, d'autre part, la rareté de récurrence chez un sujet d'une année à

l'autre et enfin, le fait qu'une trop longue période d'armistice était un facteur qui rendait possible l'éclosion d'une épidémie [37].

Une campagne de vaccination de masse bien menée peut, en quelques semaines, enrayer une épidémie de méningite à méningocoque.

A ce jour, quatre antigènes polysaccharidiques spécifiques sont actuellement disponibles, relevant des sérogroupes A, C, Y, W135. Ils sont distribués sous forme lyophilisée, et sont injectés par voie intramusculaire ou sous-cutanée. Il existe un vaccin bivalent A-C, un vaccin trivalent A-C-W135 et un vaccin quadrivalent A-C-Y-W135 [52].

Ces vaccins qui sont des polysides capsulaires induisent une réponse immunitaire thymo-indépendante variable avec l'âge. Chez les adultes et les enfants de plus de 4 ans, une dose unique induit en une dizaine de jours, une ascension rapide et une protection dans plus de 85 % des cas. La protection dure de 1 à 5 ans. La réponse est beaucoup plus faible chez les nourrissons et les jeunes enfants. Ainsi, les vaccins polysaccharidiques méningococciques ne sont pas utilisés en routine au cours de la première enfance. Cependant, le vaccin du séro groupe A est plus immunologique que ceux des autres sérogroupes et il peut induire un taux d'anticorps appréciable même chez le nourrisson de 3 mois.

Ces vaccins sont habituellement bien tolérés, mais ils peuvent entraîner des réactions secondaires mineures (à types de douleurs et infiltration locales, fièvres, malaises) chez 10 à 20 % des vaccinés, lors des 2-3 jours suivant la vaccination.

De nouveaux vaccins contre le méningocoque sont à l'étude. Des vaccins du séro groupe B, contenant une protéine membranaire externe ont été développés et testés au Brésil, au Chili, à Cuba, en Islande, et en Norvège.

Des vaccins conjugués A et C (combinant le polysaccharide avec une protéine porteuse) sont en cours d'investigation clinique en Afrique, en Europe et aux Etats-Unis. Contrairement aux vaccins polysaccharidiques, ils induisent une mémoire immunologique et une réponse chez tous les sujets vaccinés, même les nourrissons. De plus, ils sembleraient enrayer le portage rhino-pharyngé (Poolman 1994). Si ces résultats se confirmaient, cette gamme de vaccins permettra d'intégrer la vaccination méningococcique dans le calendrier infantile du programme élargi de vaccination (PEV), dans les zones à haut risque de méningite à méningocoque.

### **La chimioprophylaxie**

La chimioprophylaxie a été prise en considération dans la lutte contre la maladie méningococcique, mais elle se heurte à plusieurs limitations et son usage doit se restreindre à des circonstances particulières :

- Personnes de l'entourage du malade vivant sous le même toit que celui-ci ;
- Sujets contacts vivant en institution, qui ont dormi dans le même local que le patient ;
- Enfants et personnel de crèches et de jardins d'enfants ayant séjourné dans la même pièce que le patient ;
- Personnes ayant été en contact avec les sécrétions orales du patient en l'embrassant ou en partageant sa nourriture ou ses boissons.

Le but de la chimioprophylaxie est de prévenir les cas secondaires en éliminant le portage nasopharyngé. Elle doit, pour être efficace, être mise en route dans les 48 heures suivant le diagnostic. Elle ne peut éradiquer le portage nasopharyngé que si des antibiotiques systémiques sont utilisés. L'antibiotique de choix est la Rifampicine, administrée en 2 jours. La Ciprofloxacine et la Ceftriaxone sont des alternatives efficaces.

## **2.8. Traitement [49, 60, 68]**

Le traitement antibiotique est essentiel; il doit être combiné à un traitement symptomatique. Il a pour but de stériliser, le plus rapidement possible, le foyer infectieux afin de réduire le risque de mortalité et de séquelles neurologiques et sensorielles. Le traitement antibiotique doit être bactéricide car, à la différence du sérum, le LCR ne possède pas de capacité de bactéricidie naturelle et ne peut donc s'opposer à la pénétration et à la multiplication des bactéries. En effet, l'activité des macrophages, des anticorps et du complément y est fortement réduite (SCHELD et SANDE, 1983).

La contagiosité étant modérée et disparaissant rapidement sous traitement antibiotique, l'isolement des malades n'est pas nécessaire ; de même, le germe étant très fragile dans le milieu ambiant, il n'y a pas lieu de désinfecter les locaux, les vêtements et les objets.

### **2.8.1. Traitement antibiotique**

#### **2.8.1.1. Mise en route**

Le traitement antibiotique doit être institué aussi rapidement que possible. La ponction lombaire doit être effectuée autant que possible avant la mise en route des antibiotiques, qui doivent être administrés aussitôt après celle-ci, sans attendre les résultats du laboratoire. Le traitement antibiotique d'un cas suspect de méningococcie ne doit pas être différé quand la ponction lombaire ne peut être faite d'emblée. Si la ponction lombaire recueille un LCR

sanglant il faut immédiatement mettre en route l'antibiothérapie. C'est aussi le cas si le LCR paraît clair mais si la symptomatologie est évocatrice d'une septicémie à méningocoque : la survie du malade peut dépendre alors de l'administration immédiate des antibiotiques.

### **2.8.1.2. Choix des antibiotiques**

De nombreux antibiotiques sont actifs *in vitro* sur le méningocoque, mais le choix se limite à ceux qui pénètrent suffisamment dans le LCR et que l'on est en mesure de se procurer. La pénicilline ou l'ampicilline par voie parentérale sont les antibiotiques de choix. Le chloramphénicol huileux est une bonne alternative, peu onéreuse. Il demeure l'antibiotique de choix lors des poussées épidémiques dans les pays de la ceinture méningitique. Les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, comme la céftriaxone, sont d'excellentes alternatives d'autant qu'elles sont devenues des médicaments génériques. Le cotrimoxazole oral (triméthoprime sulfaméthoxazole) est bon marché et pénètre bien dans le LCR, mais la fréquence des souches résistantes aux sulfamides est aujourd'hui telle que les antibiotiques sulfamidés ne sont plus recommandés pour le traitement des méningites à méningocoques. Une étude récente réalisée au Niger par Epicentre a montré l'efficacité comparable de la céftriaxone en dose unique et du chloramphénicol huileux [44]. Quand les conditions sont défavorables, l'antibiotique de choix est le chloramphénicol huileux.

### **2.8.2. Traitement symptomatique**

L'équilibre hydro-électrolytique doit être surveillé, et l'apport liquidien assuré. Lorsque le malade est inconscient ou lorsqu'il vomit, si la voie intraveineuse est impossible, on doit mettre en place une sonde nasogastrique.

L'administration d'anticonvulsivants (*diazepam*) ou d'antiémétiques, par la voie appropriée, peut être indiquée. L'augmentation de la pression intracrânienne joue probablement un rôle clé dans la mortalité. Quand elle est possible, une anesthésie par barbituriques sous ventilation assistée semble être le meilleur moyen de réduire cette pression.

## **2.9. Surveillance microbiologique**

La surveillance épidémiologique a pour but principal d'alerter les autorités sanitaires nationales de la survenue d'une épidémie et de leur fournir les informations nécessaires pour prendre les mesures d'urgences. A plus long terme, les investigations épidémiques devraient permettre d'anticiper les risques d'épidémies et de prévoir leur diffusion.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconise une stratégie basée sur :

- Une surveillance des principales souches associées aux épidémies associant une surveillance longitudinale (sur toute la durée de l'épidémie) et une surveillance transversale.
- Une surveillance des souches à l'origine de la méningococcie endémique.

Au Niger, du fait de la fragilité des germes en cause au cours des méningites, la surveillance a longtemps été confinée à la ville de Niamey, la capitale.

Depuis la création d'un laboratoire de biologie moléculaire au CERMES et l'utilisation en routine de la technique PCR pour le diagnostic des méningites, la surveillance est effective sur une grande partie du territoire. Les LCR sont conservés au froid à + 4 °C et collectés périodiquement dans une zone correspondant théoriquement à 45 % de la population du pays. Des moyens de circonstances sont utilisés pour la collecte des échantillons prélevés dans les régions éloignées de la capitale.

La surveillance microbiologique intensive demeure une nécessité impérieuse pour identifier rapidement le sérotype de *N. meningitidis* à l'origine de toute épidémie et pour orienter efficacement le choix du vaccin adapté pour la riposte. La mise en place d'un réseau de laboratoires pour le diagnostic étiologique des méningites bactériennes dans les différentes régions permettrait d'élargir la surveillance au niveau national.

Ces épidémies de méningites peuvent atteindre des proportions énormes, voire 100 à 800 cas pour 100 000 habitants. Dans certaines communautés fermées elles atteignent 1 cas pour 100, tout cela malgré la surveillance et la lutte contre les méningites.

L'OMS a institué une méthode qui utilise des taux d'incidence basés sur la population générale permettant de déterminer le seuil épidémique de la maladie.

Les différents seuils sont définis comme suit :

**Dans les zones à forte densité de population**

- Seuil d'alerte : 5 cas/100.000
- Seuil d'épidémie : 10 cas/100.000
- Seuil de flambée épidémique : 15 cas/100.000

**Dans les zones à faible densité de population < 30.000 habitants**

- Seuil d'alerte : 2 cas
- Seuil épidémique : 5 cas (ou doublement des cas par rapport à la même période de référence)

# METHODOLOGIE

### **III- METHODOLOGIE**

#### **3.1. Caractéristiques de la zone de l'étude**

##### **3.1.1. Le pays de l'étude : le Niger**

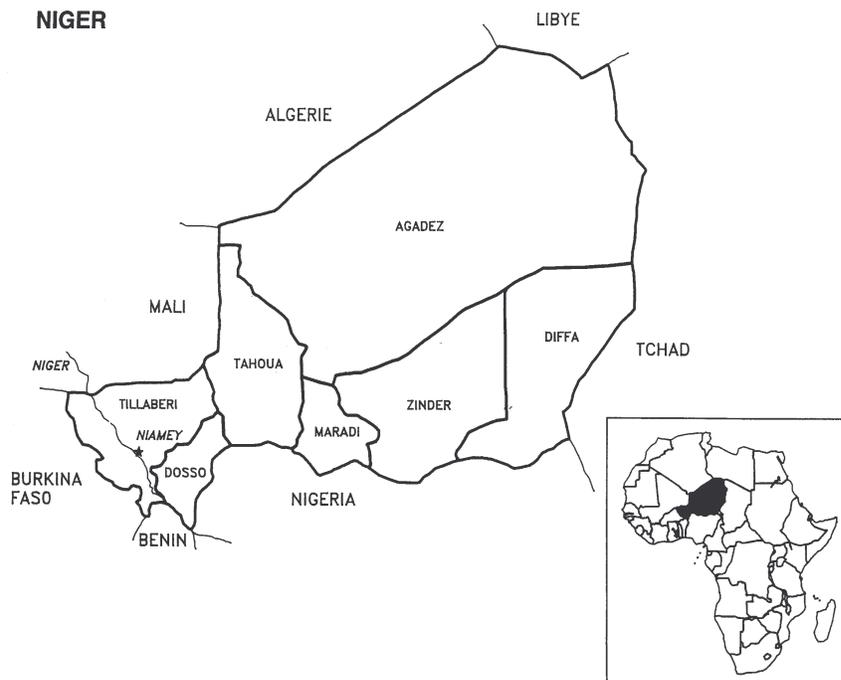
###### **3.1.1.1. Présentation générale**

Le Niger, Etat situé dans la partie Est de l'Afrique Occidentale en zone sahélo-saharienne, s'étend entre 12° et 23° de latitude Nord, et entre 0° et 16° de longitude Est à 700 km du Golfe de Guinée, 1090 km à l'Est de la côte atlantique et 1200 km au Sud de la Mer Méditerranée. Cela correspond sensiblement à un espace compris entre l'isohyète 900 mm à l'extrême Sud et le Sahara au Nord, donc largement en deçà de l'isohyète 100 mm.

Avec une superficie de 1.267.000km<sup>2</sup>, le Niger est limité par sept pays :

A l'Ouest par le Mali et le Burkina Faso, à l'Est par le Tchad, au Nord par la Libye et l'Algérie et au Sud par le Bénin et le Nigeria.

C'est un pays enclavé et la capitale Niamey se trouve à plus de 1035 km du port le plus proche (Cotonou au Bénin).



**Figure 7 :** Présentation générale du Niger

### **3.1.1.2. Le milieu physique**

Le climat, de type sahélien, est chaud et sec avec une amplitude thermique élevée. On observe une alternance de 2 saisons dans l'année : une saison sèche allant d'octobre à mai pendant laquelle souffle l'harmattan, vent chaud et sec, propice aux épidémies de méningite et une saison des pluies s'étalant de juin à septembre.

Le pays peut être divisé en trois zones :

- Une zone soudanienne, qui constitue le grenier du pays ;
- Une zone sahélienne propice à l'élevage extensif ;
- Une zone saharienne désertique, la partie la plus septentrionale du pays qui est un pôle touristique.

Le Niger présente un relief essentiellement constitué de plateaux.

Le réseau hydrographique est constitué par le fleuve Niger à l'extrémité Sud-Ouest sur une distance d'environ 550 km et le lac Tchad à l'extrémité Sud-Est, ainsi que la Komadougou Yobé qui délimite la frontière avec le Nigeria sur près de 150 km dans l'extrême Est du pays. A côté de ce réseau hydrographique principal il y a les affluents du fleuve dans la partie Sud-Est du pays et des marres semi-permanentes dans le Sud et le centre.

### **3.1.1.3. Organisation administrative**

Sur le plan administratif, le Niger est subdivisé en 8 régions (Agadez, Diffa, Dosso, Maradi, Niamey, Tahoua, Tillabery, Zinder). Ces régions sont elles mêmes subdivisées en 36 départements qui comptent en tout 265 communes.

### **3.1.1.4. Population**

A la date du 1<sup>er</sup> juin 2002, date de référence provisoire des données du recensement général de la population (RGP) et de l'habitat, le Niger compte environ 11.500.000 habitants, dont 50,14 % de femmes et 49,86 % d'hommes. La densité de la population est de 8,5 habitants au km<sup>2</sup> au niveau national en 2001. Le taux d'accroissement naturel annuel, de 3,1 % est élevé (RGP).

Selon le RGP du Niger, la majeure partie de la population du pays est jeune ; plus de 50 % de la population ont moins de 15 ans.

Les indicateurs démographiques se présentent comme suit :

- Femmes en âge de procréer : 22,18 %
- Taux de mortalité infantile : 123 ‰
- Taux de mortalité infanto-juvénile : 274 ‰
- Taux de mortalité maternelle : 7 ‰

- Taux brut de natalité : 52 ‰
- Indice synthétique de fécondité : 7,4
- Taux brut de mortalité générale : 26 ‰
- Espérance de vie à la naissance : 48 ans
- Taux de malnutrition : 18,43 %

La population est inégalement répartie sur l'ensemble du pays. En effet, les  $\frac{3}{4}$  des Nigériens se trouvent regroupés sur le  $\frac{1}{4}$  du territoire national, dans la bande Sud du pays où les conditions écologiques sont favorables aux activités agricoles. Plus de 80 % de la population vivent en milieu rural.

Il existe 8 groupes ethniques au Niger : les Haoussas, les Djerma-Songhaï, les Peulhs, les Touaregs, les Kanouris, les Arabes, les Toubous, les Gourmantchés.

#### **3.1.1.5. Le Transport et la communication**

Le transport, au Niger, repose essentiellement sur le réseau routier qui est constitué de :

- 3760 km de routes bitumées ;
- 3000 km de routes en terre stabilisée ;
- 3200 km de routes en terre sommaire ;
- 5400 km de pistes.

Toutes les capitales régionales sont reliées entre elles et avec la capitale Niamey sauf Zinder et Agadez où il reste un tronçon à réaliser. Au niveau régional, les villes importantes sont reliées entre elles soit par des routes bitumées soit par des routes en terre stabilisée.

De même, le pays est relié aux ports les plus proches par un réseau de routes bitumées, ce qui facilite les échanges inter-Etats.

#### **3.1.1.6. La santé**

Le système de santé au Niger est calqué sur le découpage administratif et comprend trois niveaux:

- Le niveau central ou niveau stratégique constitué par le cabinet du ministre, le secrétariat général, les 5 directions générales et les 16 directions centrales.
- Le niveau intermédiaire sert d'appui technique, il est constitué par les directions régionales de la santé et la direction de la santé de la communauté urbaine de Niamey.
- Le niveau périphérique ou opérationnel est composé de 42 directions départementales de la santé publique (districts sanitaires).

Avec une mortalité infantile 123 ‰, la santé de la mère et de l'enfant nigériens est l'une des plus précaires au monde : un enfant sur trois meurt avant l'âge de 5 ans et 7 femmes sur 1000 meurent en donnant la vie.

Les maladies responsables de la forte mortalité infanto-juvénile sont la rougeole, les diarrhées et la malnutrition, les infections respiratoires aiguës et le paludisme.

Les causes de mortalité maternelle sont les hémorragies lors de la délivrance, les ruptures utérines, les infections et les éclampsies.

Seules 36 % des femmes reçoivent des soins prénataux en milieu rural, contre 89 % à Niamey, la majorité des accouchements se fait encore à domicile, seules 9 % des femmes vivant en milieu rural bénéficient de l'assistance d'un personnel qualifié contre 65 % en milieu urbain.

La couverture vaccinale est faible ; 17,4 % des enfants de moins de un an ont reçu toutes les vaccinations du programme élargi de vaccination PEV à savoir : le tétanos, la coqueluche, la poliomyélite, la tuberculose, la diphtérie et la rougeole.

Pour le personnel de santé, on compte :

- Un médecin pour 31.432 habitants (norme OMS : 1 médecin pour 10.000 habitants)
- Une sage femme pour 9.395 habitants (norme OMS : une sage femme pour 5.000 habitants)
- Un infirmier pour 9.062 habitants (norme OMS : un infirmier pour 5.000 habitants)
- Un pharmacien pour 200.000 habitants
- Un dentiste pour 800.000 habitants

D'autre part, il y a un manque important de médecins spécialistes tels que les gynécologues, les chirurgiens, les ophtalmologistes etc....

### **3.1.1.7. L'éducation**

Le Niger se classe parmi les 5 pays du monde dont les populations demeurent les plus faiblement scolarisées.

A l'accession à l'indépendance en 1960, le taux de scolarisation était de 3,6 %. Depuis lors, les efforts consentis dans ce secteur ont permis de multiplier les effectifs par plus de 17 pour le primaire et plus de 64 pour le secondaire, malheureusement, la forte croissance démographique a rendu les efforts des différents gouvernements encore insuffisants.

La scolarisation des 12-17 ans est de 13,2 %, avec une disparité significative entre les centres urbains (15 % de la population) où 52 % des enfants sont scolarisés et les zones rurales (85 % de la population) où seulement 28 % le sont.

Le taux d'analphabétisme au plan national se chiffre à 75 % pour les hommes et 91,1 % pour les femmes.

#### **3.1.1.8. L'économie**

Le PIB du Niger en 2002 représentait 8.313 millions de dollars, la croissance prévisionnelle du PIB pour 2003 était de 3,2 %.

Un programme de relance économique a été mis en place et concerne prioritairement la relance du secteur rural qui inclut naturellement l'agriculture et l'élevage mais aussi l'environnement et l'hydraulique. L'agriculture emploie en effet 90 % de la population active du pays.

Selon les différentes études réalisées, plus des deux tiers de la population vivent en dessous du seuil de pauvreté et 35 % en dessous d'un seuil extrême de pauvreté. Il n'est pas prévu d'amélioration immédiate de cet état de fait puisque le taux de croissance démographique atteint plus de 3 % par an pour un taux moyen de croissance de la production agricole de 2 %.

#### **3.1.1.9. L'agriculture**

L'agriculture nigérienne reste essentiellement pluviale et d'autosubsistance. Elle est concentrée au Sud sur une bande de 200 km de large environ, traversant le pays d'Est en Ouest.

Les principales cultures vivrières sont : le mil, le sorgho, le riz, le maïs, le manioc, la canne à sucre de bouche, la patate douce....

Les cultures non céréalières sont essentiellement destinées à l'exportation et tout particulièrement au marché du Nigeria voisin, ce sont : le niébé (variété de haricot), les oignons, le souchet, l'arachide et le coton.

#### **3.1.1.10. L'élevage**

L'élevage constitue le deuxième grand pôle du secteur agropastoral nigérien : il contribue pour 33 % à la valeur ajoutée du secteur rural et pour 13 % au PIB. Les populations rurales tirent une partie substantielle de leurs ressources monétaires de cette activité. L'élevage représente, après l'uranium, la deuxième exportation du pays.

### **3.1.2. Le cadre de l'étude : le CERMES**

Le CERMES (Centre de Recherche Médicales et Sanitaires) était un institut de recherche dépendant de l' O.C.C.G.E. (Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies), organisation inter-étatique qui regroupait huit pays d'Afrique de l'Ouest (Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Mali, Mauritanie, Niger, Sénégal, Togo).

Résultant du transfert de deux laboratoires du centre Muraz de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso), le CERMES a été créé en 1977 et a ouvert ses portes à Niamey au Niger en 1980.

En deux décennies, le CERMES a acquis une réputation internationale. Cet établissement est devenu centre collaborateur OMS pour la recherche et la lutte contre les schistosomiasés depuis 1991. En décembre 2000, suite à la dissolution de l'O.C.C.G.E, le CERMES est devenu un établissement nigérien.

Le 28 mai 2002, les textes créant le nouveau CERMES en tant qu'établissement public à caractère scientifique, culturel et technique (EPSCT) ont été adoptés par l'Assemblée Nationale.

La "renaissance" du CERMES correspond à un grand besoin au Niger car, actuellement, aucune structure n'a les capacités biologiques de diagnostic, d'expertise ou d'évaluation des problèmes de santé publique.

Aujourd'hui, le CERMES se doit d'une part de pallier la défaillance générale des laboratoires de biologie médicale et d'autre part d'entreprendre des recherches dans deux domaines de santé très préoccupants pour le pays, les méningites et le paludisme.

Bien que l'adhésion du CERMES au Réseau International des Instituts Pasteurs et Instituts Associés (RIPIA) se soit réalisé lentement, le CERMES a acquis une renommée internationale.

Le CERMES a pour missions :

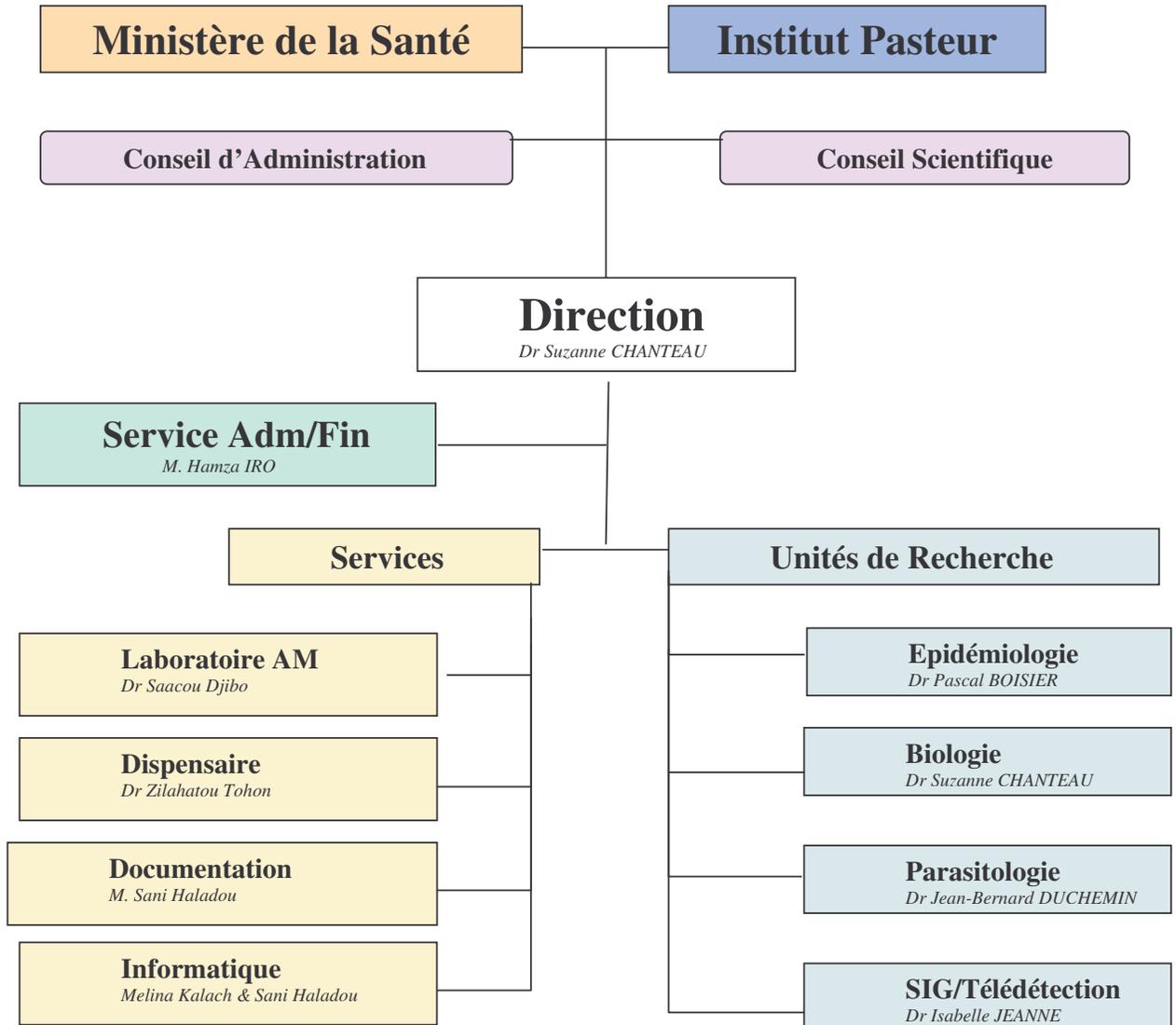
- La recherche fondamentale, appliquée et opérationnelle dans le domaine médical et sanitaire
- L'appui aux institutions et services nationaux et éventuellement à tout autre Etat, pour tout ce qui concerne la biologie médicale et la santé publique.
- L'expertise des risques et évaluation du programme de lutte contre les endémies
- La formation des cadres sanitaires nationaux ou étrangers.

Pour assurer ses missions, il dispose de plusieurs unités de recherches il s'agit de :

- L'unité de biologie
- L'unité de parasitologie
- L'unité d'épidémiologie

- L'unité du système d'information géographique (SIG) de télédétection
- Le laboratoire d'analyses médicales

## Organigramme du CERMES



## **3.2. MATÉRIELS ET METHODE**

### **3.2.1. Matériels**

#### **3.2.1.1. Verrerie et petit matériel**

Flacons de 250 et 500 ml

Tubes de 30 ml

Feuille de nitrocellulose

Papier filtre

Pinces

Micro pipettes

Cônes pour micro pipettes

Gants ;

Bacs avec plusieurs mini-rigoles

Scalpels

Eprouvettes

Chronomètres

Portoirs pour micro tubes

Tubes de (100 µl, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml)

Marqueurs

Papier essuie-tout

Stylo à bille

#### **3.2.1.2. Equipement**

Agitateur mécanique

Balance de précision

Pompe à vide

Vortex

Appareil de filtration des LCR connecté à une pompe à vide Minifold I Schleicher & Schuell Réf. 10447850

Hotte PSM II (poste de sécurité microbiologique de classe II)

Spectrophotomètre (650 nm)

Distillateur

Réfrigérateur

Congélateur (-20 °C et -80 °C)

Compteur de colonies

Bain-marie à 100 °C

Etuve (37 °C)

### **3.2.1.3. Matériel biologique**

#### **3.2.1.3.1. Les échantillons de l'étude**

Les LCR utilisés au cours de cette étude proviennent de la bibliothèque du CERMES. Les LCR sont obtenus par ponction lombaire (PL). Ces LCR proviennent de malades suspects de méningite de plusieurs districts sanitaires du pays. Pour faciliter l'acheminement des échantillons, le CERMES a mis en place un réseau de collecte associant la majorité des districts sanitaires du pays.

Avant l'acheminement, les LCR sont gardés, au niveau des districts sanitaires, au congélateur à -20 °C ou à défaut, au réfrigérateur. Durant le transport, ils sont dans des glacières. Arrivés au CERMES ils sont d'abord testés aux laboratoires de biochimie et de PCR (également en bactériologie lorsque le prélèvement n'excède pas 4 heures ou s'ils sont ensemencés sur milieux de transport Trans-Isolate (TI). Ils sont ensuite aliquotés dans des tubes et gardés au congélateur à -26 °C.

#### **3.2.1.3.2. Les méningocoques utilisés comme souches de référence**

Les bactéries utilisées pour la préparation des suspensions de contrôle sont des souches bactériennes de référence provenant de l'IMTSSA (le Pharo CC OMS pour les méningocoques) à Marseille. Le mode opératoire de la préparation et du calibrage des suspensions est le suivant :

- Les souches sont conservées à -80 °C en milieu glycérolé
- Faire une primo culture de 18-24 heures des souches sur gélose au sang de mouton ;
- Repiquer des colonies isolées de la primo culture sur une gélose à 5 % de sang de mouton et incuber à l'étuve à 37 °C ;
- Au bout de 4 heures d'incubation, suspendre les bactéries dans une solution de PBS ;
- Réajuster la densité optique de la suspension à 0,1 à la longueur d'onde de 650 nm ;
- Faire des dilutions successives de 1/10 en 1/10 de cette suspension à DO = 0,1 et couler sur gélose au sang (5 %) à raison de 10 µl par dilution.

Laisser sécher les milieux sous la hotte PSM II et placer à l'étuve à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub> ;  
Après une nuit à l'étuve, compter le nombre de colonies formées pour 10 µl de suspension à l'aide d'une camera couplée à un logiciel (sorcerer).

### **3.2.1.3.3. Le sang de mouton**

Il est utilisé pour la préparation des géloses au sang. Il provient de moutons entretenus au CERMES.

250 ml de sang sont prélevés par ponction veineuse au niveau de la carotide de l'animal dans des poches contenant un anticoagulant et du glucose. Une fois prélevé, le sang est réparti en tubes de 5 et 10 ml et gardé au réfrigérateur entre 2-8 °C (pendant 3 semaines au maximum).

### **3.2.1.3.4. Anticorps monoclonaux anti-méningocoques A et W135**

Ils sont fournis gracieusement par le Dr Farida NATO (IPP). Il s'agit de 5 immunoglobulines G (IgG) de souris anti *N. meningitidis* A et de 4 immunoglobulines M (IgM) de souris anti *N. meningitidis* W135. Ils sont présentés en tube de 1 ml à 1mg/ml d'anticorps et nous les avons répartis en micro tubes de 100 µl et stockés à -20 °C.

### **3.2.1.4. Réactifs commercialisés**

Anticorps anti IgG de souris conjugués à la peroxydase Ref.75031 (BIO-RAD®) ;

Anticorps anti IgM de souris conjugués à la peroxydase Ref.55568 (CAPPEL®) ;

PBS Ref.L-182-10 (BIOCHROM AG)

Lait écrémé (Pâturages) ;

TRIZMA BASE (Tris [hydroxyméthyl] aminométhane) Ref.T-6791 SIGMA® ;

NaCl (Chlorure de Sodium) Ref.S-3014 SIGMA® ;

4-Chloro-1-naphtol (comprimés) Ref.C-6788 SIGMA® ;

Méthanol Ref. 20 846.361 Rectapur™ PROLABO® ;

Eau oxygénée (33 %) (PROLABO®) ;

Eau distillée ;

Polysaccharides capsulaires A Ref 98/722 NIBSC

Polysaccharide capsulaire W135 Ref 01/428 NIBSC

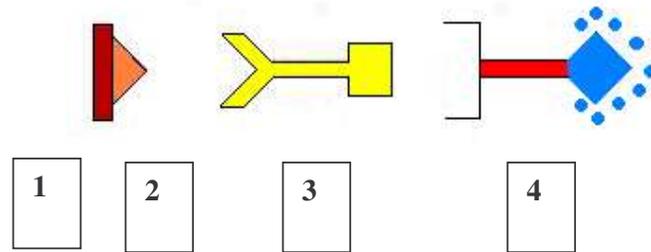
## **3.2.2. Méthode**

### **3.2.2.1. Dot-blot ELISA**

Le DOT-BLOT est une technique immuno-enzymatique basée sur le même principe que la technique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Le support utilisé est la nitrocellulose (NC). Le "Dot blot" requiert moins d'équipement que l'ELISA et utilise moins de réactifs. Comme au cours d'une réaction ELISA, on a les étapes de :

- fixation de l'antigène ;
- saturation du support
- fixation de l'anticorps spécifique ;
- fixation du conjugué ;
- révélation du complexe Ag-Ac.

### 3.2.2.2. Principe



- 1 : feuille de nitrocellulose (support)  
 2 : Antigène (Ag)  
 3 : Anticorps (Ac)  
 4 : Anticorps anti Anticorps conjugué à une enzyme (peroxydase)

**Figure 8 : Schéma du principe ELISA**

Les protéines et les polysaccharides se fixent naturellement sur une bandelette de NC de 12 cm de long sur 2 mm de large. Ensuite, il est indispensable de procéder à une saturation des sites qui ne sont pas occupés par les antigènes pour réduire les bruits de fond. La saturation est obtenue avec une solution d'albumine bovine ou de lait écrémé à 4 %, moins cher et aussi efficace que l'albumine bovine.

Après l'étape de saturation, on incube les bandelettes de nitrocellulose dans la solution d'anticorps monoclonaux spécifiques du sérotype de *N. meningitidis* 30 mn à 37 °C et sous agitation lente. Après deux lavages successifs avec du tris-saline pendant 5 minutes, on incube les bandelettes dans une solution d'anticorps anti-Ig de souris conjugués à la peroxydase 30 mn à 37 °C et sous agitation lente. Enfin, après une autre série de lavages, on procède à la révélation. Sous l'effet de la peroxydase conjuguée à l'anticorps, l'eau oxygénée  $H_2O_2$  est réduite en  $H_2O + \frac{1}{2}$  de  $O_2$ . L'oxygène libéré va oxyder son substrat, le

4-chloronaphtol. L'oxydation du 4-chloronaphtol se traduit par l'apparition de spots de couleur bleu-violet sur la NC.

### **3.2.2.3. Préparation des solutions de travail**

Solution de PBS : pour 500 ml

- Eau distillée : .....500 ml
- PBS : .....4,775 g

Solution tampon Tris-saline : pour 500 ml

- Eau distillée : .....500 ml
- Chlorure de Sodium (NaCl) : .....5,8 g
- TRIZMA BASE : .....3,03 g
- pH 9

Substrat :

- Méthanol : .....8,5 ml
- 4-Chloro-1-naphtol : .....30 mg
- Solution tris-saline : .....41,5 ml
- Eau oxygénée ( 33 %) : .....160 µl

**NB :** Pour la préparation du substrat : préparer une solution (A) de 4-chloro-1-naphtol et de méthanol et une solution (B) de solution tris-saline et d'eau oxygénée et mélanger les deux solutions en versant toujours la solution (B) dans la solution (A).

Solution de saturation et diluant pour les Mac et les conjugués : pour 100 ml

- Solution de PBS : .....100 ml
- Lait écrémé : .....4 g

### **3.2.2.4. Mode opératoire**

Toujours utiliser des gants et une pince pour manipuler les feuilles de nitrocellulose.

Utiliser un bac différent pour chaque étape d'incubation et de lavage et toujours placer une seule bandelette par rigole.

Toujours faire un contrôle positif et un contrôle négatif sur toutes les bandelettes.

- 1) Etablir un plan de distribution des échantillons en identifiant les bandelettes de nitrocellulose avec un numéro ;
- 2) Préparer la feuille de nitrocellulose et la placer sur le dispositif de filtration de 96 trous (8 lignes de 12 puits) relié à une pompe à vide ;
- 3) Mettre en marche la pompe à vide et filtrer 10 µl de LCR dans les micropuits n° 1 à 10 du dispositif de filtration, 10 µl de suspension bactérienne (le contrôle positif) dans le puits n° 12, 10 µl de PBS (comme témoin négatif) dans le puits n° 11 et laisser filtrer pendant 15 min ;
- 4) Retirer délicatement la feuille de nitrocellulose et la découper en 8 bandelettes (correspondant aux 8 lignes de 12 puits du dispositif de filtration) de 12 cm de long sur 2 mm de large ;
- 5) Laisser sécher les bandelettes à l'air libre pendant au moins 5 minutes ;
- 6) Placer les bandelettes dans un bac muni de plusieurs mini rigoles (une bandelette par rigole pour éviter les contaminations) et immerger les bandelettes avec la solution de saturation et placer le bac sur un agitateur mécanique à bascule pendant 30 minutes à température ambiante ;
- 7) Préparer une dilution d'Ac monoclonal anti-*Neisseria meningitidis* (1/500 pour les IgG anti *N. meningitidis* A et 1/250 pour les IgM anti *N. meningitidis* W135). Les Ac sont dilués dans du PBS à 4 % de lait écrémé ;
- 8) Transférer les bandelettes dans le bac pour anticorps et immerger les bandelettes avec la solution d'Ac (1,5 ml par rigole) ; pendant 30 min à température ambiante ;
- 9) Verser la solution d'Ac dans un réservoir contenant de l'eau de javel et rincer les bandelettes avec la solution de lavage en les laissant 2 fois 5 minutes sur un agitateur mécanique ;

- 10) Préparer les dilutions de conjugué (dilution au 1/500 pour le conjugué anti IgG de souris et au 1/100 pour le conjugué anti IgM de souris) dans du PBS à 4 % de lait écrémé ;
- 11) Transférer les bandelettes dans le bac à conjugué et les immerger avec la solution de conjugué (1,5 ml par rigole) pendant 30 mn à température ambiante ;
- 12) Rincer les bandelettes comme indiquées au point 8) ;
- 13) Transférer les bandelettes dans le bac de révélation et les immerger avec dans le substrat ; laisser 10 à 15 minutes sur l'agitateur mécanique jusqu'à apparition des spots bleu-violet ;
- 14) Verser la solution de substrat dans un pot réservé à cet effet et rincer les bandelettes à l'eau distillée pour arrêter la réaction ;
- 15) Laisser sécher les bandelettes à l'air libre et reporter les résultats.

La série n'est pas validée si le témoin positif n'apparaît pas et/ou si un spot apparaît au niveau du témoin négatif (faux positif).

### **3.2.2.5. Critères d'évaluation du test**

#### **3.2.2.5.1. Validité interne du test**

La sensibilité et la spécificité sont des indicateurs de validité intrinsèque des épreuves diagnostiques. Dans le cas présent, la PCR est utilisée comme test diagnostique de référence.

##### **➤ Sensibilité**

La sensibilité d'un test est sa capacité à identifier correctement les individus qui ont la maladie. C'est le rapport du nombre de patients qui ont un test positif (vrais positifs) sur le nombre total de patients qui ont la maladie (positifs avec le test de référence). Dans notre cas, la sensibilité se définit comme le nombre de LCR positif en Dot blot sur le nombre

total de LCR positifs par PCR pour un sérotype donné. Cette sensibilité est calculée d'après la formule suivante :

$$\text{Sensibilité} = \text{VP}/(\text{VP} + \text{FN})$$

VP= Vrais positifs (positifs avec le test de référence et le test investigué).

FN= Faux Négatifs (positifs avec le test de référence mais, négatifs avec le test investigué).

➤ **Spécificité**

La spécificité d'un test se définit comme étant sa capacité à identifier correctement les individus qui n'ont pas la maladie. C'est le rapport du nombre de patients qui ont un test négatif (vrais négatifs) sur le nombre total de patients qui n'ont pas la maladie. C'est donc le rapport du nombre total de LCR négatifs en Dot blot sur le nombre total de LCR négatifs en PCR. Elle se calcule comme suit :

$$\text{Spécificité} = \text{VN}/(\text{FP} + \text{VN})$$

VN = Vrais Négatifs (Négatifs avec le test de référence et le test investigué).

FP = Faux Positifs (positifs avec le test investigué mais négatifs avec le test de référence).

**3.2.2.5.2. Validité externe du test**

➤ **Valeur prédictive positive (VPP)**

C'est la probabilité qu'un sujet présente effectivement l'affection recherchée par le test quand le test est positif (dépend de la sensibilité, de la spécificité et de la prévalence de l'affection).

Elle est calculée par la formule suivante :

$$\text{VPP} = \frac{(\text{Préval.}) \times (\text{Sensibilité})}{[(\text{Préval.}) \times (\text{Sensibilité})] + [(1 - \text{Préval.}) \times (1 - \text{Spécificité})]}$$

➤ **Valeur prédictive négative (VPN)**

C'est la probabilité qu'un sujet soit effectivement indemne de l'affection recherchée par le test quand le test est négatif (dépend de la sensibilité, de la spécificité et de la prévalence de l'affection). La VPN est calculée par la formule :

$$\text{VPN} = \frac{(1 - \text{Préval.}) \times (\text{Spécificité})}{[(1 - \text{Préval.}) \times (\text{Spécificité})] + [(\text{Préval.}) \times (1 - \text{Sensibilité})]}$$

### **3.2.3. Diagnostic de la méningite par PCR au CERMES**

Cette technique est basée sur l'amplification de l'ADN des trois germes les plus fréquemment impliqués dans les méningites bactériennes en Afrique:

- *N. meningitidis* (gène *crg A*)
- *H. influenzae* (gène *bexA*)
- *S. pneumoniae* (gène *lytA*)

On commence par une réaction PCR multiplex pour détecter l'ADN de *N. meningitidis*, *H. influenzae* ou *S. pneumoniae*.

Dans le cas où le test multiplex est positif pour les méningocoque, une 2<sup>e</sup> PCR multiplex de prédiction de sérotype (A, B, C, Y/W135) est réalisée. Quand le test est positif en Y/W135, on procède à une 3<sup>e</sup> PCR pour confirmer séparément le sérotype Y ou W135. Pour les capsules des sérotypes B, C, Y et W135, c'est le gène *siaD* qui est amplifié tandis que pour le sérotype A, c'est le gène *mynA*.

Dans le cas où la 1<sup>ère</sup> PCR multiplex est positive en *H. influenzae*, une PCR de recherche de *H. influenzae* b est réalisée. (Annexe 3)

# RESULTATS

## IV. RESULTATS

### 4.1. Calibrage des suspensions bactériennes

Le mode opératoire de la préparation des suspensions est le suivant :

Faire une primo culture de 18-24 heures des souches sur gélose au sang de mouton ;

Repiquer des colonies isolées de la primo culture et incuber à l'étuve à 37 °C ;

Au bout de 4 heures d'incubation, suspendre les bactéries dans une solution de PBS ;

Ramener la densité optique de la suspension à 0,1 à 650 nm ;

Faire des dilutions successives de 1/10 en 1/10 de cette suspension (DO = 0,1) et couler sur la gélose au sang à raison de 10 µl par dilution ;

Laisser sécher et mettre à l'étuve à 37 °C et sous 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 18-24 heures ;

Le lendemain, compter le nombre de colonies formées à l'aide d'un compteur de colonie.

Les résultats sont présentés dans le **tableau II** :

**Tableau II : Concentration des suspensions bactériennes de contrôle**

Sérogroupe	Concentration de bactéries dans le PBS	Sérogroupe	Concentration de bactéries dans le PBS
<b>A</b>	0,95 .10 <sup>8</sup> bactéries/ml	<b>Y</b>	0,44. 10 <sup>8</sup> bactéries/ml
<b>C</b>	0,77. 10 <sup>8</sup> bactéries/ml	<b>Sp</b>	0,34.10 <sup>7</sup> bactéries/ml
<b>W135</b>	1,58. 10 <sup>8</sup> bactéries/ml	<b>Hib</b>	0,75.10 <sup>8</sup> bactéries/ml
<b>X</b>	0,33.10 <sup>8</sup> bactéries/ml	-	-

*Sp* = *Streptococcus pneumoniae*

*Hib* = *Haemophilus influenzae* type b

## 4.2. Dot blot

### 4.2.1. Optimisation de la méthode

Plusieurs paramètres influant sur le test ont été investigués : ce sont la nature du LCR (bouilli ou non bouilli), la composition de la solution de saturation, le choix des anticorps à utiliser, la composition du tampon de dilution de l'anticorps et du conjugué.

❖ Nature du LCR :

Nous avons comparé les mêmes échantillons de LCR à l'état bouilli et non bouilli. Il s'est avéré que l'interprétation des spots est beaucoup plus aisée lorsque les échantillons ne sont pas portés à ébullition.

❖ Choix du tampon de saturation :

Nous avons testé deux solutions de saturation différentes : l'une composée de PBS + 4 % de sérum albumine bovine et l'autre de PBS + 4 % de lait écrémé. Nous avons opté pour la solution à 4 % de lait écrémé car elle donne de meilleurs résultats (moins de bruit de fond).

❖ Choix du procédé de fixation des Ag sur la nitrocellulose :

Nous avons, dans un premier temps, directement fixé les LCR à l'aide de micro pipette (2 µl par LCR) sur la nitrocellulose.

Dans un second temps, nous avons utilisé un dispositif de filtration des LCR à travers la feuille de nitrocellulose pour concentrer les Ag polysaccharidiques dans le but de renforcer l'intensité des spots. Le procédé utilisant le dispositif de filtration donne des spots plus nets avec une coloration plus intense.

❖ Choix du tampon de dilution des Ac et conjugués :

Nous avons préparé des dilutions d'Ac et de conjugué dans des tampons PBS, PBS + lait écrémé et PBS + sérum albumine bovine pour diminuer les réactions non-spécifiques. Nous avons obtenu les meilleurs résultats avec la solution PBS + lait écrémé

#### 4.2.2. Détermination des concentrations de travail des anticorps monoclonaux et du conjugué

Nous avons fait varier les concentrations des solutions d'Ac et de conjugué pour déterminer le couple optimum Ac/conjugué donnant les meilleurs spots sans consommer trop de réactifs.

Les résultats sont présentés dans les **tableaux III et IV** :

**Tableau III : Détermination des concentrations optimales en anticorps monoclonaux et en conjugué (séro groupe A)**

		Conjugué anti-IgG peroxydase		
		Dilutions	1/250	1/500
Anticorps Monoclonal Anti NmA K 15-2	1/250	+++	+++	-
	1/500	+++	+++	-
	1/1000	-	-	-

**1+** : spot de faible intensité ; **2+** : spot d'intensité moyenne ; **3+** : coloration intense ; **+/-** : spot très faible ; **-** : absence de spot

Les spots obtenus avec les réactifs (anticorps et conjugué) dilués au 1/250 sont analogues à ceux obtenus avec des dilutions au 1/500. Les dilutions au 1/500 sont donc celles qui ont été utilisées pour la suite du travail avec l'Ac anti *N. meningitidis* A de souris et le conjugué anti IgG de souris peroxydase.

**Tableau IV: Détermination des concentrations en anticorps monoclonaux et conjugué (séro groupe W135)**

		Conjugué anti-IgM peroxydase		
Anticorps Monoclonal Anti NmW135 F 2-3	Dilutions	1/100	1/250	1/500
	1/250	++	+	-
	1/500	+	+/-	-
	1/1000	-	-	-

**1+** : spot de faible intensité ; **2+** : spot d'intensité moyenne ; **3+** : coloration intense ; +/- : spot très faible ; - : absence de spot

Les spots obtenus avec les anticorps monoclonaux IgM anti NmW135 de souris dilués au 1/250<sup>e</sup> combinés avec le conjugué peroxydase anti IgM de souris dilué au 1/100 sont les plus nets et ont une coloration plus intense. Ces dilutions ont été retenues pour la suite.

#### **4.2.3. Tests de spécificité des anticorps monoclonaux de souris**

Les anticorps monoclonaux sont dirigés contre les polysaccharides de *N. meningitidis* des sérogroupes A et W135. Nous avons testé 5 anticorps monoclonaux anti *N. meningitidis* A et 4 anti *N. meningitidis* W135, qui nous ont été gracieusement fournis par le Dr F. NATO (IP de Paris), vis-à-vis de différents sérogroupes de *N. meningitidis* et de souches de *Streptococcus pneumoniae* et de *Haemophilus influenzae* pour déterminer les plus spécifiques. Les résultats sont présentés dans les **tableaux V et VI** :

**Tableau V : Spécificité des 5 anticorps (IgG) monoclonaux anti-*Neisseria meningitidis* A**

Anticorps monoclonaux anti Nm A						
Suspension bactérienne	Conc. susp. bactérienne	K 15-2	K 20-3	L 4-8	L 13-3	L 24-5
Nm A	0,95.10 <sup>8</sup> bact/ml	++++	++++	++++	++++	++++
Nm W135	1,58 10 <sup>8</sup> bact/ml	-	-	-	-	-
Nm C	0,77.10 <sup>8</sup> bact/ml	-	-	-	-	-
Nm Y	0,44.10 <sup>8</sup> bact/ml	-	-	-	-	-
Sp	0,34.10 <sup>7</sup> bact/ml	-	-	-	-	-
Hi	0,75.10 <sup>8</sup> bact/ml	-	-	-	-	-

**1+** : spot de faible intensité ; **2+** : spot d'intensité moyenne ; **3+** : coloration intense ; **4+** : coloration très intense ; +/- : spot très faible ; - : absence de spot

Les 5 Mabs anti-*N. meningitidis* A sont tous spécifiques du polysaccharide du sérotype A. Aucun d'entre eux n'a donné une réaction croisée avec un autre sérotype de *N. meningitidis* ni avec des souches de *S. pneumoniae* ou d'*Haemophilus influenzae*.

**Tableau VI : Spécificité des 4 anticorps (IgM) monoclonaux anti-*Neisseria meningitidis* W135**

<b>Anticorps monoclonaux Anti NmW135</b>					
<b>Suspension bactérienne</b>	<b>Conc.susp. bactérienne</b>	<b>B 21-5</b>	<b>C 12-2</b>	<b>F 2-3</b>	<b>H 17-6</b>
<b>Nm A</b>	0,95.10 <sup>8</sup> bact/ml	-	-	-	-
<b>Nm W135</b>	1,58.10 <sup>8</sup> bact/ml	++	++	++	++
<b>Nm C</b>	0,77.10 <sup>8</sup> bact/ml	-	-	-	-
<b>Nm Y</b>	0,33.10 <sup>8</sup> bact/ml	-	-	-	-
<b>Sp</b>	0,34.10 <sup>7</sup> bact/ml	-	-	-	-
<b>Hi</b>	0,75.10 <sup>8</sup> bact/ml	-	-	-	-

**1+** : spot de faible intensité ; **2+** : spot d'intensité moyenne ; **3+** : coloration intense ; +/- : spot très faible ; - : absence de spot

Les 4 anticorps monoclonaux anti *N. meningitidis* W135 sont tous spécifiques de *N. meningitidis* W135. Aucun des anticorps monoclonaux n'a donné une réaction croisée avec un autre sérotype de *N. meningitidis* ni avec des souches de *S. pneumoniae* ou d'*Haemophilus influenzae*.

#### **4.2.4. Test de sensibilité des anticorps monoclonaux**

- **Anticorps monoclonaux anti-*Neisseria meningitidis* A**

Nous avons testé les 5 anticorps monoclonaux anti-*N. meningitidis* A avec une série de dilution de la suspension bactérienne de *N. meningitidis* A (0,95.10<sup>8</sup> bactéries/ml) et 3 LCR positifs à *N. meningitidis* A, 1 LCR à *S. pneumoniae*, 1 LCR à *H. influenzae*, 1 LCR négatif. Nous avons obtenu les résultats présentés dans **les tableaux VII et VIII** :

**Tableau VII : Comparaison de la sensibilité des anticorps monoclonaux anti-*Neisseria meningitidis* A avec des dilutions de la suspension de la souche de référence de *Neisseria meningitidis* A**

<b>Mabs anti Nm A</b>					
	<b>K 15-2</b>	<b>K 20-3</b>	<b>L 4-8</b>	<b>L 13-3</b>	<b>L 24-5</b>
<b>Nm A 1/1</b> ( $0,95 \cdot 10^8$ bact/ml)	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Nm A 1/10</b> ( $0,95 \cdot 10^7$ bact/ml)	++	++	++	++	++
<b>Nm A 1/100</b> ( $0,95 \cdot 10^6$ bact/ml)	+	-	-	-	-

1+ : spot de faible intensité ; 2+ : spot d'intensité moyenne ; 3+ : coloration intense ;  
+/- : spot très faible ; - : absence de spot

**Tableau VIII : Comparaison de la sensibilité des anticorps monoclonaux anti-*Neisseria meningitidis* A avec des LCR**

<b>Mabs anti Nm A</b>					
	<b>K 15-2</b>	<b>K 20-3</b>	<b>L 4-8</b>	<b>L 13-3</b>	<b>L 24-5</b>
<b>LCR A1</b>	+++	+++	++	++	+
<b>LCR A2</b>	+++	++	++	++	++
<b>LCR A3</b>	+	+/-	-	+/-	+/-
<b>LCR Sp</b>	-	-	-	-	-
<b>LCR Hi</b>	-	-	-	-	-
<b>LCR Neg.</b>	-	-	-	-	-

1+ : spot de faible intensité ; 2+ : spot d'intensité moyenne ; 3+ : coloration intense ;  
+/- : spot très faible ; - : absence de spot

Aucun des anticorps monoclonaux anti-*N. meningitidis* A n'a réagi avec les LCR positifs à *S. pneumoniae* et *H. influenzae* ni avec le LCR négatif. Ils ont tous réagi avec la suspension de *N. meningitidis* A. Mais seul l'anticorps monoclonal K15-2 a donné des spots à la dilution 1/100<sup>e</sup> de la suspension *N. meningitidis* A (0,95.10<sup>6</sup> bactéries/ml) et le LCR A3 (faible positif à *N. meningitidis* A). L'anticorps monoclonal K 15-2 est donc le plus sensible. Nous l'avons utilisé pour la suite de l'étude.

- **Anticorps monoclonaux anti-*Neisseria meningitidis* W135**

Nous avons testé les 4 anticorps monoclonaux anti-*N. meningitidis* W135 avec une série de dilutions de la suspension de *N. meningitidis* W135 (1,58.10<sup>8</sup> bactéries/ml) et 2 LCR positifs à *N. meningitidis* W135, 1 LCR à *S. pneumoniae*, 1 LCR à *H. influenzae*, 1 LCR négatif. Les résultats sont présentés dans les **tableaux IX et X** :

**Tableau IX : Comparaison de la sensibilité des anticorps monoclonaux anti-*Neisseria meningitidis* W135 avec des dilutions de la suspension de la souche de référence de *Neisseria meningitidis* W135**

Anticorps monocloaux anti <i>N. meningitidis</i> W 135				
	B 21-5	C 12-2	F 2-3	H 17-6
Nm W135 1/1 (1,58.10 <sup>8</sup> bact/ml)	++	++	++	++
Nm W135 1/10 (1,58.10 <sup>7</sup> bact/ml)	+	+	+	+
Nm W135 1/100 (1,58.10 <sup>6</sup> bact/ml)	-	-	+	-

**1+:** spot de faible intensité ; **2+:** spot d'intensité moyenne ; **3+:** coloration intense ; **+/-:** spot très faible ; **- :** absence de spot

**Tableau X: Comparaison de la sensibilité des anticorps monoclonaux anti-*Neisseria meningitidis* W135 avec des LCR**

Anticorps monoclonaux anti <i>N. meningitidis</i> W 135				
	B 21-5	C 12-2	F 2-3	H 17-6
LCR 1 W135	+	+	++	+
LCR 2 W135	-	-	+	-
LCR Sp	-	-	-	-
LCR Hi	-	-	-	-
LCR Neg.	-	-	-	-

**1+** : spot de faible intensité ; **2+** : spot d'intensité moyenne ; **3+** : coloration intense ;  
 +/- : spot très faible ; - : absence de spot

Aucun des anticorps monoclonaux anti-*N. meningitidis* W135 n'a réagi ni avec les LCR positifs à *S. pneumoniae* et *H. influenzae* ni avec le LCR négatif. Ils ont tous réagi avec la suspension de *N. meningitidis* W135 mais seul l'anticorps monoclonal F 2-3 a donné des spots faibles à la dilution 1/100 de la suspension de *N. meningitidis* W135 ( $1,58.10^6$  bactéries/ml) et le LCR2 W135 (faible positif à *N. meningitidis* W135). L'anticorps monoclonal F 2-3 a été le plus sensible et a été utilisé pour la suite de l'étude.

#### **4.2.5. Etablissement d'une gamme étalon de polysaccharides A, W et de suspensions bactériennes**

Nous avons réalisé une gamme étalon de polysaccharides A et W135 et des suspensions bactériennes de *N. meningitidis* A et de *N. meningitidis* W135. Les polysaccharides proviennent de la firme NIBSC et sont présentés sous forme lyophilisée. Après reconstitution avec de l'eau distillée, on obtient des solutions à 25 mg/ml de A et 1 mg/ml de W135. Nous avons utilisé une solution de départ à 50 µg/ml à partir de laquelle on a

réalisé des dilutions pour déterminer le seuil de détection de la méthode. Les résultats sont présentés dans les **tableaux XI et XII** :

**Tableau XI : Détermination du seuil de détection des anticorps monoclonaux K 15-2 et F 2-3 avec des dilutions de polysaccharides**

Polysaccharide	Anticorps anti NmA K 15-2		Anticorps anti NmW135 F 2-3	
	Poly A		Poly W135	
Dilution	Concentration	Intensité du spot	Concentration	Intensité du spot
<b>1</b>	50 µg/ml	+++	50 µg/ml	+
<b>1/100</b>	0,5 µg/ml	++	0,5 µg/ml	+
<b>1/200</b>	0,25 µ/ml	+	0,25 µ/ml	-
<b>1/400</b>	0,125 µg/ml	+	0,125 µg/ml	-
<b>1/500</b>	0,0625 µg/ml	+/-	0,625 µg/ml	-
<b>1/1000</b>	0,0312 µg/ml	-	0,0312 µg/ml	-

**1+** : spot de faible intensité ; **2+** : spot d'intensité moyenne ; **3+** : coloration intense ;  
+/- : spot très faible ; - : absence de spot

Avec l'anticorps monoclonal K15-2 anti-*N. meningitidis* A, on obtient des spots avec une solution à 62,5 ng/ml de polysaccharide A purifié. Avec l'anticorps monoclonal F 2-3 anti-*N. meningitidis* W135, le seuil de détection est de 0,5 µg/ml de polysaccharide W135 purifié.

**Tableau XII: Détermination du seuil de détection des anticorps monoclonaux K 15-2 et F 2-3 avec des dilutions bactériennes**

	Anticorps anti Nm A K 15-2		Anticorps anti Nm W135 F 2-3	
	Nm A	Nm W135	Nm A	W135
<b>Conc. de départ</b>	0,95 10 <sup>8</sup> N.m/ml	1,58. 10 <sup>8</sup> N.m/ml	0,95 10 <sup>8</sup> N.m/ml	1,58. 10 <sup>8</sup> N.m/ml
<b>1</b>	+++	-	-	++
<b>1/100</b>	+	-	-	+
<b>1/200</b>	+/-	-	-	-
<b>1/400</b>	-	-	-	-
<b>1/500</b>	-	-	-	-
<b>1/1000</b>	-	-	-	-

**1+** : spot de faible intensité ; **2+** : spot d'intensité moyenne ; **3+** : coloration intense ; +/- : spot très faible ; - : absence de spot

Avec l'anticorps monoclonal K15-2 anti-*N. meningitidis* A, on obtient des spots avec une solution bactérienne de *N. meningitidis* A diluée au 1/200 correspondant à 4,75 10<sup>5</sup> bactéries /ml. Avec l'anticorps monoclonal F2-3 anti-*N. meningitidis* W135, le seuil de détection est atteint dès la dilution 1/100 de la suspension de *N. meningitidis* W135 (correspondant à 1,58 10<sup>6</sup> bactéries/ml). On n'a pas eu de réaction croisée et, ces résultats confirment ceux des **tableaux VII et IX.**

#### **4.2.6. Dot blot des échantillons de LCR**

- **Avec l'anticorps monoclonal K15-2 anti-*Neisseria meningitidis* A**

Nous avons testé 182 LCR avec cet anticorps monoclonal dont : 78 LCR positifs à *N. meningitidis* A, 10 LCR à *N. meningitidis* W135, 12 LCR à *S. pneumoniae* et 82 LCR négatifs. Les résultats sont regroupés dans le **tableau XIII** :

**Tableau XIII : Comparaison dot blot *N. meningitidis* A versus PCR des échantillons de LCR**

Dot blot K 15-2	PCR				Total
	Nm A	Nm W135	Négatifs	Sp	
+	61	0	5	0	66
-	17	10	77	12	116
<b>Total</b>	78	10	82	12	182

61 LCR A sur 78 ont réagi avec l'anticorps anti-*N. meningitidis* A , 5 LCR négatifs sur 82 ont donné un résultat positif ; aucun des LCR positifs à *S. pneumoniae* et *N. meningitidis* W135 n'a réagi positivement.

- **Avec l'anticorps monoclonal F2-3 anti-*Neisseria meningitidis* W135**

Avec cet anticorps monoclonal nous avons testé 174 LCR dont : 10 LCR NmW135 ; 70 LCR NmA ; LCR négatifs ; 12 LCR Sp. Les résultats sont regroupés dans le **tableau XIV**:

**Tableau XIV : Comparaison dot blot *N. meningitidis* W135 versus PCR des échantillons de LCR**

Dot blot F 2-3	PCR				Total
	Nm W135	Nm A	Négatifs	Sp	
+	8	0	0	0	8
-	2	70	82	12	166
<b>Total</b>	10	70	82	12	174

8 LCR W135 sur 10 ont réagi avec l'anticorps anti NmW135 ; tous les 164 LCR non positifs NmW135 ont réagi négativement.

- **Calcul de la sensibilité, de la spécificité**

Par rapport aux résultats obtenus, nous avons calculé la sensibilité et la spécificité de la méthode à l'aide du module EpiTable du logiciel EpiInfo version 6.0. Sur la série de LCR testés pour l'évaluation du Dot blot nous avons pour les sérogroupes A et W135 42,85 % et 5,74 % de LCR positifs avec la méthode de référence. Les résultats obtenus avec ce logiciel ont été calculés avec un intervalle de confiance (IC) à 95 %

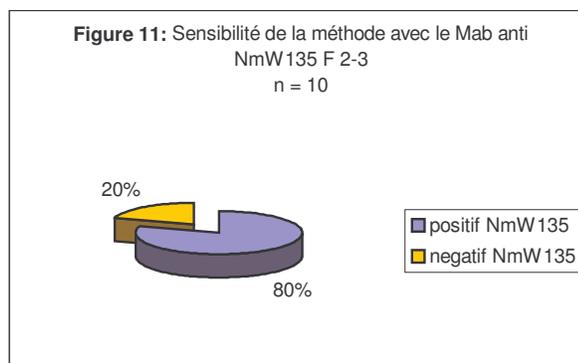
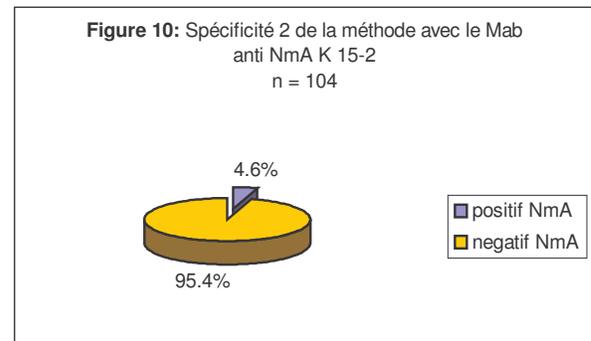
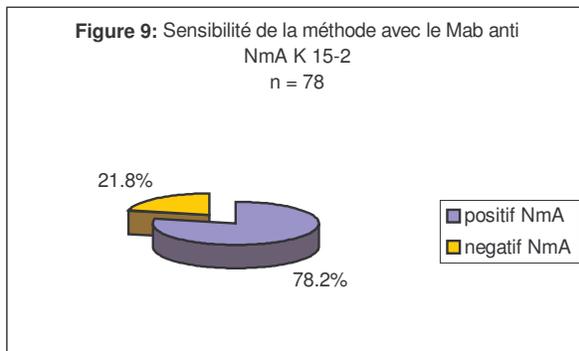
Les résultats sont présentés dans le **tableau XV et XVI** :

**Tableau XV : Sensibilité et spécificités de la méthode**

	Anti NmA K 15-2		Anti W135 F 2-3	
	% (n)	Intervalle de confiance à 95 %	% (n)	Intervalle de confiance à 95 %
<b>Sensibilité</b>	78,2 % (78)	[67,1 – 86,4]	80 % (10)	[44,2 – 96,5]
<b>Spécificité 1*</b>	93,9 % (82)	[85,7 – 97,7]	100 % (82)	[94,4 - 100]
<b>Spécificité 2*</b>	95,4 % (104)	[89,1 – 98,3]	100 % (164)	[97,1 - 100]

\***Spécificité 1** : C'est le rapport du nombre de LCR négatifs en Dot blot sur le nombre total des LCR négatifs en PCR.

\***Spécificité 2** : C'est le rapport du nombre total des LCR non A (non W135 pour le système utilisant l'anticorps F 2-3) sur le total des LCR non A (ou non W135 en PCR).



- **Valeurs prédictives positive et négative**

Nous avons calculé les VPP et VPN à partir des lots de LCR utilisés pour l'évaluation du test. Les prévalences pour les sérogroupes A et W135 sont équivalentes au pourcentage de LCR positifs sur les séries de LCR utilisés et sont respectivement de 42,85 % pour le séro groupe A et 5,74 % pour le séro groupe W135. Les résultats sont présentés dans le **tableau XVI**.

Les **figures 12 et 13** présentent les VPP et VPN pour toutes les différentes valeurs de prévalence, pour le diagnostic de *N. meningitidis* A et W135.

**Tableau XVI : Valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN) déterminées à partir des taux de LCR positifs utilisés pour l'évaluation du Dot blot**

	Anti NmA K 15-2 (prévalence= 42,85 %)		Anti W135 F 2-3 (prévalence= 5,74 %)	
	% (n)	Intervalle de confiance à 95 %	% (n)	Intervalle de confiance à 95 %
<b>Valeur prédictive positive (VPP)</b>	92,4 % (78)	[82,5 - 97,2]	100 % (10)	[59,8 - 100]
<b>Valeur prédictive négative (VPN)</b>	85,3 % (104)	[77,3 - 91]	98,8 % (164)	[94,4 - 100]

Avec l'anticorps anti NmA K 15-2, nous avons une VPP de 92,4 dans l'intervalle de confiance à 95 % de confiance [82,5 - 97,2] et une VPN de 85,3 % [77,3 - 91].

Avec l'anticorps anti NmW135, nous avons une VPP de 100% dans l'intervalle de confiance à 95 % de confiance [59,8 - 100] et une VPN de 98,8 % [95,3 - 99,8].

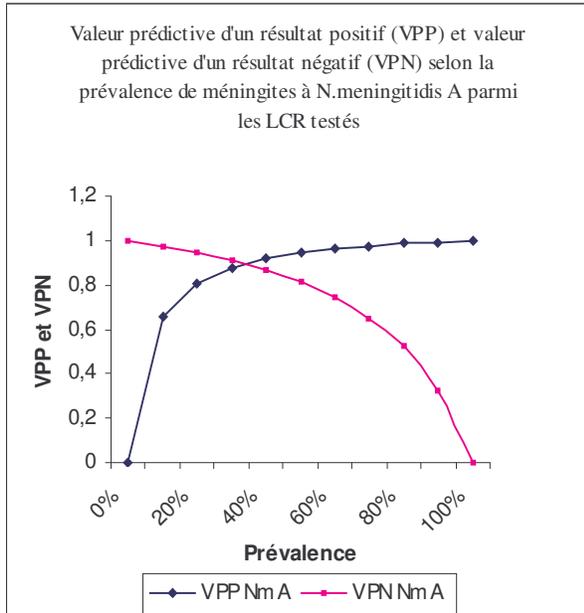


Figure 12

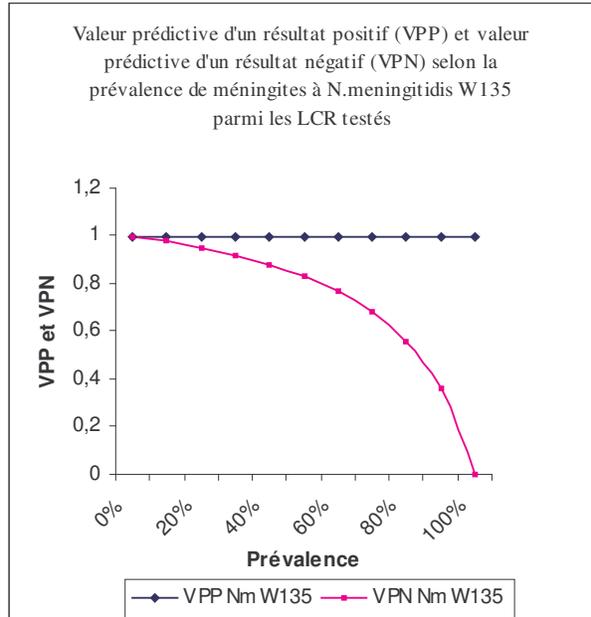


Figure 13

# COMMENTAIRES & DISCUSSION

## **V. DISCUSSION**

Plusieurs méthodes sont utilisées pour le diagnostic des méningites à méningocoque. Les plus employées actuellement sont l'examen direct, la culture, les tests d'agglutination des particules de latex et la PCR.

L'examen direct est une technique facile à réaliser et ne nécessitant pas de laboratoire spécialisé. Il ne prend pas de temps mais est limité par son manque de sensibilité et de spécificité.

La culture est la méthode de référence ; pour peu qu'il y ait des germes viables dans les prélèvements pathologiques, on peut les cultiver sur un milieu approprié et les identifier. La culture est limitée par : la sensibilité du germe au froid et à la chaleur exigeant une mise en culture dans les deux heures suivant le prélèvement ; une contamination exogène des échantillons entraînant la lyse des bactéries ou masquant la présence du méningocoque.

Le test d'agglutination au latex est un test facile à réaliser, les résultats sont disponibles en une trentaine de minutes. Actuellement, il se présente en kits prêts pour l'utilisation. Entre les mains d'un personnel expérimenté et dans un environnement technique de bonne qualité, le test de diagnostic de la méningite par agglutination de particules de latex présente des caractéristiques intéressantes. Il est toutefois limité par un coût élevé et la difficulté d'interprétation de certains résultats. De plus, il n'est pas pratique lorsqu'on doit passer plusieurs LCR en série par exemple, en période épidémique.

La PCR appliquée au diagnostic des méningites est une technique performante, qui rend actuellement de grands services en Afrique pour la surveillance épidémiologique de la méningite. C'est une méthode sensible spécifique et, il est possible de passer les LCR en série. De plus, on peut poser le diagnostic même lorsque les germes sont morts. Les difficultés de cette technique résident dans le fait que la mise en place du laboratoire coûte chère et, c'est une technique délicate, sophistiquée et extrêmement sensible. Par conséquent, la moindre contamination est amplifiée. Elle nécessite un personnel qualifié.

Devant les limites des techniques actuelles, une approche diagnostique immunologique de la méningite, a été tentée. Le principe consiste à mettre en évidence des antigènes bactériens dans les produits pathologiques. Dans le cas des infections à méningocoque, les antigènes recherchés sont le plus souvent des polysaccharides capsulaires stables et abondants, spécifiques de sérotype. Mais on peut aussi rechercher les protéines de membrane externe. L'idée d'un diagnostic immunologique par détection d'antigènes

polysaccharidiques dans le LCR n'est pas nouvelle puisque dès 1909, Vincent et Bellot ont expérimenté la double diffusion en gélose [16]. A partir des années 1970 d'autres techniques comme la contre-immunoelectrophorèse (CIE) ont été explorées [15, 24, 31]. Nous avons, à travers ce travail, fait la mise au point et l'évaluation d'une nouvelle technique immunologique, de type "Dot blot" (ELISA sur nitrocellulose) pour la recherche d'antigènes polysaccharidiques directement dans le LCR. Cette technique est déjà utilisée pour le sérogroupage des méningocoques mais, après la culture [35].

Le travail a été mené au laboratoire d'immunosérologie du CERMES. Nous avons optimisé la méthode en faisant varier plusieurs paramètres du test et par un screening de 9 anticorps monoclonaux spécifiques de séro groupe de *N. meningitidis* (5 Mabs IgG anti-*N. meningitidis* A et 4 Mabs IgM anti-*N. meningitidis* W135).

Pour évaluer la méthode dot blot nous avons utilisé la méthode PCR comme "gold standard" [22, 26, 76]. Nous avons choisi la PCR comme méthode de référence car les LCR utilisés pour l'étude sont des échantillons de la biothèque du CERMES collectés en dehors de Niamey, dans des zones où il n'y a pas de laboratoire de culture. Ils ont été collectés en 2002, 2003, 2004 et conservés à -20 °C.

Tous les LCR utilisés ont été testés et confirmés par PCR. Il s'agit de 182 LCR testés avec le test anti-*N. meningitidis* A et 174 LCR testés avec le test anti-*N. meningitidis* W135.

### **5.1. Optimisation de la méthode**

L'optimisation de la méthode a consisté en la comparaison de plusieurs paramètres pour en choisir ceux qui donnent les meilleurs résultats.

Dans un premier temps, nous avons comparé le procédé de fixation de l'antigène sur la nitrocellulose (phase solide du système Dot blot ELISA). Nous avons d'abord directement déposé 2 µl et 4 µl de LCR sur la nitrocellulose. Les antigènes polysaccharidiques ou protéiques se fixent naturellement sur la NC [66, 84]. Obtenant des résultats non-concluants, nous avons testé un dispositif de filtration relié à une pompe à vide. L'utilisation d'une pompe à vide permet d'augmenter la quantité de LCR testée et donc d'accroître la quantité d'antigène sur un même spot sur la nitrocellulose. En utilisant cette technique de concentration d'antigène, nous avons pu augmenter le volume de LCR jusqu'à 10 µl et donc augmenter l'intensité de la coloration des spots.

Nous avons ensuite comparé des "LCR non-traités" c'est-à-dire directement congelés subi et des "LCR bouillis" que nous avons porté à ébullition et soumis à une centrifugation à

12.000 rpm pendant 10 minutes. Les LCR n'ayant subi aucun traitement donnent de meilleurs résultats. Avec les LCR bouillis, il se forme un film de protéines et de cellules coagulées par la chaleur sur la feuille de nitrocellulose. La présence de ce film bouche la NC, empêche la fixation des Anticorps sur l'Antigène et favorise l'accrochage non-spécifique des Anticorps et du conjugué, conduisant ainsi à l'apparition de faux négatifs. La centrifugation, même à une vitesse élevée (12.000 rpm) n'apporte pas d'amélioration.

La saturation du support étant une étape primordiale en ELISA, nous avons comparé 2 solutions de saturation différentes : l'une composée de PBS à 4% de lait écrémé et l'autre de PBS à 4 % de BSA (sérumalbumine bovine) comme ceux décrits par Kuipers *et al.* [35]. Nous avons finalement opté pour la solution de PBS à 4 % de lait écrémé car elle donne de meilleurs résultats. De plus, le lait écrémé est beaucoup moins cher que la BSA et est facilement disponible dans les épiceries au Niger.

Constatant une persistance des bruits de fond matérialisés par de faibles réactions non-spécifiques (réactions positives avec les témoins négatifs) nous avons remplacé le PBS comme tampon de dilution des réactifs par la solution de saturation (PBS à 4 % de lait écrémé). Ce même procédé de dilution des réactifs a été utilisé par Kuipers *et al.* [35]. Avec la solution de saturation comme tampon de dilution des anticorps et conjugués, nous sommes arrivés à, pratiquement, supprimer les réactions non-spécifiques.

Dans un souci d'économie de réactifs, nous avons recherché les concentrations optimales en anticorps et en conjugué nous permettant d'obtenir des spots bien visibles et des résultats reproductibles. Les concentrations que nous avons retenues sont :

- Pour le sérotype A les anticorps (1 mg/ml) et le conjugué (dosés à 1,41 mg/ml) sont dilués au 1/500.
- Pour le sérotype W135, les Mabs (1 mg/ml) sont dilués au 1/250 et le conjugué (0,6 mg/ml) est dilué au 1/100.

Les concentrations de travail des Mabs anti-*N. meningitidis* W135 sont plus élevées car ce sont des immunoglobulines de classe M connues pour leurs difficultés de purification et leur instabilité pendant la conservation due à leur structure pentavalente et à leur haut poids moléculaire. Malgré ces concentrations élevées, les spots obtenus avec les IgM sont beaucoup moins francs que ceux obtenus avec les IgG anti-*N. meningitidis* A.

## **5.2. Dot blot**

La mise au point réalisée, nous avons fait screening des différents Mabs dont nous disposons pour déterminer leur sensibilité et leur spécificité. Les cinq Mabs anti-

*N.meningitidis* A et les quatre Mabs anti-*N.meningitidis* W135 ont été testés vis-à-vis de suspensions de *N.meningitidis* de différents sérogroupes (A, W135, C, X, Y ) et de suspensions de *S. pneumoniae* et d'*Haemophilus influenzae* type b.

Tous les Mabs se sont révélés spécifiques de leur séro groupe respectif (tableaux V et VI); aucune réaction croisée n'a été observée. Nous avons également testé les Mabs avec des LCR confirmés par PCR. Aucune réaction croisée n'a été observée avec les LCR non plus. Les anticorps monoclonaux dont nous disposons sont donc vraiment spécifiques de séro groupe.

La spécificité des anticorps prouvée, nous avons déterminé leur sensibilité. Pour cela, nous avons d'une part, passé ces anticorps (anti-*N. meningitidis* A et W135) avec une série de dilutions de suspensions calibrées de *N. meningitidis* A et W 135. Avec 4 des 5 Mabs anti-*N. meningitidis* A, on obtient des spots jusqu'à la dilution 1/10 soit  $0,95 \cdot 10^7$  bactéries/ml. Avec le Mab anti-*N. meningitidis* A K 15-2 on obtient des spots jusqu'à la dilution 1/100 (correspondant à  $0,95 \cdot 10^6$  bactéries/ml). De même, le Mab K 15-2 est le seul à détecter les polysaccharides présents dans le LCR A3 (qui est un LCR faiblement positif *N. meningitidis* A en PCR). Nous avons donc conclu que le Mabs K 15-2 est le plus sensible des 5 Mabs anti-*N. meningitidis* A (tableaux VII et VIII). Avec les 4 Mabs anti-*N. meningitidis* W135, on obtient des spots avec la suspension de *N. meningitidis* W135 diluée au 1/10 (soit  $1,58 \cdot 10^7$  bact./ml). Avec le Mab anti-*N. meningitidis* W135 F 2-3, on obtient des spots faibles à la dilution de 1/100 (correspondant à  $1,58 \cdot 10^6$  bactéries/ml). Ce même Mab F 2-3 a été le seul à détecter les polysaccharides présents dans le LCR W2 (faible positif W135 en PCR) (tableaux IX et X).

Ces résultats nous ont permis de conclure que les Mabs K 15-2 et F 2-3 sont les plus sensibles. D'autres part, nous avons testé ces Mabs K 15-2 et F 2-3 avec des solutions de polysaccharides purifiés et nous avons obtenu un seuil de détection de 62,5 ng/ml avec le Mab K 15-2 et de 0,5 µg/ml avec le Mab F 2-3. Avec le Mab anti-*N.meningitidis* W135, notre seuil est équivalent à celui obtenu dans un test ELISA immunocapture pénicillinase mis au point récemment au CERMES (R. MOUSTAPHA, non publié). Par contre, avec le Mab anti-*N.meningitidis* A, la sensibilité de la méthode est légèrement inférieure à celle du test ELISA sur plaque qui donne des seuils compris entre 1 et 10 ng/ml avec des solutions de polysaccharide purifié [16, 70].

### **5.3. Evaluation de la qualité intrinsèque**

La spécificité et le seuil de détection de la méthode déterminés, nous avons réalisé une évaluation avec des LCR de référence testés par PCR.

Sur 78 LCR positifs *N. meningitidis* A testés avec le Mab anti-*N. meningitidis* A, 61 sont restés positifs en séro groupe A et 17 ont donné un résultat négatif soit une sensibilité de 78,2 %. Cette sensibilité est inférieure à celle obtenue par Sippel *et al.* (100 %) [70] mais elle pose le diagnostic directement sur le LCR alors que le test ELISA-méningite de SIPPEL est effectué sur des souches bactériennes pures. En fait, les LCR faussement négatifs dans notre test "Dot blot" sont ceux qui ont donné des bandes faibles en PCR. Nous pensons donc que ce sont des LCR faiblement positifs en *N. meningitidis* A contenant par conséquent une faible quantité de polysaccharide capsulaire. De plus, ces LCR ont été conservés depuis 1 à 2 ans au congélateur. Il est donc possible que le polysaccharide se soit fixé à la paroi des tubes ou ait subi une dégradation. Avec ce même Mab anti-*N. meningitidis* A nous avons testé 104 LCR négatifs en *N. meningitidis* A. Nous avons obtenu 5 faux positifs soit une spécificité de 95,4 %, supérieure à celle obtenue par Van Der ENDE (88 %) [82]. Le Dot blot et la PCR ne détectent pas la même structure bactérienne (polysaccharide pour le "Dot blot" et DNA pour la PCR). Dans un même LCR, il est possible qu'il y ait la présence de ces deux types de molécule comme on peut retrouver uniquement le polysaccharide ou le DNA pour peu que la conservation soit mal faite ou que l'échantillon ait été en contact avec une DNase.

Avec le Mab anti-*N. meningitidis* W135, nous avons testé 10 LCR positifs W135 et 164 non *N. meningitidis* W135. Nous avons eu une sensibilité de 80 % et une spécificité de 100 %. Il faudrait augmenter le nombre de LCR pour affirmer ces chiffres.

Il serait intéressant d'évaluer le Dot blot en prenant un test basé sur la détection des polysaccharides capsulaires comme référence.

En résumé, nous avons pour le séro groupe A, une sensibilité de 78,2 % et une spécificité de 95,4 % avec une VPP de 92,2 % et une VPN de 85,3 % en prenant le pourcentage de LCR positif Nm A dans la série de LCR testés comme prévalence. Pour le séro groupe W135, on a une sensibilité de 80 % et une spécificité de 100 % avec une VPP de 100 % pour toutes les valeurs de prévalence.

Le test Dot blot que nous avons mis au point et évalué, contrairement aux autres études a l'avantage d'être directement réalisé sur le LCR sans mise en culture préalable. Les sensibilités pour la détection des méningocoques A (78,2 %) et W135 (80 %) sont

acceptables. On pourrait les améliorer en mettant au point des anticorps beaucoup plus affins.

Les spécificités de 95,4 % et 100 % respectivement pour les sérogroupes A et W135 sont très bonnes.

La VPP du test avec les réactifs anti NmA dépasse le seuil de 90 % dès que la prévalence atteint 30 %, pour les valeurs de prévalence comprises entre 20 et 30 % elle est supérieure à 80 %. Avec les réactifs anti W135 elle est de 100 % pour toutes les valeurs de prévalence.

Avec des valeurs prédictives positives supérieures à 90 % pour les deux sérogroupes en contexte d'épidémie (où la prévalence est généralement élevée), la technique peut être considérée comme acceptable (figures 12 et 13). La sensibilité de ce test (78,2 %) est inférieure à celle du kit de diagnostic Pastorex® (Sensibilité = 86-88 %) [20, 43] mais cette variation est peut être le fait d'une dégradation des polysaccharides présents dans les LCR (collectés en 2002, 2003, 2004).

# CONCLUSION & RECOMMANDATIONS

## **VI. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

### **6.1. Conclusion**

Depuis l'épidémie de méningite à méningocoque W135 survenue au Burkina Faso, l'OMS a fait de la détermination du germe et du sérotype en cause au cours des épidémies, un préalable pour la mobilisation du vaccin trivalent A/C/W135.

C'est dans cette optique que nous avons mis au point le test « Dot blot » pour le diagnostic et le sérotypage des méningocoques A et W135 directement sur le LCR. Les sensibilités, bien que n'atteignant pas des valeurs élevées, sont bonnes pour les deux sérotypes. Les valeurs prédictives positive et négative, supérieures à 90 % pour les deux sérotypes sont bonnes. En contexte d'épidémie où la prévalence est élevée, les VPP et VPN sont supérieures à 90 %.

Nous avons constaté que l'isotype des anticorps utilisés influe beaucoup sur les résultats car les spots obtenus avec les monoclonaux anti W135, des immunoglobulines de classe M, sont moins intenses que ceux obtenus avec les IgG anti *N. meningitidis* A. Il serait donc souhaitable de développer des IgG anti *N. meningitidis* W135 pour améliorer la valeur du test.

Ce test permet de passer des LCR en série et à moindre coût en comparaison avec le test latex et la PCR. Le gain de temps est aussi appréciable car on peut obtenir le résultat de 80 LCR en moins de 4 heures de temps. De plus, la technique ne nécessite pas un personnel qualifié comme la PCR.

En conclusion, nous estimons que la technique a été mise au point et, au vu des résultats obtenus, elle mérite d'être évaluée en contexte d'épidémie et dans les conditions de terrain.

La sensibilité et la spécificité du test pourraient être améliorées par la production d'anticorps monoclonaux de plus forte affinité.

## **6.2. Recommandations**

Au terme de cette étude, nous retenons que malgré l'existence de vaccins et d'une thérapeutique efficace, la méningite demeure encore une cause de mortalité et de morbidité élevées dans les pays en voie de développement. Nous formulons les recommandations suivantes :

### **Aux autorités sanitaires :**

- De tout mettre en œuvre pour améliorer la surveillance des méningites bactériennes pour détecter à temps les épidémies et les germes en cause ;
- De mener les campagnes de vaccination à temps ;
- De renforcer les laboratoires
- De procéder à un recyclage régulier du personnel

### **Au CERMES :**

- D'étendre le réseau de collecte des LCR à tout le pays ;
- De poursuivre les recherches en vue d'élargir la méthode aux autres agents bactériens responsables de méningites purulentes au Sahel ;
- Faire l'évaluation du test en période d'épidémie ;
- De mener des recherches sur la mise au point de test bandelettes plus rapides et d'utilisation plus simple que le dot blot

### **Au laboratoire d'analyse biologique :**

- Effectuer les examens biochimiques de tous les LCR : dosage du glucose, des protéines, des ions ;
- Faire l'examen direct sur tout prélèvement de LCR ;
- Utiliser des tubes appropriés pour le prélèvement et le stockage des LCR

# BIBLIOGRAPHIE

## **VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

01. **ALHASSANE O.** Profil épidémiologique des méningites purulentes à Niamey entre 1989 et 1995. Thèse Med Niamey, 1995.
02. **ANDREW F, RIORDAN I, POLLARD AJ.** Clinical studies, an overview. In : POLLARD AJ and MAIDEN MCJ, eds. Methods in molecular medicine, Meningococcal disease : Methods and protocols. Totowa, NJ : Humana Press Inc, volume 67 ; 2001.
03. **BELYO D.** Contribution à l'étude des méningites purulentes à Niamey. Thèse Med Niamey, 1992.
04. **BISSAGNENE E et DOMOUA K.** Situation actuelle des méningites, encéphalites infectieuses et suppurations intracrâniennes en zone tropicale africaine. Med Afr Noire 1996 ; **43** :120-3.
05. **BOUREE P.** Examens de laboratoire en médecine tropicale : liquide céphalo-rachidien. Paris : Masson 1987 ; 151p.
06. **BOUVET E.** La prophylaxie de la méningite cérébro-spinale. Med Mal Inf 1984 ; **14** (hors série) : 105-8.
07. **BUREAU CENTRAL DU RECENSEMENT.** Résultats provisoires RGP/H-2001 ; 2002.
08. **CADOZ M.** Les méningites à méningocoque en Afrique, leur prophylaxie vaccinale. Med Afr Noire 1984 ; **31** : 353.
09. **CAMPAGNE G, SCHUCHAT A, DJIBO S et al.** Epidemiology of bacterial meningitis in Niamey, Niger, 1981-96. WHO Bull 1999 ; **77** : 506-7.
10. **CERMES** Rapports annuels 2003 et perspectives. 2004.
11. **CHAKOUR M et al.** Diagnostic biologique rapide en contexte épidémique : état des lieux et perspectives. Med Mal Inf 2003 ; **33** : 396-412.
12. **CHIPPAUX JP, CAMPAGNE G et DJIBO S.** La méningite cérébro-spinale dans les états membres de l'OCCGE. OCCGE – Informations, 1998 ; (105) : 6-8.
13. **CHIPPAUX JP, MOUNKAILA A, CHAIBOU I et DJIBO S.** L'épidémie de méningite cérébro-spinale du Niger de 1995 - OCCGE-Information, 1995 ; (79) : 9-12.
14. **CHIPPAUX JP, SOULA G, CAMPAGNE G et REY M.** Compte rendu d'un atelier sur les épidémies de méningite à méningocoque, Niamey 12-14 janvier 1998. OCCGE – Informations, 1998 ; (109) : 6-7.
15. **COONROD JD, RYTEL M.** Determination of aetiological bacterial meningitis by counter immunoelectrophoresis. Lancet 1972 : 1154-7.

16. **DENIS F, MOUNIER M.** Le diagnostic rapide des méningites cérébro-spinales (Techniques, Résultats, Limites et Perspectives). *Med Mal Inf* 1984 ; **14** : 27-36.
17. **DIOP MAR I, GUERIN M, LAFAIX C et REY M.** Les méningites tuberculeuses à Dakar : difficultés du diagnostic, gravité. *Med Afr Noire* 1979 ; **26** : 411-9.
18. **DJIBO S, CHANTEAU S et ALONSO JM.** Méningites à *Neisseria meningitidis* : Diagnostic précoce, Traitement, Lutte contre les Épidémies. 4<sup>ème</sup> rencontre africaines de biologie technique, Niamey (Niger) 28 mars 2003 ; 2003.
19. **DJIBO S, NICOLAS P, ALONSO JM, DJIBO A, COURET D, RIOU JY et al.** Outbreaks of serogroup X meningococcal meningitis in Niger 1995-2000. *Trop Med Int Health* 2003 ; **8** : 1118-23.
20. **DJIBO S, NJANPOP LAFOURCADE BM, BOISIER P et al.** Evaluation of the Pastorex® meningitis kit for the rapid identification of *Neisseria meningitidis* serogroup A and W135. *Trans R Soc Trop Med.* (sous presse).
21. **ETIENNE J et PICQ JJ.** Structure antigénique, marqueurs épidémiologiques et facteurs de virulence du méningocoque. *Med Mal Inf* 1984 ; **14** : 19-26.
22. **FALLA TJ, CROOK DW, BROPHY LN, MASKELL D, KROLL JS and MOXON ER.** PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol* 1994 ; **32** : 2382-6.
23. **FERRON A.** Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. La Madeleine : C & R
24. **FOSSIECK B et al.** Counter immunoelectrophoresis for rapid diagnosis of meningitis due to *Diplococcus pneumoniae*. *J Inf Dis* 1973 ; **127** : 106-9.
25. **GALASKA A.** Les *Meningococcus* et leur prévention par les vaccins anti-méningococciques polysaccharidiques.
26. **GARCIA P, GARCIA JL, GARCIA E and LOPEZ R.** Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene* 1986 ; **43** : 265-72.
27. **GENTILLINI M.** Médecine tropicale. Paris : Flammarion, 1993 ; 989p.
28. **GHNASSIA JP, SCHMIT JL et ASTRUC A.** Manifestations atypiques des infections à méningocoques. *Med Mal Inf* 1984 ; **14** : 69-73.
29. **GOTSCHLICH E C, GOLDSCHNEIDER I and ARTENSTEIN MS.** Human immunity to the *Meningococcus*. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J Exp Med* 1969 ; **129** : 1367 - 84.
30. **GREENWOOD BM.** The epidemiology of acute bacterial meningitis in tropical Africa. In : WILLIAM JD and BURNIE J, eds. *Bacterial meningitis*. London : Academic Press, 1987 ; p.61-91.

31. **HIGASHI GE, SIPPEL JE, GIRGIS NI, HASSAN A.** Counter immunoelectrophoresis : an adjunct to bacterial culture in the diagnosis of meningococcal meningitis. *Scan J Infect Dis* 1974 ; **6** : 233-5.
32. **INSERM.** Méningites bactériennes - stratégies de traitement et de prévention. Paris : INSERM 1996 ; 167p.
33. **INSTITUT PASTEUR.** Méningites bactériennes en Afrique : un programme recherche-action de cinq ans. *Lettre Inst Pasteur* 2003 ; **40** : 16.
34. **KOUMARE B.** Techniques de laboratoire pour la confirmation des épidémies de méningite, choléra et dysenterie bacillaire 1999 ; OMS/ICP/EMC/WAB.
35. **KUIPERS B, DOBBELSTEEN G, WEDEGE E, ALPHEN L.** Serological characterization. In : POLLARD AJ and MAIDEN MCJ, eds. *Methods in molecular medicine, Meningococcal disease : Methods and protocols.* Totowa : Humana Press Inc, volume 67 ; 2001 ; p.131-45.
36. **KYELEM N et al.** Les méningites à méningocoque non A-non C à Ouagadougou : analyse de 8 observations. *OCCGE – Informations* 1999 ; (111) : 23.
37. **LAPEYSSONIE L.** Épidémiologie des méningites purulentes en Afrique: méningites méningococciques. *Méd Afr Noire* 1979 ; **26** : 545-59.
38. **LAPEYSSONNIE L.** Méningite cérébro-spinale en Afrique. *Bull OMS* 1963 ; **28** : 103-14.
39. **Le CAMUS JL, TOURE JE, PICQ JJ et AUBRY P.** Les infections à méningocoques.
40. **Le MINOR L.** Bactériologie médicale. Flammarion Médecine Sciences 1982.
41. **MAYNARD SJ.** The population genetics of bacteria. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1991 ; **245** : 37-41.
42. **MINDADOU HT.** Importance de *Mycobacterium tuberculosis* dans la méningite à Niamey. Thèse Pharm Bamako 2003.
43. **NATHAN N, BOREL T et al.** Short-course treatment of meningococcal meningitis during epidemics : Equivalence trial of ceftriaxone versus long-acting chlorhamphenicol. *The Lancet* (sous presse).
44. **NATHAN N et al.** high sensitivity and specificity of Pastorex® latex agglutination test for *Neisseria meningitidis* serogroup A during a clinical trial in Niger (sous presse).
45. **NATO F et al.** Production of polyclonal and monoclonal antibodies against group A, B, C capsular polysaccharides of *Neisseria meningitidis* and preparation of Latex reagents. *J Clin Microbiol* 1991 ; **29** : 1447-52.
46. **NICOLAS P.** Épidémie de méningite à méningocoque de sérotype W135 en 2000 et 2001. *Med Trop* 2001 ; **61** : 259-61.

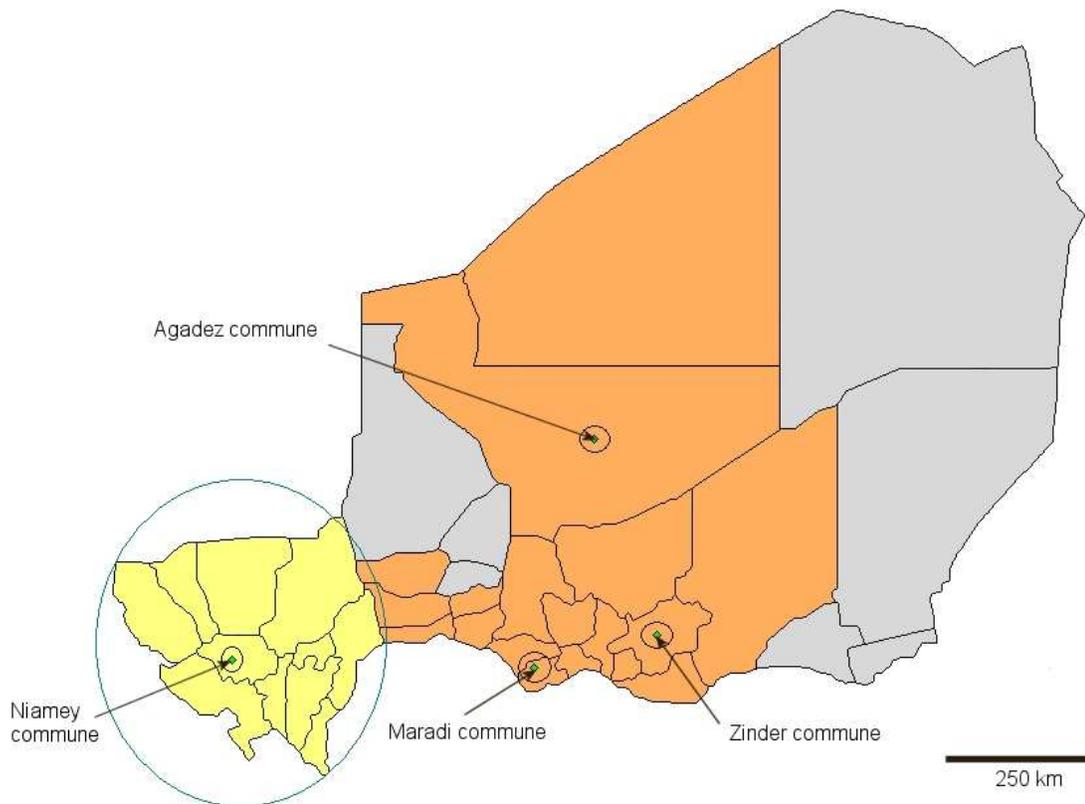
47. **NICOLAS P.** Les marqueurs utiles au suivi épidémiologique des méningocoques. *Med Trop* 2004 ; **64** : 215.
48. **NICOLAS P, DECOUSSET L, RIGLET V, CASTELLI P, STOR R and BLANCHET G.** Clonal expansion of sequence type (ST-)5 and emergence of ST-7 serogroup A meningococci, in Africa. *Emerg Infect Dis* 2001 ;**7** : 849-54.
49. **OMS.** Lutte contre les épidémies de méningite à méningocoque. Genève : OMS, 1999 ; 92p.
50. **OMS.** Manuel des techniques de base pour le laboratoire médical : examen du liquide céphalo-rachidien. Belgique : OMS, 1982 ; 487p.
51. **OMS.** Emergence de la méningococcie W135, Rapport d'une consultation de l'OMS. Genève : OMS, 2001. Document WHO/CDS/GAR/2002.1
52. **OMS.** Procédures opérationnelles standard pour la surveillance renforcée de à méningite en Afrique. Genève : OMS, 2005 ; 22p.
53. **OMS.** Techniques de laboratoire pour le diagnostic des méningites à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* b. Genève : 1999 ; OMS WHO/CDS/CSR/EDC/99.7
54. **OUMAROU I.** Aspects épidémiologiques des méningites purulentes à Niamey (à propos de 341 cas). Thèse Med Niamey 1998.
55. **PARENT du CHATELET I, ALONSO JM, TAHA MK.** Expansion clonale de *Neisseria meningitidis* W135. Implications épidémiologiques pour la ceinture africaine de la méningite. *Bull Soc Pathol Exot*, 2002 ; **95** : 323-5.
56. **PARENT du CHATELET I et al.** Bacterial meningitis in Burkina Faso : Surveillance using field-based polymerase chain reaction testing. *CID* 2005 ; **40** : 17.
57. **POOLMAN JT.** (1994) Nouveaux vaccins méningococciques. *Ann Inst Pasteur* 1994 ; **5** : 157-60.
58. **POPOVIC T, AJELLO G, FACKLAM R et al.** Techniques de laboratoire pour le diagnostic des méningites à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*. WHO/CDS/CSR/EDC/99.7 2000 ; 71p.
59. **REY M.** Aspects africains de la vaccination contre les méningites purulentes. *Med Trop* 1977; **37** : 179-87.
60. **REY M, OUEDRAOGO L, SALIOU P, PERINO L.** Traitement de la méningite cérébro-spinale épidémique par injection IM unique de chloramphénicol (suspension huileuse). *Med Mal Inf* 1986; **4** : 120-4.
61. **REY M, TRIAU R.** La vaccination dans les méningites purulentes.
62. **RIOU JY.** Introduction et historique : Infections méningococciques et gonococciques. *Ann Inst Pasteur* 1994 ; **5** : 95-7.

63. **RIOU JY.** Taxonomie de *N. meningitidis*. Med Trop 1983 ; **43** : 61-4.
64. **RIOU JY et GUIBOURDENCHE M.** Diagnostic bactériologique de *Neisseria meningitidis* – souches déficientes – espèces voisines. Méd Mal Inf 1984 ; **14** : 11-7.
65. **RIOU JY et GUIBOURDENCHE M.** Méthodes de laboratoire *Neisseria et Branhamella*. Institut Pasteur. 128 p.
66. **ROSENQVIST E et al.** Serogroup determination of *Neisseria meningitidis* by whole-cell ELISA, dot-blotting and agglutination. APMIS 1990 ; **98** : 501-6.
67. **ROSENSTEN N.E.** Global surveillance for meningococcal disease. In : POLLARD AJ and MAIDEN MCJ, eds. Methods in molecular medicine, Meningococcal disease : Methods and protocols. Totowa : Humana Press Inc, volume 67. 2001
68. **SCHANN F.** Chloramphenicol for meningitis and pneumoniae. The Lancet 1986 : 507.
69. **SIDIKOU F, DJIBO S, TAHA MK et al.** Polymerase chain reaction assay and bacterial meningitis surveillance in remote areas, Niger. Emerg Infect Dis 2003 ; **9** : 1486-8.
70. **SIPPEL JE, PRATO CM, GIRGIS NI, EDWARDS EA.** Detection of *Neisseria meningitidis* Group A, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* Antigens in Cerebrospinal Fluid Specimens by Antigen capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. J Clin Microbiol 1984 ; **20** : 259-65.
71. **SIROT D, PEIGUE La FEUILLE H et al.** Recherche d'antigènes solubles le LCR par CIE et agglutination au latex. Intérêt diagnostique et pronostic de ces méthodes. Med Mal Inf 1983 ; **13** : 507-14.
72. **SOUSOU M et YAYE A.** Importance relative des fréquences de méningites à pneumocoques et à *H. influenzae* b par rapport aux méningites à *Neisseria meningitidis* au sein de la CUN de 1985 à 1993. Mémoire technicien sup. labo. ENSP de Niamey 1994 ; 33p.
73. **SUMI M, MATHAI A, REUBEN S, SARADA C et al.** A comparative evaluation of dot immunobinding assay (Dot-Iba) and polymerase chain reaction (PCR) for the laboratory diagnosis of tuberculous meningitis. Diag Microbiol Infect Dis 2002 ; **42** : 135-8.
74. **SUGASAWARA RJ, PRATO CM, SIPPEL JE.** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with monoclonal antibody for detecting group A meningococcal antigens in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1984 ; **19** : 230-4.
75. **TAHA MK et ALONSO JM.** Actualité des infections méningococciques. In EYQUEM A., ALOUF J, MONTAGNIER L, eds. Traité de microbiologie clinique. 4<sup>e</sup> mise à jour.

76. **TAHA MK.** Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol. 2000 ; **38** : 855-7.
77. **TAHA MK, PARENT DU CHATELET I, SCHLUMBERGER M, SANOU I, DJIBO S.** *Neisseria meningitidis* serogroup W135 and A were equally prevalent among meningitis cases occurring at the end of 2001 epidemics in Burkina Faso and Niger. J Clin Microbiol 2002 ; **40** : 1083-4.
78. **TILTON RC, DIAS F, RYAN RW.** Comparative evaluation of three commercial products and counter immunoelectrophoresis for the detection of antigens in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol 1984 ; **20** : 231-4.
79. **TINSLEY C, NASSIF X.** Invasion of central nervous system by *Neisseria meningitidis*. In : POLLARD AJ and MAIDEN MCJ, eds. Methods in molecular medicine, Meningococcal disease : Methods and protocols. Totowa : Humana Press Inc, volume 67 ; 2001 ; p.635-647.
80. **TRIAU R, ROUMIANTZEFF M.** La vaccination anti-méningococcique. Méd Mal Inf 1984 ; **14** : 85-95.
81. **VANDEPITTE J, ENGBAEK K, PIOT P et HEUCK C.** Bactériologie clinique : liquide céphalo-rachidien. Genève : OMS, 1994 ; 121p.
82. **Van Der ENDE A et al.** Comparison of commercial diagnostic tests for identification of serogroup antigens of *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol 1995 ; **33** : 259-65.
83. **VICONI, VICARY P., ROGERIE F.** Épidémie de MCSm dans la région sanitaire de Rubengeri (Rwanda). Med Trop 1983 ; **43** : 155.
84. **WEDEGE E et al.** Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by co-agglutination, dot-blotting and ELISA. J Med Microbiol 1990 ; **31** : 195-201.

# ANNEXES

**Annexe 1:** Provenance des échantillons de LCR reçus au CERMES au cours des années 2003 et 2004 (Boisier P., CERMES.)



- Districts ayant expédié des LCR vers le CERMES
- District n'ayant fourni aucun LCR
- Districts où le CERMES a activement collecté des LCR

**Annexe2 : Mode opératoire de la PCR réalisé au CERMES pour le diagnostic étiologique des méningites bactériennes :**

**1 Préparation des Mix de réactifs**

### 1. 1 Préparation du Mix stock (QSP 2000µl)

Dans un tube Eppendorf de 2 ml, préparer un Mix de réactifs selon le tableau I. Les réactifs sont placés successivement dans un tube Eppendorf à l'aide de micropipettes. Homogénéiser en vortexant brièvement. Utiliser ou conserver à -20°C pendant 1 mois.

**Tableau I** : Préparation du mix stock (pour 2ml)

Réactifs	Quantité
PCR Buffer (pH 8,8) 10X	200 µL
Chlorure de magnésium: MgCl 50mM	200 µl
DMSO: (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40 µL
dNTP à 5mM	160 µL
Primer 1	3µl
Primer 2	3 µl
Eau distillée stérile	1394 µl

### 1. 2. Préparation du Mix test (solution extemporanée)

Ce Mix test est préparé à partir du Mix stock en y ajoutant la Taq polymérase.

### 2. Préparation de l'échantillon

La réalisation d'un test PCR nécessite une étape préalable de préparation des échantillons pour rendre l'ADN accessible aux amorces et à l'enzyme.

Il sera utilisé de préférence un échantillon de LCR mais on peut utiliser du sang ou du sérum (moins sensible)

Sous la hotte prélever 1,5 ml (ou moins) de LCR, transférer dans un tube eppendorf de 2 ml. Congeler s'il s'agit de LCR frais.

### 2. 1. Extraction de l'ADN bactérien

Décongeler l'échantillon à la température du laboratoire. L'extraction de l'ADN bactérien se fait en deux étapes :

- Ebullition : les échantillons sont placés sur des portoirs flottants et plongés dans un bain marie bouillant (100°C) pendant 5 min.
- Centrifugation : Les LCR bouillis sont centrifugés à 12000 tpm pendant 10 min pour éliminer les débris cellulaires.

Le surnageant est recueilli et aliquoté. L'échantillon est ainsi prêt pour être utilisé directement ou conservé à -20°C dans un congélateur placé dans la pièce de la chaîne de froid

## 2. 2. Addition de l'échantillon au Mix.

10µl du surnageant de l'échantillon à tester ou de chaque témoin sont ajoutés au Mix réactionnel (préalablement repartie en microtubes).

Refermer délicatement les tubes PCR en évitant tout contact de la main avec la partie interne du couvercle. Vortexer et passer à l'amplification.

## 3. Amplification et électrophorèse

**3. 1. Amplification** différentes séquences d'ADN cibles se fait selon des programmes bien définis (**Tableau II et III**) qui dépendent du gène à amplifier.

Placer les tubes PCR dans un thermocycleur et démarrer le programme d'amplification correspondant aux gènes à amplifier.

**Tableau II:** Programme amplification de la PCR multiplex (Nm, Sp, Hi)

	cycle 1	Cycle 2 à 35	Fin
1 dénaturation	94°C 3 min	92°C 40 sec	
2 hybridation	58°C 30 sec	58°C 30 sec	
3 extension	72°C 30sec	72°C 30 sec	72°C 10 min puis 4°C

**Tableau III:** Programme d'amplification de la PCR des capsules de Nm et du sérotype b de Hi

	cycle 1	Cycle 2 à 36	Fin
1 dénaturation	94°C 3 min	92°C 40 sec	
2 hybridation	51°C 30 sec	51°C 30 sec	
3 extension	72°C 30sec	72°C 30 sec	72°C 10 min puis 4°C

**Important** : Sortir les microtubes du thermocycleur, laisser refroidir et centrifuger quelques secondes pour faire tomber les microgouttelettes de condensation. Ceci évite la diffusion dans l'air des amplicons, responsables de contaminations.

### 3.2 Electrophorèse

#### *Préparation du gel d'agarose à 2%*

- Peser 2g d'agarose et ajouter 100 ml de tampon TBE dans un Erlenmeyer .
- Dissoudre l'agarose par chauffage dans un four à micro ondes ou dans un bain marie bouillant.
- Refroidir à une température de 65 °C
- Ajouter 10 µl de Bromure d'Ethidium (BET) à 10%
- Couler le gel dans le support réservé à cet effet où sont alignés des peignes
- Laisser durcir le gel
- Découper le gel à l'aide d'un scalpel dans le sens de la longueur de chaque peigne
- Enlever délicatement les peignes.
- Les gels ainsi prêts sont soit utilisés aussitôt ou conservés dans un bac contenant du tampon TBE1X et 10% de BET.

**Attention** : Le bromure d'Ethidium est cancérigène, toujours manipuler les gels avec des gants et jeter les déchets dans une poubelle à part.

Après quelques jours de conservation du gel dans le tampon TBE, des cristaux se forment dans les puits. Pour se débarrasser de ces cristaux (qui gênent le dépôt et la lecture des amplicons), laver chaque puit de gel avec le tampon de migration avec un micropipette avant le dépôt.

#### *Préparation des échantillons et dépôt dans le gel*

- Chauffer les tubes PCR 3 min à 65°C avant le dépôt pour séparer les brins d'ADN
- Déposer 3 µl de tampon de charge (Bleu de Bromophénol/glycerine/SDS) sur une bande de parafilm
- Ajouter 7 µl de produit pcr dans le bleu. Mélanger par aspirations et refoulements (2 fois) et déposer dans un puits du gel
- Exécuter cette opération pour chaque échantillon en changeant de pointe lors du passage à l'échantillon suivant.

Attention de ne pas déborder d'un puits à l'autre.

Voir en annexe la préparation des témoins

- Déposer le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du TBE 1X

**Tableau IV** : dépôt des amplicons dans les puits du gel

N° des puits du gel	1	2	3	4	5	6	7
Echantillons	Témoin de poids moléculaire	Témoin amplicons	Témoin négatif	Témoin positif	LCR1	LCR2	....

*Electrophorèse*

- Démarrer l'électrophorèse après avoir raccordé les électrodes à la source de tension de façon à ce que l'ADN amplifié puisse migrer du pôle négatif (borne noire) vers le pôle positif (borne rouge)
- Laisser migrer pendant 35 min à 120 V

*Révélation de l'ADN amplifié*

- En fin d'électrophorèse, couper la source d'électricité et retirer le gel de la cuve.
- Rincer le gel par passage dans un bain d'eau distillée
- Mettre les lunettes de protection anti-UV
- Examiner le gel sous le transilluminateur (lampe UV) et le photographier

*Lecture et interprétation*

- Vérifier les témoins positifs et négatifs sur la photo.
- Repérer les échantillons ayant donné un fragment d'ADN amplifié à la taille attendue, par comparaison de la bande observée à celles du témoin de poids moléculaire, du témoin « amplicons » (labo) et des témoins positifs.

Important : La PCR n'est valable que si le témoin négatif est réellement négatif et si toutes les bandes du témoin positif attendues sont visibles.

**Tableau V** Caractéristiques des Primers pour la PCR multiplex

Primers	Germe	Gène	T°C Annealing	Taille produit PCR (paire de bases)
98-6	Meningocoques	<i>crgA</i>	58°C	230
98-10				
99-10	S.pneumoniae	<i>lytA</i>	58°C	390
99-11				
H11	H. influenzae	<i>bexA</i>	58°C	343
H12				

**Tableau VI Caractéristiques des Primers pour la PCR Sérotype et Hib**

Primers	Sérotype	Gène	T°C Annealing	Taille produit PCR (pb)
98-28	A	mynB	51 °C	400
98-29				
98-19	B	<i>siaD</i>	51 °C	450
98-20				
98-17	C	<i>siaD</i>	51 °C	250
98-18				
98-32	W135	<i>siaD</i>	51 °C	120
98-33				
98-34	Y	<i>siaD</i>	51 °C	120
98-35				
98-30	Y/W135	<i>siaD</i>	51 °C	350
98-31				
B1	Hi sérotype b	cap	51 °C	480
B2				

**Préparation des témoins ADN****Préparation de l'ADN témoin positif : Méningocoques, Pneumocoques, Haemophilus influenzae b**

- Prendre 10<sup>6</sup> bactéries d'une culture témoin, (noter le numéro de la souche témoin)
- Ajouter 0,5 ml d'eau distillée stérile
- Congeler à - 20 °C
- Décongeler
- Faire bouillir 5 min à 100 °C pour décontaminer et lyser
- Centrifuger à 12000 tpm pendant 10 min
- Prendre le surnageant et le diluer 100X avec de l'eau distillée stérile
- 10µl de cet extrait sont utilisé comme témoin positif

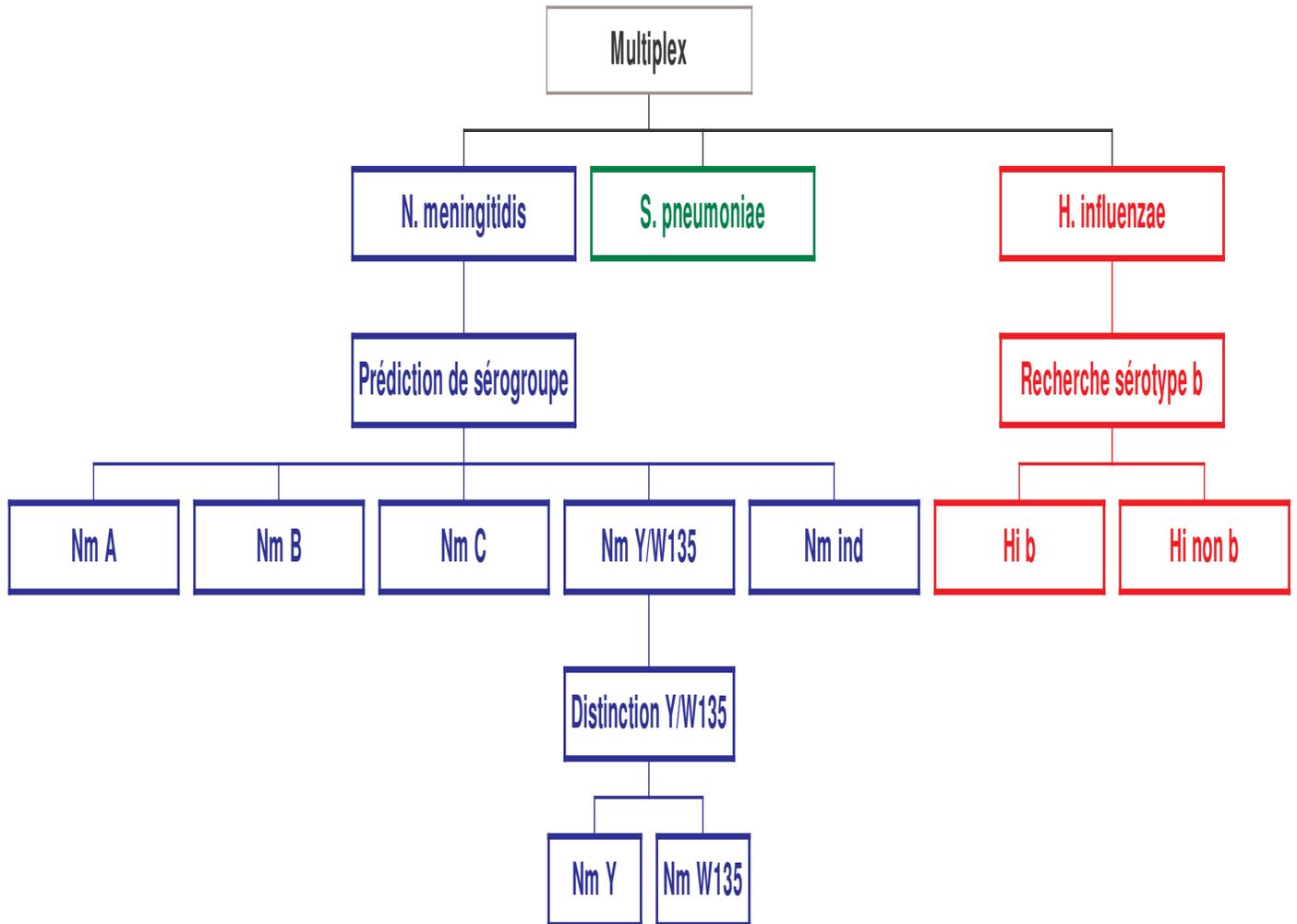
**Témoin négatif**

Pour le témoin négatif prendre uniquement 10 µl de mix test (cf page 3)

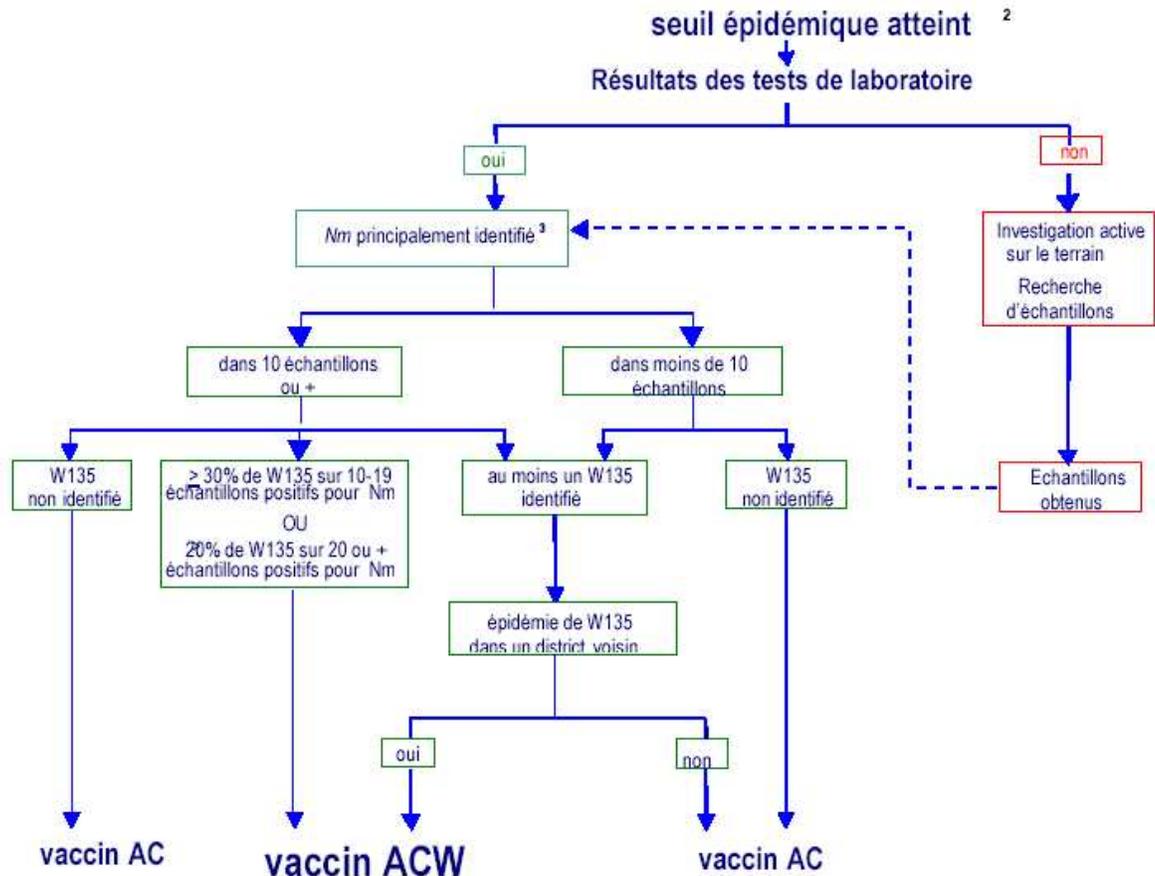
**Témoin de poids moléculaire.** Réf : 90506 IPP

Ajouter 10µl de tampon de charge au contenu du flacon de 50 µg et déposer 3 µl dans le 1<sup>er</sup> puits du gel

### Annexe 3 : Algorithme de décision PCR MENINGITES



## Annexe 4 : Arbre Décisionnel pour l'Utilisation du Vaccin Polysaccharidique (PS) Trivalent ACW dans les Pays de la Ceinture Africaine de la Méningite



### 2 Seuil épidémique

- Population supérieure à 30 000: incidence de 15 cas par 100 000 habitants par semaine, sur 1 semaine,

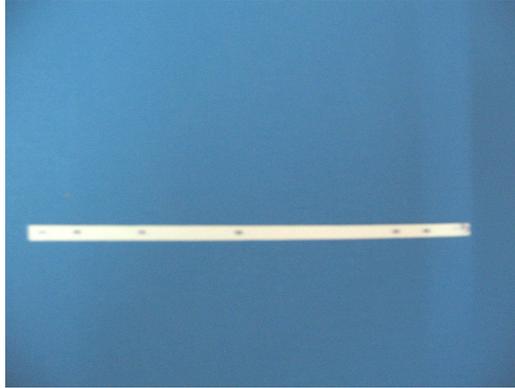
Cependant, quand le risque épidémique est élevé (absence d'épidémie depuis 3 ans ou franchissement

du seuil d'alerte tôt dans la saison sèche), le seuil épidémique recommandé est de 10 cas par 100 000 habitants par semaine, sur 1 semaine (*cf. article de référence pour plus de détails*).

- Population inférieure à 30 000: 5 cas par semaine ou doublement du nombre de cas sur une période de 3 semaines (*les autres situations doivent être évaluées au cas par cas selon le risque épidémique*).

- Pour des raisons opérationnelles, quand une épidémie est confirmée dans une zone voisine, le seuil d'alerte sert aussi de seuil épidémique.

**Annexes 5 : Résultat d'un Dot blot avec les réactifs anti *Neisseria meningitidis* A**



## **Fiche signalétique**

**Nom et Prénom:** MAMADOU M. AOUAMI Souleymane

**Pays d'origine :** Niger

**Titre:** Mise au point et évaluation d'une technique Dot blot pour le diagnostic et le sérogroupage de *Neisseria meningitidis* A et W135

**Année:** 2004-2005

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la faculté de médecine de pharmacie et d'odontostomatologie de l' Université de Bamako.

**Ville de soutenance:** Bamako

**Secteur d'intérêt:** Bactériologie ; Santé publique

## **Résumé**

Le but de notre étude était d'optimiser et d'évaluer le dot blot dans le diagnostic de la méningite à *Neisseria meningitidis* A et W135 au Niger.

Le PBS additionné de lait écrémé et des L.C.R frais filtrés ont été utilisés pour l'optimisation du dot blot. Des anticorps monoclonaux ont été utilisés pour l'identification de *N. meningitidis* A et W135 : ce sont des IgG anti-*Neisseria meningitidis* A et des IgM anti-*Neisseria meningitidis* W135. La sensibilité des anticorps a été étudiée vis-à-vis de souches de référence de *N. meningitidis* A et W135.

L'anticorps monoclonal K15-2 anti-*N. meningitidis* A et le conjugué anti-IgG ont donné des spots intenses à la dilution 1/500. L'anticorps monoclonal F2-3 anti-*N. meningitidis* W135 et le conjugué anti-IgM ont donné des spots intenses aux dilutions 1/250 et 1/100 respectivement. Les seuils de détection ont été de 62,5 ng/ml et 0,5 µg/ml de polysaccharides purifiés respectivement pour les sérogroupes A et W135.

La sensibilité du dot blot a été de 78,2 % pour l'anticorps K15-2 et 80 % pour l'anticorps F2-3. La spécificité du dot blot a été de 93,9 % et 100 % pour les anticorps K15-2 et F2-3 respectivement.

Les valeurs prédictives positives du dot blot ont été 92,4 % pour l'anticorps K15-2 et 100 % pour l'anticorps F2-3. Les valeurs prédictives négatives du dot blot ont été de 85,3 % et 98,8 % pour les anticorps K15-2 et F2-3 respectivement.

Le dot blot permet de passer des LCR en série.

**Mots-clés :** *Neisseria meningitidis* A et W135. Dot blot. Méningite. Niger.



## 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!**