

Ministère de l'Éducation

Université de Bamako

**Faculté de Médecine de Pharmacie et
d'OdontoStomatologie**

REPUBLIQUE DU MALI

Un peuple-Un but-Une foi

Thèse n° 20.....

Année 2002- 2003

Importance de *Mycobacterium tuberculosis* dans la méningite à Niamey

THESE

Présentée et soutenue publiquement le
et d'OdontoStomatologie du Mali

devant la Faculté de Médecine de Pharmacie

Par : M^{elle} **MINDADOU Habsatou Tassala**

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLOME d'ÉTAT

Membres du Jury :

Président : Professeur DIALLO Amadou

Membre : Docteur MAIGA Abdrahamane Sidèye

Codirecteur : Docteur CHANTEAU Suzanne

Directeur de thèse : Docteur I.MAIGA Ibrahim

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE
ANNEE UNIVERSITAIRE 2002 - 2003

ADMINISTRATION

DOYEN : MOUSSA TRAORE - PROFESSEUR

1^{ER} ASSESSEUR : MASSA SANOGO - MAITRE DE CONFERENCES

2^{EME} ASSESSEUR : GANGALY DIALLO - MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

SECRETARE PRINCIPAL : YENIMEGUE ALBERT DEMBELE - MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

AGENT COMPTABLE : MADAME FATOUMATA TALL - CONTROLEUR DES FINANCES

LES 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

1. PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alassane TOURE	Orthopédie - Traumatologie, Chef de D.E.R.
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco Obstétrique

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale
Mr Abdel Kader TRAORE Dit DIOP	Chirurgie Générale
Mr Alhousseïni Ag MOHAMED	O.R.L.
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie - Réanimation
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale

3. MAITRES DE CONFERENCES

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

4. MAITRES ASSISTANTS

Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE	Gynéco-Obstétrique
Mr. Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique
Mr Sadio YENA	Chirurgie Générale
Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale
Mr Issa DIARRA	Gynéco-obstétrique

5. ASSISTANTS CHEF DE CLINIQUE

Mr Mamadou L. DIOMBANA
Mr Sékou SIDIBE
Mr Abdoulaye DIALLO
Mr Tiéman COULIBALY
Mme TRAORE J. THOMAS
Mr Nouhoum ONGOIBA
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
Mr Djénèba DOUMBIA
Mr Tiemoko D. COULIBALY
Mr Souleymane TOGORA
Mr Mohamed KEITA

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

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. 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 **Chef de D.E.R.**

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Yénimégué Albert DEMBELE
Mr Anatole TOUNKARA
Mr Amadou TOURE
Mr. Flabou Bougoudogo

Chimie Organique
Immunologie
Histoembryologie
Bactériologie-Virologie

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Bakary M. CISSE
Mr Abdourahamane S. MAIGA
Mr Adama DIARRA
Mr Mamadou KONE
Mr.Massa SANOGO

Biochimie
Parasitologie
Physiologie
Physiologie
Chimie Analytique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mahamadou CISSE
Mr Sékou F.M. TRAORE
Mr Abdoulaye DABO
Mr Abdourahamane TOUNKARA
Mr Ibrahim I. MAIGA
Mr Moussa Issa DIARRA
Mr Amagana DOLO
Mr Kaourou DOUCOURE
Mr Bouréma KOURIBA
Mr Souleymane DIALLO
Mr Cheik Bougadari TRAORE

Biologie
Entomologie médicale
Malacologie, Biologie Animale
Biochimie
Bactériologie - Virologie
Biophysique
Parasitologie
Biologie
Immunologie
Bactériologie-Virologie
Anatomie-Pathologie

5. ASSISTANTS

Mr Mounirou BABY Hématologie
Mr Mahamadou A. THERA Parasitologie

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, **Chef de DER**
Mr Moussa TRAORE Neurologie
Mr Issa TRAORE Radiologie
Mr Mamadou M. KEITA Pédiatrie
Mr Hamar A. TRAORE Médecine Interne
Mr Dapa Aly DIALLO Hématologie

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Toumani SIDIBE Pédiatrie
Mr Bah KEITA Pneumo-Phtisiologie
Mr Boubacar DIALLO Cardiologie
Mr Somita KEITA Dermato-Leprologie
Mr Moussa Y. MAÏGA Gastro-entérologie
Mr Abdel Kader TRAORE Médecine Interne
Mr Siaka SIDIBE Radiologie

3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mamadou DEMBELE Médecine Interne
Mr Mamady KANE Radiologie
Mme 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 Hépatogastro-entérologie
Mr Moussa T. DIARRA Hépatogastro-entérologie
Mr Souleymane DIALLO Pneumologie
Mr Souleymane COULIBALY Psychologie
Mr Daouda K. MINTA Maladies Infectieuses
Mr Soungalo DAO Maladies Infectieuses

5. ASSISTANT

Mr Cheick Oumar GUINTO Neurologie

D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS

Mr Boubacar Sidiki CISSE	Toxicologie
Mr Gaoussou KANOUTE	Chimie analytique

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Arouna KEITA †	Matière Médicale
Mr Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Boukassoum HAIDARA	Législation
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie, Chef de D.E.R.

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Benoît KOUMARE	Chimie Analytique
Mr Drissa DIALLO	Matières Médicales
Mr Alou KEITA	Galénique
Mr Ababacar I. MAIGA	Toxicologie
Mr Yaya KANE	Galénique

D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

1. PROFESSEUR

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

2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

Mr Moussa A. MAIGA	Santé Publique
--------------------	----------------

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sanoussi KONATE	Santé Publique
--------------------	----------------

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Bocar G. TOURE	Santé Publique
Mr Adama DIAWARA	Santé Publique
Mr Hamadoun SANGHO	Santé Publique
Mr Massambou SACKO	Santé Publique
Mr Alassane A. DICKO	Santé Publique

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA	Botanique
Mr Bouba DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique
Mr Bokary Y. SACKO	Biochimie
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souleymane GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu
Mr Arouna COULIBALY	Mathématiques
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie Médicale
Mr Yaya COULIBALY	Législation
Mme Rokia SANOGO	Pharmacognosie
Mr Boubacar TRAORE	Pharmacognosie
Mr Saïbou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire
Mr Samba DIOP	Anthropologie Médicale
Mr Seydou DOUMBIA	Epidémiologie
Mr Oumar THIERO	Biostatistique
Mr Mangara M. BAGAYOGO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Guimogo DOLO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Djibril SANGARE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Mouctar DIALLO	Biologie Parasitologie

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. Doudou BA	Bromatologie
Pr. Babacar FAYE	Pharmacodynamie
Pr. Eric PICHARD	Pathologie Infectieuse
Pr. Mounirou CISSE	Hydrologie
Pr. Amadou Papa DIOP	Biochimie

A decorative horizontal scroll with ornate, curved ends at the top and bottom. The scroll is filled with a dense, stippled or textured pattern.

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A mon père, Mindadou MAKKO

Les mots sont insuffisants pour traduire toute ma reconnaissance envers vous. Ce travail est votre œuvre car vous avez toujours voulu le meilleur pour moi et vous n'avez ménagé aucun effort pour ma réussite. Puisse ce travail vous honorer et vous exprimer tout mon amour filial. Qu'ALLAH (SWT) vous bénisse, vous accorde longue vie et bonne santé, amine!

A ma mère, Adiza ALAMAÏ

Je sais que vous avez consenti d'énormes sacrifices pour que je puisse poursuivre des études supérieures. Vos qualités humaines, vos conseils pratiques, votre amour et surtout votre entière disponibilité et votre patience seront toujours pour moi un exemple à suivre. Qu'ALLAH (SWT) vous bénisse, vous accorde longue vie et bonne santé, amine!

A mes frères et sœurs

Adamou MINDADOU, Adams tu m'a toujours protégé envers et contre tous,
Ousmane MINDADOU, Abdoul-Salam MINDADOU, Aminatou MINDADOU Fanta MINDADOU, soyons toujours unis, solidaires et généreux.

A la famille Goubé KAHIA

Vous êtes ma deuxième famille, cher père, cher mère, puisse ce travail vous honorer!
Mamane, Ramatou, Fatchima, Habsatou, Balkissa et Ali puisse ce travail vous servir d'exemple!

A mes grands parents

Puisses vos âmes reposer en paix, amine !

Grand mère toi qui nous reste que DIEU t'accorde longue vie et santé, amine !

A mes oncles, tantes, cousins, cousines, neveux et nièces paternels et maternels

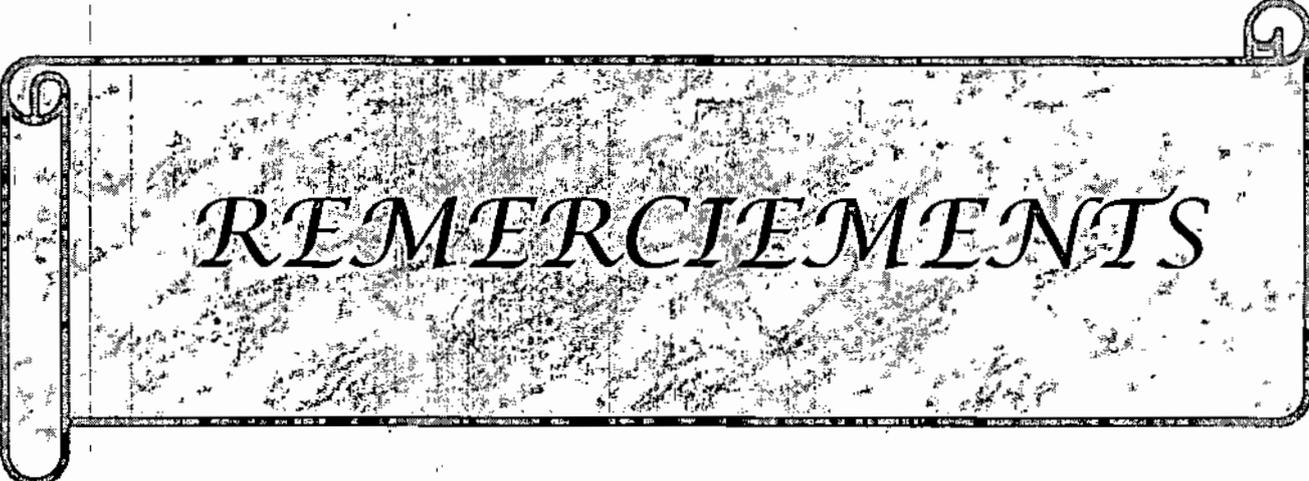
je ne peut pas tous vous citer, merci pour votre soutien constant trouvez ici l'expression de mon attachement affectueux, Mention spéciale à tonton Moïse!

A Marie ISSA DROUHIMOU

Tu es plus qu'une amie, tu es une sœur, qu'ALLAH (SWT) raffermisse davantage nos liens, amine! Merci pour la patience ma chérie!

A Sanoussi MALLAM SAIDOU

Darling tu m'as beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail, tu as supporté et partagé mes angoisses et mon anxiété! Merci pour ta compréhension!

A decorative horizontal scroll border with ornate, curved ends at the top and bottom. The scroll is filled with a dense, stippled or textured pattern.

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont :

A ALLAH

Le très clément, le très miséricordieux, qui m'a permis de réaliser ce travail et qui m'a toujours soutenu et aidé en me gratifiant de la chance, de la santé et de son aide. Louange à toi YA ALLAH!

Au peuple Malien, pour son hospitalité!

A tous les enseignants de la faculté de médecine et d'odontostomatologie du Mali : je vous suis très reconnaissante pour avoir contribué à ma formation, en me permettant de tirer profit de votre savoir et de vos expériences.

A toutes les connaissances et amis (es) du Mali et du Niger, Nana, Zabbaou, Cardo, Ami, Kia, Zara, Hannatou, Adama, Tankari, Salissou, Claustre, Aicha, Housseina, Fati, Bakary, Ben, Yousouf, Ibou, Cheick, Diouf, Bous, Bou, Ali, Youba, Wafi, Ramatou, Thiery, vous m'avez aidé, conseillé, supporté, recevez mes remerciements les plus chaleureux.

A tous mes camarades de promotion, bonne continuation et excellente carrière!

A tous le personnel du CERMES, pour votre disponibilité et votre gentillesse plus particulièrement à :

Fati SIDIKOU, pour les encouragements, l'assistance et la disponibilité dont vous avez fait preuve. Qu'ALLAH (SWT) vous récompense!

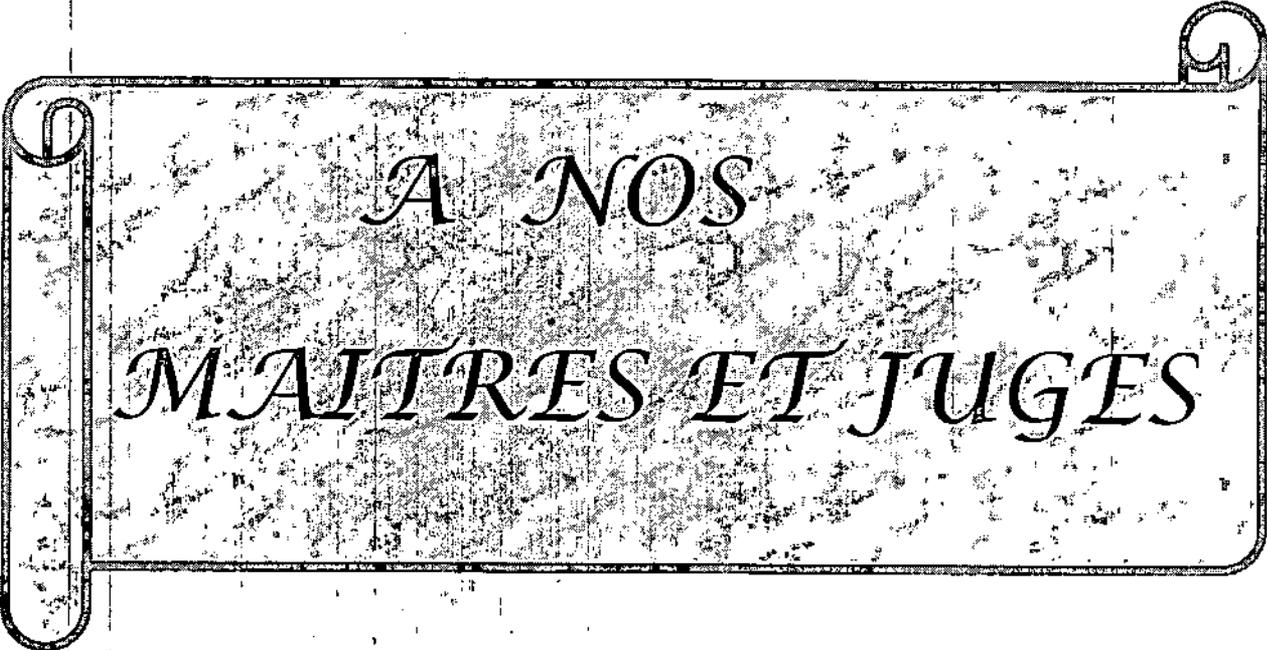
Pascal BOISIER, Votre apport dans l'élaboration de cette thèse à été d'une qualité inestimable. Qu'ALLAH (SWT) vous récompense!

Amina AMADOU, Ali EL.MAHAMANE, Ibrahim LAMINE, Nafissa KOUKA, Issaka SEYDOU, Mamane Sani HALADOU, Ramatou MOUSTAPHA, Fouréra ISSOUFOU, pour votre collaboration particulièrement agréable, efficace et amicale, vos réflexions, suggestions et commentaires, et votre aide. Qu'ALLAH (SWT) vous récompense!

A la famille Abdourhamane TOURE, J'ai trouvé auprès de vous la chaleur familiale qui me manquait, recevez ici toute ma gratitude.

A la famille Alio SABO, Doka KAHIA, Mani MASSAMA, Toudou ADAM, Elhadj Nouhou TAKE, Makori ALKALY, Mallam Kadri, Kamayé AMADOU, Doka KAKA, Abdoua MOUSSA, merci pour votre soutien et votre aide!

A, tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail et dont je n'ai pas pu citer le nom, qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements.

A decorative rectangular border with ornate scrollwork at the corners and ends, framing the text.

*A NOS
MAITRES ET JUGES*

A Notre Maître et président de jury

Professeur Amadou DIALLO

Professeur agrégé de Biologie animale.

Chargé de cours de Biologie animale et de Zoologie à la FMPOS.

Cher maître, vous nous avez fait l'honneur d'accepter de présider notre jury de thèse malgré vos multiples occupations.

Recevez ici notre reconnaissance et notre plus grand respect.

A Notre maître et codirectrice de thèse

Docteur Suzanne CHANTEAU

Docteur en Biologie.

Directrice du Centre de Recherche Médicale et Sanitaire (CERMES).

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

Vos conseils, votre rigueur et votre vivacité nous ont marqués, trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance et notre respectueux attachement.

A Notre Maître et juge de thèse

Docteur Abdrahamane SIDEYE MAÏGA

Maître de conférence en Parasitologie

Chef du service de Parasitologie à l'INRSP

Chargé de cours de Parasitologie à la FMPOS.

Malgré vos multiples activités, vous avez accepté de juger ce travail. Merci pour tous vos conseils avisés et votre grande disponibilité. Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A Notre Maître et directeur de thèse

Dr Ibrahim I. MAIGA,

Maître assistant de BactériologieVirologie à la FMPOS.

Chef du service du laboratoire de Biologie Médicale de l'Hôpital du Point G.

En dépit de vos occupations, vous avez accepté de diriger ce travail. Pendant la réalisation de cette thèse, nous avons eu l'occasion d'apprécier votre esprit de synthèse et vos qualités humaines. Cela a été un privilège et un grand plaisir de travailler avec vous. Avec nos remerciements, nous vous prions de trouver ici le témoignage de notre gratitude.

PLAN

I. INTRODUCTION - OBJECTIFS

II. GENERALITES

III. METHODOLOGIE

IV. RESULTATS

V. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

VI. CONCLUSIONS

VII. RECOMMANDATIONS

VIII. BIBLIOGRAPHIE

IX. FICHE SIGNALETIQUE

X. ANNEXES

SIGLES ET ABBREVIATIONS

ADN :	Acide Desoxyribo Nucleique
ADN H37RV :	ADN de Mycobacterium tuberculosis
AAMP :	Association d'Aide à la Médecine Préventive
ARN :	Acide Ribonucleique
BAAR :	Bacille acido-alcaloo-résistant
BCG :	Bacille Calmette et Guerin
BK :	Bacille de Koch
C3G :	Céphalosporine 3 ^{ème} Génération
CERMES :	Centre de Recherche Médicale et Sanitaire
CMB :	Concentration Minimale Bactericide
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CNAT :	Centre Nationale Anti-Tuberculeux
CO ₂ :	Dioxyde de carbone
CSI :	Centre de Santé Intégré
dNTP :	Nucléotides
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FLP :	FLP
<i>H.influenzae</i> / <i>H.i</i> :	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Hib</i> :	<i>Haemophilus influenzae b</i>
HNN :	Hôpital National de Niamey
INS1/INS2 :	Amorces ou oligonucleides
IV :	Intra Veineuse
LCMV :	Lymphocytic chorioMeningitis Virus
LCR :	Liquide Céphalo-Rachidien
LPS :	Lipopolysaccharide
min :	minute
<i>M.tuberculosis</i> :	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MIX :	Mélange réactionnel pour la PCR
mmHg :	Milimètre de mercure
<i>N.meningitidis</i> / <i>N.m</i> :	<i>Neisseria meningitidis</i>
NaNO ₂ :	Nitrate de sodium
Nbre :	Nombre
O ₂ :	Oxygène
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PCR :	Polymerase Chain Reaction
pH :	Potentiel d'Hydrogène
PNLT :	Programme National de lutte contre la tuberculose
PRM :	Pavillon Raymond Madras
QI :	Quotient Inhibiteur
RGP :	Recensement Général de la Population
<i>S.pneumoniae</i> / <i>S.p</i> :	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SIDA :	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
THA :	Trypanosomiase Humaine Africaine
TPHA :	Treponema Pallidum Haemagglutination Assay
UFC :	Unité Formant Colonie
UV :	Ultra Violet
VDRL :	Veneral Disease Research Laboratory
VIH :	Virus de l'Immunodéficiency Humaine
ZN :	Ziehl Neelsen

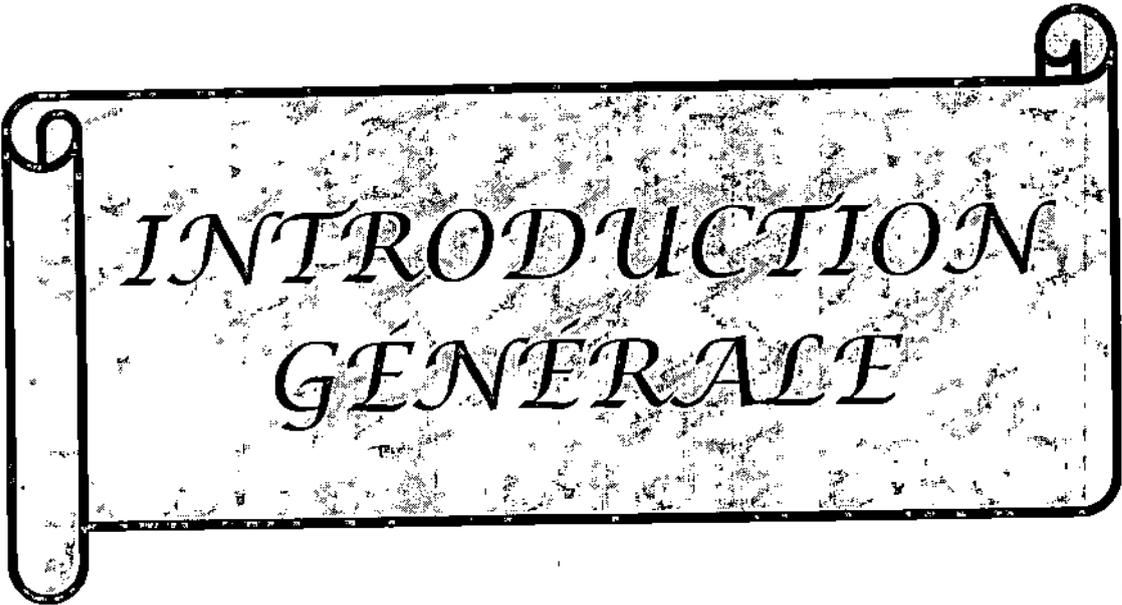
TABLE DES MATIERES

Pages

I-INTRODUCTION GENERALE	5
1-1 INTRODUCTION.....	5
1-2 OBJECTIFS.....	7
II. GENERALITES SUR LES MENINGITES.....	9
2.1 DEFINITION.....	9
2.2 HISTORIQUE	10
2.3 PHYSIOPATHOLOGIE	11
2.4 ÉPIDEMIOLOGIE	14
2.5 ÉTIOLOGIES	17
2.5.1 Les méningites purulentes.....	17
2.5.1.1 Les méningites à <i>Neisseria meningitidis</i>	17
2.5.1.2 Les méningites à <i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
2.5.1.3 Les méningites à <i>Haemophilus influenzae</i>	18
2.5.2 Les méningites à liquide clair.....	19
2.5.2.1 Les méningites virales	19
2.5.2.2 Les méningites bactériennes.....	19
2.5.2.2.1 Les méningites dues à <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
2.5.2.2.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
2.5.2.2.1.1.1 Caractères morphologiques et structuraux.....	20
2.5.2.2.1.1.2 Caractères cultureux	22
2.5.2.2.1.1.3 Caractères biochimiques.....	24
2.5.2.2.1.1.4 Pouvoir pathogène	25
2.5.2.2.1.1.4.1 Généralités sur la tuberculose.....	25
2.5.2.2.1.1.4.1.1 Physiopathologie	26
2.5.2.2.1.1.4.1.2 Symptomatologie.....	26
2.5.2.2.1.1.4.1.3 Formes cliniques.....	27
2.5.2.2.1.1.4.1.4 Diagnostic.....	28
2.5.2.2.1.1.4.1.4.1 Diagnostic bactériologique	28
2.5.2.2.1.1.4.1.4.1.1 Prélèvements.....	28
2.5.2.2.1.1.4.1.4.1.2 Microscopie directe	29
2.5.2.2.1.1.4.1.4.1.3 Culture	29
2.5.2.2.1.1.4.1.4.1.4 Méthodes d'identification.....	29
2.5.2.2.1.1.4.1.4.1.5 Antibiogramme.....	30
2.5.2.2.1.1.4.1.4.2 Diagnostic radiologique.....	30
2.5.2.2.1.1.4.1.4.3 Test tuberculinique	30
2.5.2.2.1.1.4.1.5 Traitement.....	31
2.5.2.2.1.1.4.2 La méningite tuberculeuse.....	31
2.5.2.2.1.1.4.2.1 La transmission.....	31
2.5.2.2.1.1.4.2.2 La formation du complexe primaire	32
2.5.2.2.1.1.4.2.3 Dissémination sanguine et formation de tuberculome cérébral	33
2.5.2.2.1.1.4.2.4 Symptomatologie de la méningite tuberculeuse	34
2.5.2.2.1.1.4.2.5 Diagnostic	34
2.5.2.2.1.1.4.2.6 Prophylaxie :.....	35
2.5.2.2.2 Les méningites à <i>Listeria monocytogenes</i>	36
2.5.2.2.3 La méningite brucellienne	37

2.5.2.2.4	La méningite au cours de la maladie de Lyme	37
2.5.2.2.5	La méningite à Leptospire	37
2.5.2.2.6	La méningite syphilitique	37
2.5.2.2.7	La méningite à streptocoques G	38
2.5.2.2.8	La méningite à méningocoque, pneumocoque ou Haemophilus	38
2.5.2.3	Les étiologies rares.....	38
2.5.2.3.1	Méningites fongiques.....	38
2.5.2.3.2	Méningites parasitaires.....	38
2.5.2.3.3	La méningite plastique.....	38
2.6	DIAGNOSTIC	39
2.7	TRAITEMENT	42
2.7.1	Antibiothérapie d'attaque.....	44
2.7.2	Antibiothérapie après identification du germe.....	45
2.7.2.1	Méningites à <i>Neisseria meningitidis</i>	45
2.7.2.2	Méningites à <i>Haemophilus influenzae b</i>	46
2.7.2.3	Méningites à <i>Streptococcus pneumoniae</i>	46
2.7.2.4	Les méningites à <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	47
2.7.3	Corticothérapie.....	48
III.	METHODOLOGIE	50
3.1	CARACTERISTIQUES DE LA ZONE D'ETUDE	50
3.1.1	Le Pays de l'étude : Le Niger.....	50
3.1.1.1	Présentation générale.....	50
3.1.1.1.1	Le milieu physique.....	50
3.1.1.1.2	Organisation administrative	51
3.1.1.1.3	La population.....	52
3.1.1.1.4	Les transports et les communications.....	53
3.1.1.1.5	L'économie.....	53
3.1.1.1.6	Le secteur de la santé.....	54
3.1.1.1.7	Situation épidémiologique	55
3.1.1.2	La ville de l'étude : la Communauté Urbaine de Niamey.....	57
3.1.1.2.1	Présentation générale de la ville de Niamey	57
3.1.1.2.2	Centre National Antituberculeux (CNAT).....	59
3.1.1.2.3	Hôpital National de Niamey	59
3.1.1.2.3.1	Pavillon Raymond Madras (pavillon D).....	60
3.1.1.2.4	Présentation du cadre d'étude : le CERMES (13).....	60
3.1.1.2.4.1	Historique	60
3.1.1.2.4.2	Organisation administrative.....	61
3.1.1.2.4.3	La surveillance microbiologique des méningites bactériennes par PCR au CERMES : création d'un réseau national de surveillance.	61
3.2	MATERIEL ET METHODES.....	64
3.2.1	Matériels	64
3.2.1.1	Réactifs.....	66
3.2.1.2	Les échantillons de l'étude	67

3.2.2 METHODE.....	69
3.2.2.1 Principe de la PCR.....	69
3.2.2.1 Extraction de l'ADN de Mycobacterium tuberculosis.....	70
3.2.2.2 Transfert et optimisation de la technique PCR du BK au CERMES.....	70
3.2.2.3 Protocole de la technique PCR du BK au laboratoire PCR du CERMES.....	71
IV. RESULTATS	77
4.1 LA DISTRIBUTION DES GERMES RESPONSABLES DE LA MENINGITE ANALYSES EN PCR MULTIPLEX ET/OU EN BACTERIOLOGIE DANS LA VILLE DE NIAMEY	77
4.2 RESULTATS GLOBAUX.....	78
4-2-1 Transfert de la technique PCR du BK au CERMES.....	78
4-2-2 OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE PCR DU BK DANS LES CONDITIONS DU CERMES.....	80
4-2-2-1 Optimisation de la concentration de Taq	80
4-2-2-2 Optimisation de la concentration de MgCl ₂	82
4-3 Analyse des LCR en PCR du BK.....	84
4-3-1 Exemple de vingt LCR analysés en PCR du BK.....	85
4-3-2 LCR positifs obtenus en PCR du BK.....	87
4.4 LA PREVALENCE DES GERMES DE LA MENINGITE.....	88
4.5 DONNEES CLINIQUES DES MALADES TUBERCULEUX.....	89
V. COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	91
5.1 LES MATERIELS ET LA METHODOLOGIE	91
5.2 LES RESULTATS	94
VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	100
VII. RECOMMANDATIONS	102
VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	105
IX. FICHE SIGNALETIQUE.....	116
X. ANNEXES	118



*INTRODUCTION
GÉNÉRALE*

I-INTRODUCTION GENERALE

1-1. INTRODUCTION

La méningite est une inflammation des méninges souvent causée par des bactéries.

La méningite bactérienne est une infection du système nerveux central, où le système de défense de l'organisme est absent. C'est une maladie grave, qui peut entraîner la mort en quelques heures ou laisser des séquelles neurologiques importantes surtout, lorsque le traitement est retardé (35).

Un diagnostic rapide permet l'instauration de l'antibiothérapie adéquate. Souvent, comme outil diagnostique, les données cliniques sont rares et non spécifiques, surtout chez les enfants, d'où l'utilisation de plusieurs méthodes diagnostiques.

Les analyses cytochimiques du liquide céphalo-rachidien même s'ils indiquent l'inflammation, ne sont ni assez sensibles, ni assez spécifiques.

La culture bactérienne est spécifique, mais c'est une technique lente cas de la culture de *Mycobacterium tuberculosis* dans la méningite tuberculeuse qui dure plusieurs semaines .

D'autres méthodes diagnostiques plus rapides telles que la microscopie, la sérologie et la détection des antigènes sont également utilisées (62). Mais ces méthodes sont limitées par une non spécificité et des réactions croisées.

Une autre technique, la Polymerase Chain Reaction (PCR) est préconisée dans le diagnostic des méningites bactériennes (49). Plusieurs travaux ont prouvé la sensibilité, la spécificité et la rapidité dans le diagnostic de la méningite par la PCR (12, 56, 72, 74).

Au Niger, la PCR est mise au point depuis octobre 2002 au laboratoire de biologie moléculaire du CERMES. Elle est employée pour la surveillance microbiologique des méningites bactériennes et le dépistage de l'émergence de *Neisseria meningitidis* W135 ou toute autre nouvelle souche de *Neisseria*.

Ainsi tous les LCR de la ville de Niamey sont recueillis et passés d'abord en bactériologie puis en PCR Multiplex (*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*). Le but de notre étude est de transférer la technique PCR du BK au CERMES afin de connaître l'importance de *Mycobacterium tuberculosis* dans la méningite à Niamey, capitale du Niger.

1-2 OBJECTIFS

Objectif général

Évaluer l'importance de la méningite tuberculeuse dans la ville de Niamey.

Objectifs spécifiques

- Transférer la technique PCR de détection de *Mycobacterium tuberculosis* au CERMES
- Optimiser la technique PCR sur les LCR dans nos conditions de laboratoire.
- Analyser les LCR provenant de malades suspects de méningite à Niamey.
- Déterminer la prévalence de *M.tuberculosis* et rechercher l'évolution clinique des malades tuberculeux.
- Déterminer la prévalence des germes de la méningite à Niamey pendant la période de l'étude.

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. Mais les méningites les plus fréquentes sont les méningites infectieuses.

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 céphalo-rachidien (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 qui comprend le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral.
- L'arachnoïde fait partie des méninges molles ou leptoméniges.
- L'espace sous-arachnoïdien contient le liquide céphalo-rachidien.
- La pie-mère appelée leptoméninge est constituée d'une membrane très fine qui adhère à la surface du système nerveux directement.

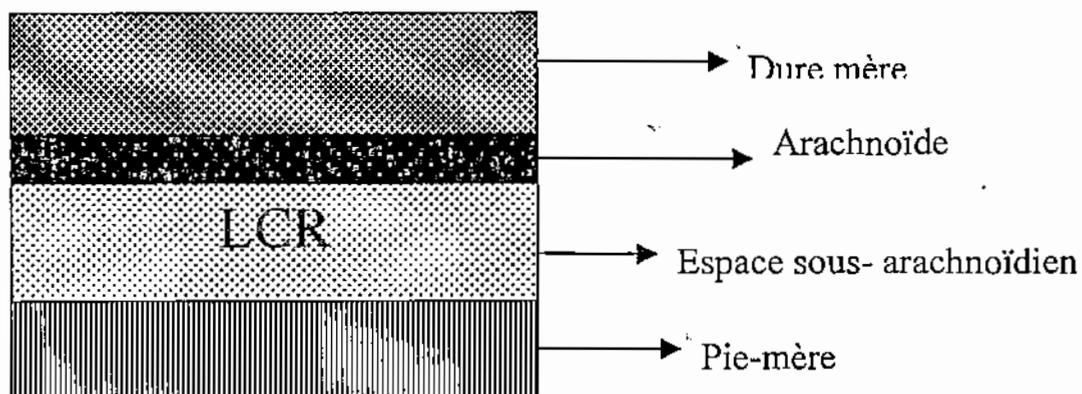


Figure 1 : Anatomie des méninges (20)

2.2 Historique (5)

L'histoire de la méningite pourrait remonter à l'époque d'**HYPPOCRATE** mais c'est à partir de 1805 que les idées sur cette maladie commencent à se faire claires avec **VIEUSSEUX** et **MATHEY**.

Dans les années suivantes, des épidémies semblables étaient signalées dans tous les pays de l'Europe et aux Etats-Unis dès 1806.

En 1836, une épidémie a frappé une garnison des Basses Pyrénées, dès cette époque, **TOURDES** sur les seules données de la clinique et de l'épidémiologie avait mis l'accent sur l'unité des symptômes et avait pressenti l'existence d'un seul et même agent causal.

De 1837 à 1849, une deuxième vague s'abat sur la France, l'Algérie, l'Italie, la Grèce, le Danemark, l'Irlande et les Etats-Unis.

De 1854 à 1861, c'est au tour des pays nordiques (Suède, Norvège), de 1862 à 1868 celui de l'Allemagne et de l'Europe centrale.

De 1885 à 1895, la méningite est partout sous sa forme épidémique en Europe, en Algérie, en Amérique et même aux Iles Fidji. C'est à **WEICHSELBAUM** que revient le mérite de la découverte de cet agent spécifique: le méningocoque dont il a donné les principaux caractères bactériologiques en 1887.

Peu après en 1890, **QUINCKE** introduisait la ponction lombaire dans la pratique. Dès lors, **FLEXMER** et **JOBLING** d'une part et **DOPTER** à l'Institut Pasteur d'autre part s'efforçaient à mettre au point en 1908 un sérum anti-méningococcique. L'avènement de la thérapeutique par les Sulfamides (**DOMAGK** et **TREFOMEL**, 1935) a amélioré considérablement le pronostic de la méningite. C'est surtout la découverte de la pénicilline (**FLEMING**, 1945) qui a apporté un appoint thérapeutique très intéressant.

2.3 Physiopathologie (35)

Un prérequis 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 teichoïque) 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 événements 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, participent à l'anoxie cérébrale et à de profondes altérations du débit sanguin cérébral.

Mais ceci prend du temps et les bacilles tuberculeux peuvent rester vivants et capables de se multiplier pendant de nombreuses années.

A partir du moment de l'infection, les bacilles passent dans le courant sanguin et sont transportés vers d'autres parties du corps.

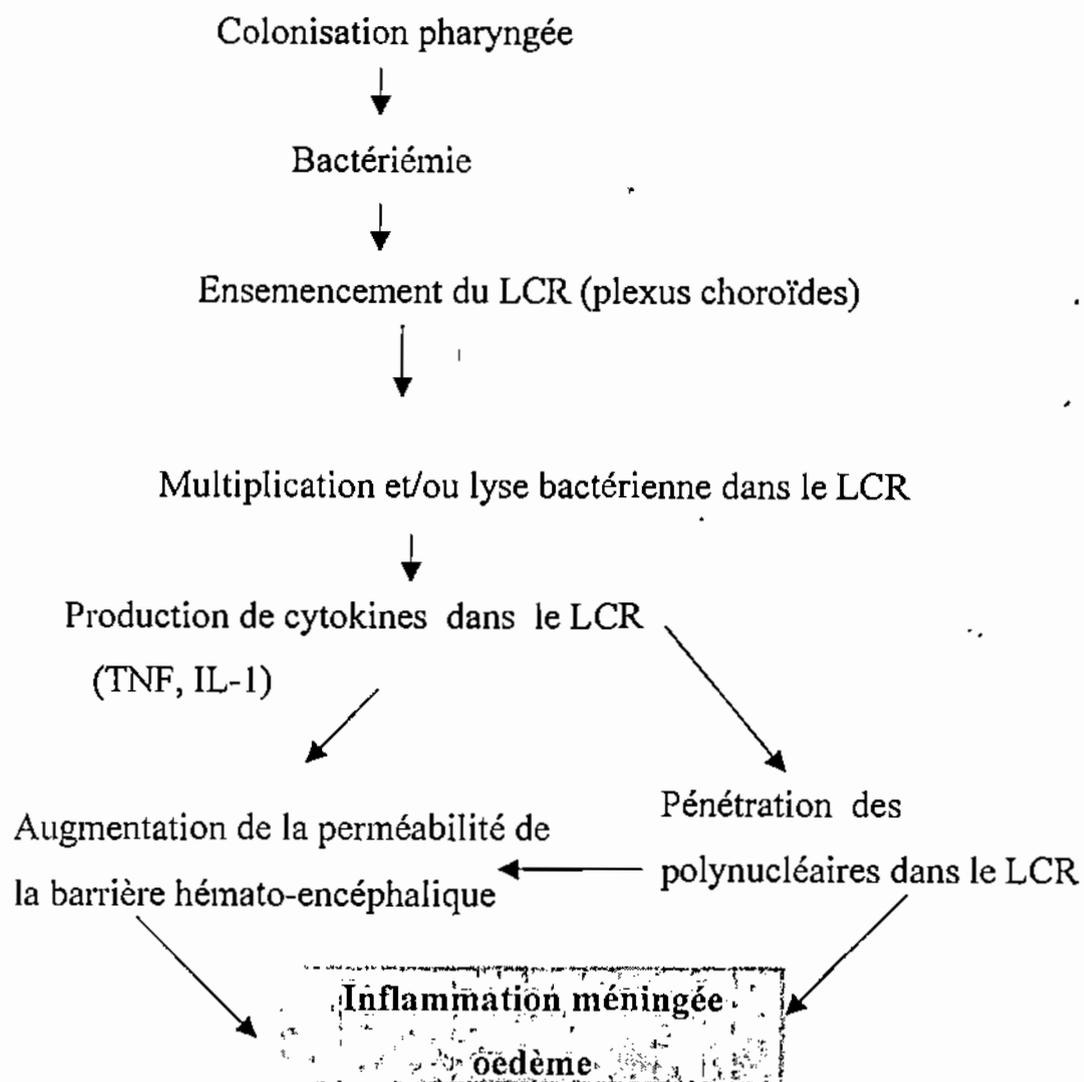
2.5.2.2.1.1.4.2.3 Dissémination sanguine et formation de tuberculome cérébral

Au cours et quelques temps après la formation du complexe primaire, des bacilles tuberculeux provenant du foyer primaire et des ganglions passent dans le courant sanguin. Ceci peut survenir soit par érosion d'un vaisseau sanguin soit par l'intermédiaire des lymphatiques.

Le courant sanguin transporte les BK dans les parties distales du corps comme le foie, la rate, les os, le cerveau et les reins.

La tuberculose du système nerveux débute lorsque les BK disséminent par le courant sanguin ou lors de la dissémination de la tuberculose miliaire. Ainsi donc les BK atteignent les tissus nerveux et il est possible qu'une réaction locale forme un tuberculome. Notons que les tuberculomes sont plus présents chez l'adulte que chez l'enfant. En raison de sa dimension et de la même façon qu'une tumeur maligne, le tuberculome entraîne des symptômes. Mais les tuberculomes peuvent se rompre dans l'espace sous-arachnoïdien et provoquer à ce niveau:

- une inflammation des méninges responsable du syndrome méningé,
- la formation d'une masse grise, gélatineuse à la base du cerveau, et
- l'inflammation et le rétrécissement des artères cérébrales.



Principales étapes de la physiopathologie des méningites bactériennes

2.4 Épidémiologie (20,35,56,61,65)

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 épidémique on distingue la méningite à méningocoque épidémiologique et les méningites endémo-sporadiques notamment les méningite à méningocoque, à Haemophilus, à pneumocoque et autres.

Les données épidémiologiques sur les méningites sont évolutives. Tous les ans on estime à 1 million le nombre de cas de méningite survenant dans le monde, dont 200.000 de ces cas sont fatals. 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 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.

Dans les pays en 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.

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.

En Afrique la méningite épidémique est surtout présente dans la zone dite "ceinture de la méningite" sub-saharienne.

Les épidémies surviennent pendant la saison sèche (décembre-juin), elles reviennent deux ou trois années de suite, avec une période d'interruption pendant la saison de pluies intermédiaires. 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 où les brassages de population sont plus prononcés.

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. 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 causés par le sérotype W135. Le Burkina Faso et le Niger étant des pays voisins dans la crainte d'une épidémie de méningites à W135 au Niger en 2003 une surveillance accrue des cas de méningites à W135 a été instaurée.

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.

En effet il existe une méthode qui utilise des taux d'incidence basés sur la population générale permettant de déterminer le seuil épidémique de la maladie:

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

Doublement des cas par rapport à la même période de référence.

African Meningitis Belt

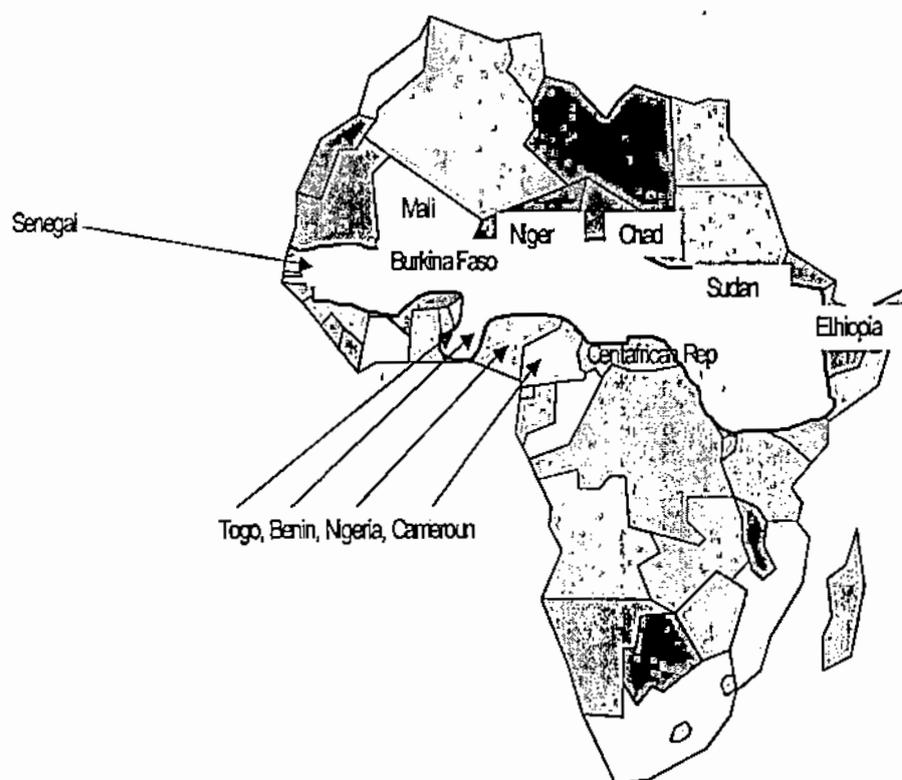


Figure 2 : La ceinture africaine de la méningite

Source : (20)

2.5 Étiologies

2.5.1 Les méningites purulentes

Elles sont également appelées méningites suppurées et elles sont causées le plus souvent par des bactéries : le méningocoque, le pneumocoque, le bacille de Pfeiffer, les staphylocoques, les salmonelles, les entérobactéries,etc.

2.5.1.1 Les méningites à *Neisseria meningitidis* (20,35,40)

La méningococcie ou infection à *N. meningitidis*, se présente sous deux formes cliniques : la méningite et la septicémie (méningococcémie). Les deux syndromes peuvent coexister mais seule la méningite est particulièrement fréquente.

Le rhino-pharynx de l'homme est la porte d'entrée habituelle du germe. La transmission s'effectue par contact direct, notamment avec les gouttelettes de Pflügge qu'émettent les voies respiratoires des sujets infectés (nez, gorge).

N. meningitidis ou méningocoque apparaît sous forme de diplocoques Gram négatif intraleucocytaires, encapsulé, dont les faces adjacentes, planes, donnent à l'ensemble un aspect de grain de café. Le méningocoque possède 12 sérogroupes : A, B, C, X, Y, Z, W135, 29E, H, J, I et L.

Une chimioprophylaxie courte par la rifampicine orale, une dose unique de ciprofloxacine ou une injection de ceftriaxone permettent d'éliminer le portage rhinopharyngé de *N. meningitidis*. Mais la chimioprophylaxie de masse n'est pas recommandée en situation épidémique.

La vaccination représente en fait le seul moyen de prévention efficace, on dispose actuellement de certains vaccins polysaccharidiques:

Vaccins A et C ; Vaccins A, C, Y et W135 et Vaccin A, C et W135.

Des recherches sur de nouveaux vaccins plus efficaces sont actuellement en cours.

2.5.1.2 Les méningites à *Streptococcus pneumoniae* (27,35,64)

Le Streptocoque est le deuxième agent responsable de méningite purulente après le méningocoque. *S. pneumoniae* est transmis par voie respiratoire. Les méningites des âges extrêmes de la vie; nourrisson, jeune enfant (moins de 2 ans) et personne âgée (plus de 60 ans) sont en générale dues à *Streptococcus pneumoniae* et pratiquement chaque individu a été en contact avec des pneumocoques avant l'âge de 2 ans.

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

Il existe un vaccin anti-pneumococcique polyvalent, le Pneumo 23® (préparé à partir des polysides capsulaires des sérotypes les plus fréquemment rencontrés.

2.5.1.3 Les méningites à *Haemophilus influenzae* (27,35,64)

La méningite à *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) survient presque exclusivement chez l'enfant de moins de 5 ans, et la plupart des cas sont dues à *Haemophilus influenzae* de type b ou Hib. Il appartient à la flore commensale des voies respiratoires de l'enfant et de l'adulte (Dabernat et Sanson-Le Pors, 1990). La colonisation débute très tôt après la naissance et plus de 80% des enfants deviennent ainsi porteurs du germe à l'âge de 3 ans. La bactérie est transmise par voie respiratoire comme *S. pneumoniae*.

H. influenzae découvert en 1890 par PFEIFFER est un coccobacille polymorphe, à Gram négatif, immobile, capsulé ou non, non sporulé.

Dans le LCR ils se présentent sous forme de longs bâtonnets.

Il existe un vaccin pour lutter contre la méningite à Hib.

2.5.2 Les méningites à liquide clair

Les méningites à liquide clair sont aiguës et bénignes car le plus souvent elles sont causées par des virus, mais elles peuvent être mortelles quand elles sont dues aux bactéries, et exceptionnellement elles sont dues à certains champignons, parasites et processus néoplasiques.

2.5.2.1 Les méningites virales (50)

Les entérovirus (*Echovirus*, *Coxsackievirus*) sont responsables d'environ 80 % des méningites virales identifiées.

La fréquence de *Mumps virus* (le virus des oreillons) a diminué depuis la généralisation de la vaccination.

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

Le VIH peut aussi être responsable de méningite lors de la primo-infection.

On peut rencontrer des virus plus rares comme les arbovirus, les poliovirus, les adénovirus, et le LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus).

2.5.2.2 Les méningites bactériennes

2.5.2.2.1 Les méningites dues à *Mycobacterium tuberculosis*

2.5.2.2.1.1 *Mycobacterium tuberculosis* (1,15,18,24,31,33,45,38,50)

Mycobacterium tuberculosis ou bacille de Koch (BK) est découvert en 1882 par Robert KOCH dans les expectorations des malades tuberculeux.

Le milieu de culture des mycobactéries est mis au point en 1902 par DORSET. De 1908-1921 CALMETTE et GUERIN réalisent le vaccin de la tuberculose, le BCG (Bacille de CALMETTE-GUERIN).

Le premier antituberculeux, la streptomycine est découvert en 1944 par WAKSMAN.

En 1952 c'est la découverte du deuxième antituberculeux, l'isoniazide (Rimifon®) et en 1967 c'est celle du troisième, la rifampicine.

La classification de *Mycobacterium tuberculosis* dans le Bergey's manual :

Ordre: *Actinomycetale*

Famille: *Mycobacteriaceae*

Genre: *Mycobacterium*

Espèce: *tuberculosis*

2.5.2.2.1.1.1 Caractères morphologiques et structuraux

L'homme est le principal réservoir de *Mycobacterium tuberculosis* mais il peut infecter certains animaux domestiques (chat, chien, perroquet). C'est un germe fragile qu'on ne trouve pas à l'état saprophyte dans la nature, cependant dans les expectorations telles que les crachats il peut rester vivant pendant plusieurs jours.

Mycobacterium tuberculosis est une bactérie intracellulaire facultative, que l'on rencontre généralement dans les macrophages. Le BK contient du peptidoglycane sur sa membrane cytoplasmique mais il n'est pas identifiable par coloration de Gram, effectivement il est faiblement Gram+ ou alors ne donne aucune coloration.

La morphologie de *Mycobacterium tuberculosis* est appréciée après coloration de Ziehl-Neelsen (spécifiques des mycobactéries). On obtient des BAAR (bacille alcalo-acido résistant), bacilles colorés en rouge sur fond bleu, en forme de bâtonnets plus au moins long (2 à 5 μ m), fins (0,3 μ m de diamètre), droits ou légèrement incurvés. On remarque des BAAR isolés, accolés par deux, en amas.



Figure 3 : *Mycobacterium tuberculosis* après coloration de ZIEHL-NEELSEN, BAAR colorés en rouge. Source : (38)

Mycobacterium tuberculosis peut être également coloré par l'auramine phéniquée, il devient alors fluorescent sous l'influence de la lumière UV.

Le BK a une structure unique parmi les procaryotes, déterminante dans la virulence. Son complexe pariétal contient du peptidoglycane (muréine, mucopeptide). Au peptidoglycane vient s'ajouter un lipopolysaccharide (mycolate d'arabino-galactane) et en plus des lipides complexes. Les composants lipidiques majeurs contenus dans la paroi sont:

Les acides mycoliques, ce sont d'énormes molécules d'acides gras ramifiés que l'on trouve essentiellement au niveau de la paroi des genres *Mycobacterium*, *Nocardia* (acides nocardiques) et *Corynebacterium* (acides corynémycoliques). Ces lipides représentent 50% du poids sec de l'enveloppe bactérienne. Les acides mycoliques sont des puissantes molécules hydrophobes qui forment une coquille lipidique autour de l'organisme de l'hôte affectant les propriétés de perméabilité à la surface de cette cellule. On pense que ces acides sont déterminants dans la virulence de la bactérie. Probablement les acides mycoliques préviennent les mycobactéries de l'attaque des protéines cationiques des lysosomes et des radicaux hydrogénés dans le granule phagocytaire.

Ces acides protègent également les mycobactéries extracellulaires de l'action du complément à leur surface. Ce sont les seuls constituants acido-résistants des mycobactéries.

Le cord-factor, c'est un dimycolate de tréhalose responsable de la formation de la corde serpentine. La production de ce facteur est abondante uniquement sur des BK virulents.

Les cires-D, ce sont les majeurs composants des adjuvants complets de Freud.

2.5.2.2.1.1.2 Caractères cultureux

Mycobacterium tuberculosis est un germe très exigeant qui se multiplie lentement à pH compris entre 6,7 et 7,0 et à une température optimale de 37 °C. Ainsi, il est aérobic strict, ne se développant que lorsque la pression partielle en O₂ est supérieure à 100 mmHg et la pression partielle en CO₂ est d'environ 40 mmHg. Cela explique son développement dans les niveaux très aérés (poumons) et bien irrigués (vertèbres, reins). Cette bactérie comme toutes les mycobactéries ne pousse pas sur un milieu ordinaire mais sur des milieux spécifiques:

- Milieu de LÖWENSTEIN-JENSEN

Solution 1:

- Phosphate monopotassique	2,4 g
- Sulfate de magnésium	0,24 g
- Citrate de magnésium	0,60 g
- L- Asparagine	3,60 g
- Glycérine	12 ml
- Eau distillée (stérilisé à l'autoclave)	600 ml

On ajoute 30 g de fécule de pomme de terre (stérile) à la solution 1 et on chauffe la solution ainsi obtenue à 100 °C pendant 30 minutes puis on maintient cette solution à 56 °C.

A cette solution on ajoute 1 litre d'œufs (cassés stérilement) et 20 ml de vert de malachite à 2 %, on distribue ce milieu homogène à raison de 6 ml par tube et on laisse coaguler 40 minutes à 85 °C.

– *Milieu de COLETOS*

En plus des ingrédients contenus dans le milieu de LÖWENSTEIN-JENSEN ce milieu contient des oligo-éléments, du pyruvate de sodium et un supplément en jaune d'œuf.

Les mycobactéries poussent plus vite sur ce milieu, leur temps de division étant de 20 h en moyenne soit 60 fois plus long que celui d'*Escherichia coli*.

Mycobacterium tuberculosis pousse en 21 à 28 jours et donne des colonies de 2 à 3 mm de diamètre, rugueuses, beiges, irrégulières, bombées, ayant un aspect de choux-fleur, se détachant du milieu de culture en se brisant par blocs et se dissociant difficilement.



Figure 4 : Colonies de *Mycobacterium tuberculosis* sur milieu de LÖWENSTEIN-JENSEN. Source : (38)

2.5.2.2.1.1.3 Caractères biochimiques

Les mycobactéries sont caractérisées par leur grande richesse en lipides, soit 60% du poids sec. Cette richesse en lipides permet aux mycobactéries de résister plus que les autres bactéries à l'action des acides, des bases, de nombreux antibiotiques et antiseptiques, et même à la phagocytose.

➤ Recherche de la catalase

Avec une pipette Pasteur stérile on dépose 0,5 ml de tampon phosphate M/15, pH 7 dans deux tubes à hémolyse. On prélève la masse bactérienne du milieu de culture avec une anse et on l'émulsionne dans le tampon. On place l'un des tubes dans un bain-marie et on le chauffe à 68°C pendant 20 minutes (le temps et la température sont importantes). L'autre tube est laissé à la température ambiante de la salle. On retire le tube du bain-marie et on le laisse refroidir à la température de la salle. Dans les deux tubes, on ajoute 0,5 ml d'un mélange à volumes égaux de Tween 80 et d'eau oxygénée. On observe la formation de bulles apparaissant à la surface du liquide en cas de réaction positive, on attend 20 minutes avant de considérer le résultat négatif.

Mycobacterium tuberculosis a une catalase thermolabile ; en effet il est catalase + à 25 °C et catalase - à 68 °C.

➤ Recherche de la niacine

Le test à la niacine est le test le plus fiable pour identifier le bacille de Koch ; en effet il est niacine +.

Le test à la niacine consiste à introduire 1,5 ml d'eau distillée stérile dans un tube contenant une culture de *Mycobacterium tuberculosis* et à laisser l'extraction se faire pendant 2 heures. On récupère à l'aide d'une pipette Pasteur cette eau (0,5 ml) que l'on place dans un autre tube à hémolyse stérile. Dans ce dernier tube on ajoute 2 gouttes de bromure de cyanogène et 2 gouttes d'aniline.

Il apparaît immédiatement une coloration jaune caractéristique de la niacine. Si on remplace l'aniline par la benzidine on obtient une coloration rouge.

☉ Test de la réduction des nitrates

Réactif 1

Acide acétique	285 ml
Eau distillée	715 ml
Acide sulfanilique	8 g

Réactif 2

Acide acétique	285 ml
Eau distillée	715 ml
N-N'-diméthyl naphthylamine	6 ml

Ce test consiste à écraser une anse pleine de culture de *Mycobacterium tuberculosis* dans 1 ml de solution de nitrate de sodium (NaNO_2). On laisse incuber à 37 °C pendant 2 heures, puis on ajoute 0,25 ml du mélange des réactifs 1 + 2, volume à volume. On laisse les tubes à température ambiante et après 20 minutes on fait la lecture. On observe un virage à la couleur rouge.

2.5.2.2.1.1.4 Pouvoir pathogène

2.5.2.2.1.1.4.1 Généralités sur la tuberculose

La tuberculose reste une affection fréquente et mortelle dans le monde. L'OMS estime que le nombre total de cas de tuberculose dans le monde va augmenter de 7,5 millions en 1990 à 10,2 millions en l'an 2000. Le nombre total de décès causés par la tuberculose va passer de 2,5 millions à 3,5 millions. L'expansion de la tuberculose en rapport avec le développement de l'épidémie de VIH-SIDA pose un problème majeur de santé publique en Afrique Subsaharienne.

2.5.2.2.1.1.4.1.1 Physiopathologie

La transmission, la formation du complexe primaire et la dissémination sanguine sont les mêmes que ceux de la méningite tuberculeuse, qui dérive de la tuberculose.

Après la contamination, le plus souvent aérienne, parfois digestive, les bacilles sont phagocytés par les macrophages et se multiplient à l'intérieur de ces cellules.

Ces bacilles ne libèrent aucune substance toxique au cours de leur multiplication leur pouvoir pathogène est fonction uniquement de leur virulence. Et celle-ci est liée d'abord à la capacité du bacille de se multiplier à l'intérieur des macrophages de l'organisme hôte. L'infection présente donc des manifestations différentes chez un sujet qui n'a jamais été infecté et chez une personne qui a déjà été infectée auparavant, la tuberculose se manifeste de deux façons:

✦ La primo-infection tuberculeuse : c'est la maladie des personnes qui sont infectées pour la première fois. Elle est caractérisée par le développement d'une inflammation aiguë localisée, suivie d'une réponse inflammatoire plus chronique.

✦ La tuberculose secondaire généralement due à la réactivation des germes quiescents à l'intérieur de l'organisme. C'est l'aspect caractéristique de la tuberculose, maladie chronique associée à des lésions tissulaires étendues. Le malade devient alors infectieux et capable de transmettre la tuberculose à d'autres personnes.

2.5.2.2.1.1.4.1.2 Symptomatologie

Les symptômes les plus importants pour le diagnostic de la tuberculose :

- Toux persistantes pendant plus de trois semaines
- Expectoration

Les malades atteints de tuberculose pulmonaire peuvent présenter d'autres symptômes, respiratoires ou généraux.

Respiratoires :

- Hémoptysie
- Fièvre
- Sifflements localisés
- Rhumes fréquents

Généraux :

- Perte de poids
- Fièvre et sueurs
- Fatigabilité
- Perte d'appétit

2.5.2.2.1.1.4.1.3 Formes cliniques

Tuberculose pulmonaire

- ♦ Tuberculose pulmonaire
- ♦ Epanchement pleural tuberculeux et empyème
- ♦ Tuberculose miliaire

Tuberculose extrapulmonaire

- ♦ Tuberculose du tractus respiratoire supérieur: épigllotte, larynx, pharynx
- ♦ Tuberculose de la bouche, des amygdales et de la langue
- ♦ Méningite tuberculeuse
- ♦ Tuberculose du péricarde
- ♦ Tuberculose des ganglions lymphatiques
- ♦ Tuberculose des os et des articulations
- ♦ Tuberculose du rein et des voies urinaires
- ♦ Tuberculose du tractus génital féminin/masculin
- ♦ Tuberculose intestinale/péritonéale
- ♦ Tuberculose des surrénales
- ♦ Tuberculose de l'œil
- ♦ Tuberculose cutanée

Tuberculose/SIDA

Le VIH et la tuberculose sont étroitement liés. Les tests effectués dans certains pays en développement montrent que jusqu'à 70% des personnes qui ont la tuberculose sont infectées par le VIH. En outre, jusqu'à 50% des personnes vivant avec le VIH peuvent s'attendre à développer une tuberculose. Dans le monde entier, 36,1 millions de personnes sont infectées par le VIH et 95% d'entre elles vivent dans des pays en développement où les taux de tuberculose sont les plus élevés. Près de 13 millions de personnes sont infectées à la fois par le VIH et par le germe qui cause la tuberculose.

2.5.2.2.1.1.4.1.4 Diagnostic

2.5.2.2.1.1.4.1.4.1 Diagnostic bactériologique

La mise en évidence des bacilles acido-alcoolo résistants (BAAR) à l'examen microscopique, la culture et l'antibiogramme sont les piliers et les méthodes de référence du diagnostic bactériologique de la tuberculose.

2.5.2.2.1.1.4.1.4.1.1 Prélèvements

Les prélèvements dans lesquels on peut rechercher des mycobactéries sont très variés à l'image des localisations de la maladie. En règle générale il devra se faire en dehors de toute antibiothérapie. Le choix des prélèvements doit privilégier les produits de l'expectoration provoquée c'est-à-dire le tubage gastrique, la fibroscopie bronchiqueetc. Notons aussi que, le prélèvement peut également privilégier le sang au cours des infections chez les immunodéprimés ou alors le LCR en cas de méningite tuberculeuse.

Dans tous les cas, les prélèvements d'aspect salivaire ne peuvent convenir et doivent être écartés.

2.5.2.2.1.1.4.1.4.1.2 Microscopie directe.

La recherche microscopique des mycobactéries s'effectue après coloration de Ziehl-Neelsen à la fuchsine phéniquée ou après coloration fluorescente à l'auramine. Ces deux méthodes mettent en évidence la présence ou non de BAAR dans le prélèvement et contribuent au diagnostic présomptueux précieux et souvent suffisant pour commencer une antibiothérapie de première intention.

2.5.2.2.1.1.4.1.4.1.3 Culture

C'est un excellent moyen diagnostique, du fait de sa sensibilité : en théorie il suffit d'un BAAR dans l'échantillonensemencé pour que la culture soit positive. Ainsi le rendement de la culture des mycobactéries dans les produits pathologiques est meilleur que celui de l'examen microscopique.

2.5.2.2.1.1.4.1.4.1.4 Méthodes d'identification

L'identification des mycobactéries est fondée sur des caractères morphologiques, cultureux et métaboliques.

Méthodes classiques :

Les méthodes classiques se basent généralement sur l'obtention d'une culture positive préalable (étape nécessitant 3 à 4 semaines d'incubation) et l'identification qui amène à une série de tests biochimiques et demande 2 à 4 semaines supplémentaires.

Méthodes modernes :

De nouvelles méthodes sont actuellement disponibles, elles tendent à diminuer les délais des méthodes classiques. Il s'agit de :

- méthodes chimiques : HPLC, chromatographie gazeuse, spectrométrie de masse.
- méthodes faisant appel au génie génétique : sonde à ADN, PCR, FLP.
- méthodes immunologiques : ELISA

2.5.2.2.1.1.4.1.4.1.5 Antibiogramme

L'antibiogramme est le complément habituel du diagnostic bactérien de la tuberculose. Il est indiqué de faire un antibiogramme avant la mise sous traitement chez :

- ☒ les malades porteurs fréquemment d'une résistance dite acquise aux antibiotiques.
- ☒ les malades qui font une rechute de tuberculose après un premier traitement antibiotique qui a semblé efficace et chez lesquels une résistance bactérienne peut avoir été la cause de la rechute.
- ☒ les malades qui n'ont jamais été traités pour déceler une résistance dite primaire.

2.5.2.2.1.1.4.1.4.2 Diagnostic radiologique

La radiographie ne permet pas de diagnostiquer la tuberculose avec certitude, d'autres maladies ont souvent un aspect très similaire. Néanmoins certaines opacités radiologiques font suspecter fortement la tuberculose:

- des mouchetures ou des opacités nodulaires dans la zone supérieure ;
- une excavation (en particulier s'il y a plus d'une cavité) ;
- les opacités calcifiées.

2.5.2.2.1.1.4.1.4.3 Test tuberculinique

Ce test est très utile pour mesurer la prévalence de la tuberculose dans une communauté. Mais ce test peut être négatif en cas de malnutrition ou d'autres maladies même si le malade est atteint d'une tuberculose active. Ce test donne également des faux positifs (BCG, tuberculine).

2.5.2.2.1.1.4.1.5 Traitement

En pratique chez les malades dont la tuberculose vient d'être diagnostiquée, le traitement recommandé est d'une durée de 6 à 9 mois.

Les médicaments antituberculeux essentiels sont : l'Isoniazide (H), la Rifampicine (R), le Pyrazinamide (Z), la Streptomycine (S), l'Ethambutol (E), la Thiacétazone (T).

Exemple de traitement : régime standard: 2HRZE / 4HR

Pour les deux premiers mois correspondant à la phase initiale ou intensive on donne durant ces deux mois en association : HRZE puis durant 4 mois :HR dans la phase de continuation.

2.5.2.2.1.1.4.2 La méningite tuberculeuse

2.5.2.2.1.1.4.2.1 La transmission

Mycobacterium tuberculosis est le principal agent responsable de tuberculose dans le monde.

La tuberculose est une maladie essentiellement inter-humaine c'est-à-dire qu'elle se transmet d'un individu malade à un individu sain. Cette transmission du bacille tuberculeux a lieu lorsque le malade tuberculeux tousse, crachote, éternue ou simplement parle. De nombreuses gouttelettes transportant des bacilles tuberculeux sont propulsées dans l'air. Les gouttelettes les plus volumineuses tombent au sol tandis que les plus petites, invisibles restent dans l'air qui les véhiculent. A l'extérieur ou dans les pièces bien ventilées ces gouttelettes sont évacuées lors des déplacements d'air. Mais dans les pièces fermées, les petits espaces ou les endroits mal aérés où l'air ne circule pas convenablement ces gouttelettes demeurent dans l'air et augmentent en nombre lorsque la personne continue à tousser. Toute personne partageant la pièce avec le "tousseur" et respirant le même air court le risque d'inhaler des bacilles tuberculeux. C'est ainsi que les bacilles sont entraînés dans les poumons lors de la respiration.

Plus rarement la tuberculose peut se transmettre par des aliments souillés et surtout avec du lait non bouilli de vache tuberculeuse (transmission de *Mycobacterium bovis*).

Plus rarement encore le bacille de Koch se transmet à travers la peau le plus souvent égratignée, des parties les plus exposées donnant ainsi une tuberculose de la peau.

2.5.2.2.1.1.4.2.2 La formation du complexe primaire

Les minuscules gouttelettes transportant les bacilles, une fois inspirées, sont véhiculées à travers les voies aériennes jusqu'à la périphérie du poumon où elles restent sur place et les bacilles tuberculeux se multiplient lentement. En même temps certains de ces bacilles sont transportés par la lymphe jusqu'aux ganglions les plus proches, situés le long des bronches. En ces deux endroits, la présence des bacilles provoque une réaction des cellules de défense de l'organisme. En effet en 4 à 8 semaines environ, au centre de ce processus existe une petite zone où les tissus de l'hôte sont morts (caséification) et autour de laquelle il y a une couronne de cellules de défense de plus en plus nombreuses. En ce moment, la plupart des sujets deviennent sensibles aux bacilles tuberculeux, cela est révélé par un test tuberculinique cutané positif.

L'ensemble des modifications au niveau du poumon (chancre primaire) et des ganglions lymphatiques sont connus sous le nom de complexe primaire.

A partir de ce moment, l'issue finale dépend de la capacité de la personne infestée à résister à la multiplication du bacille tuberculeux et de limiter l'importance de la caséification. Cette capacité varie avec l'âge, elle est plus faible chez les sujets très jeunes. Elle varie également avec l'état de nutrition, une mauvaise nutrition affaiblit les défenses de l'organisme.

La plupart des sujets réussissent lentement après de nombreux mois à cicatriser à la fois le chancre situé au niveau du poumon et les ganglions lymphatiques.

2.5.2.2.1.1.4.2.4 Symptomatologie de la méningite tuberculeuse

La méningite tuberculeuse frappe dans la majorité des cas, dans le semestre ou l'année qui suit le contact infectant et surtout l'enfant entre 2 et 6 ans. Le risque d'atteinte méningée est deux fois plus important chez les sujets immunodéprimés.

Les différents signes cliniques permettant de reconnaître une méningite tuberculeuse sont peu spécifiques. L'évolution de la maladie se fait en trois stades :

- Le premier se caractérise par une simple modification du comportement voire du caractère, anorexie, apathie et une fièvre modérée;
- Au cours du deuxième stade, on relève des symptômes d'hypertension intracrânienne et des troubles neurologiques tels qu'une hémiplégie, des convulsions et des paralysies des nerfs crâniens;
- Le troisième stade se caractérise par un coma et des troubles respiratoires et cardiaques. L'importance des signes parenchymateux est due à l'atteinte encéphalique associée à celle des méninges.

Différentes séquelles peuvent être observées : troubles du comportement, ophthalmoplégie, hémiplégie, ou tétraplégie, surdité, calcifications intracrâniennes et retard mental. Un bon pronostic dépendra de la précocité du diagnostic et de l'administration d'un traitement antibiotique approprié.

2.5.2.2.1.1.4.2.5 Diagnostic :

Dans la crainte d'une méningite tuberculeuse, il faut procéder de la manière suivante:

- *Recherche de l'allergie* : l'intradermo-réaction est le plus souvent franchement positive, mais exceptionnellement elle est négative, ce qui n'élimine pas le diagnostic.
- *Radiographie du thorax* : montre souvent des séquelles d'une primo-infection, parfois miliaire quelquefois rien.

- *Examen du fond d'œil* : montre souvent un flou papillaire et une fois sur trois des tubercules choroïdiens.
- *Une ponction lombaire* : le liquide est clair ou opalescent mais il peut former un caillot en toile d'araignée après quelques temps mais aussi être jaunâtre s'il existe un blocage médullaire avec :
 - hyperleucocytose de 30 à 500 éléments, à prédominance lymphocytaire,
 - hyperalbuminorachie de 0,60 à 2,5 g/l et plus,
 - hypoglycorachie inférieure à 0,30 g/l,
 - hypochlorurorachie inférieure à 6,5 g/l,
 - élévation de l'acide lactique supérieure à 300 mg/l.

Toute méningite lymphocytaire avec hypoglycorachie doit faire rechercher une méningite tuberculeuse qui est possible même en l'absence d'éléments de primo-infection évidente.

On doit rechercher le BK (coloration de Ziehl Neelsen, immunofluorescence, ensemencement, inoculation). L'identification du BK par PCR est recommandée car cette méthode donne des résultats rapides et très sensibles.

2.5.2.2.1.1.4.2.6 Prophylaxie :

La méningite tuberculeuse est un des aspects de la tuberculose, maladie transmissible par voie aérogène dans sa forme pulmonaire, la plus souvent rencontrée.

Le vaccin BCG (Bacille de Calmette et Guérin) protège partiellement contre les formes graves de tuberculose en particulier des méningites tuberculeuses, avec une efficacité variable selon les études.

Malgré les incertitudes et les controverses portant sur son efficacité, il est largement admis que le BCG doit être utilisé dans les pays à forte prévalence de tuberculose ou elle constitue un important problème de santé publique.

Plusieurs études ont démontré un effet protecteur de la vaccination par le BCG chez les jeunes enfants, contre les formes graves de tuberculose, en particulier la méningite tuberculeuse.

Le vaccin BCG est inoculé par voie intradermique ou par scarification, c'est un vaccin vivant atténué. Une souche stable a été obtenue à partir d'une culture de *M. bovis* atténué par 230 passages sur pomme de terre biliée, glycéinée, réalisée pendant 13 ans.

Ce vaccin entraîne peu de complications, les plus fréquentes étant des adénites locales et les plus graves des ostéites ou des infections généralisées à BCG.

2.5.2.2 Les méningites à *Listeria monocytogenes* (35,50)

Listeria monocytogenes est un germe ubiquitaire, c'est un petit bacille à Gram positif, non capsulé, responsable de méningites lymphocytaires. Les antigènes somatiques (O) et flagellaires (H) permettent de reconnaître 16 sérotypes. Le milieu extérieur est un réservoir de germes dans lesquels l'homme et l'animal se contaminent indépendamment l'un de l'autre. L'infection se développe après inhalation ou ingestion de produits animaux ou de nourriture contaminée. Le portage du germe dans les voies génitales de la femme explique que la maladie puisse être acquise pendant l'accouchement.

Dans de nombreuses séries de méningites de l'adulte, *Listeria monocytogenes* est souvent en cause. En dehors de la période néonatale et de la grossesse, la listériose affecte plus volontiers les sujets de plus de 65 ans et les immunodéprimés. Elle détermine des atteintes neuro-méningées dans 1/3 des cas.

2.5.2.2.3 La méningite brucellienne (50)

Elle survient loin de la contamination et les signes caractéristiques de la maladie sont absents. C'est surtout la notion d'un possible contagé professionnel (éleveur, équarrisseur) qui oriente le diagnostic vers un test ELISA sanguin et sur le LCR.

2.5.2.2.4 La méningite au cours de la maladie de Lyme (50)

Elle survient loin de la contamination par morsure de tique qui doit être cependant recherchée par l'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 le LCR.

2.5.2.2.5 La méningite à *Leptospire* (50)

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 *Leptospire*.

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

2.5.2.2.6 La méningite syphilitique (50)

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 font le diagnostic.

2.5.2.2.7 La méningite à streptocoques G (50)

Elle est vue chez les bouchers, c'est la culture du LCR qui permet de faire le diagnostic.

2.5.2.2.8 La méningite à méningocoque, pneumocoque ou Haemophilus (35,50)

Lorsqu'elles sont décapitées par une antibiothérapie préalable, éventualité rare, elles sont des méningites à liquide clair. Mais dans le cas du pneumocoque, on peut retrouver un LCR clair fourmillant de germe sans polynucléaire neutrophile, même en l'absence d'antibiothérapie. La PCR et la recherche d'antigènes solubles permettent de faire le diagnostic.

2.5.2.3 Les étiologies rares

2.5.2.3.1 Méningites fongiques

Ce sont des méningites qui surviennent sur des terrains immunodéprimés (SIDA). Les levures responsables sont *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans*.

2.5.2.3.2 Méningites parasitaires

A ce niveau il faut toujours penser au neuropaludisme qui est une urgence thérapeutique mais aussi la THA qui réalise un tableau de méningo-encéphalite avec hypersomnie.

Ces méningites secondaires à une affection parasitaire peuvent être une amibiase, une toxoplasmose, trypanosomiase congénitale ou acquise.

2.5.2.3.3 La méningite plastique

Elle est également appelée lymphome aqueux et se localise spécifiquement aux méninges.

2.6 Diagnostic (8,34,35,62,65)

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

① *Examen clinique*

Dans sa forme typique, la méningite réalise un **syndrome méningé** associant céphalées violentes généralisées, vomissements, raideur de la nuque, signe de **Kernig** (impossibilité d'obtenir l'extension de la jambe sur la cuisse chez le malade assis ou couché) et signe de **Brudzinsky** (flexion passive du genou lors de la flexion forcée de la nuque). L'existence de fièvre et de frissons oriente vers une origine infectieuse. Chez le nourrisson fébrile, algique, supportant mal les manipulations et geignard on recherchera un bombement de la fontanelle antérieure et une hypotonie axiale qui remplace souvent à cet âge la raideur rachidienne.

② *La ponction lombaire*

La ponction lombaire est un acte médical simple, facile, peu douloureux et sans danger.

Tout report de cet examen aboutissant à un retard dans la mise en route du traitement est particulièrement préjudiciable pour le pronostic. La ponction lombaire doit donc être pratiquée à la moindre suspicion de méningite.

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 associé à des antalgiques simples suffisent à vaincre ces douleurs.

③ *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 protides et dont la concentration en glucose est égale à la moitié de la glycémie, soit 0,5 g/l. D'autre part, la cellularité (nombre de cellules par mm³) 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 :

L'examen biochimique comportant 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.

L'étude cytologique est quantitative et qualitative. Elle estime la cellularité, souvent très importante, et détermine le type de cellules présentes, lymphocytaires ou polynucléaires. Une réponse inflammatoire marquée par une quantité importante de polynucléaires évoque le diagnostic de méningite bactérienne, jusqu'à preuve du contraire, surtout s'il existe une hypoglycorachie et une hyperalbuminorachie. Cependant, des réactions cellulaires méningées constituées de polynucléaires peuvent s'observer au cours d'abcès du cerveau, et l'inflammation méningée est alors purement réactionnelle; D'autre part, certaines méningites virales, notamment les méningites herpétiques, peuvent s'accompagner à leur tout début d'une réaction à polynucléaires neutrophiles. Classiquement, une hyperlymphocytose a pour origine une méningite virale, dont le diagnostic est conforté par une notion épidémique, un état clinique particulièrement bien conservé, une albuminorachie inférieure à 1 g/l et l'absence d'hypoglycorachie.

Mais certaines méningites bactériennes, tuberculeuses ou listériennes, notamment, peuvent s'accompagner d'une hyperlymphocytose. Dans ce cas le contexte clinique, une albuminorachie supérieur à 1 g/l et une hypoglycorachie prennent alors toute leur importance. Une hyperlymphocytose peut également être observée dans le cas d'une méningite bactérienne « décapitée » par un traitement antibiotique inapproprié qui, administré au préalable, peut transformer une réaction à polynucléaires en une réaction lymphocytaire. Là encore, le contexte clinique devra trancher.

L'examen bactériologique est fondamental pour confirmer le diagnostic par isolement du germe et choisir grâce à un antibiogramme un traitement adapté au germe isolé. Cet examen bactériologique consiste en une coloration de Gram et une coloration au bleu de méthylène, et une mise en culture, afin d'isoler le germe et de faire un antibiogramme. Il est possible de rechercher d'éventuels antigènes solubles qui sont le témoin indirect de la présence de bactéries, aussi bien dans le LCR que dans le sang et dans les urines. Cette recherche est en fait peu sensible mais présente une grande valeur lorsqu'elle est positive, en particulier en cas de méningite décapitée par un traitement antibiotique antérieur au prélèvement.

L'examen microbiologique : la PCR donne des résultats très sensibles et rapides, d'où son intérêt dans la méningite qui est une urgence médicale. Cependant, cette technique basée sur l'amplification des brins d'ADN ou d'ARN, nécessite des appareillages lourds et un personnel qualifié. La PCR est une technique délicate qui ne peut être effectuée que dans des laboratoires de haut niveau.

2.7 Traitement (15,35)

Le traitement antibiotique de méningite bactérienne est instauré dès que la ponction lombaire est réalisée, avant même l'identification du germe, compte tenu de sa gravité. Même en l'absence des données microbiologiques, un choix probabiliste peut être fondé sur d'éventuels éléments d'orientation étiologiques, les données épidémiologiques et la présence de signes de gravité permettent d'orienter le choix en faveur de:

- *Streptococcus pneumoniae*, s'il existe des antécédents de traumatisme crânien, de chirurgie de la base du crâne, en présence d'une rhinorrhée, en cas de début brutal, en présence de signes neurologiques, d'une otite, de sinusite ou d'une pneumopathie associée, en cas d'asplénie ou d'infection par le VIH;
- *Neisseria meningitidis*, en fonction des données épidémiologiques et /ou en présence de purpura;
- *Listeria monocytogenes*, en cas d'immunodépression, de signes de thrombo-encéphalite ou en présence de LCR peu trouble à formule panachée;
- *Haemophilus influenzae* b, quand le sujet a moins de 5 ans et, bien sûr, n'est pas vacciné contre *Haemophilus influenzae* b.
- *Mycobacterium tuberculosis* quand le sujet présente des tubercules choroïdiens.

Le traitement des méningites bactériennes a pour but de stériliser le plus rapidement possible le foyer infectieux afin de réduire le risque de mortalité et de séquelles neurologiques ou sensorielles. Le traitement antibiotique doit être bactéricide car à la différence du sérum, le LCR ne possède pas 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 réduite (SCHELD et SANDE, 1983).

La bactéricidie induite par le traitement antibiotique doit être rapide, puisqu'une bactéricidie lente et un retard à la stérilisation du LCR ont été corrélés avec une augmentation de l'incidence des séquelles chez les survivants (LEBEL et Mc CRACKEN, 1989). En raison de la multiplication lente des bactéries dans le LCR (temps de génération du pneumocoque de 60 minutes dans le LCR, contre 20 minutes en bouillon de culture, ERNST *et al.*, 1983) et de la présence habituelle d'un fort inoculum bactérien (concentration fréquemment supérieure à 10 germes/ml de LCR, BINGEN *et al.*, 1990) une bactéricidie rapide est cependant difficile à obtenir. Pour obtenir un effet bactéricide optimal (diminution de l'inoculum bactérien initial de 1 log UFC (unité formant colonie)/ml/h), la concentration intra-rachidienne d'antibiotique doit être 10 fois supérieure à la concentration minimale bactéricide (CMB) déterminée *in vitro* (TÄUBER *et al.*; 1984 Mc CRACKEN et SAKATA, 1985). Pour les antibiotiques bactéricides, dont la concentration minimale inhibitrice (CMI) est très proche de la CMB, un quotient inhibiteur (QI = concentration *in situ* au pic/CMI du germe en cause) supérieur ou égal à 10 au niveau du LCR est donc un préalable à l'obtention d'une activité bactéricide maximale. Le traitement antibiotique doit également présenter une bonne activité bactéricide systémique, car une phase de dissémination sanguine précède ou est associée à l'envahissement des méninges.

La résistance aux antibiotiques sera le plus rapidement possible déterminée par le résultat des investigations bactériologiques demandées en urgence, antibiogramme par diffusion sur disque d'oxacilline (β -lactamines) ou en gélose et détermination de la CMI. La valeur de la CMI par rapport aux concentrations critiques (concentrations sériques minimales et maximales pour un antibiotique) permet de définir la sensibilité de chaque souche.

Si la CMI est supérieure à la concentration critique maximale, on parle de souche de haut niveau de résistance ; si la CMI est comprise entre les deux concentrations critiques, la souche est de résistance intermédiaire ; enfin les souches sensibles ont une CMI inférieure à la concentration critique minimale.

2.7.1 Antibiothérapie d'attaque

Le traitement antibiotique d'attaque est mis en route dès que la ponction lombaire est effectuée, il doit tenir compte de l'âge du sujet lorsque l'étiologie n'est pas connue et l'examen direct négatif. Les tableaux I, II et III indiquent les antibiotiques recommandés pour ce traitement de première intention (9^{ème} conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse, 1996).

Tableau I: Antibiothérapie d'attaque des méningites

Antibiothérapie			
Nouveau Né	Amoxicilline	C3G	Aminoside
Nourrisson	Vancomycine	C3G	
Enfant	Vancomycine	C3G	
Adulte	Vancomycine	C3G	

Tableau II : Posologie de l'antibiothérapie d'attaque chez l'enfant et l'adulte

Posologie (mg/kg/j)		
	Enfant	Adulte
Céfotaxime	200-300/4 perfusions	200-300/4 perfusions
Ceftriaxone	70-100/1 à 2 injection IV	70-100/ 1 à 2 injection IV
Vancomycine	40-60/4 perfusions	

Tableau III: Posologie de l'antibiothérapie d'attaque chez le nouveau-né

Nouveaux Nés				
	< 7 jours		> 7 jours	
	Dose (mg/kg/j)	Nbre d'inject°	Dose (mg/kg/j)	Nbre d'inject°
<u>β- lactamines</u>				
Amoxicilline	200	2	200	3
<u>C3G</u>				
Céfotaxime	150	2	150	3
Ceftriaxone	100	1	100	1
<u>Aminosides</u>				
Gentamicine	4	2	6*	2
Netilmicine	4-6	2	4-6	3
Amikacine	10-15	2	10-15	3

* la dose est de 4 mg/kg/j en cas de prématurité.

2.7.2 Antibiothérapie après identification du germe

2.7.2.1 Méningites à *Neisseria meningitidis*

Lors du traitement de ces méningites on utilise une C3G :

- ❖ soit le Céfotaxime, 200 mg/kg/j repartis en quatre injections intraveineuses, la première injection étant de 100 mg/kg de manière à obtenir le plus rapidement possible une concentration efficace dans le LCR (dose de charge) ;
- ❖ soit la Ceftriaxone, 50 à 80 mg/kg en une ou deux injections intraveineuses, précédées d'une dose de charge de 100 mg/kg

La durée du traitement est de 5 à 7 jours en traitement intraveineux.

2.7.2.2 Méningites à *Haemophilus influenzae* b

Pour le traitement d'une méningite à *Haemophilus influenzae* b on utilise une C3G à la même posologie que dans les méningites à *Neisseria meningitidis*.

La durée du traitement parentérale est de 10 jours pour les formes sans complication.

2.7.2.3 Méningites à *Streptococcus pneumoniae*

Suite aux recommandations énoncées à l'issue de la 9^{ème} conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse en 1996. Chez l'enfant âgé de plus de 3 mois et chez l'adulte avec facteurs de risque de pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline et/ou signes de gravité, la bithérapie d'attaque comportant une C3G (céfotaxime ou ceftriaxone) associée à la vancomycine est maintenue jusqu'à l'obtention des CMI. L'antibiothérapie est ensuite adaptée en fonction de la sensibilité de la souche:

- Souche de sensibilité normale (CMI de la pénicilline G < 0,1 mg/l), posologie classique d'amoxicilline (150-200 mg/kg/j) ;
- Souche de sensibilité diminuée aux β -lactamines avec une CMI des C3G < 0,5 mg/l, le maintien du céfotaxime ou de la ceftriaxone est préférable à la prescription d'amoxicilline. La vancomycine peut être arrêtée.
- Souche présentant une CMI des C3G \geq 0,5 mg/l mais < 1 mg/ml, poursuite du traitement par la bithérapie céfotaxime + vancomycine.
- Si la CMI du céfotaxime est > 1 mg/l, le traitement repose sur l'association vancomycine + rifampicine (FRIEDLANDER et ISTRE, 1992 ; FRIELANDER *et al.*, 1993 ; ASTRUC, 1994).

Chez l'adulte sans facteur de risque de pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline ni signe de gravité, le traitement de première intention doit comporter de préférence une C3G mais l'on peut utiliser de l'amoxicilline.

La durée du traitement est de 10 à 14 jours et peut être prolongée en cas de réponse lente au traitement et/ou de souche de sensibilité diminuée.

2.7.2.4 Les méningites à *Mycobacterium tuberculosis*

Le traitement de la méningite tuberculeuse doit être aussi complet que possible et débiter le plus rapidement possible pour éviter des séquelles.

Le meilleur traitement est :

- isoniazide : 10 mg/kg associé à
- rifampicine: 10 mg/kg et à
- pyrazinamide: 35 mg/kg

Au début du traitement on ajoute de l'ethambutol (25 mg/kg) ou de la streptomycine

(10 mg/kg).

Pour traiter l'effet secondaire de l'isoniazide à savoir la neuropathie périphérique on administre 100 à 200 mg de pyridoxine par jour mais pour la prévenir on préconise 10 mg par jour.

Si le malade évolue bien, on peut arrêter la streptomycine (ou l'ethambutol) et le pyrazinamide au bout de 2-3 mois. A ce stade on peut également diminuer la dose d'isoniazide à 5 mg/kg. Poursuivre la rifampicine et l'isoniazide pendant au moins 9 mois.

En l'absence de rifampicine et de pyrazinamide, on donne la chimiothérapie standard :

2 SHT / 10 HT (pendant 2 mois : SHT puis pendant 10 mois: HT)

Isoniazide : H

Streptomycine : S

Thioacétazone (Tb1) : T

Mais on donne une dose d'isoniazide de 10 mg/kg pendant les 2 premiers mois, avec de la pyridoxine.

Si le malade évolue bien au bout de 2-3 mois, on peut arrêter la streptomycine mais on poursuit le traitement avec l'isoniazide et la thioacétazone (à la dose

standard) pendant au moins un an et il est même préférable de le poursuivre pendant 18 mois pour plus de sûreté.

Les corticostéroïdes, surtout la prednisolone sont conseillés plus particulièrement pour les jeunes enfants et les patients sévèrement atteints. On débute avec 30 mg deux fois par jour

(1 mg/kg deux fois par jour pour les enfants) pendant 4 semaines, puis on diminue la dose pendant plusieurs semaines quand l'état du patient s'améliore. Pour les patients sous rifampicine, la dose doit être augmentée de moitié et comporter 2 fois par jour 45 mg pour les adultes et 1,5 mg/kg pour les enfants.

La chirurgie peut être nécessaire pour soulager l'hypertension du LCR dans les ventricules cérébraux (hydrocéphalie) ou pour prévenir une chute rapide de la vision. Mais cela n'est possible que dans des centres spécialisés.

2.7.2.5 Les méningites à *Listeria monocytogenes*

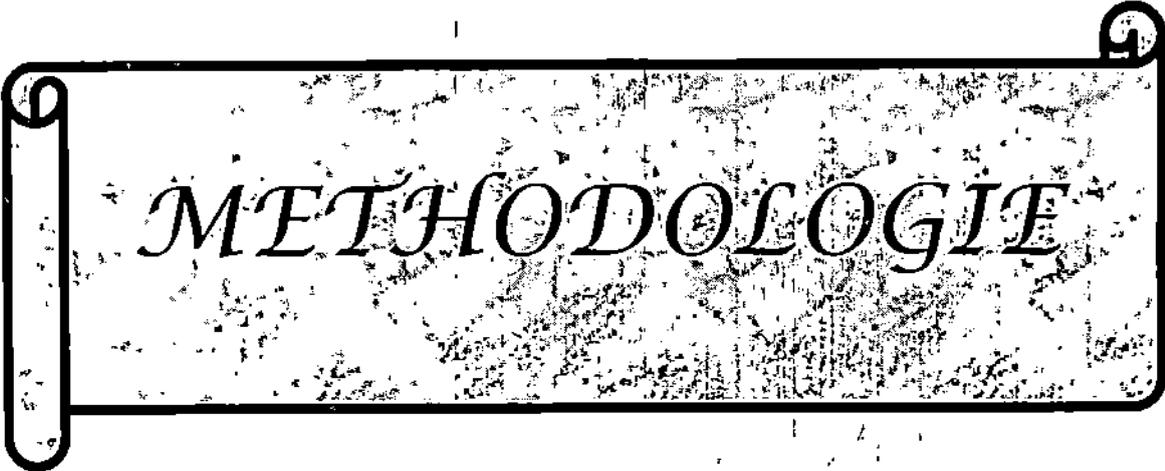
Leur traitement de référence est constitué par la pénicilline G ou l'amoxicilline (200 mg/kg/j).

On associe dans les premiers jours un aminoside (gentamicine ou nétilmicine), qui agit en synergie in vitro comme in vivo. L'alternative en cas d'allergie vraie aux β -lactamines est limitée à l'administration de chloramphénicol ou de cotrimoxazole.

2.7.3 Corticothérapie

Malgré une antibiothérapie adaptée aux modifications épidémiologiques et les progrès effectués dans la prise en charge symptomatique, les séquelles à long terme des méningites purulentes restent sévères et de fréquence élevée.

Pour réduire la fréquence, en particulier des atteintes neurosensorielles, une corticothérapie a été préconisée depuis les travaux de LEBEL et Mc CRAKEN (1989). C'est ainsi que la dexaméthasone (DXM) est utilisée dans les méningites bactériennes.



METHODOLOGIE

III. METHODOLOGIE

3.1 Caractéristiques de la zone d'étude

3.1.1 Le Pays de l'étude : Le Niger

3.1.1.1 Présentation générale

Le Niger est situé dans la partie Est de l'Afrique Occidentale en zone sahélo-saharienne; il s'étend entre le 12^{ème} et le 23^{ème} degré de latitude Nord, entre 0° et 16° de longitude Est et les 12° et 23° de latitude Nord 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 à l'extrême Nord, donc très largement en deçà de l'isohyète 100 mm.

Avec une superficie de 1.267.000 km², le Niger est limité par sept pays (fig. 5) :

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

C'est un pays enclavé et Niamey la capitale se trouve à plus de 1.035 km du port le plus proche (Cotonou au Bénin).

3.1.1.1.1 Le milieu physique

Le climat de type sahélien est chaud et sec. Deux saisons alternent dans l'année :

- Une saison sèche allant d'Octobre à Mai pendant laquelle souffle l'harmattan, vent chaud et sec.
- Une saison de pluies de Juin à Septembre pendant laquelle souffle la mousson, vent chargé d'humidité.

Du Sud au Nord le pays présente trois zones:

- Une zone soudanienne qui est la région agricole.
- Une zone sahélienne constituant la région de prédilection pour l'élevage.
- Une zone saharienne désertique, la région touristique.

Le relief nigérien est constitué essentiellement 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-ouest, ainsi que la Komadougou Yobé qui sert de limite entre le Nigeria et le Niger sur 150 km dans l'extrême Est du pays. Il faut noter également l'existence d'environ 150 mares semi-permanentes dans le sud et le centre du pays.

3.1.1.1.2 Organisation administrative (60)

Sur le plan administratif, le Niger est subdivisé en sept régions: Agadez, Dosso, Tillabéry, Zinder, Tahoua, Maradi, Diffa plus une communauté urbaine, la capitale Niamey. Les régions sont subdivisées en 36 arrondissements. Le pays compte 18 communes urbaines, trois communes rurales, et 27 postes administratifs. Une récente réorganisation administrative relative à la décentralisation prévoit 42 communes urbaines (districts), 32 communes rurales et 28 postes administratifs. A la tête de chaque entité administrative est placé un responsable :

- Préfet, pour la région;
- Préfet- Maire, pour la Commune urbaine ;
- Sous-Préfet, pour l'arrondissement ;
- Maire, pour la commune rurale;
- Chef de poste administratif, pour le poste administratif.

3.1.1.1.3 La population

A la date du 1^{er} juin 2002, date de référence provisoire des données du recensement général de la population et de l'habitat, le Niger compte 10.790.352 habitants, dont 5.380.287 hommes (49,86%) et 5.410.065 femmes (50,14%). La densité de la population est de 8,5 habitants par km² au niveau national, en 2001. Le taux d'accroissement naturel de 3,1% par an, est élevé (10).

Selon les renseignements fournis par RGP Niger 1988 (60) :

La majeure partie de la population est relativement jeune 50% ont moins de 15 ans et 79,36% ont moins de 35 ans. La proportion des enfants de 0 à 11 mois est de 4,7% celle des enfants de 1 à 4 ans est de 16,6% et celle des enfants de 5 à 14 ans est d'environ 50%.

Les indicateurs démographiques du Niger se présentent comme suit :

- Proportion des femmes en âge de procréer 22,18%
- Un taux de mortalité infantile de 123‰ ;
- Un taux de mortalité infanto-juvénile de 274‰ ;
- Un taux de mortalité maternelle de 7‰ ;
- Un taux brut de natalité de 52‰ ;
- Un taux brut de mortalité générale de 26‰ ;
- Un indice synthétique de fécondité de 7,4 ;
- Une espérance de vie à la naissance de 48 ans ;
- Un taux de malnutrition de 18,43%.

L'une des principales caractéristiques de cette population est son inégale répartition géographique. En effet les 3/4 des Nigériens se trouve regroupés sur 1/4 du territoire national; dans la bande sud du pays où les conditions écologiques sont plus favorables aux activités agricoles. Plus de 80% de la population nigérienne vit en milieu rural.

Il existe huit groupes ethniques au Niger classés comme suit: Haoussa, Djerma-Songhaï, Peulh, Touareg, Kanouri, Arabe, Toubou, Gourmantché.

Plus de 95% des Nigériens sont musulmans.

3.1.1.1.4 Les transports et les communications

Les transports intérieurs et extérieurs reposent essentiellement sur le réseau routier qui était de 3.000 km à l'indépendance et qui atteint à présent une longueur de 14.630 km. Il est constitué de :

- 3.761 km de routes bitumées
- 2.552 km de routes en latérite
- 2.917 km de routes en terre
- 5.400 km de pistes.

Dans le domaine de la communication, les infrastructures se composent de plusieurs centres périphériques, de 5 stations terriennes domestiques et de 2 stations internationales.

Des radios communautaires régionales et privées ainsi que 3 chaînes de télévision sont opérationnelles. Un programme de promotion de l'utilisation des téléphones portables et du réseau Internet est en extension.

3.1.1.1.5 L'économie

L'économie nigérienne repose sur l'agriculture de subsistance et l'élevage extensif. Le produit intérieur brut (PIB) estimé à 89.800 F CFA par habitant en 1996, fait du Niger l'un des pays les plus pauvres du monde.

Au Niger 96% de la production agricole reposent sur les cultures pluviales et sont soumises aux aléas climatiques. Il existe 56 aménagements hydro-agricoles couvrant 13.500 ha dans la zone riveraine du fleuve. On note aussi la pratique de jardinage et des cultures de maraîchage dans les oasis et des points d'eau créés dans les cités minières de la zone Nord.

3.1.1.1.6 Le secteur de 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, celui de la secrétaire d'état chargée de la lutte contre les endémies, 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).

Selon la carte sanitaire du Niger, les infrastructures sanitaires étatiques sont composées de 42 districts sanitaires, 471 CSI dont 462 fonctionnels, plusieurs cases de santé auxquelles vont s'ajouter les 1000 cases de santé du programme spécial 2001 du président de la république, cinq centres hospitaliers régionaux, trois hôpitaux nationaux et trois maternités de référence.

En plus des structures de l'état, on note le réseau des centres médico-sociaux de la caisse nationale de sécurité sociale, les structures de santé des armées, ainsi que les officines publiques de distribution des médicaments. On note également l'existence de deux Écoles Nationales de Santé Publique (ENSP), un Institut de Santé Publique (ISP) et une Faculté des Sciences de la Santé (FSS).

Le secteur privé est en pleine expansion.

Les ressources humaines du ministère de la santé sont estimées à 6.207 agents en date du 31 octobre 2000, (toutes catégories confondues).

Les principaux ratio se présentent comme suit:

Tableau IV : Ratio pour quatre catégories du personnel de la santé

Catégorie	Nombre	Ratio	Normes OMS
Médecin	229	1/37.602	1/10.000
Pharmacien	21	1/535385	1/20.000
Sage-femme	460	1/5.377	1/5.000
Infirmier	2.367	1/4.750	1/5.000

Source: Direction de la formation et de la gestion du personnel/MSP/LCE

3.1.1.1.7 Situation épidémiologique (5)

Au Niger, il existe une direction du système national d'informations sanitaire (DSNIS) qui a développé un réseau de collecte et d'analyse de données ; de recherche, de prévention et de lutte contre les épidémies.

Le Niger fait partie de la ceinture de la méningite, où la méningite sévit sur un mode endémo-épidémique.

Les épidémies surviennent pendant la saison sèche et s'arrête avec l'arrivée des pluies. La méningite touche de préférence les sujets jeunes (80% des cas dans le groupe d'âge de 5 à 15 ans).

Les épidémies n'obéissent pas à un cycle rigoureux, elles apparaissent de temps à autre.

La marche des épidémies se faisait généralement d'Est en Ouest mais à partir de 1970, les épidémies se déclarent partout à partir des foyers initiaux.

Les sérogroupes A et C restent les plus épidémiogènes au Niger. Les autres sérogroupes sont rares.

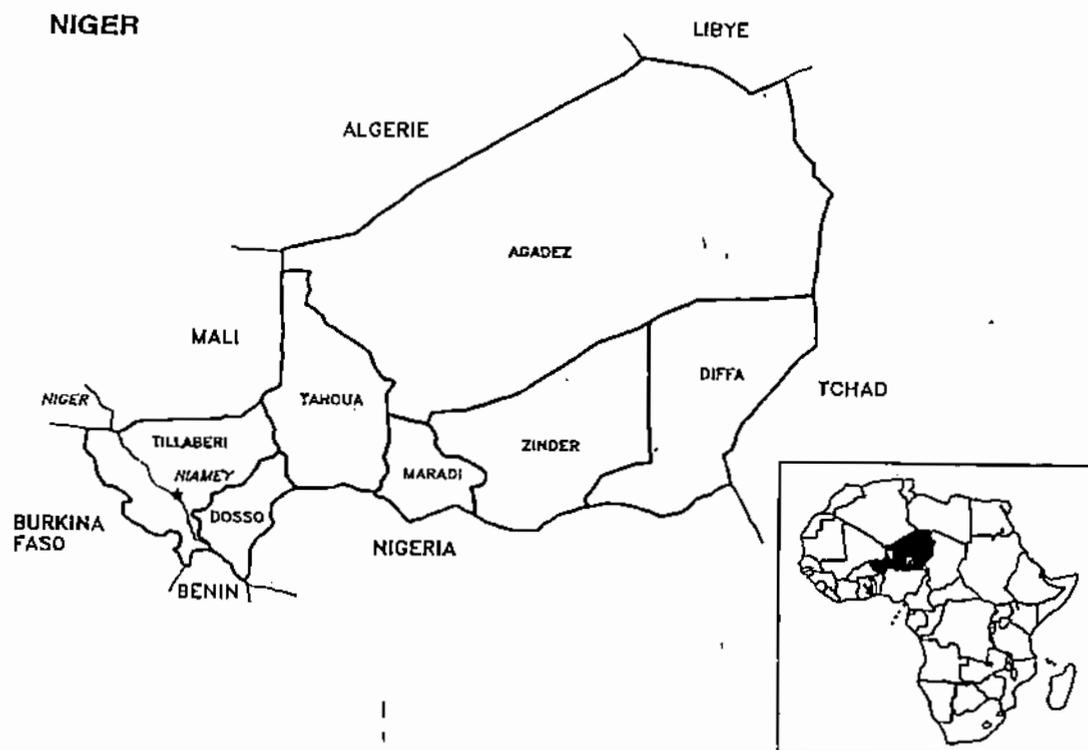


Figure 5 : Présentation générale du Niger

3.1.1.2 La ville de l'étude : la Communauté Urbaine de Niamey

3.1.1.2.1 Présentation générale de la ville de Niamey

Niamey, la capitale du Niger, avec une superficie de 255 km², est située sur un plateau, au bord du fleuve Niger, dans la partie sud-ouest du pays. Elle couvre une superficie de 120 km². Elle est située entre 2°30' et 2°10' de longitude Est, et entre 13°28' et 13°35' de latitude Nord. La ville épouse la courbe du fleuve Niger sur une longueur de 15 km. Le fleuve divise l'agglomération en deux parties : une zone de plateau sur la rive gauche et une zone alluviale sur la rive droite. La population de Niamey est estimée à 674.950 habitants en 2001 (RGP/H 2001, données provisoires). La ville de Niamey dispose de plusieurs infrastructures sanitaires :

- Trois Cases de Santé
- Deux hôpitaux nationaux
- Un hôpital de district
- Un hôpital communal
- Une maternité de référence (maternité centrale)
- Neuf maternités périphériques
- Trente quatre Centres de Santé Intégrés
- Un centre hospitalier régional
- Un Centre de Santé de la Reproduction
- Un Centre National de Radioprotection
- Un Centre National Antituberculeux
- Un Centre Dermato-Lèpre
- Douze dispensaires de quartier
- Des centres médico-sociaux
- Dix huit cliniques privées
- Des cabinets de soins (18) et salles de soins privées (37) en nombre croissant
- Huit pharmacies populaires, Trente pharmacies privées et Trois centrales d'approvisionnement en médicaments dont deux privées.

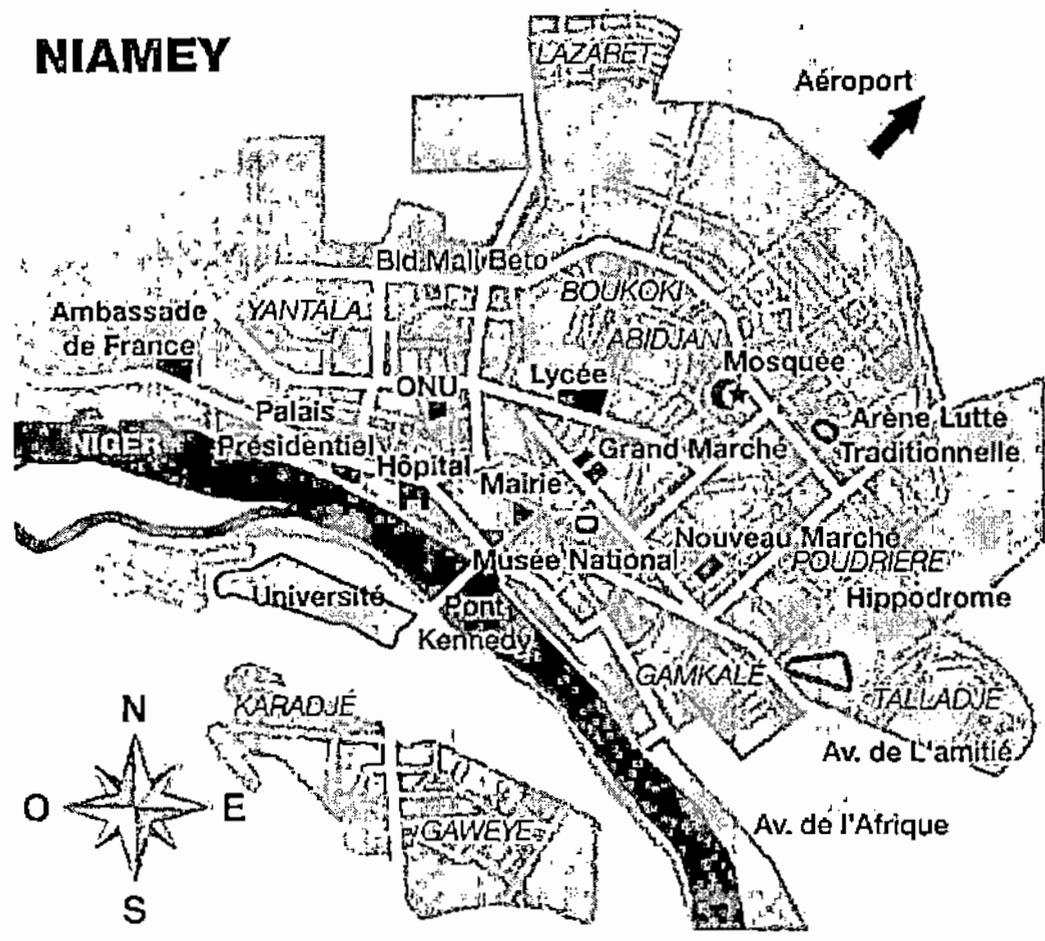


Figure 6 : Présentation générale de la ville de Niamey

Source: www.air-voyage-niger.com/Air%20pages/Niamey-Niger-Carte.html

IX. FICHE SIGNALÉTIQUE

NOM: MINDADOU

PRENOM : Habsatou Tassala

TITRE : IMPORTANCE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
DANS LA MENINGITE A NIAMEY

VILLE DE SOUTENANCE : Bamako

PAYS D'ORIGINE : Niger

LIEU DE DÉPOT : Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et
d'OdontoStomatologie

SECTEUR D'INTERET : Bactériologie – Santé Publique

RESUME

Les méningites bactériennes constituent un problème de santé publique au Niger.

Notre objectif était de transférer la réaction d'amplification en chaîne (PCR) pour l'identification de *Mycobacterium tuberculosis* au CERMES, dans le liquide céphalo-rachidien des malades suspects de méningite tuberculeuse à Niamey, afin de déterminer la part due à la tuberculose.

Les amorces IS6110 ont été utilisées pour la PCR en vue de la recherche de l'ADN de

M. tuberculosis.

La technique PCR a été transférée avec succès et le laboratoire est opérationnel depuis mi-avril 2003. Entre le 20 juin 2002 et le 2 mai 2003, 465 échantillons de LCR provenant de malades suspects de méningites ont été adressés au CERMES pour un diagnostic étiologique de méningites bactériennes. Ils ont été analysés en bactériologie dès réception puis en PCR Multiplex (*Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*). C'est ainsi que 65 LCR (14%) ont été trouvés positifs à *N. meningitidis*, 27 LCR (5,8%) à *H. influenzae*, 42 LCR (9%) à *S. pneumoniae*, 12 LCR (2,6%) sont positifs à d'autres microorganismes (entérobactéries, staphylocoques, cryptocoque). Le reste, 319 échantillons de LCR (68,6%) sont négatifs, parmi ces LCR négatifs, 161 (34,6%) sont négatifs en PCR Multiplex et en bactériologie (double négatifs), 129 (27,7%) sont négatifs en PCR Multiplex et 29 (6,2%) sont négatifs en bactériologie.

Les échantillons de LCR négatifs ont été testés en PCR du BK mais par manque de reliquat de 30 échantillons de LCR négatifs, des 319 LCR, 289 LCR négatifs ont été testés. C'est ainsi que 3 LCR (1 %) ont été positifs à *Mycobacterium tuberculosis*. Globalement sur 465 malades suspects de méningites à Niamey, nous avons trouvé 3 cas de méningite tuberculeuse soit 0,6%.

La prévalence de la méningite tuberculeuse est faible à Niamey.

Mots-clés : Méningite tuberculeuse. Prévalence. PCR. Optimisation. *Mycobacterium tuberculosis*.

3.1.1.2.2 Centre National Antituberculeux (CNAT)

Ce centre relevant du Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT) a été créé en 1965. Il a pour mission le dépistage et la guérison du maximum de malades tuberculeux. Ce centre compte 17 agents toutes catégories confondues et possède comme infrastructures :

- un service de tri
- un service de prise en charge
- un service social
- un laboratoire
- une salle de soins

3.1.1.2.3 Hôpital National de Niamey

L'Hôpital National de Niamey couvre une superficie de 5,41 hectares.

L'HNN a été créé en 1922 et il a été inauguré par le Gouverneur des Colonies Jules Brevier. Il porta son nom jusqu'en 1965, date à laquelle il devient l'Hôpital National du Niamey. Il est devenu EPA en 1992. Actuellement L'HNN compte 858 lits :

- 545 lits en médecine et spécialités médicales
- 291 lits en chirurgie et spécialités médicales
- 22 lits en urgence

En fin 2002 HNN compte 519 agents toutes catégories confondues dont 61 médecins et chirurgiens et possède comme infrastructures :

- les services médicaux techniques
- les services généraux
- les services administratifs
- les services hospitaliers

3.1.1.2.3.1 Pavillon Raymond Madras (pavillon D)

Le pavillon D de l'HNN de Niamey a été créé en 1956 et depuis 1997, il porte le nom de **Raymond Madras** un missionnaire français qui a servi au Niger pendant plus de vingt ans.

Ce pavillon accueille, hospitalise et traite tous les malades suspectés de maladies infectieuses telles que la méningite, la rougeole, la rage, la fièvre typhoïde, le SIDA.....etc.

Ce pavillon compte 16 agents toutes catégories confondues dont 5 médecins et dispose de 80 lits.

3.1.1.2.4 Présentation du cadre d'étude : le CERMES (13)

3.1.1.2.4.1 Historique

Le CERMES, Centre de Recherche sur les Méningites et les Schistosomiasés était un centre de recherche dépendant de l'OCCGE (Organisation de Coordination et de Coopération pour la lutte contre les Grandes Endémies), organisme Inter-Etats regroupant huit pays d'Afrique de l'Ouest, Bénin, Burkina Faso, Côte.d'Ivoire, Mali, Mauritanie, Niger, Sénégal et Togo.

Le CERMES résultait du transfert de deux laboratoires du Centre Muraz de Bobo Dioulasso (Burkina Faso), il a été créé en 1977 et a ouvert ses portes à Niamey au Niger en 1980.

En décembre 2002, suite à la dissolution de l'OCCGE, le CERMES devenu EPCST (établissement public à caractère scientifique et technique) prend ainsi le nom : **Centre de Recherches Médicales et Sanitaires** tout en gardant la même dénomination, "**CERMES**".

Bien que le processus de son intégration dans le système national et dans le Réseau International des Instituts Pasteurs et Instituts Associés (RIPIA) se soit réalisé lentement le CERMES a acquis une réputation internationale.

3.1.1.2.4.2 Organisation administrative

Le CERMES dispose de quatre unités de recherche travaillant en complémentarité dans la réalisation des travaux de recherche. Il s'agit de l'unité épidémiologie, de l'unité parasitologie, de l'unité biologie, de l'unité santé/environnement et climat.

A ces unités vient s'ajouter l'administration qui s'occupe de la gestion administrative et financière.

Le CERMES s'est donné 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 état, pour tout ce qui concerne la biologie médicale et la santé publique ;
- l'expertise des risques et l'évaluation des programmes de lutte contre les endémies ;
- la formation des cadres sanitaires nationaux ou étrangers.

3.1.1.2.4.3 La surveillance microbiologique des méningites bactériennes par PCR au CERMES : création d'un réseau national de surveillance.

Le CERMES fait partie du consortium GREMEN (groupe de recherches sur les méningites) regroupant l'Institut Pasteur, l'AAMP (Association d'Aide à la Médecine Préventive) et deux autres centres de recherches du Burkina Faso et du Mali.

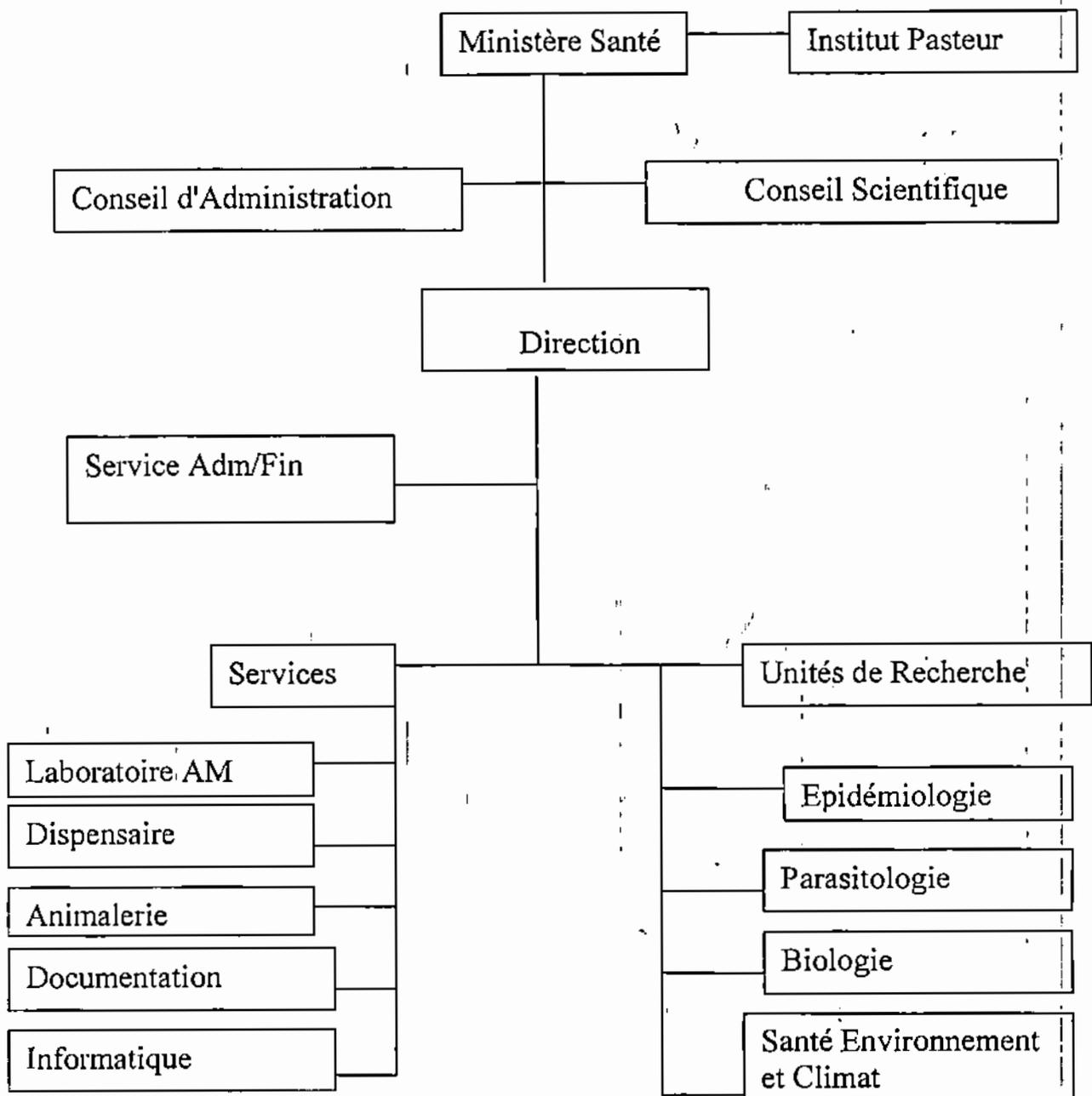
Le laboratoire PCR du CERMES est opérationnel depuis octobre 2002. L'objectif principal de la mise en place de ce laboratoire est de contribuer à une meilleure connaissance de l'épidémiologie des méningites bactériennes au Niger en instaurant une surveillance des cas survenant en zone rurale, en période

endémique et en période épidémique, et en renforçant la surveillance microbiologique à Niamey.

Pour atteindre cet objectif, le CERMES a initié la création d'un "Réseau méningites" associant les responsables de la surveillance épidémiologique et de la lutte contre les épidémies, des médecins et des infirmiers ruraux. Les cas suspects font l'objet d'une ponction lombaire et d'un questionnaire. Les LCR sont conservés au froid et collectés périodiquement par le CERMES dans une zone correspondant théoriquement à 45% de la population du Niger. Pour les régions trop éloignées (Tahoua, Maradi, Zinder, Diffa, Agadez), des moyens de circonstance sont mis en œuvre pour acheminer les LCR.

En conclusion, la PCR, associée à une collecte systématique d'échantillons biologiques va permettre une meilleure connaissance de l'épidémiologie des méningites bactériennes au Niger et contribuera à une meilleure définition des stratégies de contrôle des épidémies.

ORGANIGRAMME DU CERMES



3.2 MATERIEL ET METHODES

3.2.1 Matériels

- Agitateur mécanique
- Alèze
- Autoclave
- Bac de conservation du gel
- Bain marie
- Balance ohaws navigator
- Becher
- Bistouri (scalpel)
- Boîtes de séparation
- Centrifugeuse 5417 R 230 (centrifugeuse eppendorf réfrigéré)
- Chronomètres
- Ciseaux
- Cônes à filtres (2-30 μ l, 1-40 μ l, 20-200 μ l, 200-100 μ l)
- Cônes sans filtres
- Congélateur à -20°C
- Cuve de migration
- Eprouvette
- Erlenmeyer
- Fer à souder Vacumaster
- Fioles
- Flacon en pyrex
- Flacon en verre
- Four micro-ondes 231
- Gaine soufflet (30 x 60 mm)
- Gants
- Générateur de courant (consort , 3 cuves)
- Glace synthétique

- Hotte microbiologique
- Hotte filtrair Biocap
- Lunettes de protection contre les UV
- Marqueurs
- Masque hygiène bleu
- Masque de protection en plastic
- Microtubes de 0,2 ml
- Mini centrifugeuse
- Papier essuie tout
- Peignes pour gel
- Pipettes en μl : P20 P100 P200 P1000
- Plaques chauffantes
- Plateau porte gel
- pH mètre
- Portoirs
- Portoirs flottants
- Réfrigérateur à $+4^{\circ}\text{C}$
- Ruban jaune
- Sacs poubelles
- Sacs polyéthylène
- Système polaroid Gelcom (2 camera GH: 20cm sur 15 cm et 10 cm sur 8 cm)
- Thermocycleur Primus 96^{plus} MWG AG BIOTECH
- Transluminateur (table UV 312)
- Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)
- Verre à pied
- Vortex Fischer Brand

3.2.1.1 Réactifs

Agarose

- Poudre d'agarose ultra pure GibcoBRL

Amorces (IS6110)

- Oligonucléotides 5'3' IS6110 PROLIGO
- INS-1 (5'CGTGAGGGCATCGAGGTGGC3') MW: 6239, TM: 68, 194 OD/ μ mol, 258,8 μ M, 1,6 μ g/ μ l.
- INS-2 (5'GCGTAGGCGTCGGTGACAAA3') MW: 6207, TM: 64 201 OD/ μ mol, 245,1 μ M, 1,5 μ g/ μ l

Bleu de charge

- Glycérol (C₃H₈O₃) Pur 98% Recta purTM Pro labo,
- Bromophénol blue 3',3'',5',5'' tetrabromophenolsulfonephthalein (C₁₉H₉Br₄O₅SSNa) FW: 691.9 SIGMA.
- Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) à 10% Biorad (MW: 288.38)

Ethydium Bromide

- 2,7-diamino 10 ethyl 9 phenyl phenanthridinium bromide FW : 394.3 SIGMA.

DNTP

- La boite commercialisée par INVITROGEN life technologies contenant :
- dATP, dGTP, dCTP et dTTP à 25 μ mol dans chaque tube.

Eau stérile

- Eau ultra pure non stérile Biochrom KG qu'on autoclave pendant 15 min.
- r-Taq (l'ADN polymerase)

- Dans la boîte commercialisée par INVITROGEN life technologies il y a :
 - o Taq DNA polymerase invitrogen 500 unités (5u/ μ l).
 - o MgCl₂, 50 mM, 1ml.
 - o 10X PCR Rxn Buffer -MgCl₂ 1ml.
 - o 1 % W-1 (solution servant à diluer la r-Taq en cas de besoin).

TBE 10X

- Trizma® base (C₄H₁₁NO₃) SIGMA
- Acide Orthoborique (H₃BO₃) R.P Normapur™AR Prolabo,
- EDTA : éthylène diamine tétra acétique acide (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O) SIGMA.
- NaOH R.P Norma pur™ Prolabo (P.M : 40.00)
- HCl R.P Normapur™AR Prolabo (37%, M : 36.46g/mol)

TE 10X (tampon d'extraction)

- Trizma® base (C₄H₁₁NO₃) SIGMA
- EDTA : ethylene diamine tétraacétique acide (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O) SIGMA.

100 Pb DNA Ladder INVITROGEN life technologies

MgCl₂

- MgCl₂.6H₂O PM/FW: 203.3

3.2.1.2 Les échantillons de l'étude

Les LCR de notre étude proviennent de l'Hôpital National de Niamey (HNN), des cliniques de Niamey et des centres de santé de Niamey. Ce sont 465 LCR réceptionnés au CERMES du 20 juin 2002 au 2 mai 2003 , ils ont d'abord été

testés au laboratoire de bactériologie du CERMES ou de l'HNN avant d'être congelés et traités au laboratoire PCR du CERMES.

Les LCR testés lors de cette étude sont 289 LCR négatifs en PCR Multiplex (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*) et/ou en bactériologie.

3.2.2 METHODE

3.2.2.1 Principe de la PCR

Appelée en anglais PCR, pour "Polymerase Chain Reaction", cette technique est imaginée par Kary Mullis et développée par Henri A. Herlich et ses collaborateurs de la compagnie CETUS (California, USA) en 1985, permet l'amplification sélective, in vitro, de séquences d'acides nucléiques.

La PCR est dérivée de la technique dite "d'extension d'amorce" au cours de laquelle de courtes séquences d'ADN (oligonucléotides) sont utilisées par une enzyme de réplication, l'ADN polymérase pour répliquer fidèlement l'ADN ciblé.

L'originalité de la PCR est d'effectuer cette extension d'amorce simultanément sur les deux brins d'ADN. Pour cela les deux oligonucléotides sont choisis pour être chacun complémentaire d'un des brins d'ADN. Ils sont positionnés de part et d'autre de la région d'intérêt afin que le produit d'extension par l'ADN polymérase de l'un, quand il sera dénaturé, puisse servir de matrice pour l'autre et inversement (extrémités 3' en regard) (figure 2). Après séparation des deux brins d'ADN, les amorces se fixent sur le brin d'ADN matrice dont elles sont complémentaires et vont orienter la synthèse vers la région d'intérêt. Cette synthèse ayant lieu de façon simultanée sur chacun des deux brins, aboutit à la duplication de la séquence matrice initiale. Le produit de l'amplification correspond donc à un segment d'ADN double brin dont les extrémités 5' sont constituées par les amorces (figure 2). Ces produits d'amplification néosynthétisés vont à leur tour, après dénaturation, devenir des matrices et fixer des amorces qui seront étendues par l'ADN polymérase, générant ainsi de nouvelles molécules. Une réaction en chaîne s'établit pour la répétition des cycles de dénaturation/hybridation/extension se traduisant par une accumulation exponentielle du fragment d'ADN cible.

Cette réaction peut se traduire sous la forme d'une formule mathématique simplifiée : $N = N_0 \times 2^n$

N = nombre de molécules à la fin de l'expérience

N_0 = nombre de molécules d'ADN présents au départ

n = nombre de cycles PCR réalisées.

3.2.2.1 Extraction de l'ADN de *Mycobacterium tuberculosis*

Les échantillons de LCR de 1 ml sont contenus dans des tubes de 1,5 ml.

L'extraction de l'ADN bactérien se fait selon trois étapes :

1°) **Ebullition** : les échantillons sont placés sur des portoirs flottants et plongés dans l'eau bouillante, ils sont bouillis pendant 5 min.

2°) **Centrifugation** : les LCR bouillis sont centrifugés à 12.000 tpm pendant 10 min.

3°) **Décantation** : le surnageant est recueilli et aliquoté .

L'aliquote est ainsi fin prête pour la PCR, il est conservée à - 20°C.

3.2.2.2 Transfert et optimisation de la technique PCR du BK au CERMES

Nous avons préparé une solution stock d'ADN H37RV par dilution d'une poudre lyophilisée de 2 µg d'ADN H37RV dans 50 µl de TE.

Nous avons effectué plusieurs dilutions de cette solution stock afin d'obtenir des quantités décroissantes de l'ADN témoin positif H37RV (de 50 ng/µl à 1 fg/µl) pour avoir une idée de notre seuil de detection en PCR du BK.

Dans cette même optique nous avons effectué plusieurs dilutions sur un échantillon de crachat obtenu par traitement de trois prélèvements de crachats de malades tuberculeux positifs à la bacilloscopie amenés du CNAT.

L'échantillon de crachat qui a été dilué a subi toutes les étapes de l'extraction d'ADN bactérien sauf l'étape de la centrifugation.

Nous avons amplifié toutes les différentes solutions d'ADN H37RV et de crachat préparées en respectant le protocole PCR du BK de l'Institut Pasteur de Madagascar.

Dans le but d'optimiser la technique PCR du BK au CERMES nous avons d'abord amplifié certaines quantités d'ADN H37RV (0,625 ng/ μ l) et de crachat avec différentes quantités de la r-Taq polymérase. Notamment avec 5 unités/ μ l de r-Taq, 2,5 unités/ μ l et 1,25 unités/ μ l par tube.

Ensuite nous avons amplifié les quantités d'ADN H37RV choisies comme témoins positifs (100,50,10 fg) avec des MIX différents de part leur concentrations en MgCl₂.

Alors le MIX₁ a été préparé avec du MgCl₂ à 10 mM; le MIX₂ avec du MgCl₂ à 15 mM; le MIX₃ avec du MgCl₂ à 20 mM; le MIX₄ avec du MgCl₂ à 25 mM; le MIX₅ avec du MgCl₂ à 30 mM et le MIX₆ avec du MgCl₂ à 50 mM.

3.2.2.3 Protocole de la technique PCR du BK au laboratoire PCR du CERMES

Dans la salle de préparation du MIX

La préparation du mélange réactionnel pour la PCR du BK se réalise dans la salle MIX sous la hotte en respectant ces différentes étapes :

- Tout d'abord la salle MIX est stérilisée avant et après chaque manipulation, à cet effet la lampe UV est allumée pendant 15 minutes.
- Puis les réactifs sont décongelés à température ambiante dans un portoir.
- Ensuite les microtubes (tube 0,2 ml) pour PCR sont numérotés. Nous prévoyons 5 tubes pour les témoins :
 - 1 témoin négatif (eau à la place de l'ADN dans la pièce de préparation du Mix),
 - 1 témoin hotte (eau à la place de l'ADN dans la pièce d'extraction de l'ADN),
 - 3 témoins positifs ADN H37RV (100 fg/ μ l, 50 fg/ μ l, 10 fg/ μ l).

- Après nous préparons la solution de travail des amorces INS-1 et INS-2 (solution à 5 pmole/ μ l)
- Subséquemment nous préparons le MIX pour **n+1 tubes** dans l'ordre suivant: **Eau - tampon 10X - MgCl₂ - dNTP - amorces - enzyme.**
- Enfin nous disposons les microtubes dans une boîte contenant de la glace synthétique et répartissons le MIX dans les microtubes en raison de 45 μ l/tube. A la fin de la manipulation la lampe UV est aussitôt allumée pour 15 minutes et les microtubes sont transportés dans la pièce d'addition d'ADN (pièce d'extraction de l'ADN).

TABLEAU V: Préparation de MIX pour BK

	1 tube	N+1 tubes	Concentration finale
Tampon 10X	5 μ l		1X
Mgcl ₂ (20 mM)	8 μ l		2 mM
dNTP (2,5 mM)	5 μ l		0,4 mM
INS-1 (5 pmole/ μ l)	5 μ l		0,5 μ M
INS-2 (5 pmole/ μ l)	5 μ l		0,5 μ M
r-Taq (5 unités/ μ l)	5 unités		5 unités/ μ l
H ₂ O q.s.p 50 μ l	16 μ l		

Dans la salle d'addition d'ADN

Avant d'entrer dans la salle MIX, dans la salle d'addition d'ADN nous allumons la lampe UV pendant 15 mn puis nous plaçons les échantillons de LCR à analyser sur un portoir sous la hotte pour les décongeler. La lampe UV est également utilisée dans cette salle avant et après chaque manipulation.

D'autre part une fois que les microtubes rentrent dans cette salle nous agitions au Vortex d'abord les échantillons de LCR et les témoins avant d'ajouter 5 μ l de

LCR dans le microtube identifiant ce LCR. Nous obtenons ainsi un volume final de réaction de 50 μ l par microtube.

Enfin les microtubes sont agités au Vortex et transportés dans la salle d'amplification et de lecture.

Dans la salle d'amplification et de lecture

** L'amplification*

La PCR est une répétition de trois étapes thermiques dans le thermocycleur réalisées successivement dans un même tube: une étape de dénaturation des acides nucléiques, une étape d'hybridation des amorces sur les séquences cibles, une étape d'extension des amorces par l'ADN polymérase.

Un cycle d'amplification est constitué par l'enchaînement de ces trois étapes thermiques.

De ce fait les microtubes sont introduits dans le thermocycleur (fabricant et marque).

TABLEAU VI: Programme d'amplification :

Etapes	Température	Temps	Nombre de cycle
1. Déroulement	94 °C	3 min	
2.1.Dénaturation	① 94 °C	1 min	30 cycles
2.2.Hybridation	② 65 °C	1 min	
2.3 Extension	③ 72 °C	2 min	
3.Extension terminale	72 °c	4 min	

* La lecture

— La préparation du gel

Un gel de 1.8 % d'agarose est préparé avec du TBE 1X ; 8 μ l de BET (10 mg/ml) est ajouté au gel. Nous avons des peignes de 26, 20 et 15 dents.

Le gel est immergé dans une solution de 100 ml de TBE 1X et de 8 μ l de BET, qui est la solution de conservation du gel.

— La migration des amplicons

Dans la même salle 5 μ l de Bleu de charge (solution stop) sont introduits dans chaque amplicon. Les amplicons et la solution de travail du marqueur de poids moléculaire sont chauffés pendant 3 mn dans le bain marie (65 °C).

Une cuve de migration est remplie de solution de TBE 1X et le gel est immergé dans cette solution afin de déposer les amplicons.

TABLEAU VII: dépôt des amplicons dans les puits du gel

Numéro des puits du gel	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Echantillons	Témoin λ (100 pb)	Témoin négatif	Témoin hotte	ADN H37Rv 100fg/ μ l	ADN H37Rv 50fg/ μ l	ADN H37Rv 10fg/ μ l	L C R 1	L C R 2

Dans le premier puits du gel 3 μ l de la solution de travail du marqueur de poids moléculaire Ladder 100bp (50ng/ μ l) sont déposés.

Dans les puits suivants, 10 μ l de chaque amplicon sont déposés dans le puits correspondant. La migration se fait à 80 volts pendant une heure environ.

— **Révélation et photographie du gel**

Le gel est visualisé sous transilluminateur UV et une photo du gel est réalisé au besoin.

— **Interprétation de la photographie**

Les bandes 100-300 pb du témoin Ladder doivent être séparées, les trois témoins positifs et les LCR positifs donnent une bande ≈ 230 pb.

RESULTS

IV. RESULTATS

4.1 La distribution des germes responsables de la méningite analysés en PCR Multiplex et/ou en bactériologie dans la ville de Niamey

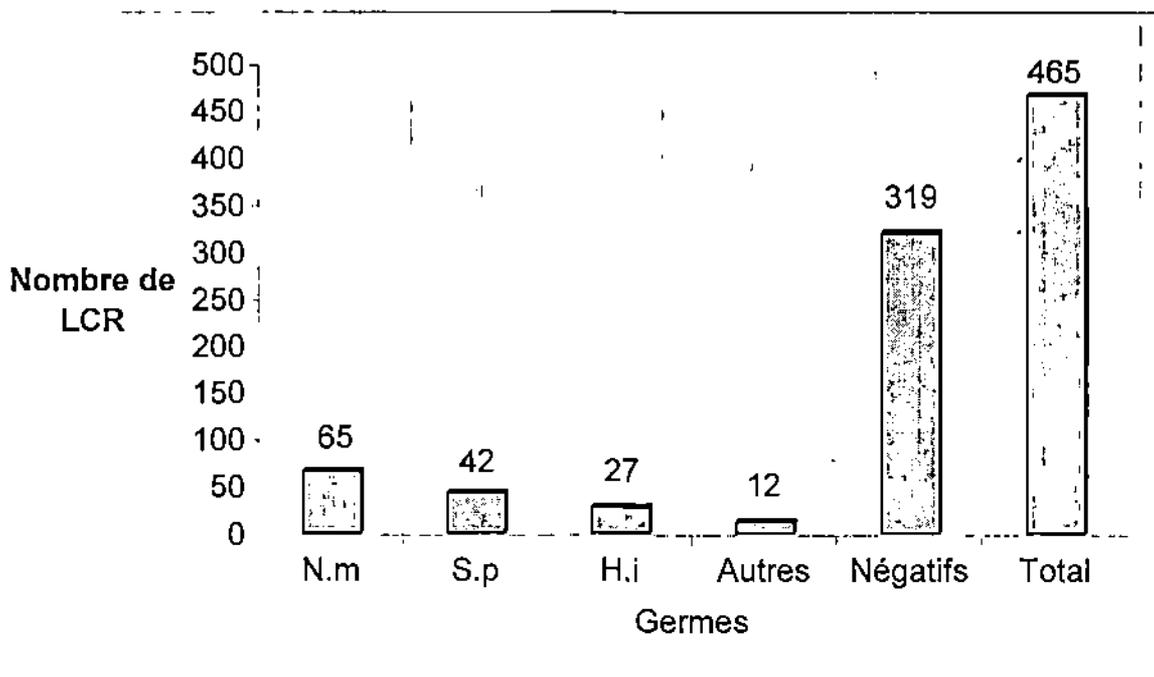


Figure 12 : Distribution des germes responsables de méningite du 20 Juin 2002 au 2 Mai 2003 à Niamey.

Sur un total de 465 LCR analysés en PCR Multiplex (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*) et/ou en bactériologie; 65 LCR (14%) sont positifs à *N. meningitidis*, 42 LCR (9%) sont positifs à *S. pneumoniae*, 27 LCR (5.8%) sont positifs à *H. influenzae* et 12 LCR (2.6%) sont positifs à d'autres microorganismes (entérobactéries, staphylocoques, cryptocoque).

Parmi les 319 LCR négatifs, 161 sont des double-négatifs par PCR et bactériologie, 129 sont négatifs uniquement en PCR et 29 sont négatifs uniquement en bactériologie.

VII. RECOMMANDATIONS

Au terme de nos travaux et au regard de tout ce que nous avons observé et constaté nous recommandons :

- Au CERMES:
 - Augmenter une case pour la vaccination BCG dans la fiche que le CERMES fait remplir aux agents de santé et les encourager à remplir correctement cette fiche qui comporte des renseignements cliniques précieux sur le malade ;
 - Effectuer les examens biochimiques de tous les LCR : dosage du glucose, des protéines et des ions chlorures ;
 - Rechercher *Mycobacterium tuberculosis* par la PCR dans le LCR de tout malade ayant une suspicion clinique ou des résultats cytologiques et biochimiques évocateurs de méningite tuberculeuse au Niger.
- A l'Hôpital National de Niamey, au Pavillon Raymond Madras:
 - Remplir correctement les fiches de renseignement et le registre du service pour une meilleure interprétation des résultats ;
 - Conduire avec le CERMES une étude prospective sur les cas suspects de méningite tuberculeuse à Niamey.
- A la population
 - Amener le malade le plus tôt possible à l'hôpital en cas de suspicion de méningite, car un diagnostic rapide permet d'éviter la mort du patient ;

- Accepter le traitement anti-tuberculeux en cas de méningite tuberculeuse, effectivement c'est une tuberculose qui tue plus rapidement que la tuberculose pulmonaire et surtout abolir les tabous sur la tuberculose.

BIBLIOGRAPHIE

VIII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AIT-KHALED N & ENARSON N - Tuberculose : manuel pour les étudiants en médecine. OMS 1999; 149p.
2. ALHASSANE O - Profil épidémiologique des méningites purulentes à Niamey entre 1989 et 1995. Thèse Med; Niamey 1995; 55p.
3. ATADOKPEDE F, DRANCOURT M & BERBIS P - Intérêt et limite de la Polymerase Chain Reaction dans le diagnostic des mycobactérioses cutanées. Med Trop 1994; 54:432-436.
4. BARAN J, RIEDERER J & KHATIB R - Limits of detection of mycobacterium tuberculosis in spiked cerebrospinal fluid using the polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19:47-50.
5. BELYO D - Contribution à l'étude des méningites purulentes à Niamey. Thèse Med Niamey 1992; 90p.
6. BISSAGNENE E & DOMOUA K - Situation actuelle des meningitis, encéphalites infectieuses et suppurations intracrâniennes en zone tropicale africaine. Méd Afr Noire 1996; 43:120-123.
7. BONINGTON A, STRANG G, KLAPPER E, HOOD V & coll - Use of Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR, early diagnosis of tuberculous meningitis. J Clin Microbiol 1998; 36:1251-1254.

8. BOUREE P - Examens de laboratoire en médecine tropicale : liquide céphalo-rachidien. Paris : Masson 1987; 151p.
9. BRIENZE V, TONON A, PEREIRA F, LISO E, TOGNOLA W, DOS SANTOS M & FERREIRA M - Low sensitivity of polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculous meningitis in south eastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2001; 34:389-393.
10. BUREAU CENTRAL DU RECENSEMENT - Résultats provisoires RGP/H-2001; 2002; 29p.
11. CAMPAGNE G, SCHUCHAT A, DJIBO S & al - Epidemiology of bacterial meningitis in Niamey, Niger, 1981-96. WHO Bull 1999; 77:506-507.
12. CAWS M, WILSON S, CLOUGH C & DROBNIEWSKI F - Role of IS6110-targeted PCR, culture, biochemical, clinical, and immunological criteria for diagnosis of tuberculous meningitis. J Clin Microbiol 2000; 38:3150-3155.
13. CERMES - Rapport annuel 2002 et perspectives sur 3 ans. 2003.
14. COLE ST, BROSCHE R, PARKHILL J, GARNIER T, CHURCHER C, HARRIS D & al - Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998; 393:537 - 544.
15. CROFTON J, HORNE N & MILLER F - Tuberculose clinique 2^{ème} édition. France : Chirac 2001; 249p.

16. DEBORAH M, GASCOYNE-BINZI, RACHAEL E, BARLOW L, FROTHINGHAM R, ROBINSON G & al - Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. J Clin Microbiol 2000; **39**:69-74.
17. DEL PORTILLO P, MURILLO L & PATARROYO M - Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. J Clin Microbiol 1992; **30**:3299-3300.
18. DENEUVILLE E & JEZEQUEL C - Primo-infection tuberculeuse. 1999. www.med.univ-rennes1.fr/etud/pediatrie/tuberculose.htm - site visité le 16.09.03
19. DIOP MAR I, GUERIN M, LAFAIX C & REY M - Les méningites tuberculeuses à Dakar : difficultés du diagnostic, gravité. Med Afr Noire 1979; **26**:411-419.
20. DJIBO S, CHANTEAU S & ALONSO JM - Méningites à *Neisseria meningitidis*: Diagnostic précoce, Traitement, Lutte contre les Épidémies. 4^{ème} rencontres africaines de biologie technique, Niamey (Niger); 28 mars 2003.
21. DONALD PR, VICTOR TC, JORDAAN AM, SCHOEMAN JF & HELDEN PD - Polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculous meningitis. Scan J Infect Dis 1993; **25**:613-617.
22. DOUCET-POPULAIRE F, LALANDE V, CARPENTIER E, BOURGOIN A, DAILLOUX M, BOLLET C & al - A blind study of the

- polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA. *Tubercle Lung Dis* 1996; 77:358-362.
23. EING B, BECKER A, SOHNS A & RINGELMANN R - Comparison of Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* Assay with In-House PCR and Culture for Detection of *M. tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1998, 36:2023-2029.
24. ELHADJI M A - Infection par le virus VIH dans la population tuberculeuse à Niamey (NIGER) : dépistage et diagnostic biologique de la tuberculose et du VIH. Mémoire Ingén Génie Biologie Algérie, 2001, 47p.
25. FOLGUEIRA L, DELGADO R, PALENQUE E & NORIEGA AR - Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis in AIDS patients. *Neurology* 1994; 44:1336-1338.
26. FRESQUET-WOLF C, HAAS J, WILDEMANN B & STORCH-HAGENLOCHER B - Value of polymerase chain reaction (PCR) for diagnosis of tuberculous meningitis. *Nervenarzt* 1998; 69:502-506.
27. GARBA A - Prévalence de *Streptococcus pneumoniae* et *d'Haemophilus influenzae* dans l'étiologie de la méningite en pédiatrie (0-2 ans), Mémoire de technicien sup de labo Niamey 1987, N° 115/87, 53p.
28. GASCOYNE-BINZI D.M & P.M HAWKEY - False negative polymerase chain reaction on cerebrospinal fluid samples in tuberculous meningitis, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* August 1999, 67:250.

29. GENTILLINI M - Médecine tropicale, Paris : Flammarion, 1993, 989p.
30. GNINAFON M, ANAGONOU S, KINDE-GAZARD D & JOSSE R - La tuberculose extra-pulmonaire en milieu hospitalier au Bénin cas du CNNHPP-C de 1986-1990. Med Afr Noire 1995; 42:227-232.
31. GROSSET J, BOISVERT H, TRUFFOT-PERNOT C. Mycobactéries. In: LE MINOR L et VERON M; eds. Bactériologie Médicale; Paris: Flammarion 1990; 965-1117.
32. HASHIMOTO, T SUZUKI K, AMITANI R & KUZE F - Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* in sputa by amplification of IS6110. Inter Med 1995; 34:605-610.
33. HOOKER JA, MUHINDI DW, AMAYO EO, MCLIGEYO SO, BHATT KM & ODHIAMBO JA - Diagnosis utility of cerebrospinal fluid studies in patients with clinically suspected tuberculous meningitis. Int J Tuberc Lung Dis 2003; 7:787-796.
34. HUGO D, LEVY-FREBAULT V & THOREL MF - Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique; Paris : Institut Pasteur 1989; 87p.
35. INSERM - Méningites bactériennes - stratégies de traitement et de prévention. Paris: INSERM; 1996; 167p.
36. INSTITUT PASTEUR - Méningites bactériennes en Afrique : un programme recherche-action de cinq ans. Lettre Inst Pasteur 2003; 40:16.

- 37.KANEKO K, IGARASHI S, WATANABE H, TSUJI S & MIYATAKE T - Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction (PCR). *Rinsho Shinkeigaku* 1992; **32**: 88-90.
- 38.KENNETH TODAR-Tuberculosis; 2002.
www.textbookofbacteriology.net/ site visité le 16.09.03
- 39.KOX L, KUIJPER S & KOLK A - Early diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. *Neurology* 1995; **45**:2228-2232.
- 40.LAPEYSSONIE L - Épidémiologie des méningites purulentes en Afrique: méningites méningococciques. *Med Afr Noire* 1979; **26**:545-559.
- 41.LEAKE J, KONE M, YADA A & al - Early detection and response to meningococcal disease epidemics in Sub-Saharan Africa : appraisal of the WHO strategy. *WHO Bull* 2002; **80**:347.
- 42.LEE BW, TAN JA, WONG SC, TAN CB & coll - DNA amplification by the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. Comparison of protocols involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, 65kDa, and MPB64. *J Neurol Sci* 1994; **123**:173-179.
- 43.LEE BW, TAN JA, WONG SC, TAN CB, YAP HK, LOW PS, CHIA JN & TAY JS - The diagnosis of tuberculous meningitis using the polymerase chain reaction. *Singapore Med J* 1994; **35**:349-350.
- 44.LIN JJ, HSU YD, TSAO WL & HARN HJ - A young adult with tuberculous meningitis diagnosed by polymerase chain reaction on serial CSF samples : a case report. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1995; **56** 134-138.

- tuberculous meningitis established by culture. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; **67**:249-250.
52. MICHAEL J, LALITHA M, CHERIAN T, THOMAS K, MATHAI D, ABRAHAM O & BRAHMADATTAN K - Evaluation of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis. *Indian J Tuberculosis* 2002; **49**:133-137.
53. MIORNER H, SJOBRING U, NAYAK P & CHANDRAMUKI A - Diagnosis of tuberculous meningitis: a comparative analysis of 3 immunoassays, an immune complex assay and the polymerase chain reaction. *Tubercle Lung Dis* 1995; **76**:381-386.
54. NARAYANAN S, PARANDAMAN V, NARAYANAN P, VENKATESAN P, GIRISH C, MAHADEVAN S, & RAJAJEE S - Evaluation of PCR using TRC₄ and IS6110 primers in detection of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 2001; **39**:2006-2008.
55. NGUYEN LN, KOX LF, PHAM LD, KUIJPER S & KOLK AH - The potential contribution of the polymerase chain reaction to the diagnosis of tuberculous meningitis. *Arch Neurol* 1996, **53**:771-776.
56. NICOLAS P - Épidémie de méningite à méningocoque de sérotype W135 en 2000 et 2001. *Med Trop* 2001; **61**:259-261.
57. NOORDHOEK G, VAN EMBDEN J & AREND K - Questionable reliability of the polymerase chain reaction in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *N Eng J of Med* 1993; **329**:2036.

- 58.NOORDHOEK G, VAN EMBDEN J & AREND K - Reliability of Nucleic Acid Amplification for Detection of Mycobacterium tuberculosis: an International Collaborative Quality Control Study Among 30 Laboratories. J Clin Microbiol 1996; **34**:2522-2525.
- 59.OKUDA T, AKAI F, NAKANO N, UCHIYAMA T & TANEDA M - A case report of tuberculous meningitis: limits of detection using polymerase chain reaction (PCR). No To Shinkei 2003; **55**:65-69.
- 60.OMS - Carte sanitaire du Niger. Niamey : OMS 1994; 218p.
- 61.OMS - Lutte contre les épidémies de méningite à méningocoque. Genève : OMS 1999; 92p.
- 62.OMS - Manuel des techniques de base pour le laboratoire médical : examen du liquide céphalo-rachidien. Belgique : OMS 1982; 487(339-350).
- 63.OUEDRAOGO M, OUEDRAOGO G, OUEDRAOGO S, ZOUBGA Z, BAMBARA M, KY C & al - Aspects épidémiologique et clinique des miliaires tuberculeuses au Burkina Faso : à propos de 93 cas. Med Afr Noire 2000; **47**: 180-183.
- 64.OUMAROU I - Aspects épidémiologiques des méningites purulentes à Niamey (a propos de 341 cas). Thèse Méd Niamey 1998; 54p.
- 65.POPOVIC T, AJELLO G, FACKLAM R & coll - Technique de laboratoire pour le diagnostic des méningites à *Neisseria meningitidis*,

Streptococcus pneumoniae et *Haemophilus influenzae*.
WHO/CDS/CSR/EDC/99.7 2000 ; 71p.

- 66.RAFI A & STANFORD JL - Application and evaluation of PCR for the diagnosis of tuberculous meningitis. Clin Microbiol Inf 2000; 6:157.
- 67.RAFI A et NAGHILY B - Efficiency of Polymerase Chain Reaction for the diagnosis of tuberculous meningitis. Med J Islamic Acad Sci 1998; www.medicaljournal-ias.org/11_4/Rafi.htm site visité le 12.07.03.
- 68.RIOU JY - Introduction et historique : Infections méningococciques et gonococciques. Ann Inst Pasteur 1994; 5:95-97.
- 69.ROBERTS F - Problems in the diagnosis of tuberculous meningitis. Arch Neurol 1981; 38:319-320.
- 70.SAROJINI M, LALITHA M, CHERIAN T, KURIEN T & coll - Evaluation of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculous meningitis. Ind J Tub 2002; 49:133-137.
- 71.SETH P, AHUJA GK, VIJAYA BHANU N, BEHARI M, BHOWMIK S, BROOR S, & al - Evaluation of Polymerase Chain Reaction for rapid diagnosis of clinically suspected tuberculous meningitis. Tubercle Lung Dis 1996; 77: 353-357.
- 72.SHANKAR P, MANJUNATH N, MOHAN K, PRASAD K, BEHARI M, SHRINIWAS & AHUJA GK. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. Lancet 1991; 337:5-7.

73. SHARMA M, NAND N & PRASAD H - Polymerase chain reaction in tuberculous meningitis. *J Indian Acad Clin Med* 1999; **4**:96-98.
74. SOUSOU M & 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.
75. SUMI M, MATHAI A, REUBEN S, SARADA C & coll - 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**:135-138.
76. SUNIL K, NAIR M, KUNAL K & SARIN N - Polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis. *Indian Pediatrics* 2000; **37**:375-382.
77. TAN MF, NG WC, CHAN SH & TAN WC - Comparative usefulness of PCR in the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* 1997; **46**:164-169.
78. TRUFFOT-PERNOT C, DE BENOIST A-C, SCHWOEBEL V, TRYSTRAM D, GROSSET J, ROBERT J & al - Surveillance active de la méningite tuberculeuse en France en 1995, *BEH* 12/1998.
79. VANDEPITTE J, ENGBAEK K, PIOT P & HEUCK C - Bactériologie clinique : liquide céphalo-rachidien. OMS 1994; 121p.

Du 15 au 19 nous avons une amplification de l'ADN H37 RV 0,07 ng (16) et de l'ADN H37RV 0,625 ng (17) avec 1,25 unités de r-Taq/ μ l et les bandes des crachats (15, 18, 19) sont visibles sur la photo.

4-2-2 Optimisation de la technique PCR du BK dans les conditions du CERMES

4-2-2-1 Optimisation de la concentration de Taq (ADN polymerase)

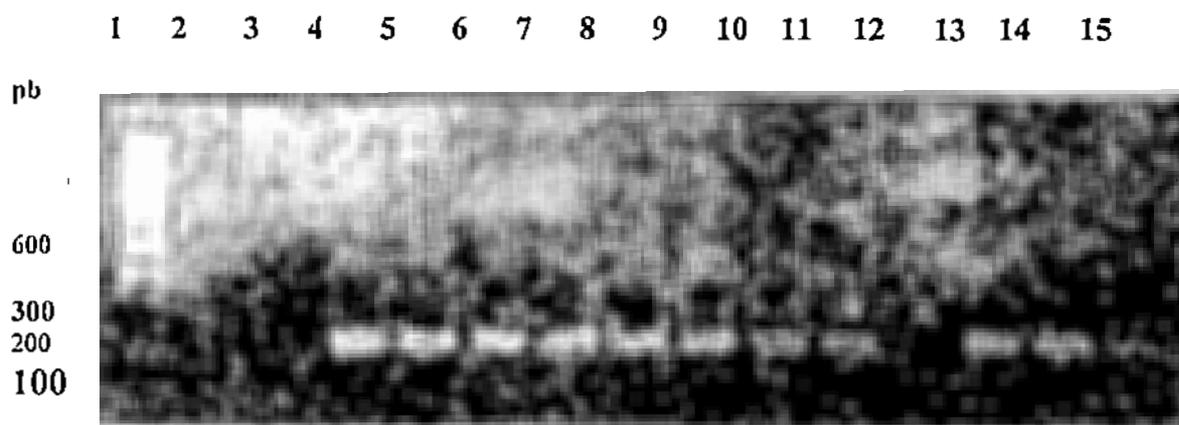


Figure 8 : optimisation de la concentration de la Taq

1 = témoin λ ; 2 = témoin négatif; 3 = témoin hotte; 4 = ADN H37RV 10 ng;
 5 = ADN H37RV 5 ng ; 6 = ADN H37RV 2,5 ng; 7 = ADN H37RV 1,25 ng;
 8 = ADN H37RV 0,625 ng; 9 = ADN H37RV 0,3125ng ; 10 = ADN H37RV
 0,15625 ng;

11 = ADN H37RV 0,078125 ng; 12 = vide; 13 = ADN H37RV 0,625 ng ;

14 = ADN H37RV 0,625 ng; 15 = ADN H37RV 0,625 ng

Amplification de quantités décroissantes d'ADN H37RV. Les bandes de 4 à 11 ont été acquises par amplification de quantités décroissantes successives d'ADN H37RV obtenues par dilution avec un LCR négatif.

La bande 13 est obtenue par amplification de l'ADN H37RV 0,625ng avec 5 unités de r-Taq/ μ l, la bande 14 par amplification de la même quantité d'ADN avec 2,5 unités de r-Taq/ μ l et la bande 15 par amplification de la même quantité d'ADN avec 1,25 unités de r-Taq/ μ l.

Nous avons une bande moins foncée en utilisant 1,25 unités de r-Taq/ μ l et une bande plus foncée en utilisant 5 unités de r-Taq/ μ l qui est la meilleure concentration de r-Taq.

4-2-2-2 Optimisation de la concentration de $MgCl_2$

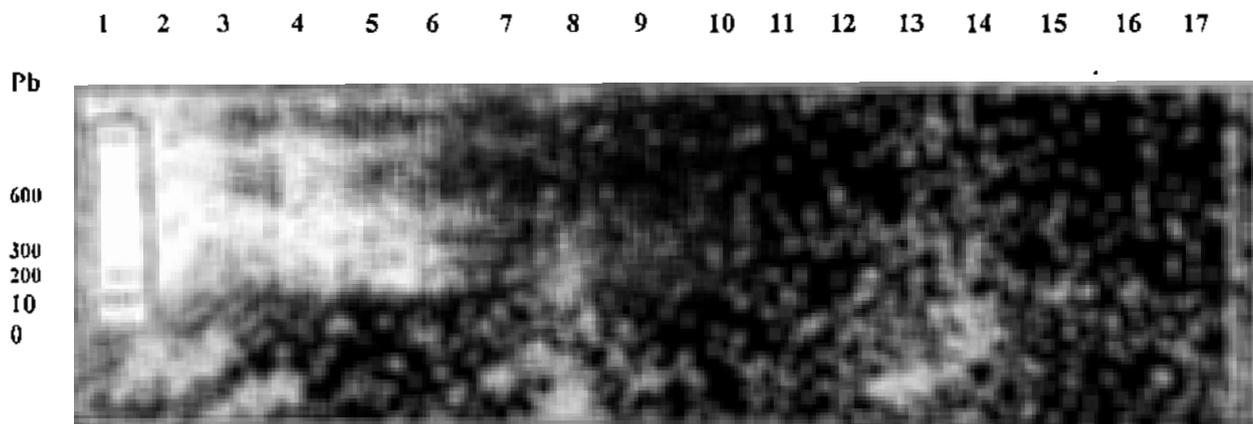
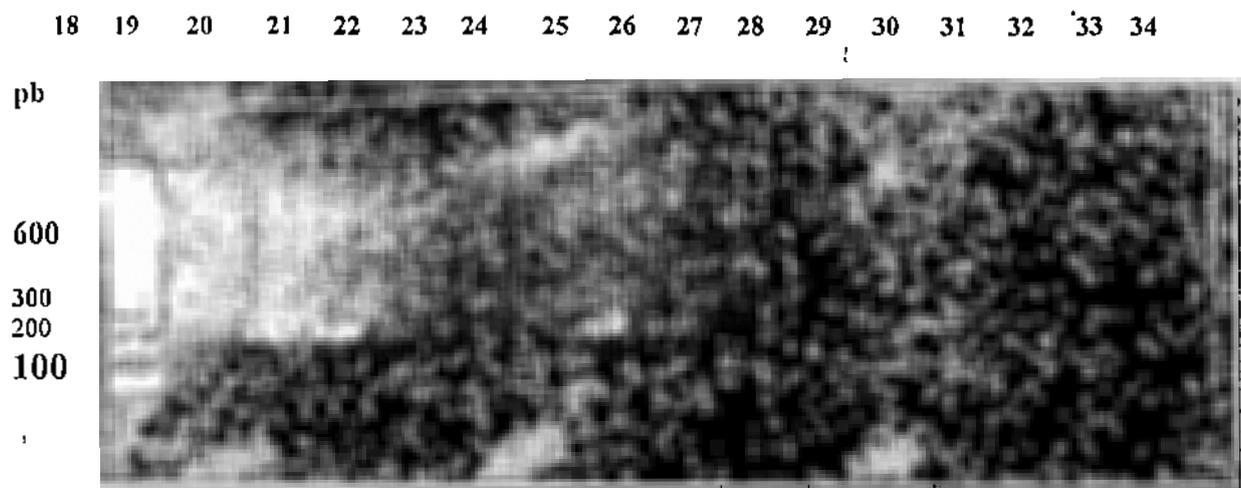


Figure 9 : Optimisation de la concentration de $MgCl_2$



Suite de la figure 9

1 = témoin λ ; 2 = témoin négatif; 3 = témoin hotte; 4 = ADN H37RV 10 fg;
 5 = ADN H37RV 100 fg ; 6 = ADN H37RV 50 fg; 7 = ADN H37RV 5 fg;
 8 = ADN H37RV 1 fg; 9 = ADN H37RV 10 fg; 10 = ADN H37RV 100 fg ;
 11 = ADN H37RV 50 fg; 12 = ADN H37RV 5 fg; 13 = ADN H37RV 1 fg;
 14 = ADN H37RV 10 fg; 15 = ADN H37RV 100fg; 16 = ADN H37RV 50 fg;

17 = ADN H37RV 5 fg; 18 = témoin λ ; 19 = ADN H37RV 10 fg; 20 = ADN H37RV 100 fg; 21 = ADN H37RV 50 fg; 22 = ADN H37RV 5 fg; 23 = ADN H37RV 1 fg;

24 = ADN H37RV 10 fg; 25 = ADN H37RV 100 fg; 26 = ADN H37RV 50 fg; 27 = ADN H37RV 5 fg; 28 = ADN H37RV 1 fg; 29 = ADN H37RV 10 fg; 30 = ADN H37RV 100 fg; 31 = ADN H37RV 50 fg; 32 = ADN H37RV 5 fg; 33 = ADN H37RV 1 fg; 34 = vide.

Amplification d'ADN H37RV 100, 50, 10, 5 et 1 fg avec une série de MIX (1 à 6) de concentration en $MgCl_2$ variable.

Les bandes 4, 5, 6, 7, 8 ont été obtenues par amplification avec le MIX₁ ($MgCl_2$ 10 mM);

9, 10, 11, 12, 13 avec le MIX₂ ($MgCl_2$ 15 mM);

14, 15, 16, 17 avec le MIX₃ ($MgCl_2$ 20 mM);

19, 20, 21, 22, 23 avec le MIX₄ ($MgCl_2$ 25 mM);

24, 25, 26, 27, 28 avec le MIX₅ ($MgCl_2$ 30 mM);

2, 3, 29, 30, 31, 32, 33 avec le MIX₆ ($MgCl_2$ 50 mM);

La bande 4, celle de l'ADN H37RV 10 fg n'est pas visible avec le MIX₁

Nous n'avons pas de bande visible avec le MIX₂ (9,10,11,12,13).

Nous avons une bande visible avec l'ADN H37RV 100, 50 et 10 fg pour tous les autres MIX sur le transilluminateur UV mais la bande de l'ADN H37RV 10 fg est plus visible avec le MIX₃ (14). Pour tous les MIX, nous n'avons pas de bandes visibles avec l'amplification de l'ADN H37RV 5 et 1 fg.

Les meilleures bandes (14,15,16) ont été obtenues avec le MIX₃ soit avec $MgCl_2$ 20mM qui est la meilleure concentration en $MgCl_2$.

4-3 Analyse des LCR en PCR du BK

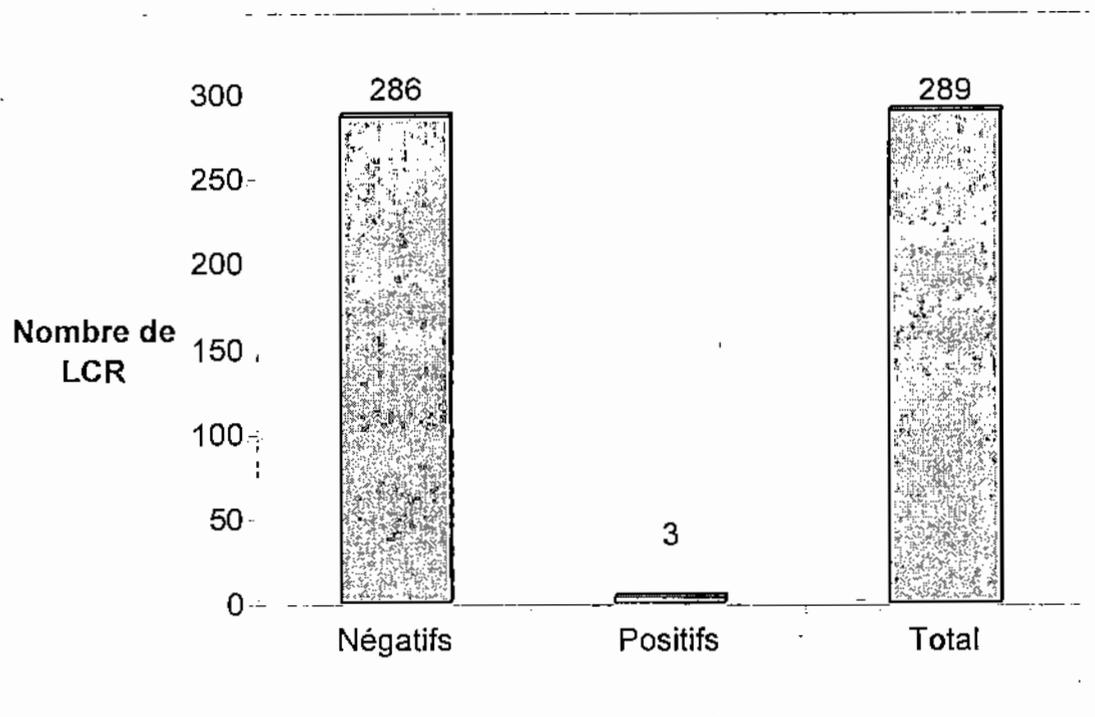


Figure 13 : Résultat des LCR analysés en PCR du BK

Parmi les 319 LCR négatifs en PCR multiplex et/ou bactériologie, 289 (90,5%) ont été analysés en PCR du BK. Le volume était insuffisant pour les 30 autres échantillons.

Sur les 289 LCR analysés, 3 ont été trouvés positifs à *Mycobacterium tuberculosis*, soit 1% (3/289) des LCR analysés ou 0,69% (3/435) des cas suspects de méningites à Niamey.

4-3-1 Exemple de vingt LCR analysés en PCR du BK

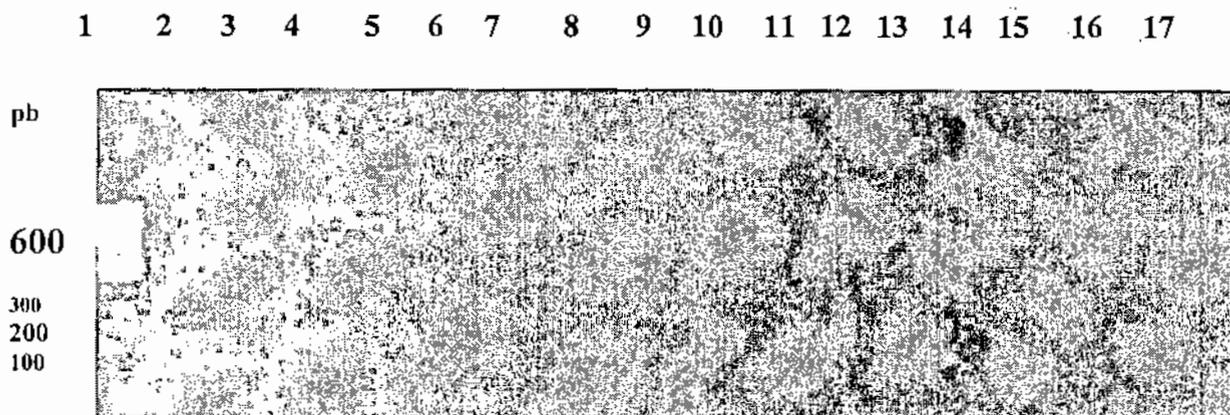
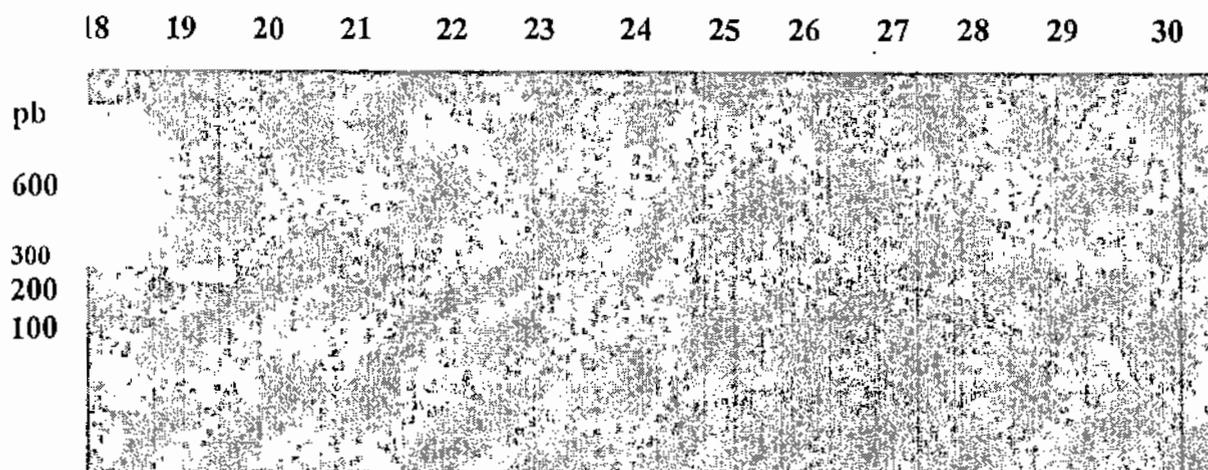


Figure 10 : Résultat de 20 LCR testés



Suite de la figure 10

1 = témoin λ ; 2 = ADN H37RV 100 fg ; 3 = ADN H37RV 50 fg ; 4 = ADN H37RV 10 fg ;

5 = témoin négatif ; 6 = témoin hotte ; 7 = LCR_1 ; 8 = LCR_2 ; 9 = LCR_3 ;

10 = LCR_4 ; 11 = LCR_5 ; 12 = LCR_6 ; 13 = LCR_7 ; 14 = LCR_8 ; 15 = LCR_9 ;

16 = LCR_{10} ; 17 = LCR_{11} ; 18 = témoin λ ; 19 = ADN H37RV 100 fg ;

20 = ADN H37RV 50 fg ; 21 = ADN H37RV 10 fg ; 22 = LCR_{12} ; 23 = LCR_{13} ;

24 = LCR_{14} ; 25 = LCR_{15} ; 26 = LCR_{16} ; 27 = LCR_{17} ; 28 = LCR_{18} ; 29 = LCR_{19} ; 30

= LCR_{20} .

Amplification de 20 LCR , nous n'avons pas de contamination puisque nous n'observons pas de bande pour le témoin négatif (5) et le témoin hotte (6). Par conséquent nous n'avons pas de faux positifs au cours de cette manipulation. Nous n'avons pas non plus observé de bande pour ces 20 LCR analysés. Ils ont tous été négatifs en PCR du BK (7 à 30). En effet ils sont tous identiques à 5 et 6, nos témoins négatifs.

Les bandes des témoins positifs ADN H37RV 100, 50 et 10 fg sont bien visibles (230 pb).

4-3-2 LCR positifs obtenus en PCR du BK

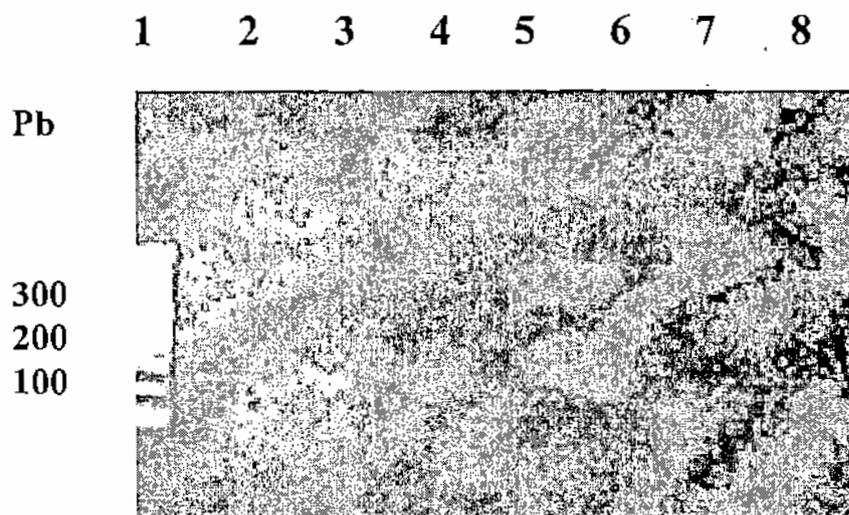


Figure 11 : LCR positifs

1= témoin λ ; 2 = ADN H37RV 100 fg ; 3 = ADN H37RV 50 fg ; 4 = ADN H37RV 10 fg ;

5 = LCR 1456 ; 6 = LCR 1397 ; 7 = LCR 1445

Nous observons des bandes pour ces trois échantillons de LCR. Les bandes obtenues sont au même niveau que les bandes des témoins positifs ADN H37RV 100 fg , 50 fg et 10 fg

(230 bp). Nous avons obtenus trois LCR positifs en PCR du BK.

L'intensité de la bande obtenue pour le patient No1 (5) est comprise entre celle des témoins positifs 50 fg et 100 fg, celle du patient No2 (6) est plus faible que le témoin positif 10 fg et celle du patient No3 (7) entre les témoins positifs 50 fg et 10fg.

4.4 La prévalence des germes de la méningite

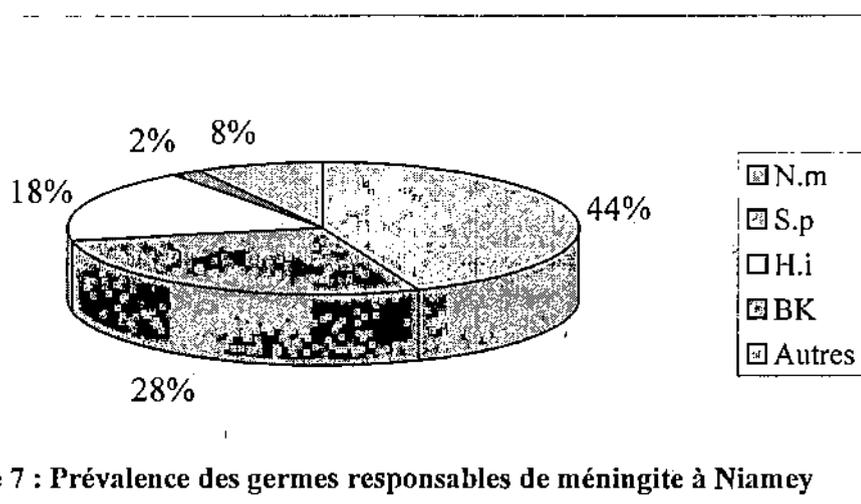


Figure 7 : Prévalence des germes responsables de méningite à Niamey

Globalement sur les 465 échantillons de LCR analysés au CERMES du 20 Juin 2002 au 02 Mai 2003, 316 LCR (68%) ont été trouvés négatifs et 149 LCR (32 %) ont été trouvés positifs.

Parmi les 149 (100%) LCR trouvés positifs, 44% sont positifs à *N.meningitidis*, 28% à *S.pneumoniae*, 18% à *H. influenzae*, 2% à *Mycobacterium tuberculosis* et enfin 8% des échantillons de LCR positifs ont été trouvés positifs à d'autres germes dont certains sont des germes de contamination.

4.5 Données cliniques des malades tuberculeux

Le patient N°1 est un jeune homme de 24 ans, hospitalisé au Pavillon D de l'HNN le 18 Avril 2003. Il est décédé le 20 Avril 2003 soit deux jours après son hospitalisation. Il avait un LCR hémorragique à prédominance lymphocytaire (69%).

Le patient N°2 est une jeune femme de 25 ans. Elle a été enregistrée dans le registre de garde de l'HNN à l'aiguillage le 16 Avril 2003. Elle a reçu un traitement de PeniV + Meganolose CP mais n'a pas été hospitalisée. Son LCR était clair. Son évolution clinique est inconnue.

Le patient N°3 est une jeune femme de 22 ans, hospitalisée le 11 Avril 2003 en médecine B3 puis transférée le même jour au pavillon D de l'HNN. Elle est décédée juste après son transfert. Le LCR était hématique et la numération a été effectuée dans le laboratoire du HNN (GB 100/mm³ et GR 10 000 /mm³). On n'a aucune autre donnée supplémentaire.



*COMMENTAIRES
ET
DISCUSSION*

V. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

5.1 Les matériels et la méthodologie

La PCR est une technique d'amplification autorisant une détection rapide de l'ADN cible. Un diagnostic rapide des méningites est essentiel et vital. Or les méthodes classiques de diagnostic que sont la microscopie et la culture ne sont ni assez sensibles pour la microscopie ni assez rapide pour la culture. Ceci est encore plus vrai pour le cas des méningites tuberculeuses où la culture prend 4 à 8 semaines suivant les milieux utilisés.

Aussi plusieurs auteurs ont comparé la sensibilité et la spécificité de la technique PCR à celles de la culture et de la microscopie pour le diagnostic de la méningite tuberculeuse (12, 56, 72, 74).

La plupart de ces auteurs ont conclu à une sensibilité élevée de la technique PCR par rapport à la culture et à la microscopie (12, 32, 37, 39, 43, 56, 67, 70, 71,). D'autres auteurs ont trouvé l'inverse (9, 51). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer. En effet, la technique PCR permet théoriquement de détecter une molécule d'ADN et permet tout autant théoriquement l'identification précise d'une espèce donnée au sein d'un genre; de cela émane une sensibilité et une spécificité élevée de cette technique. Mais il arrive que la sensibilité soit diminuée en raison de la présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase dans l'échantillon. On obtient alors des faux négatifs. La faible spécificité de la technique PCR peut également résulter d'une contamination des échantillons lors des manipulations donnant alors des faux positifs.

D'autres auteurs par contre ont évalué la performance de la technique PCR dans la détection de l'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (22, 58).

De tous ces travaux il découle que si les conditions opératoires sont bien respectées la technique PCR est rapide, sensible et spécifique. Le problème des résultats faux positifs pourrait être résolu par une standardisation de la technique PCR (57) et le respect strict des procédures pour éviter la contamination.

Néanmoins dans nos pays en voie de développement, la culture et la microscopie constituent des moyens de diagnostic abordables et faisables.

Toutefois, au Niger la technique PCR est un outil utilisé pour la surveillance microbiologique des méningites. Le laboratoire PCR du CERMES est opérationnel depuis octobre 2002 et réalise la PCR Multiplex de *Neisseria meningitidis* (méningocoque A, B, C, Y, W135) de *Streptococcus pneumoniae* et d'*Haemophilus influenzae* (b et indéterminé). Le CERMES en tant que laboratoire de référence des méningites reçoit tous les LCR de l'HNN. Ce dernier est l'hôpital de référence vers lequel tous les cas suspects de méningites de la capitale sont acheminés. Les LCR sont analysés en bactériologie et/ou en PCR Multiplex. Afin de déterminer la part de la tuberculose dans les cas de méningites à Niamey, la technique PCR du BK a été transférée au CERMES en mi-Avril 2003. Nous avons commencé ce transfert en janvier en nous inspirant dans un premier temps du protocole de l'Institut Pasteur de Madagascar. Puis en vue d'optimiser les conditions de la technique PCR du BK nous avons fait varier la concentration de $MgCl_2$ et de la r-Taq pour trouver la meilleure concentration. La technique PCR utilise les amorces spécifiques d'un fragment pour amplifier une région de l'ADN cible. Nous avons utilisé les amorces INS1 et INS2 amplifiant le fragment IS6110 de l'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* dans des échantillons de LCR (48,76).

Avant l'amplification proprement dite de l'ADN bactérien, il est nécessaire d'abord d'extraire l'ADN bactérien. La méthode d'extraction utilisée au CERMES est simple et rapide.

Il est très important pour toute technique PCR d'éviter une contamination pendant toute la durée de la manipulation.

C'est pour cela que nous travaillons dans trois pièces différentes et il n'y a pas d'échange de matériels entre ces différentes pièces.

L'usage des hottes et de la lampe UV pendant et après chaque manipulation est strictement respecté dans les différentes pièces.

Le CERMES met tout en œuvre pour éviter toute contamination car une contamination est difficile à éliminer et ses conséquences sont désastreuses.

Ainsi pour identifier une éventuelle contamination, des contrôles négatifs sont utilisés dans toutes nos séries de manipulations. Nous avons un témoin négatif destiné au contrôle de la hotte de la pièce de préparation du MIX et un témoin hotte (th) destiné au contrôle de la hotte de la pièce d'extraction de l'ADN bactérien.

Ces témoins négatifs et les témoins hottes doivent toujours être négatifs. Au cours de cette étude nous n'avons pas rencontré de faux positif, tout comme KANEKO K et coll (37). Ils ont décelé l'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* dans 5 LCR de 6 LCR provenant de 6 patients suspectés cliniquement de méningite tuberculeuse. Ils n'ont rien trouvé dans 10 LCR provenant de patients atteints d'autres types de méningites et 10 contrôles négatifs.

Nous avons utilisé un plus grand nombre d'échantillons mais pas autant de contrôles négatifs.

Il est certain que l'utilisation de trois pièces séparées, de deux hottes et de matériels différents dans chaque pièce nous a évité des problèmes de contamination.

En ce qui concerne nos témoins positifs, nous avons utilisé les concentrations d'ADN H37RV de 100fg/ μ l, 50 fg/ μ l et 10 fg/ μ l. cette dernière étant le seuil de détection de la réaction. La concentration limite 10 fg/ μ l était toujours visible montrant la reproductibilité de nos séries. Tout LCR contenant 10 fg/ μ l d'ADN de *Mycobacterium tuberculosis* était donc décelable. DEL PORTILLO P et coll (17) avaient le même seuil.

Mais aussi au cours de nos travaux nous n'avons pas recherché la présence ou l'absence d'inhibiteur de la r-taq polymérase dans les échantillons de LCR analysés.

Par ailleurs LIN et coll (44) ont rapporté le cas d'un patient suspecté de méningite tuberculeuse, pour lequel une réaction sur trois était positive.

Ce malade a bien répondu au traitement anti-tuberculeux. Il est donc intéressant dans certains cas de répéter la PCR du BK.

5.2 Les résultats

Dans la présente étude le CERMES a reçu 465 échantillons de LCR du 20 Juin 2002 au 02 Mai 2003 de patients suspectés de méningites de la ville de Niamey. Ces LCR ont été d'abord analysés en bactériologie et en PCR Multiplex, avant d'être analysés en PCR du BK. Ainsi 146 LCR (31,4 %) ont été trouvés positifs en bactériologie et/ou en PCR Multiplex et 319 LCR ont été trouvés négatifs. Parmi les 146 LCR positifs 44% ont été trouvés positifs à *N. meningitidis*, 28% à *S. pneumoniae*, 18% à *H. influenzae* et 8% positifs à d'autres microorganismes (entérobactéries, staphylocoques, cryptocoque).

Dans l'étude de SOUSOU et coll (74) allant de 1985 à 1993, 2587 cas de méningites ont été recensés dans la ville de Niamey, parmi lesquels 53,85 % des cas de méningites repérés étaient dûs à *N. meningitidis*, 21,99% à *S. pneumoniae*, 16,46 % à *H. influenzae* et 7,69 % positifs à d'autres microorganismes.

Dans la période de notre étude nous avons trouvé un taux moins élevé de cas de méningites dûs à *N. meningitidis* et un taux plus élevé à *S. pneumoniae*. Cependant nous avons manifestement les mêmes taux pour *H. influenzae* et les autres microorganismes.

Dans une autre étude (5) qui a porté sur 287 cas de méningites purulentes bactériologiquement confirmés dans la ville de Niamey d'octobre 1990 à octobre 1991; 42,51% étaient positifs à *N. meningitidis*; 18,47% à *S. pneumoniae*; 16,38% à *H. influenzae* et 4,18% à d'autres microorganismes.

Parmi les 319 LCR négatifs nous avons trouvé 3 LCR soit 0,6 % du total des patients suspects de méningites.

Au cours des travaux de MATAR et coll. (49) 46 LCR de patients de l'université américaine du centre médical de Beyrouth (Liban) suspectés de méningite bactérienne ont été analysés par la technique PCR. De ce fait le fragment 16S rRNA a d'abord été utilisé pour détecter l'ADN d'*Haemophilus influenzae*, de *Staphylococcus aureus*, de *Neisseria meningitidis* et de *Streptococcus pneumoniae* ensuite le fragment IS6110 a été utilisé pour détecter l'ADN de *Mycobacterium tuberculosis*. Ils ont trouvé 36 LCR (78,3%) négatifs et 10 LCR (21,7%) positifs dont 7 LCR (15,2%) positifs à *Haemophilus influenzae*, 1 LCR (2,17%) à *Staphylococcus aureus*, 1 LCR (2,17%) à *Streptococcus pneumoniae* et 1 LCR (2,17%) positif à *Mycobacterium tuberculosis*.

Comparativement aux travaux de MATAR et coll, notre échantillon est beaucoup plus important. Ils ont trouvé 10 LCR (21,7 %) positifs et 36 LCR (78,3%) négatifs. Notre taux de confirmation est 32%. Le Niger est situé dans la zone de la ceinture africaine de la méningite d'où un taux élevé de méningites à *Neisseria meningitidis*. MATAR et coll ont trouvé 1 LCR (2,17%) positif à *Mycobacterium tuberculosis* et nous avons trouvé 3 LCR (0,6 %) positif à *Mycobacterium tuberculosis*. Le taux de *Mycobacterium tuberculosis* dans l'étude de MATAR et coll est plus élevé que le nôtre, 2,17% pour 0,6%, du fait peut être de leur faible échantillonnage.

Une enquête rétrospective sur l'évolution de nos trois malades tuberculeux a été faite à partir de leur fiches accompagnant le prélèvement reçu au CERMES (annexe 3).

Ces trois malades tuberculeux provenaient tous de l'hôpital national de Niamey. Deux échantillons de LCR provenaient du pavillon Raymond Madras (celui des maladies infectieuses) et le dernier LCR de l'aiguillage (service d'entrée). Nous avons remarqué que de nombreuses fiches ne sont pas correctement remplies. Effectivement beaucoup de données cliniques manquent dans les trois fiches de nos malades tuberculeux.

Car mis à part le nom et l'âge des patients seule la température était évoquée pour deux des trois malades tuberculeux. L'un des deux patients provenant du PRM avait une température de 40°C et son évolution était inconnue alors que la fiche du second ne contenait aucun renseignement clinique. En ce qui concerne le patient provenant de l'aiguillage sa fiche n'indiquait que la température (38°C). Afin d'obtenir d'autres renseignements cliniques nous avons consulté le registre du laboratoire de bactériologie du CERMES, du PRM, de l'aiguillage et du laboratoire de bactériologie de l'HNN.

A l'HNN, tous les patients suspects de méningites sont dirigés au PRM. De ce fait dans ce pavillon, lorsqu'un patient est suspecté de méningite tuberculeuse, un traitement anti-tuberculeux est instauré et le malade est référé au CNAT. En effet au Niger, la culture du BK ne se pratique pas, un cas de méningite tuberculeuse est suspecté suivant les données cliniques du malade, les analyses du LCR et la réponse au traitement anti-tuberculeux.

Dans le cas particulier de nos deux malades tuberculeux, une jeune femme de 22 ans et un jeune homme de 24 ans hospitalisés au PRM, la suspicion de tuberculose n'a pas été évoquée malgré un LCR lymphocytaire et hémorragique. Le diagnostic de méningite tuberculeuse n'est pas aisé avec les données cliniques (19).

Les deux malades tuberculeux du PRM sont tous deux décédés, la jeune femme le jour même de son hospitalisation et le jeune homme deux jours. On ignore le sort du 3^{ème} malade.

Les trois malades tuberculeux détectés dans notre étude étaient âgés de 22, 24 et 25 ans, en comparaison avec le patient atteint de méningite tuberculeuse dans l'étude de MATAR et coll. est un adulte de 32 ans.

Pendant la période de cette étude aucun cas de méningite tuberculeuse n'a été suspecté au PRM. Par contre en Juin 2003 un cas a été suspecté.

Le malade tuberculeux était un jeune homme de 18 ans qui avait un LCR lymphocytaire et qui répondait au traitement anti-tuberculeux, ainsi il a été référé au CNAT. Ce malade était VIH négatif.

Il y a une forte corrélation tuberculose/SIDA (6, 24), par conséquent méningite tuberculeuse/SIDA (7, 25).

Le statut sérologique d'un seul de nos trois malades tuberculeux était connu, il était VIH négatif. Celui des deux autres malades tuberculeux était inconnu. Nous n'avons pas non plus le statut BCG de nos trois malades tuberculeux.

Le vaccin BCG protège surtout l'enfant des formes extra-pulmonaires de la tuberculose comme la méningite et la miliaire tuberculeuse. Mais on pense qu'il protège également de la tuberculose pulmonaire et que cette immunité se conserve durant 15 ans au minimum (35).

L'immunité que confère le vaccin BCG est certes très controversé et des critères très stricts doivent être remplis par un pays pour surseoir à cette vaccination. Mais les pays en voie de développement sont loin de remplir ces critères.

La tuberculose est hyperendémique au Niger la vaccination BCG est obligatoire à la naissance normalement. Une petite cicatrice sur l'avant bras gauche est la preuve de cette vaccination. La couverture vaccinale en BCG pour les enfants <11 mois est 35,46% en 2000 au Niger (DNI/PEV/SGD) et l'incidence de la tuberculose était estimé à 100-300 cas pour 100.000 habitants en 2000 par l'OMS (WHO/Global Control; 2003). Au courant de la même année, 4292 cas de tuberculose toutes formes confondues étaient notifiés au Niger alors que 13.500 cas étaient attendus d'où un taux de détection très bas de 31,79 % (WHO/Global Control; 2003). La couverture vaccinale en BCG en 2002 (DNI/PEV/SGD) pour les enfants de <11 mois était de 52% au Niger et de 87 % pour la ville de Niamey. Dans la même année 2733 cas de tuberculose ont été dépistés au Niger dont 652 cas à Niamey (données PNLTCNAT). En Août 2003 la couverture vaccinale en BCG est de 62% au Niger et elle est de 88% pour la ville de Niamey. (DNI/PEV/SGD)

La vaccination BCG assure une protection à 80 % des enfants contre la méningite tuberculeuse, avec une bonne couverture vaccinale en BCG de 87 puis 88 % en 2002 et 2003 la ville de Niamey pendant la période au cours de laquelle cette étude a été effectuée. Cela peut expliquer l'absence d'enfant atteint de méningite tuberculeuse dans cette étude et le fait que les trois cas diagnostiqués soient tous des adultes.

En France en 1995 la couverture vaccinale était d'environ 80 % (67). Au cours d'une enquête sur 7075 cas de tuberculose TRUFFOT-PERNOT et coll (67) ont recensés 49 cas de méningite tuberculeuse, 47 étaient des adultes et seulement deux enfants de moins de 5 ans (9 mois et 23 mois) n'ayant pas reçu la vaccination.



CONCLUSION

VI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons transféré avec succès au CERMES, la méthode PCR pour la détection de *M tuberculosis*. En l'absence de laboratoire de culture de BK au Niger, cette technique est la seule qui puisse nous permettre de mener une étude sur la part de la tuberculose dans les cas de méningites dans la capitale où la couverture vaccinale pour le BCG est estimée à 88% chez les enfants de <11 mois.

Sur les 465 LCR provenant de cas suspects de méningites de l'Hôpital National de Niamey (hôpital de référence pour les méningites) entre le 20 juin 2002 et le 02 Mai 2003, le taux de confirmation par la bactériologie et/ou la PCR multiplex (*N.meningitidis*, *S.pneumoniae*, *H.influenzae*) a été de 31,4%. Il s'agit de *N meningitidis* (14%), *S pneumoniae* (9 %) et *H. influenzae* (5,8%) qui sont les 3 germes principalement mis en cause dans les méningites bactériennes dans les pays de la ceinture de la méningite.

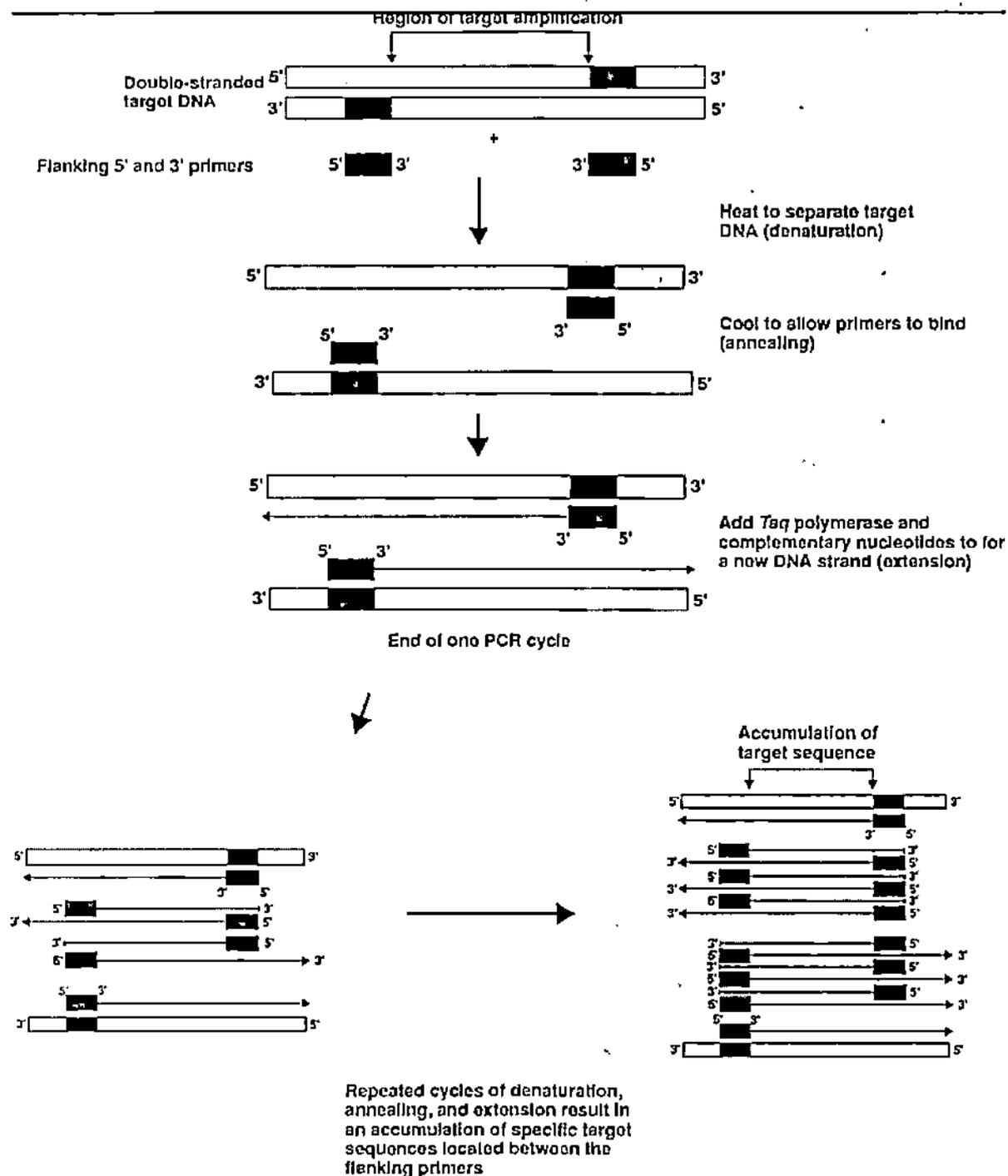
Le diagnostic de la tuberculose par la PCR *IS 6110* a été posé rétrospectivement pour 3 malades soit une prévalence de 0,64% des suspicions de méningites à Niamey. Ce sont 3 malades adultes dont 2 sont décédés rapidement et le dernier non hospitalisé a été perdu de vue. Ces résultats préliminaires doivent être affinés sur un plus grand nombre de cas de méningites.

La tuberculose est hyperendémique au Niger (100 à 300 cas/ 100 000 hbt) et la couverture vaccinale du BCG est très basse dans certaines régions (57% en 2002 dans la zone de Tahoua). On dispose aujourd'hui de très peu de données sur la méningite tuberculeuse au Niger. Il serait souhaitable d'étendre cette étude sur une plus longue période dans la capitale et si possible sur d'autres régions à condition que des prélèvements représentatifs puissent être obtenus.

A decorative horizontal scroll border with curled ends, containing the word 'RECOMMENDATIONS' in a serif font.

RECOMMENDATIONS

Annexe 2 : principe de la technique d'amplification



Fiche de renseignement pour prélèvement de LCR

N° du prélèvement	<input type="text"/>	Date de prélèvement	<input type="text"/>
Service demandeur	<input type="text"/>		
Etablissement	<input type="text"/>		
Ville	<input type="text"/>		
Département	<input type="text"/>		

Nom du patient	<input type="text"/>		
Prénom du patient	<input type="text"/>		
Sexe	<input type="checkbox"/> masculin	<input type="checkbox"/> féminin	Age <input type="text"/> ans ou <input type="text"/> mois
Ville/village de résidence	<input type="text"/>		
Canton	<input type="text"/>		
Département	<input type="text"/>		
Date de début de maladie	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> ou <input type="checkbox"/> inconnu	Date de consultation	<input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> ou <input type="checkbox"/> inconnu

Antécédents de vaccination méningo A/C	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu
Si oui, année du dernier vaccin méningo A/C	<input type="text"/>	ou	<input type="checkbox"/> inconnu

Antécédents de vaccination Hib	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	Nombre de doses reçues	<input type="text"/>	ou	<input type="checkbox"/> inconnu
Date 1e dose	<input type="text"/>	Date 2e dose	<input type="text"/>	Date 3e dose	<input type="text"/>		

Autres cas de méningite dans l'entourage	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu		
Voyage dans les 30 derniers jours	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	Lieu	<input type="text"/>
Participation au dernier pèlerinage	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	Si oui, date de retour	<input type="text"/>
Contact avec un pèlerin rentré du pèlerinage depuis moins de 3 mois	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu		

Température	<input type="text"/>	Vomissements	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu			
Céphalées	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	Photophobie	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	
Raideur de la nuque	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	Fontanelle bombée	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	<input type="checkbox"/> NA
Troubles de conscience	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	Irritabilité	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	
Convulsions	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	Purpura	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	
Arthrite	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	Paralysie localisée	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	
Hypoacousie	<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non	<input type="checkbox"/> inconnu	Autre	<input type="text"/>			

Antibiotique administré	<input type="text"/>				
Date de début	<input type="text"/>	Evolution	<input type="checkbox"/> guérison	<input type="checkbox"/> décès	<input type="checkbox"/> inconnu

Fiche remplie le	<input type="text"/>	par	Nom	<input type="text"/>
			Fonction	<input type="text"/>

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 de 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.

4.2 Résultats globaux

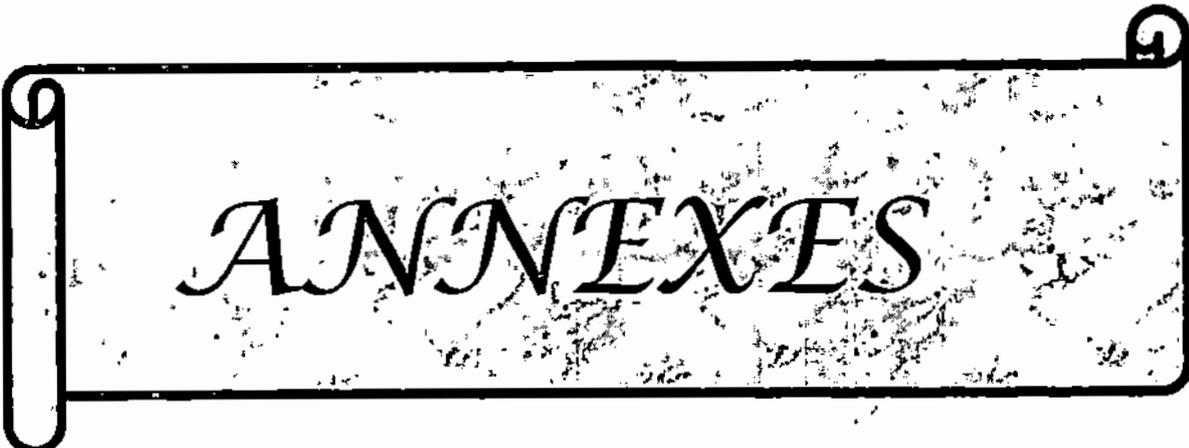
4-2-1 Transfert de la technique PCR du BK au CERMES



Figure 7 : Transfert de la technique PCR du BK.

1 = témoin λ (100 pb); 2 = témoin négatif; 3 = témoin hotte; 4 = LCR témoin;
 5 = ADN H37RV 10 ng ; 6 = ADN H37RV 5 ng; 7 = ADN H37RV 0,07 ng;
 8 = ADN H37RV 0,625 ng; 9 = Solut° initiale de crachats ; 10 = Solut° de crachats n°1; 11= Solut° de crachats n°2; 12 = Solut° de crachats n°3; 13 = Solut° de crachats n°4; 14 = témoin λ ; 15 = Solut° de crachats n°1; 16 = ADN H37RV 0,07 ng;
 17 = ADN H37RV 0,625 ng; 18 = Solut° de crachats n°4; 19 = Solut° initial de crachats;
 20 = témoin λ .

Amplification de quantités décroissantes d'ADN H37RV et de crachats de malades tuberculeux. Les bandes des différentes quantités d'ADN H37RV (5-8) sont bien visibles sur la photo et se lisent entre 100 et 300 pb (230 pb). Les bandes des différentes dilutions des crachats de malades tuberculeux (9-13) ne sont pas visibles sur la photo mais sont visibles sur le transilluminateur UV.



ANNEXES

X. ANNEXES

Annexe 1 : les différentes préparations des solutions de travail

Préparation du TBE 10X (solution stock)

On Utilisé le TBE 1X (solution de travail) pour la préparation et la conservation du gel et pour la migration électrophorétique .

Produit	Quantité (1L)	Concentration finale
Trizma base (121.1 g /mol)	108g	0.9M
Acide borique (61.83 g/mol)	55g	0.9M
EDTA (372.2 g/mol)	9.3g	27.3M

On dissout les différents produits dans un volume d'eau bidistillée (moitié du volume finale), on homogénéise avec l'agitateur et on ajuste à pH 7 avec de la soude (NaOH) et si besoin est avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl). Puis, on complète jusqu'au volume final avec de l'eau bidistillée.

Préparation du TE 10X (solution stock)

On utilise le TE 1X (solution de travail) pour la préparation de la poudre de H37Rv et pour les différentes dilutions de la quantité de H37Rv pour l'obtention de témoins positifs.

Tris (Trizma base)	1.2110g
EDTA	0.3722g
Eau déminéralisée q.s.p	100ml

On fait dissoudre en homogénéisant avec l'agitateur dans un volume d'eau bidistillée (moitié du volume finale), on ajuste à pH 8 avec du HCl, puis on autoclave et on conserve à température ambiante.

Pour obtenir la solution de travail on dilue au 10^{ème} avec de l'eau bidistillée, cette solution peut être conserver à température ambiante.

Tampon PCR 10X Buffer

Il est fourni par les compagnies commerciales avec la r-Taq.

Préparation du témoin λ ou témoin pb Ladder

On prélève 20 μ l de pb Ladder auquel on ajoute 10 μ l de bleu de charge.

Préparation de la solution de DNTP

Les DNTP sont fournies par les compagnies commerciales à 100 mM. on utilise du DNTP à 2.5mM pour la PCR de BK.

Donc on prépare une solution de travail à 2.5 mM en prélevant 25 μ l de chaque DNTP (dTTP, dATP, dCTP, dGTP) et le mélangeant à 900 μ l d'eau ultra pure autoclavée.

Préparation des Amorces

On prépare d'abord une solution stock à 50 mM. On aliquote cette solution à raison de 10 μ l par tube. Pour obtenir la solution de travail, qui est de 5 mM on ajoute 90 μ l d'eau desionisée dans la solution stock (tube de 10 μ l).

Préparation du MIX Stop ou Bleu de charge

On prépare d'abord la solution de l'EDTA 0.5M pH 8, la solution de SDS à 10% et la solution de tris 1M pH 8 avant de préparer le bleu de charge.

Préparation de l'EDTA

On fait dissoudre 372.2g d'EDTA dans 1.6l d'eau bidistillée stérile (la solution est laiteuse et ne devient limpide qu'à pH basique), on homogénéise avec l'agitateur, on ajuste le pH avec la soude jusqu' à obtention de pH 8, puis on complète le volume jusqu' à 2 litres et on répartit en fonction du besoin dans des flacons de 250, 500 ml et enfin on autoclave.

Préparation de SDS à 10 %

Pour des raisons de sécurité, le port de gant, de lunettes et de masque est obligatoire jusqu'à la fin de la manipulation (dissolution complète du produit).

On dissout 200g de SDS dans 1.8 litres d'eau bidistillée stérile, on homogénéise avec l'agitateur, on ajuste à pH en ajoutant quelques gouttes de NaOH et on complète le volume à 2 litres.

Il faut Répartir la solution en fonction du besoin dans des flacons de 250, 500 ml.

Préparation du tris 1M (pour 2 litres de solution).

On pèse 242.2 g de tris base que l'on fait dissoudre en homogénéisant avec l'agitateur dans 1.6 litres d'eau bidistillée. On ajuste le pH avec du HCl concentré.

pour une solution de tris 1M pH 7.4 :

on ajoute 100 à 150 ml de HCL jusqu'à la valeur pH 7.4.

Pour une solution de tris 1M de pH 8 :

on ajoute 70 à 90 ml de HCL concentré jusqu'à la valeur pH 8.

Une fois le pH ajusté, on complète le volume à 2 litres .

Composants	Poids ou volume pour 5ml	Concentration finale
EDTA 1M pH 8	1.25ml	0.25M
Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) à 10%	1ml	2 %
Glycerol Pur	3ml	60 %
Bleu de bromophénol	10mg	0.2 %

Préparation du MgCl₂

MgCl₂ 50 Mm = solution disponible

MgCl₂ 10 Mm = 8 µl de solution disponible + 32 µl d'eau ultra pure stérilisée

MgCl₂ 15 Mm = 12 µl de solution disponible + 28 µl d'eau ultra pure stérilisée

MgCl₂ 20 Mm = 16 µl de solution disponible + 24 µl d'eau ultra pure stérilisée

MgCl₂ 25 Mm = 20 µl de solution disponible + 20 µl d'eau ultra pure stérilisée

MgCl₂ 30 Mm = 24 µl de solution disponible + 16 µl d'eau ultra pure stérilisée

On pèse 10 g de MgCl₂.6H₂O que l'on fait dissoudre dans de l'eau bidistillée (100ml) et on homogénéise la solution. On fait des dilutions au 10^{ème}, on autoclave 15 mn, et l'on a ainsi la solution stock à 50 mM.

On prépare la solution de travail de 20 mM en diluant au 3/2 avec de l'eau ultra pure stérilisée.

Préparation de l'Eau desionisée

Autoclavé de l'eau apyrogène pendant 15 minutes et laissé sous UV pendant 15 minutes.

Dilution de l'ADN H37RV

Solution stock : 2µg de poudre d'ADN H37RV lyophilisée + 40 µl de TE = solution de H37RV à 50 ng / µl

Solution de H37RV à 10 ng = 1 µl de solution stock + 4 µl de TE

Solution de H37RV à 5 ng = 2µl de solution stock + 18 µl de TE

Solution de H37RV à 2.5 ng = 8 µl de solution de H37RV à 5 ng + 8 µl de TE

Solution de H37RV à 1.25 ng = 8 µl solution de H37RV à 2.5 ng + 8 µl de TE

Solution de H37RV à 0.0625 ng = 8 µl solution de H37RV à 1.25 ng + 8 µl de TE

Solution de H37RV à 0.3125 ng = 8 µl solution de H37RV à 0.0625 ng + 8 µl de TE

Solution de H37RV à 0.15625 ng = 8 µl solution de H37RV à 0.3125 ng + 8 µl de TE

Solution de H37RV à 0.078125 ng = 8 µl de solution de H37RV à 0.15625 ng + 8 µl de TE

Solution de H37RV à 1000 fg = 1 μ l de solution de H37RV à 0.0625 ng + 624 μ l de TE

Solution de H37RV à 100 fg = 10 μ l de solution de H37RV à 1000 fg + 90 μ l de TE

Solution de H37RV à 50 fg = 10 μ l de solution de H37RV à 100 fg + 10 μ l de TE

Solution de H37RV à 10 fg = 10 μ l de solution de H37RV à 100 fg + 90 μ l de TE

Solution de H37RV à 5 fg = 30 μ l de solution de H37RV à 10 fg + 30 μ l de TE

Solution de H37RV à 1 fg = 10 μ l de solution de H37RV à 10 fg + 90 μ l de TE

Dilution de la solution de crachats

Solution initiale de crachats : solution de départ

Solution de crachats 1 = 8 μ l de solution de départ + 8 μ l d'eau ultra stérilisée

Solution de crachats 2 = 8 μ l de solution 1 + 8 μ l d'eau ultra pure stérilisée

Solution de crachats 3 = 8 μ l de solution 2 + 8 μ l d'eau ultra pure stérilisée

Solution de crachats 4 = 8 μ l de solution 3 + 8 μ l d'eau ultra pure stérilisée