



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

M. M'BOUROU NDOMBI Fred

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Microbiologie Fondamentale et Appliquée

THÈME

**Tests de susceptibilité moléculaire et phénotypique
des antituberculeux au Gabon, performances des
tests MTBDRplus, MTBDRsl et SIRE**

Soutenu publiquement le 17 Mai 2017

DEVANT LE JURY

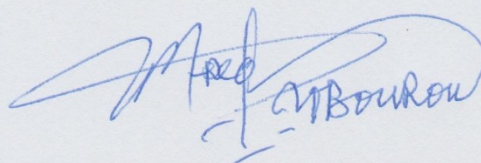
Présidente	Mlle MAHMOUDI Fatima Zohra	Université de Mostaganem
Encadreur	M. BAHRI Fouad	Université de Mostaganem
Examineur	M. BEN ALI Sid 'Ahmed	Université de Mostaganem

*Thème réalisé au Laboratoire du Centre International de Recherches Médicales de Franceville
(CIRMF-Gabon)*

Attestation sur l'honneur

Je, sous signé, **M'BOUROU NDOMBI Fred**, atteste sur l'honneur, avoir effectué mon stage au Centre Internationale de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF-Gabon), du 04 juillet au 04 octobre 2016, en réalisant toutes les expériences liées à mon sujet de mémoire intitulé **Tests de susceptibilité moléculaire et phénotypique des antituberculeux au Gabon, performances des tests MTBDR^{plus}, MTBDR^{sl} et SIRE**, et en rédigeant mon mémoire sans aucune aide non autorisée.

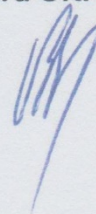
M'BOUROU NDOMBI Fred



Je, sous signé, **Dr Richard ONANGA**, atteste que l'étudiant **M'BOUROU NDOMBI Fred** a effectué son stage, sous ma direction, au Centre Internationale de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF-Gabon) au sein du laboratoire de Bactériologie dont je suis le responsable, du 04 juillet au 04 octobre 2016, en réalisant tous les travaux liés à son sujet de mémoire sans aucune aide non autorisée.

Cette attestation lui est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Dr Richard ONANGA



Dédicaces

A ma mère, qui m'a donné la vie et qui continue de veiller sur moi d'où elle est.
Paix à son âme.

A mon père, Lazare MBOUROU, pour ses précieux conseils et l'intérêt constant qu'il porte à mes études ainsi qu'à ce travail.

A tous mes frères et sœurs Laing-Leroy, Léa-Prisca, Nadine, Carine et Christ pour l'amour qu'ils me portent.

A toute ma grande famille OPIMBA pour son soutien, particulièrement à ma tante Marie-Jacqueline OPIMBA et mon oncle Isidore KATI.

A tous mes amis à travers le monde pour leurs amitiés et pour tous les beaux moments partagés avec eux.

A tous mes compatriotes étudiants en Algérie, particulièrement à ceux de ma promotion, Aurel, Christie, Davy, Glenn, Martine, Yorick et William.

A toute la communauté chrétienne de Mostaganem, particulièrement aux frères Maristes.

A Toute ma promotion de Master 2 Microbiologie Fondamentale et Appliquée (M.F.A.) 2016-2017, que Dieu les accompagne tout au long de leurs études.

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'achèvement de ce travail.

Dédicaces

A ma mère, qui m'a donné la vie et qui continue de veiller sur moi d'où elle est.
Paix à son âme.

A mon père, Lazare MBOUROU, pour ses précieux conseils et l'intérêt constant qu'il porte à mes études ainsi qu'à ce travail.

A tous mes frères et sœurs Laing-Leroy, Léa-Prisca, Nadine, Carine et Christ pour l'amour qu'ils me portent.

A toute ma grande famille OPIMBA pour son soutien, particulièrement à ma tante Marie-Jacqueline OPIMBA et mon oncle Isidore KATI.

A tous mes amis à travers le monde pour leurs amitiés et pour tous les beaux moments partagés avec eux.

A tous mes compatriotes étudiants en Algérie, particulièrement à ceux de ma promotion, Aurel, Christie, Davy, Glenn, Martine, Yorick et William.

A toute la communauté chrétienne de Mostaganem, particulièrement aux frères Maristes.

A Ange Fidèle pour son soutien indéfectible et ses vifs encouragements.

A Toute ma promotion de Master 2 Microbiologie Fondamentale et Appliquée (M.F.A.) 2016-2017, que Dieu les accompagne tout au long de leurs études.

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'achèvement de ce travail.

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord DIEU le tout Puissant pour la vie, l'intelligence, la persévérance, le courage et la force qu'il m'a procuré afin que je puis mener à bien ce modeste travail qui me permettra de conclure avec succès mes études universitaire.

Je remercie l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de prendre le temps de participer à l'examen de mon travail de mémoire.

Un très grand merci au professeur Fouad BAHRI qui a accepté de m'encadrer et m'a accordé de son précieux temps en me donnant des orientations, des conseils et des indications qui m'ont été importants dans la finalisation de ce travail.

Au cours de mes études à la Faculté, vous m'avez dispensé un enseignement de grande qualité et m'avez transmis votre passion pour la Microbiologie. Je vous en remercie et souhaite que vous trouviez ici le témoignage de ma grande reconnaissance et de mon profond respect.

Mes remerciements vont également à l'endroit de tout le personnel du département de Biologie de l'université de Mostaganem, particulièrement à M. MEDJAED, chef du dit département, et à tous mes enseignants qui ont su nous transmettre les connaissances nécessaires afin d'assurer notre formation tout au long de nos études. Particulièrement à M. BOUZNAD, M. NABBECHÉ, M. et Mme CHERIGANE, M et Mme AIT SAADA, M. CHADLI, M. YAHLA, M. MEKHALDI et M. ALILI du département d'Agronomie pour leur disponibilité et leurs précieux conseils.

Je ne saurai finir sans adressé des vives remerciements au Docteur Richard ONANGA, chef de l'unité de Recherche en Analyses Médicales et Bactériologie du Centre Internationale de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF-Gabon), pour avoir accepté de m'accueillir comme stagiaires dans son unité de recherche et d'avoir dirigé mes travaux, ainsi qu'à tout le personnel de cette structure pour leurs encouragements et leur disponibilité, en particulier à Arsène MABIKA-MABIKA.

Résumé

La tuberculose, est l'une des maladies infectieuses ayant le plus fort taux de contagiosité au monde. Elle est causée par les bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* qui attaque majoritairement les poumons, mais qui peut aussi attaquer d'autres organes chez l'homme ou certains animaux. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 2 milliards d'humains seraient infectés par *Mycobacterium tuberculosis*, dont, chaque année, environ 9 millions d'humains sont malades de la tuberculose, avec 3 millions de morts. Les chiffres sont plus alarmants en Afrique où le taux est de 1500 morts par jour en moyenne. Cette augmentation est en majorité due à la co-infection au VIH, qui est le facteur principal limitant l'éradication de cette maladie en Afrique. Un autre des facteurs limitants l'éradication de la tuberculose est la présence de souches multirésistantes aux médicaments antituberculeux. C'est pourquoi notre étude qui consiste à réaliser des tests de susceptibilité aux antituberculeux au Gabon est très importante. Au cours de cette étude, nous avons évalué la performance de quelques tests, notamment MTBDRplus, MTBDRsl et SIRE. Il en ressort que ces tests nous permettent d'établir un diagnostic rapide de la susceptibilité des souches de *Mycobacterium tuberculosis* face à certains médicaments antituberculeux.

Mots clés : Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, Multirésistance, Antituberculeux, Tests de susceptibilité, MTBDRplus, MTBDRsl, SIRE.

Summary

Tuberculosis is one of the most infectious diseases with the highest rate of contagiousness in the world. It is caused by bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, which predominantly attacks the lungs, but can also attack other organs in humans or certain animals. The World Health Organization (WHO) estimates that 2 billion people are infected with *Mycobacterium tuberculosis*, with about 9 million people each year sick with tuberculosis, with 3 million deaths. The figures are more alarming in Africa where the rate is 1,500 deaths per day on average. This increase is mainly due to co-infection with HIV, which is the main factor limiting the eradication of this disease in Africa. Another factor limiting the eradication of tuberculosis is the presence of multidrug-resistant strains of anti-tuberculosis drugs. This is why our study, which consists in carrying out tests of susceptibility to anti-tuberculosis drugs in Gabon, is very important. In this study, we evaluated the performance of some tests, including MTBDRplus, MTBDRs1 and SIRE. It emerges that these tests allow us to establish a rapid diagnosis of the susceptibility of strains of *Mycobacterium tuberculosis* to certain antituberculous drugs.

Key words : Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Multiresistance, Antituberculosis, Tests of susceptibility, MTBDRplus, MTBDRs1, SIRE.

Liste des Abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMK : Amikacine

ARN : Acide Ribonucléique

BAAR : Bacilles Acido-Alcool Résistants

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

BK : Bacille de Koch

CDT : Centre de Traitement de la Tuberculose

CIRMF : Centre International de Recherches Médicales de Franceville

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPC : Chlorure de Cétyl Pyridinium

CPM : Capreomycine

DOTS : Directly Observed Treatment, Short-course

EDR : Ecole Doctorale Régionale de Franceville

EMB : Ethambutol

ETH : Ethionamide

FQ : Fluoroquinolones

IDR : Intradermo-réaction

INH : Isoniazide

KM : Kanamycine

LJ : Lôwenstein-Jensen

MDR : Multi-drug resistant

MEP : Malnutrition Energétique et Protéique

MGIT : Mycobacteria Growth Indicator Tube

MTB : Mycobacterium tuberculosis

MTbC : complexe Mycobacterium tuberculosis

OADC : Acide oléique, Albumine bovine, Dextrose, Catalase

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Liste des Abréviations

PCR : Polymerase Chain Reaction

PIB : Produit Intérieur Brut

PZA : Pyrazinamide

QRD : Quinolones Resistance Determinant

RIF : Rifampicine

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise

SIRE : Streptomycine, Isoniazide, Rifampicine, Ethambutol

SM : Streptomycine

TB : Tuberculose

TMA : Transcription Mediated Amplification

TSA : Trypticase de Soja Additionnée de 5 % de sang de mouton

UV : Ultra-violet

VIH : Virus d'Immunodéficience Humaine

WHO : World Health Organization

XDR : Extreme drug resistant

Liste des figures

Figure 1. Mycobactéries du complexe <i>M. tuberculosis</i> en microscopie	7
Figure 2. Classification des mycobactéries	9
Figure 3. Estimation de l'incidence de la tuberculose dans le monde en 2007	15
Figure 4. La tuberculose est une maladie de la pauvreté	16
Figure 5. La tuberculose et le VIH dans le monde en 2007	17
Figure 6. Radiographie du thorax	19
Figure 7. Test de Mantoux à la tuberculine	20
Figure 8. Frottis des BAARs par coloration à l'Auramine et au Ziehl-Nelsen	22
Figure 9. Traitement d'un prélèvement pour la recherche des mycobactéries	27
Figure 10. Kit GenoLyse	40

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractères d'identification du complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
Tableau 2. Caractéristiques des patients prélevés	37
Tableau 3. Mix pour PCR MTBDR <i>plus</i>	41
Tableau 4. Mix pour PCR MTBDR <i>sl</i>	42
Tableau 5. Volumes de préparation des antibiotiques	48
Tableau 6. Résultats du test MTBDR <i>plus</i>	52
Tableau 7. Résultats du test MTBDR <i>sl</i>	53
Tableau 8. Résultats de l'antibiogramme SIRE	54

Sommaire

Attestation sur l'honneur	I
Dédicaces	II
Remerciements	III
Résumé	IV
Liste des abréviations	V
Liste des figures	VII
Liste des tableaux	VIII
Sommaire	IX
Introduction	1
Partie I : Etude Bibliographique	5
Chapitre I : Le genre <i>Mycobacterium</i>	6
I-1. Caractéristiques	7
I-2. Classification	8
Chapitre II : La tuberculose	11
II-1. Définition	12
II-2. Histoire	13
II-3. Epidémiologie	14
II-3-1. Les facteurs sociaux de la tuberculose	14
II-3-2. L'impact de la co-infection VIH-tuberculose	16
II-3-3. Autres facteurs	17

Sommaire

II-4. Diagnostique de la tuberculose	18
II-4-1. L'examen radiologique	19
II-4-2. L'intradermo-réaction à la tuberculine	19
II-4-3. Diagnostic bactériologique	20
II-5. Traitement	27
II-5-1. Chimio-prophylaxie	28
II-5-2. Traitement de la tuberculose maladie	28
II-5-3. Traitement de la tuberculose multirésistante	28
II-6. Résistances aux antituberculeux	28
II-6-1. Causes	29
II-6-2. Détection des résistances	29
II-6-3. Résistance aux antibiotiques de première ligne	30
II-6-4. Résistance aux antibiotiques de deuxième ligne	32
II-7. Prévention de la tuberculose	32
II-7-1. La stratégie DOTS	33
II-7-2. Vaccination par BCG	33
II-7-3. Autres modes de prévention	34
Partie II : Etude pratique	35
Chapitre I : Matériel et méthodes.....	36
I-1. Population cible, période et type d'étude	37

Sommaire

I-2. Echantillonnage et lieux de collecte	38
I-2-1. Prélèvement, transport, conservation	38
I-2-2. Décontamination et fluidification	39
I-2-3. Examen microscopique	40
I-2-4. Extraction d'ADN	40
I-2-5. Amplification par PCR des extraits d'ADN	41
I-2-6. Hybridation et révélation	42
I-2-7. Test GenoType MTBDR <i>plus</i> 96	44
I-2-8. Test GenoType MTBDR <i>sl</i> 96	45
I-2-9. Test BACTEC MGIT 960 SIRE	46
Chapitre II : Analyse et interprétation des résultats	50
II-1. Présentation des résultats	51
II-2. Analyse et interprétation des résultats	55
Chapitre III : Discussion	56
Conclusion et perspectives	59
Références bibliographique.....	62
Annexes	71

Introduction

Introduction

Causée par les mycobactéries du complexe tuberculosis, la tuberculose, autrefois appelée phtisie, est l'une des maladies infectieuses les plus répandues à travers le monde. Elle attaque majoritairement les poumons, mais elle peut être localisée sur d'autres organes. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 2 milliards d'êtres humains infectés par *Mycobacterium tuberculosis*. Chaque année, 7 à 9 millions d'entre eux font une tuberculose maladie ; tandis que 3 millions en meurent [1].

Bien que la tuberculose soit une maladie connue depuis longtemps, elle reste un problème de santé publique d'actualité dans le monde. En effet, il s'agit de la maladie infectieuse la plus répandue chez l'espèce humaine.

Elevée par l'OMS en 1993 au rang d'urgence mondiale, la tuberculose est, avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le paludisme, l'une des premières causes mondiales de mortalité par maladie infectieuse. En 2009, le bacille tuberculeux a été responsable de la mort de plus de 1,7 millions de personnes, soit 4700 décès par jour [2]. Cette même année, l'OMS a dénombré plus de 9,4 millions de nouveaux cas de tuberculose. La distribution mondiale des cas de tuberculose montre que la grande majorité d'entre eux survient dans les pays en voie de développement, particulièrement en Asie (55%) et en Afrique (30%) : l'Inde, la Chine, l'Afrique du Sud, le Nigéria, et l'Indonésie comptant à eux seuls près de la moitié des cas de tuberculose estimés en 2009, soit 4,7 millions (49,8% des cas) [2].

En Afrique, les chiffres sont les plus alarmants, notamment avec un taux de tuberculose qui est en augmentation avec en moyenne 1500 morts par jour, les premières victimes étant des enfants [3]. Cette nette augmentation est causée en majorité par la co-infection au VIH, qui est le facteur limitant l'éradication de la tuberculose en Afrique [3].

L'Algérie connaît une augmentation du nombre de cas de tuberculose, passant de 20 070 cas en 2008 à 22 153 cas en 2014 [4]. Toutefois, le taux de tuberculose pulmonaire contagieuse a considérablement baissé, passant de 50,6% à 38,1% entre 2008 et 2014 [4].

Le chargé du programme national algérien de lutte contre la tuberculose, Sofiane Ali Halassa, déclarait lors d'une rencontre organisée à l'institut national de la santé publique (INSP) en mars 2015, que si l'incidence de la tuberculose pulmonaire contagieuse a baissé de 10 cas sur 100.000 habitants depuis 2001, celle de la tuberculose extra pulmonaire a par contre, enregistré une "progression" et a atteint un niveau relativement "élevé" [4].

Introduction

En 2001, l'incidence pour 100.000 habitants était de 26,2 cas pour la tuberculose pulmonaire, en 2014, elle était de 17, 5. Pour la forme extra pulmonaire, l'incidence pour 100.000 habitants était de 26,9 en 2001, en 2014 elle a atteint 35,4% [4].

Au total, l'incidence en 2014 était de 57,2 pour toutes formes confondues de tuberculose, en 2001, le chiffre était de 60,1 par 100.000 habitants. La baisse presque insignifiante est due à la "persistance d'un niveau relativement élevé" de cas de tuberculose extra pulmonaire [4].

Avec ces chiffres, l'Algérie se place en incidence "moyenne" sur le plan mondial quant à la propagation de cette infection, a fait remarquer M. Ali Halassa [4].

Au Gabon, la tuberculose reste un véritable problème de santé publique car le taux de prévalence demeure très élevé pour tous les âges. Aussi, le nombre de cas de tuberculose est en augmentation constante. Le taux de mortalité de la tuberculose était de 55,0 (par 100 000 personnes) en 2014 [89]. Ceci s'explique notamment par le cout élevé du traitement qui s'estime à 350.000 francs CFA (environ 535€). Ainsi, le Programme National de Lutte contre la Tuberculose (PNLT) évalue à 3559 cas de tuberculose en 2009, 4378 en 2010, 4916 en 2011 et 5467 cas en 2012. Parmi tous ces cas, 40% sont co-infecté tuberculose et VIH [5].

La cause principale de cette augmentation au Gabon réside d'une part dans le fait que l'obtention d'un diagnostic bactériologique fiable soit difficile, d'autre part, cela est lié à l'apparition des souches multirésistantes aux antituberculeux qui complique le traitement.

La principale difficulté des pays en voie de développement réside dans le manque de laboratoire bien outillé pour assurer un diagnostic fiable.

Au Gabon, la situation de la tuberculose inquiète les autorités nationales. Le Secrétaire Général de la Santé déclarait le 25 Mars 2013, au cours de la célébration de cette Journée mondiale de lutte contre la Tuberculose, qu'à ce jour, le Gabon ne disposait pas de laboratoires à même de faire la culture et de réaliser les tests de sensibilité pour diagnostiquer les cas de tuberculose pharmaco résistante [5].

Aujourd'hui, seuls le CERMEL, le LNSP et le CIRMF, sont capable d'établir un Diagnostic efficace de la tuberculose Multirésistante. Mais le CERMEL et le LNSP sont à ce jour incapable d'établir un diagnostic génotypique de la tuberculose Multirésistante aux antituberculeux. Seul le CIRMF possède un excellent plateau technique capable de mettre en place un diagnostic à la fois phénotypique et moléculaire rapide et fiable afin d'améliorer la lutte contre la tuberculose Multirésistante.

Introduction

C'est pour cette raison que nous avons choisis le CIRMF, car il possède un laboratoire qui nous permet de mettre en œuvre notre études qui consiste à faire des tests de susceptibilité des antituberculeux au Gabon en évaluant la performance des tests GenoType MTBDR plus, GenoType MTBDR sl et du test SIRE.

Cette étude permettrait d'établir un diagnostic plus précis de la tuberculose multirésistante dans la mesure où il permet la détection des résistances aux antituberculeux par deux méthodes à la fois, à savoir la méthode phénotypique et la méthode génotypiques.

Ainsi, au cours de ce travail, notre étude aura pour objectif principal, la comparaison de la performance des tests de susceptibilité pour la détection des souches Multirésistantes aux antituberculeux de première ligne et de seconde ligne, mais aussi la réalisation des tests sérologiques de la tuberculose, notamment par coloration de Ziehl Neelsen, par culture liquide et solide, par des tests moléculaires.

Le développement de notre travail obéira à un plan structuré autour des généralités sur le genre Mycobactérium et la tuberculose, notamment avec son épidémiologie, son diagnostic, son traitement, l'étude des résistances au traitement et la prévention de la maladie. Aussi, nous aurons à présenter notre méthodologie de recherche pour terminer par l'analyse des résultats et la discussion.

Partie I :
Etude
Bibliographique.

Chapitre I :

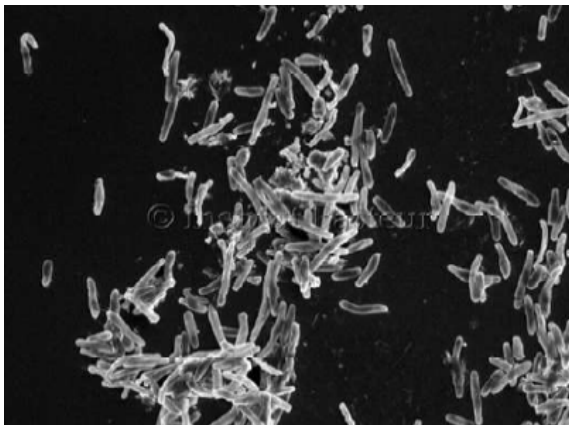
Le genre

Mycobacterium

I-1. Caractéristiques bactériennes.

Les mycobactéries sont des bacilles aérobies assez longs et fins, droit ou légèrement incurvés (figure 1). Elles ont 1 à 10 μm de long sur 0,2 à 0,6 μm de large. Elles sont immobiles et ne forment pas de spores, des conidies, des hyphes aériens ni des capsules. Elles constituent le genre *Mycobacterium* qui est le seul (genre) de la famille des *Mycobacteriaceae* [6 ; 7 ; 8 ; 9].

Figure 1 : Mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* en microscopie électronique à balayage [7].



Du point de vue physiologique, les mycobactéries sont aérobies ou microaérophiles. Leur température optimale de croissance varie selon les espèces et est comprise entre 30 et 45°C. Les mycobactéries synthétisent la catalase et produisent des acides à partir des sucres par voie oxydative. Certaines synthétisent des pigments caroténoïdes non diffusibles conditionnées par l'exposition des cultures à la lumière visible (espèces dites photochromogènes) ou même à l'obscurité (espèces scotochromogènes) [8].

Les différentes mycobactéries donnent des colonies de types différentes sur milieu solide : colonies lisses ou rugueuses, eugoniques (de grande taille) ou dysgoniques (petites colonies). L'aspect est variable en fonction du milieu, mais reste invariant pour un milieu donné [10]. Les cultures jeunes peuvent montrés des ramifications rudimentaires. Les cellules de *M. tuberculosis* ont tendance à se ranger en parallèle pour former des «cordes» ou «serpentes» ; cette propriété est associée à la présence d'un glycolipide toxique (cord factor) [11].

Les mycobactéries ont une paroi qui présente une structure particulière. Cette paroi, riche en acides mycoliques (acides gras insaturés à longue chaîne carbonée (C₆₀ à C₉₀) qui sont le support de l'acido-alcool-résistance et qui constituent un critère taxonomique de choix car leur structure varie selon les espèces bactériennes), leur permet de retenir les colorants malgré l'action combinée d'acide dilué et d'alcool. Elle leur confère aussi une grande résistance aux antiseptiques, à certains antibiotiques et aux macrophages.

Les mycobactéries sont des bacilles Acido-alcool-résistants (BAAR). Cette propriété est également liée à la richesse de la paroi bactérienne en lipides et entraîne une imperméabilité aux colorants usuels, ainsi qu'une résistance à la décoloration par un traitement acide/alcool. C'est pourquoi, elles ne prennent que faiblement la coloration de Gram (Bien que faiblement colorées par la méthode de Gram, les mycobactéries sont considérées comme des bactéries Gram positives) [12 ; 13]. En revanche, la paroi fixe de façon intense les colorants alcalins tels que la fuchsine basique. La coloration de Ziehl-Neelsen et la coloration à l'Auramine, basées sur cette propriété, sont utilisées pour la réalisation de l'examen microscopique.

Les bactéries du genre *Mycobacterium* ont un ADN dont le contenu en Guanine et Cytosine (GC%) est compris entre 61 et 71% (à l'exception de *Mycobacterium leprae* dont le GC% est compris entre 54 et 57%). Ce pourcentage élevé explique que les 2 brins d'ADN soient fortement liés et impose des conditions techniques particulières lorsqu'il faut rompre les 3 liaisons Hydrogènes. Elles ont un temps de génération très long, atteignant vingt heures (20h), ce qui explique l'évolution lente de la tuberculose, la nécessité de prescrire des traitements longs et les délais de réponse des cultures. [14 ; 9].

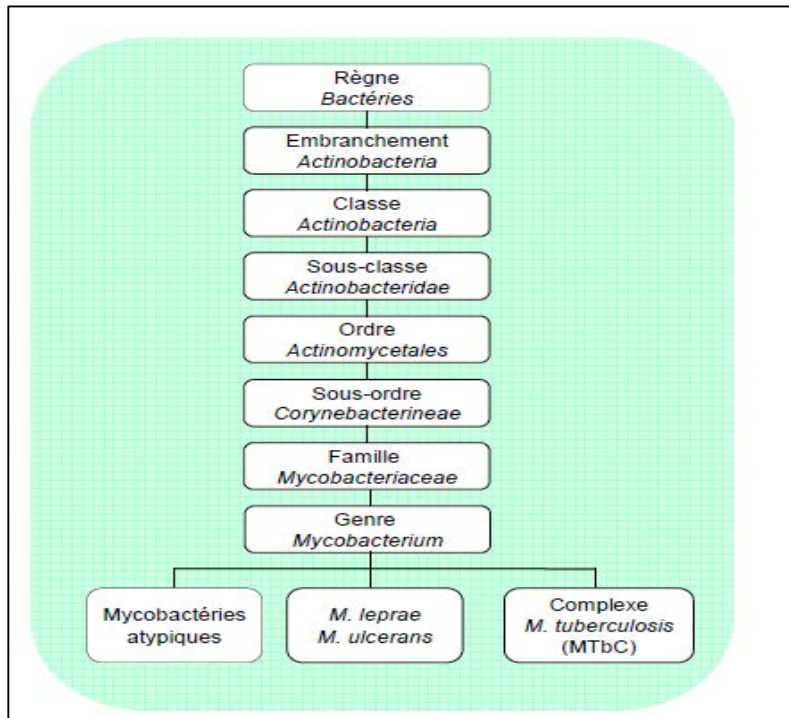
I-2. Classification.

La taxinomie des mycobactéries (Figure 2), les classe dans l'ordre des *Actinomycétales* et en particulier à la famille des *Mycobacteriaceae* qui ne comprend qu'un seul genre : *Mycobacterium* [15].

Ce genre regroupe plus de 120 espèces différentes [16], classées en mycobactéries atypiques (ou mycobactéries non tuberculeuses) ou en mycobactéries du complexe *Mycobacterium*

tuberculosis (MTbC) (Figure 1). De nouvelles espèces sont identifiées chaque année : entre 2003 et 2006, plus de 30 nouvelles espèces ont été décrites [16].

Figure 2 : Classification des mycobactéries [7].



Les mycobactéries atypiques, si elles ne sont généralement pas pathogènes pour l'homme, peuvent causer des infections chez les personnes immunodéprimées en donnant des manifestations cliniques (pulmonaires, osseuses, ganglionnaires ou cutanées) simulant ceux de la tuberculose. Ces mycobactéries opportunistes sont responsables d'affections surtout dans les pays de faible prévalence tuberculeuse [8]. Elles se différencient du MTbC par leur moindre virulence et l'absence de transmission d'homme à homme. Une distinction particulière est cependant faite pour *M. leprae*, et *M. ulcerans*, responsables respectivement de la lèpre (de l'homme et du rat) et de l'ulcère de Buruli, puisque tout en étant pathogènes elles n'appartiennent pas au MTbC [8].

❖ Le Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTbC).

La tuberculose chez l'homme est causée par les mycobactéries du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTbC) :

Mycobacterium tuberculosis est le principale responsable de la tuberculose humaine. Morphologiquement, c'est un fin bacille de 2 à 5 µm de long, légèrement incurvé, aux extrémités arrondies, non capsulé, non sporulé, immobile [17]. C'est une bactérie Gram positif mais difficilement colorable par cette méthode. La coloration de Ziehl-Neelsen révèle son acido-alcool-résistance. Physiologiquement, *M. tuberculosis* est une bactérie exigeante qui nécessite de nombreux facteurs de croissance pour son développement. C'est une bactérie aérobic stricte qui se localisera préférentiellement dans les tissus bien oxygénés ce qui explique la prépondérance des tuberculoses pulmonaires. *M. tuberculosis* peut survivre au froid et à la dessiccation, ce qui explique que l'on puisse l'isoler de façon transitoire dans l'environnement. Cette bactérie est sensible aux agents physiques tels que les rayonnements ionisants, les rayons X, les UV dans certaines conditions, la lumière et la chaleur. Sa sensibilité aux agents chimiques varie : détruit par l'alcool à 70°, il résiste à de nombreux antiseptiques, aux bases et aux acides dilués [6].

Mycobacterium bovis provoque chez les bovins des lésions tuberculeuses pulmonaires, des lésions des glandes mammaires. Il peut être pathogène pour tous les mammifères (chèvres, moutons, chiens, chats, ...) et également pour l'homme [18 ; 19 ; 20] qui se contamine à partir du réservoir animal par inhalation de particules infectées, notamment par le lait non pasteurisé ou non bouilli [8]. Le Bacille de Calmette et Guérin (ou BCG) est d'ailleurs une souche de *M. bovis* modifiée par Calmette et Guérin pour obtenir une souche vaccinale.

Mycobacterium africanum est responsable de tuberculoses humaines en Afrique. Les cas de tuberculose à *M. africanum* sont quasi-exclusivement répertoriés en Afrique de l'ouest où ils représenteraient plus de la moitié des cas [21 ; 22 ; 23 ; 24 ; 25 ; 26 ; 27], il est plus rare en Europe.

Mycobacterium canetti est rarement responsable de tuberculose, ces cas ont été décrits en Afrique.

Mycobacterium microti est une espèce très peu pathogène pour l'homme qui infecte les rongeurs et les bovins [28].

Chapitre II :
La tuberculose.

II-1. Définition.

La tuberculose, appelée autrefois également phtisie, est une maladie contagieuse infectieuse et non immunisante, due à une des bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* correspondant à différents germes et principalement *Mycobacterium tuberculosis* (ou bacille de Koch ; BK) [29].

Il s'agit d'une maladie qui tue plusieurs millions de personnes par an. On constate depuis quelques années, une augmentation des cas de tuberculose dans les pays en voie de développement. Cette recrudescence, s'explique par un appauvrissement des populations et l'émergence du Sida.

La tuberculose présente des signes cliniques variables. La bactérie s'attaque habituellement aux poumons, mais parfois aussi à d'autres parties du corps, comme les reins, les ganglions et les os. Autrefois, la tuberculose était souvent mortelle et on lui donnait le nom de « consommation ». De nos jours, le traitement par antibiotiques permet d'en guérir. Elle est provoquée par une mycobactérie du complexe tuberculosis [29].

Mycobacterium tuberculosis est un agent pathogène strictement humain ; la forme pulmonaire est la plus fréquente et assure principalement la transmission interhumaine du bacille. La transmission de *Mycobacterium tuberculosis* se fait par voie aérienne, la contamination se produit par inhalation d'un aérosol pulmonaire provenant d'un patient bacillifère lors de toux, de paroles, d'émission de gouttelettes de Pflügge... [29].

La multiplication des bacilles de la tuberculose dans n'importe quel site de l'organisme humain provoque une inflammation spécifique avec formation d'un granulome caractéristique.

Pour ce qui est du poumon, en premier lieu, apparaît tout d'abord, une inflammation banale bien différente des autres inflammations, qui s'accompagne d'une infiltration des tissus, entraîne l'apparition d'une lésion, qui est susceptible de disparaître spontanément, et se résorber en elle-même [29].

On peut distinguer différentes formes de tuberculose en fonction de la localisation du lieu d'infection. Nous allons les regrouper en trois types : La tuberculose pulmonaire ou phtisie est une maladie infectieuse du poumon. Cette affection est le résultat de la pénétration du bacille de Koch, appelé également BK. La localisation pulmonaire est de loin la plus fréquente et

représente environ 80% des formes de tuberculose maladie [29]. Les bactéries détruisent les tissus pulmonaires, créant ainsi des cavités. La maladie reste localisée dans les poumons.

Les localisations extra pulmonaires de la tuberculose représentent une minorité de cas ; par ordre de fréquence, on peut distinguer : les localisations séreuses : l'atteinte de la plèvre est la plus fréquente et représente 10 à 15% des tuberculoses. Dans ce cas de tuberculose, les bactéries attaquent d'autres parties du corps, comme les os, les reins, les ganglions lymphatiques, les méninges ou le système nerveux central. La tuberculose extrapulmonaire s'accompagne ou non d'une tuberculose pulmonaire [6].

La tuberculose du système nerveux central fait partie de l'une des formes les plus dangereuses des tuberculoses extrapulmonaire, et est responsable des méningites [6].

Les formes osseuses et ostéoarticulaires ne sont pas exceptionnelles et de nombreux organes peuvent être touchés et des formes rénales, urogénitales, méningées, hépatiques, ainsi qu'une péricardite tuberculeuse ou un pyothorax sont possibles [6].

Chez les sujets immunodéprimés, les manifestations extra pulmonaires sont plus fréquentes que chez les autres malades [6].

La miliaire tuberculeuse est une forme rare mais sévère, caractérisée par une dissémination hémotogène rapide du bacille (comme des graines de millet disséminées dans tout le poumon, lui donnant une apparence caractéristique) [29].

II-2. Histoire.

L'ancienneté de la tuberculose est attestée par l'existence de lésions osseuses caractéristiques, découvertes sur des squelettes très anciens dont certains dataient du Néolithique ou chez des momies de l'Égypte ancienne. Cependant, certaines formes de la maladie n'ont été individualisées que tardivement : ainsi la description de la méningite tuberculeuse ne remonte qu'au milieu du XVIII^{ème} siècle. La transmissibilité de la tuberculose a été démontrée en 1866 par Villemin qui, par méthode expérimentale, a prouvé le caractère inoculable de produits tuberculeux à l'animal et donc la contagion de la tuberculose [6].

En 1921, Calmette et Guérin mettent au point le BCG, un bacille rendu virulent par repiquages successifs et qui est à la base de la vaccination.

En 1944, Waksman découvre la Streptomycine qui s'avère efficace contre les bacilles tuberculeux. D'autres antibiotiques apparaissent ensuite comme l'Isoniazide en 1952, le

Pyrazinamide en 1954, l'Ethambutol en 1962 et surtout la Rifampicine en 1968. Enfin, le séquençage complet du génome de *Mycobacterium tuberculosis* fut réalisé en 1998 [6].

En 1882, le microbiologiste allemand Hermann Heinrich Robert Koch mit en évidence le lien existant entre la tuberculose humaine et l'agent pathogène *Mycobacterium tuberculosis* qu'il nomme alors bacille de Koch (BK) [30 ; 31] (la découverte de l'agent bactérien de la tuberculose en 1882 est à mettre au crédit Robert Koch, d'où le nom de bacille de Koch ou BK donné au bacille tuberculeux).

II-3. Epidémiologie.

Depuis 1997 la tuberculose fait l'objet d'un suivi épidémiologique annuel par l'OMS afin d'évaluer l'efficacité des différents programmes de lutte mis en place. On considère qu'un tiers de la population mondiale est infecté de façon latente (asymptomatique) par *M. tuberculosis* ; chez ces personnes, les bacilles présentent un métabolisme minimal dit de « dormance ». Même si seulement 5 à 10% des individus infectés développent une tuberculose, le réservoir est tel que le nombre de nouveaux cas annuels est élevé, environ 10 millions [3].

La tuberculose touche principalement les pays en développement et est officiellement considérée comme une maladie « de la pauvreté ». Son incidence est étroitement associée à l'impact de l'infection par le VIH (virus d'immunodéficience humaine) et/ou au PIB (produit intérieur brut) par habitant et à la stabilité socio-économique des pays concernés (Figure 4 et Figure 5).

II-3-1. Les facteurs sociaux de la tuberculose.

Dans les pays développés, la réapparition de cette pathologie est également associée à l'augmentation de la pauvreté et de la précarité, ainsi qu'à l'augmentation de l'indice démographique, à l'existence de flux migratoires en provenance de régions endémiques et à des problèmes de santé publique tels que la toxicomanie, le tabagisme, l'alcoolisme, l'obésité et l'interférence avec des traitements utilisés contre d'autres pathologies comme les maladies chroniques inflammatoires. La stabilité géopolitique des régions touchées est un élément essentiel du succès des stratégies de contrôle [3].

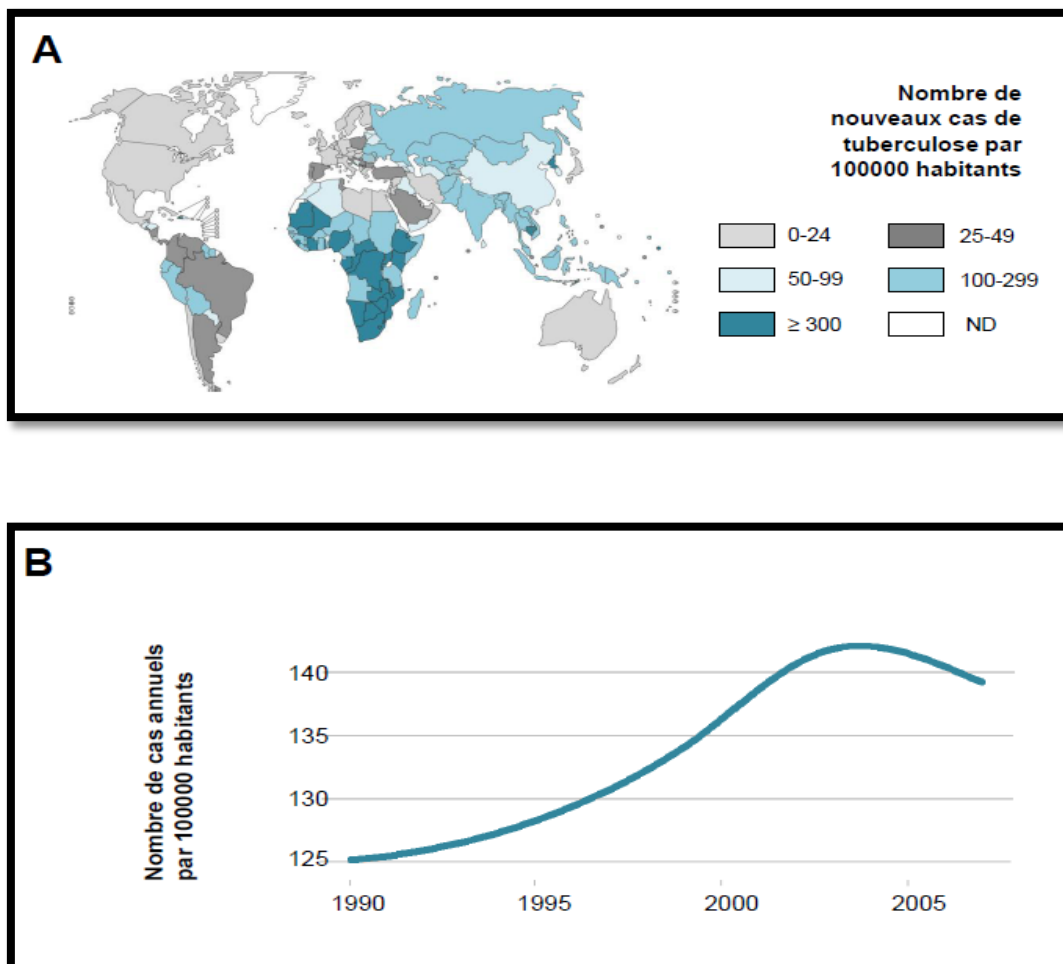
En 2007, les régions où l'incidence de la tuberculose était la plus élevée correspondent majoritairement aux pays en développement (Figure 3A). A l'échelle mondiale, cette

incidence n'a cessé d'augmenter entre les années 1990 et 2004 où le pic d'incidence globale de la maladie semble avoir été atteint : 150/100000 (Figure 3B). Depuis 2004 et suite à la mise en place de différents programmes de lutte, la proportion de personnes atteintes par cette pathologie tend à diminuer (139/100000 en 2007) (Figure 3B) [3].

Figure 3 : Estimation de l'incidence de la tuberculose dans le monde en 2007 [3].

(A- Nombre de nouveaux cas de tuberculose en 2007 par 100000 habitants sur l'ensemble de la planète.

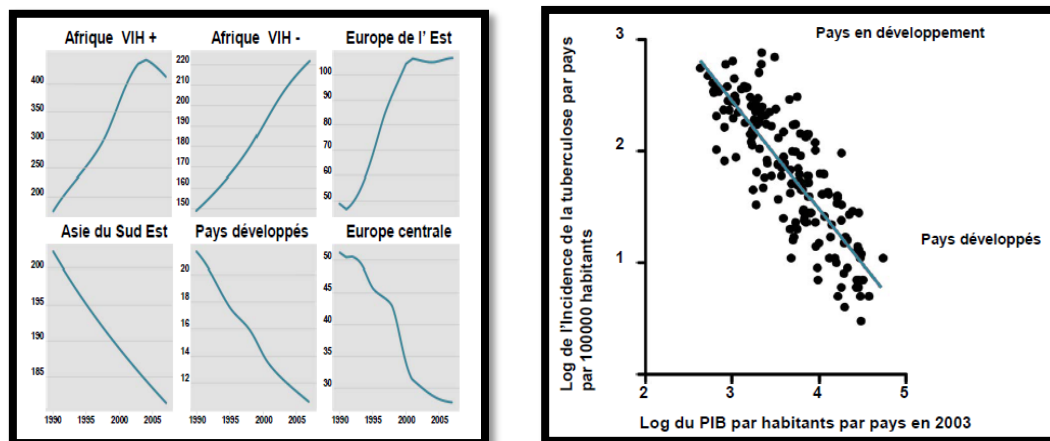
B- Evolution du nombre de nouveaux cas annuels par 100000 habitants entre les années 1990 et 2007).



L'incidence dans les pays développés tels qu'en Europe occidentale et aux Etats-Unis tend à diminuer très nettement.

Cependant, dans d'autres régions du globe, telles qu'en Afrique et en Europe de l'Est, le nombre de nouveaux cas annuels ne cesse d'augmenter (Figure 4).

Figure 4 : La tuberculose est une maladie de la pauvreté [3].



Cette figure présente l'évolution du nombre de nouveaux cas annuels de tuberculose par 100000 habitants dans différentes régions du monde et la corrélation entre le PIB par habitant et le nombre de cas annuels de tuberculose. On observe clairement que, pendant que cet indice tend à diminuer dans les régions développées ; il n'a de cesse d'augmenter dans les régions pauvres, où d'autres pathologies telles que le SIDA ont aussi une forte incidence (Figure 4) [3 ; 32].

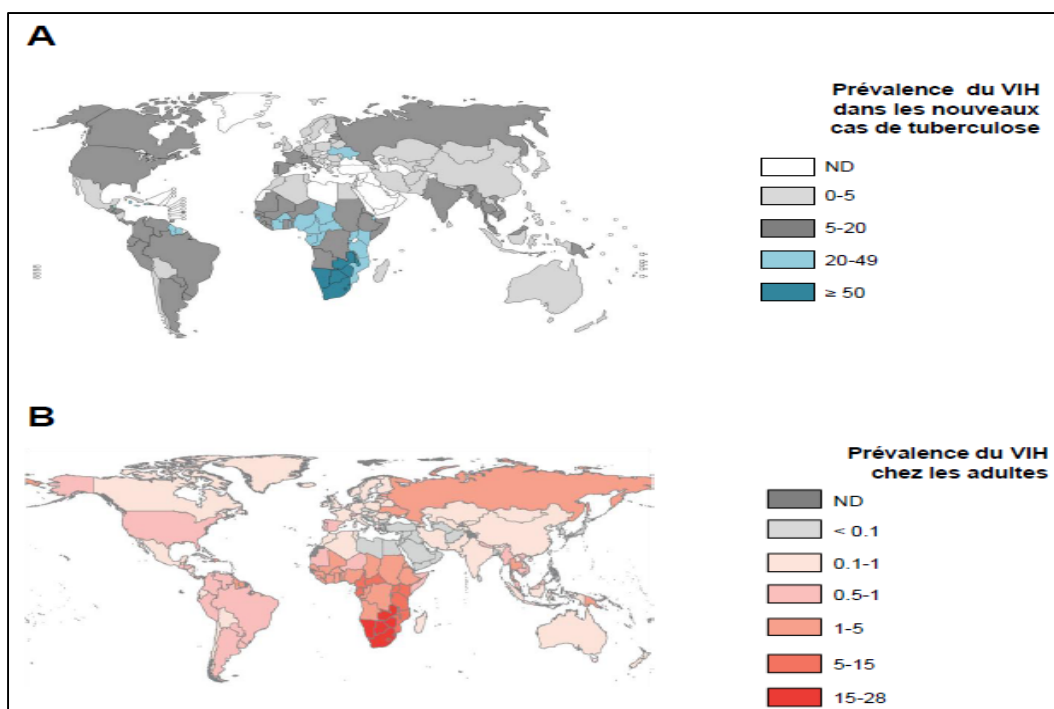
II-3-2. L'impact de la co-infection VIH-tuberculose.

La tuberculose se développe très rapidement dans un contexte d'immunosuppression, ainsi les personnes atteintes par le VIH sont très sensibles à l'infection par *M. tuberculosis* (Figure 5). Depuis 1980 et la description des premiers cas de SIDA aux Etats-Unis, l'épidémie s'est répandue à l'ensemble de la planète et depuis les années 1990, elle est considérée comme pandémie. A la fin de l'année 2005, on comptait 40 millions de séropositifs dans le monde, soit 5 millions de plus que l'année précédente [2]. Le VIH se réplique dans différents types cellulaires dont principalement les lymphocytes T CD4+, entraînant leur destruction et l'apparition d'un syndrome d'immunodéficience (SIDA). Les personnes atteintes du SIDA sont, de par leur immunodépression, très susceptibles à différentes pathologies opportunistes telles que des pneumonies induites par *Pneumocystis carinii* ou des cancers tels que le

sarcome de Kaposi qui sont des pathologies à faible incidence dans les populations immunocompétentes [2].

Nombreux sont les séropositifs qui développent une tuberculose comme première expression du SIDA, dans la mesure où l'infection par le VIH constitue le plus fort facteur de risque de transformation d'une tuberculose latente en infection active, ou de rechute chez les patients ayant déjà subi un traitement. Par ailleurs, en cas de coinfection, chacune de ces maladies accélère le développement de l'autre, leur puissance destructrice cumulée étant supérieure à leur impact indépendant. Dans certaines régions d'Afrique, où le nombre de nouveaux cas de tuberculose a plus que quadruplé depuis 1990, 75 % des tuberculeux sont séropositifs. Et si le taux mondial de prévalence de la coinfection est de 0,36 % seulement, dans huit pays africains, il dépasse les 5 % (Figure 5A) [2].

Figure 5 : La tuberculose et le VIH dans le monde en 2007 [2].



II-3-3. Autres facteurs.

Outre le SIDA et la pauvreté, d'autres facteurs influent sur l'incidence de la maladie.

L'un des facteurs aggravant de l'évolution de l'ensemble des pathologies infectieuses mais aussi chroniques dans le monde est la malnutrition. Dans une revue récente, Schaible et

Kaufmann évoquent l'impact majeur de la malnutrition sur l'évolution des épidémies dans le monde et leurs impacts économiques [33].

La dénutrition mais aussi la surnutrition ont aujourd'hui un impact dramatique sur la santé mondiale car toutes deux contribuent à un affaiblissement du système immunitaire, augmentant ainsi la susceptibilité aux infections [34].

Il existe aussi de nombreux facteurs de risques associés au développement de la pathologie, tels que la consommation de tabac, la consommation de drogues et d'alcool mais aussi l'augmentation de la pollution environnementale. « Où il y a de la fumée, il y a de la tuberculose » ; dans des publications récentes, Gordon et Rylance [35], Lin et Murray [36], Koloppan et Subramani [37] mettent en évidence l'existence d'un facteur de risque aggravé dû aux effets nocifs des fumés sur le poumon.

L'âge influence le risque de développement de la maladie et le type de tuberculose développée. En effet, les jeunes enfants de moins de 2 ans ont davantage de risque de développer une tuberculose suite à une primo-infection que des enfants plus âgés ou que des adultes [38 ; 39 ; 40 ; 41].

Il existe un dimorphisme sexuel globalement observé associé à la susceptibilité à développer la tuberculose. En effet on compte deux patients hommes pour une patiente dans presque tous les pays du monde. Cette différence est observée à tous les âges, sauf chez les jeunes enfants de moins de 14 ans, ce qui suggère une implication des hormones stéroïdes dans l'immunité antituberculeuse. D'autres facteurs pourraient contribuer à la plus grande résistance des femmes contre l'infection, des facteurs génétiques et métaboliques [42].

II-4. Diagnostic.

La suspicion d'une tuberculose chez un patient, suite à l'altération générale de son état de santé ou dans le cadre d'un contexte épidémiologique favorable, conduira à la mise en place d'une démarche diagnostique, à la réalisation d'examen cliniques et bactériologiques puis, dans un certain nombre de cas, à la mise sous traitement du patient.

Au Gabon, la tuberculose est une maladie à déclaration obligatoire, ainsi les cas probables ou confirmés de tuberculose maladie chez l'adulte ainsi que les cas d'infection tuberculeuse chez l'enfant de moins de 15 ans devront être signalés aux autorités de santé publique.

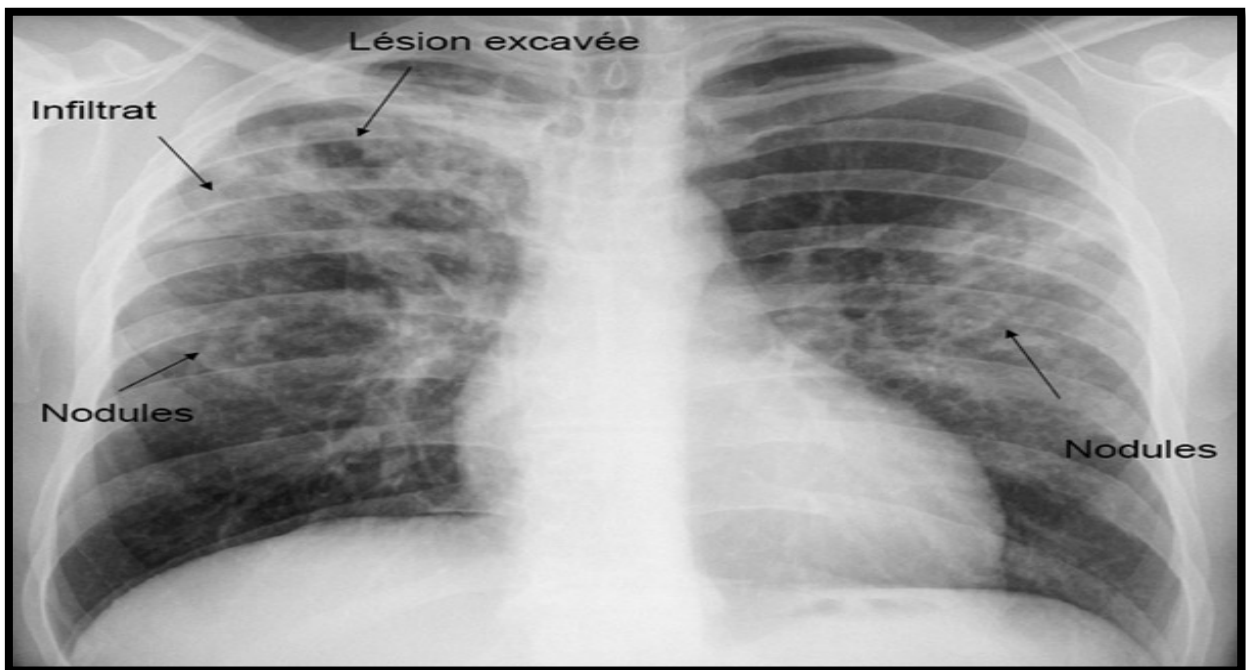
Le diagnostic d'une tuberculose doit être évoqué lors d'une situation épidémique favorable ou en présence d'une personne présentant des signes généraux évocateurs de la maladie.

II-4-1. L'examen radiologique.

La radiographie pulmonaire permet d'établir le bilan initial des lésions thoraciques pouvant être de morphologie et d'étendue variable, sans rapport avec l'intensité de la maladie. On retrouve trois types de lésions élémentaires : le nodule, l'infiltrat et la caverne.

Dans sa forme pulmonaire, la tuberculose se manifeste par la présence d'infiltrats et de nodules principalement localisés dans les sommets des poumons et parfois associés à des cavernes.

Figure 6 : Radiographie du thorax [43].



La tomodensitométrie thoracique peut être utile pour préciser des Images difficiles à interpréter.

II-4-2. L'intradermo-réaction à la tuberculine.

L'intradermo-réaction (IDR) ou Test de Mantoux à la tuberculine est un test cutané qui explore l'hypersensibilité de type retardée induite par l'injection de composants antigéniques de *Mycobacterium tuberculosis*, ce qui provoque l'afflux de lymphocytes T et de macrophages au niveau du site d'injection intradermique de tuberculine. La source antigénique utilisée est la tuberculine.

L'intradermo-réaction (IDR) à la tuberculine est une réaction qui témoigne de l'existence d'une immunité à médiation cellulaire vis-à-vis des mycobactéries chez le patient, induite soit par une vaccination préalable par le BCG, soit par un contact antérieur avec le BK ou certaines mycobactéries atypiques.

L'IDR consiste à injecter 0,10 ml de solution liquide de tuberculine dans le derme de la face antérieure de l'avant-bras et à mesurer le diamètre de l'induration induite après 72 heures. Le test sera positif si ce diamètre est supérieur à 5 mm et très positif s'il est supérieur à 10 mm. Dans ce deuxième cas, il y aura présomption de tuberculose maladie.

L'IDR peut être utilisée comme dépistage, à la recherche d'une réaction phlycténulaire, mais il existe des formes graves de tuberculose avec une IDR négative.

Figure 7 : Test de Mantoux à la tuberculine [43].



II-4-3. Diagnostic bactériologique.

La mise en évidence de la présence de *M. tuberculosis* dans des prélèvements biologiques constitue le véritable diagnostic de tuberculose. En cas de tuberculose pulmonaire, les examens bactériologiques seront pratiqués avant tout traitement sur l'expectoration du malade trois jours de suite. Ils peuvent aussi être pratiqués sur des tubages gastriques (sécrétions bronchiques dégluties) ou des aspirations bronchiques. Pour les patients chez lesquels une localisation extra-pulmonaire de la tuberculose est soupçonnée, les prélèvements seront faits en fonction de la localisation de la maladie.

➤ **Prélèvements.**

La qualité des prélèvements est primordiale pour optimiser le diagnostic. L'émission des bacilles étant souvent discontinue, les examens bactériologiques sont réalisés 3 jours consécutifs avant la mise en route d'un traitement antituberculeux, ou après un arrêt de 3 jours du traitement. Par ailleurs, les prélèvements seront répétés s'ils se révèlent négatifs alors que la symptomatologie est évocatrice de tuberculose.

La symptomatologie de la tuberculose étant dominée par les formes pulmonaires, il est logique que la majorité des prélèvements parvenant au laboratoire soient d'origine pulmonaire. Il s'agit des crachats, les tubages gastriques, Les prélèvements sous fibroscopie bronchique.

Des prélèvements extrapulmonaires peuvent aussi être effectués pour rechercher une tuberculose extrapulmonaire. Il s'agit des urines, des biopsies, le sang et la moelle osseuse.

➤ **Traitement des échantillons : décontamination et fluidification.**

Il faut distinguer deux catégories de prélèvements :

Les prélèvements réalisés au niveau de sites stériles tels que les liquides d'épanchement sont supposés ne pas renfermer d'autres germes, ils sontensemencés directement ou après une étape de centrifugation pour concentrer les bacilles. Les prélèvements susceptibles d'être contaminés par d'autres germes, c'est-à-dire effectués au niveau de sites non stériles, nécessitent une étape préalable de décontamination afin d'éliminer la flore tout en respectant les mycobactéries. On utilise pour cela les propriétés de résistance des mycobactéries à certains agents antiseptiques, aux bases et aux acides. Cette étape s'accompagne d'une fluidification des prélèvements destinée à optimiser l'action des décontaminants.

Après action d'un agent fluidifiant et décontaminant, le milieu est neutralisé puis le prélèvement est centrifugé. Le culot de centrifugation servira à la réalisation de l'examen microscopique et à la mise en culture. Cependant, le plus souvent, l'examen microscopique s'effectue directement sur le prélèvement, avant cette étape de décontamination.

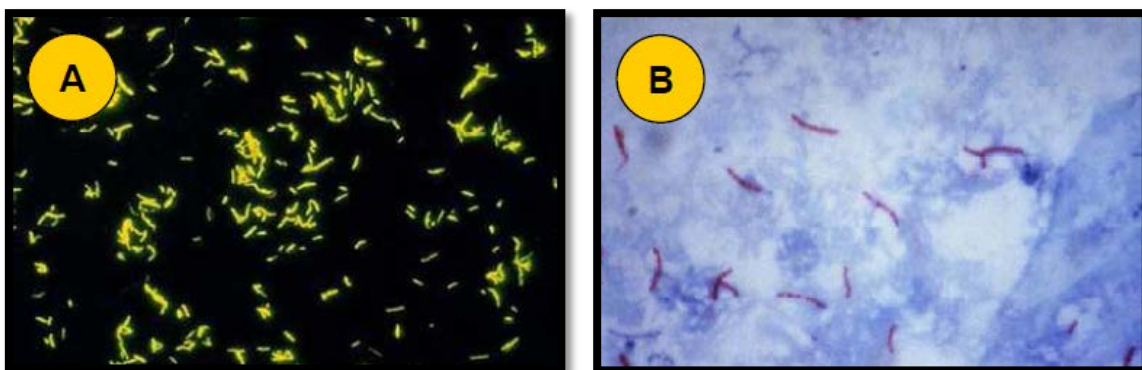
➤ **Examen microscopique.**

Cette première étape du diagnostic est primordiale. Simple et rapide, c'est parfois la seule méthode de diagnostic disponible dans les pays en voie de développement.

Les étalements sont réalisés soit directement à partir d'une fraction purulente (expectoration), soit le plus souvent sur le culot de centrifugation du prélèvement après fluidification et décontamination. Les frottis sont séchés sur une plaque chauffante, fixés par l'alcool méthylique puis colorés par la technique de Ziehl-Neelsen, mettant à profit les propriétés d'acido-alcool-résistance des mycobactéries : les BAAR apparaissent rouges sur fond bleu (Figure 10B). *Mycobacterium tuberculosis* se présente sous forme de bacilles de 5 µm de long souvent disposés en cordes [44].

La technique de fluorescence de Degommier à l'auramine est très utilisée pour le dépistage car la lecture est plus aisée : les bacilles apparaissent jaunes fluorescents sur fond rouge (Figure 10A). Une confirmation est ensuite effectuée par la méthode Ziehl-Neelsen (Figure 10B) [44].

Figure 8 : Frottis montrant des BAAR par coloration à l'Auramine (A) et au Ziehl-Nelsen (B) [44].



Un examen microscopique positif révèle la présence de BAAR mais ne permet pas de déterminer l'espèce mycobactérienne. Dans la forme pulmonaire, il signe la plus grande contagiosité de la maladie [44].

➤ **Amplification génomique à partir des échantillons biologiques.**

En termes de délai de réponse, ces méthodes se situent entre l'examen microscopique et la culture. Les techniques commercialisées sont validées pour les échantillons pulmonaires. Leur sensibilité est supérieure à celle de l'examen microscopique mais inférieure à celle de la culture qui sera toujours effectuée en parallèle. Par ailleurs, leur spécificité est bonne. Ces techniques concernent d'une part les mycobactéries du groupe tuberculeux et d'autre part les mycobactéries non tuberculeuses.

La technique de la Polymerase Chain Reaction (ou PCR) est la plus utilisée. Le principe de la PCR (Polymerase Chain Reaction) est d'amplifier un fragment du génome jusqu'à atteindre le seuil de détection. Cette méthode a pour cible l'ARN 16S, elle est pratiquée à partir des culots de décontamination des échantillons; en présence d'amorces, de nucléotides et de la Taq Polymérase, on réalise un certain nombre de cycles d'amplification comportant une étape de séparation des brins, une étape de fixation des amorces puis une élongation de celles-ci. Les amplicons dénaturés sont ensuite détectés grâce à des sondes spécifiques du complexe MTB. Des contrôles positifs et négatifs sont ajoutés aux séries. Cette méthode commercialisée en kit est standardisée, automatisable et permet de détecter les inhibiteurs. En revanche, elle nécessite de travailler dans différentes zones pour ne pas entraîner de contamination et requiert du matériel spécifique (bain-marie, amplificateur, laveur, lecteur de plaques). La sensibilité de cette technique est de l'ordre de 60 à 70% des prélèvements positifs à la culture, c'est-à-dire un peu supérieure à celle de l'examen microscopique [45].

D'autres techniques sont aussi utilisées, parmi lesquelles, La TMA (Transcription Mediated Amplification) qui est une amplification de l'ARN ribosomal [46].

Les techniques d'amplification génomique sont utiles lorsque l'examen microscopique est positif pour identifier le complexe tuberculosis, lorsque celui-ci est négatif mais que la clinique est fortement évocatrice ou éventuellement pour l'identification précoce d'une culture positive.

➤ **La culture.**

Différents milieux de culture peuvent être utilisés :

❖ **Milieux solides.**

Le milieu à l'œuf de Lôwenstein-Jensen (LJ) et Coletsos sont les milieux les plus utilisés. Ils renferment de l'œuf ou des extraits d'œuf, du glycérol, de l'amidon, des sels minéraux et du vert de malachite, antiseptique et indicateur de pH. Le milieu de Coletsos contient du pyruvate de sodium et une plus faible concentration en glycérol que le milieu de Lëwenstein-Jensen, favorisant ainsi le développement des *_mycobactéries* déficientes ou microaérophiles telles que *Mycobacterium bovis* ou *africanum*.

Quatre tubes de milieux de culture sontensemencés, 2 Lôwenstein-Jensen et 2 Coletsos, incubés inclinés et légèrement ouverts dans une atmosphère humide, à 37°C et également à

40°C pour les patients immunodéprimés à la recherche de mycobactéries atypiques. Les prélèvements d'origine cutanée sont ensemencés et incubés à 37°C et 30°C.

La croissance des mycobactéries étant lente, les tubes sont incubés pendant 8 semaines. Ils sont examinés quotidiennement au cours de la première semaine afin de détecter d'éventuelles contaminations ou de mettre en évidence des mycobactéries à croissance rapide. Les tubes sont ensuite examinés une fois par semaine.

Sur ces milieux solides à l'œuf, les colonies de *Mycobacterium tuberculosis* sont rugueuses, de couleur crème et apparaissent sous l'aspect de « chou-fleur » ou de « verrues », en 3 semaines à 37°C.

❖ Milieux liquides.

Le recours aux milieux liquides permet une détection plus rapide de la croissance des mycobactéries, et donc un diagnostic plus rapide. Selon les systèmes, la détection de la croissance des mycobactéries repose soit sur la consommation d'oxygène, soit sur le dégagement de CO₂. Le délai de détection des mycobactéries est alors de 8 à 30 jours, en général entre 2 et 3 semaines. La lecture se fait grâce à des techniques de fluorescence (Tubes MGIT, système Bactec) ou de colorimétrie (système MB Redox, Bact/Alert). Lorsque la culture apparaît positive, il convient de vérifier qu'il s'agit de mycobactéries par l'examen d'un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen. Par ailleurs, selon la législation, une culture sur milieu solide effectuée en parallèle est obligatoire.

Les délais de culture, de 15 jours à 3 semaines environ, expliquent que la biologie moléculaire se soit développée.

➤ L'identification.

Après avoir vérifié le caractère acido-alcool-résistant des bacilles, l'identification des espèces peut être effectuée par des méthodes traditionnelles (mise en évidence des caractères biochimiques) ou par biologie moléculaire, par des techniques mettant en œuvre des réactions d'hybridation avec des sondes spécifiques, précédées ou non d'une réaction d'amplification.

Ces différents caractères biochimiques sont traditionnellement utilisés pour l'identification d'une espèce mycobactérienne à partir d'une culture positive, ils permettent de différencier les

mycobactéries du complexe tuberculeux des mycobactéries atypiques et d'identifier les espèces du groupe tuberculeux (Tableau 1).

Tableau 1 : Caractères cultureux et biochimiques des mycobactéries du groupe tuberculeux [6].

	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium africanum</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>	BCG
Culture sur Loewenstein-Jensen. Aspect des colonies	Chou-fleur Grosses colonies Rugueuses	Plates Petites colonies Rugueuses	Bombées Petites colonies Lisses	Chou-fleur Grosses colonies Rugueuses
Délai de culture	15 à 30 jours	30 à 60 jours	30 à 60 jours	15 à 30 jours
Type respiratoire	Aérobie	Microaérophile	Microaérophile	Aérobie
Catalase thermolabile	+	+	+	+
Niacine	+	+/-	-	-
Nitrate	+	+/-	-	-
TCH 2 µg/ml	R	R/S	S	S
D- Cyclosérine 30 µg/ml	S	S	S	R

➤ Techniques de biologie moléculaire.

Actuellement, les techniques biochimiques tendent à être remplacées par des techniques de biologie moléculaire pour permettre un diagnostic d'espèce rapide. Cependant, pour ce qui concerne les espèces du complexe tuberculeux, la différenciation est difficile du fait du pourcentage d'homologie élevé.

Les nouveaux kits de biologie moléculaire permettent à partir de la culture d'identifier les principales espèces mycobactériennes.

- Le test Accuprobe™ de GenProbe permet à partir d'une colonie l'identification des mycobactéries du complexe tuberculosis : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti* et du BCG. Il permet également d'identifier *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium gordonae* et *Mycobacterium kansasii*.
- Le test GenoType® MTBC, est un test génétique de différenciation du complexe tuberculosis à partir de la culture, il permet en 4 heures l'identification de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis ssp bovis*,

Mycobacterium bovis ssp caprae et du BCG [47]. Cette méthode comprend une extraction de l'ADN suivie d'une amplification par PCR et d'une hybridation avec des sondes spécifiques. Sa sensibilité est un peu supérieure à celle du test Accuprobe® [48].

- Selon le même principe, le test GenoType® *Mycobacterium* est un test génétique qui permet en 3 heures l'identification des 13 principales espèces de mycobactéries atypiques à partir d'une culture.
- Le test INNO-LiPA MYCOBACTERIA® est un test d'hybridation moléculaire sur bandelette pour la détection et l'identification simultanée de 16 espèces du genre *Mycobacterium*, à partir de cultures sur milieux solides ou liquides.

Non seulement les kits de biologie moléculaire permettent d'identifier les espèces mycobactériennes, mais il existe des kits qui ont à la fois, la capacité d'identifier les espèces mycobactériennes et de détecter la résistance à certains antituberculeux. C'est le cas du test GenoType® MTBDR *plus* qui permet la détection des résistances de *Mycobacterium tuberculosis* à la rifampicine et à l'isoniazide et du test GenoType® MTBDR *sl* qui permet la détection des résistances de *Mycobacterium tuberculosis* aux Fluoroquinolones, aux Aminoglycoside/peptides cycliques et à l'éthambutol. Le test INNO-LiPA Rif TB® permet l'identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et la détection simultanée d'une résistance à la rifampicine [47 ; 48].

➤ **Antibiogramme.**

L'antibiogramme ne constitue pas en lui-même un acte de diagnostic de la tuberculose mais peut aider à la détermination de l'espèce incriminée en cas de présence d'une mycobactérie atypique.

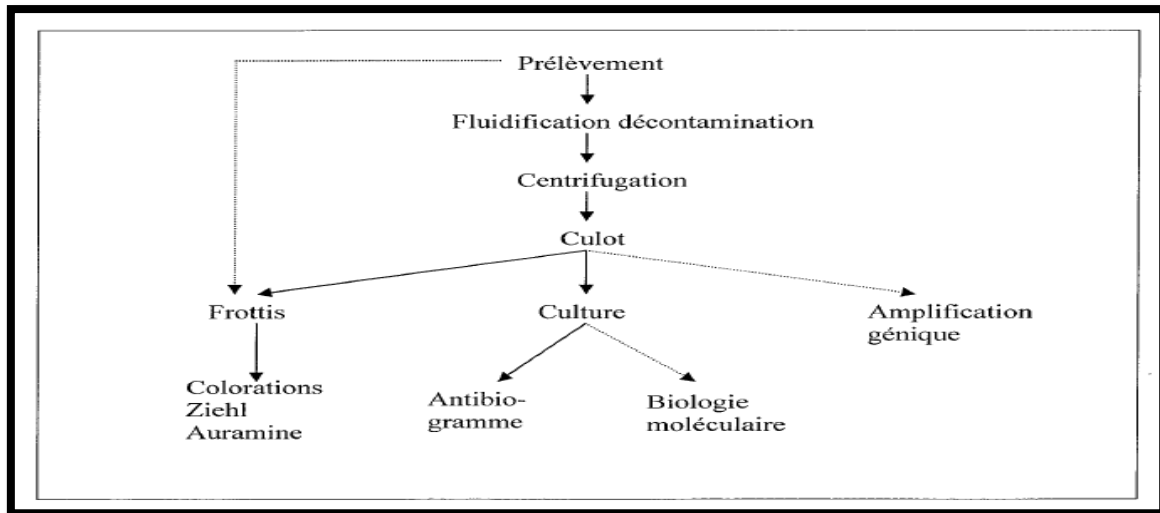
La détermination de la sensibilité des souches aux antituberculeux majeurs nécessite qu'un antibiogramme soit systématiquement entrepris dès l'isolement et l'identification de la souche. Les cinq antituberculeux majeurs seront toujours testés : Isoniazide, Rifampicine, Ethambutol, Streptomycine et Pyrazinamide.

Quand il existe des résistances aux antituberculeux, elles sont dues à des mutations chromosomiques, la résistance à la Rifampicine étant la plus fréquente et souvent associée à une résistance à l'Isoniazide. Les tests SIRE et Myco TB, sont le plus souvent utilisé pour l'antibiogramme.

❖ Démarche globale.

Le traitement appliqué aux prélèvements parvenant au laboratoire est résumé ci-dessous [49].

Figure 9 : Traitement d'un prélèvement pour la recherche des mycobactéries [49].



Les techniques de biologie moléculaire permettent d'obtenir des résultats rapides. Ces techniques qui sont en perpétuelle évolution ont beaucoup progressé en ce qui concerne l'identification des mycobactéries. Cependant, elles ne peuvent fournir d'antibiogramme complet et jusqu'à présent il est indispensable d'effectuer en plus un antibiogramme par la méthode des proportions.

II-5. Traitement.

La tuberculose est une maladie dont on guérit si un traitement approprié est prescrit et que celui-ci est scrupuleusement respecté par le malade.

Les principaux médicaments antituberculeux sont [50] : l'Isoniazide, la Rifampicine, l'Ethambutol, la Pyrazinamide et la streptomycine de la famille des aminoglycosides. Il existe d'autres antituberculeux de seconde intention comme par exemple les Fluoroquinolones (Moxifloxacine).

II-5-1. Chimio-prophylaxie.

On entend par chimio-prophylaxie le traitement préventif de patients ne présentant pas les symptômes d'une tuberculose mais ayant fait un virage tuberculinique récent ou présentant une IDR positive ainsi que de patients présentant un risque accru de développer une tuberculose (patients immunodéprimés par exemple) [51]. Le traitement préventif classique consiste en une prise quotidienne d'INH en monothérapie pendant six à neuf mois. Ce traitement a prouvé son efficacité avec un taux de guérison supérieur à 90% mais reste cependant associé à de sérieux effets indésirables tels que l'hépatotoxicité [52].

II-5-2. Traitement de la tuberculose maladie.

Le traitement standardisé de la tuberculose maladie, qu'elle soit pulmonaire ou extrapulmonaire, d'une durée de six mois, comporte deux phases. Pendant les deux premiers mois le traitement est une quadrithérapie associant INH, RIF, PZA, et EMB. Il s'en suit une bithérapie d'une durée de quatre mois alliant RIF et INH. Si la PZA ne peut être administrée, la phase de continuation sera prolongée de trois mois portant alors la durée totale du traitement à neuf mois.

II-5-3. Traitement de la tuberculose multirésistante.

En dépit de sa toxicité, c'est la durée du traitement, le plus souvent supérieure à six mois, qui est à l'origine de la mauvaise observance par les patients. Ce phénomène est le principal mode de sélection des souches MDR voire XDR et nécessitera l'emploi d'antituberculeux de seconde ligne lors de la prise en charge du patient. Ces antituberculeux de seconde ligne (aminoglycosides, fluoroquinolones, acide para-aminosalicylique, thioamides) sont moins efficaces ou plus toxiques que les antituberculeux de première intention rendant le traitement bien plus compliqué qu'en présence d'une souche tuberculeuse sensible [53 ; 54].

II-6. Résistances aux antituberculeux.

Les antibiotiques ont été à l'origine d'une révolution démographique et sociale, en diminuant de façon drastique la mortalité infectieuse. Malheureusement, chaque apparition d'un nouvel

antibiotique s'est rapidement accompagnée de l'apparition de bactéries qui lui sont résistantes. Face à la rapidité de l'accroissement des résistances et à leur élargissement à des familles de bactéries de plus en plus nombreuses, les molécules d'antibiotiques efficaces se raréfient et le retour à l'ère pré-antibiotique semble être une réalité pour certaines parties du monde.

II-6-1. Causes.

M. tuberculosis est naturellement résistant à un grand nombre d'antibiotiques, tels que les β -lactamines, les macrolides, les cyclines, les sulfamides, les glycopeptides et les quinolones classiques. Cette résistance naturelle est en grande partie liée à la faible perméabilité de la paroi mycobactérienne qui est épaisse et très riche en lipides, en particulier en acides mycoliques, ainsi qu'à d'autres mécanismes comme la production de β -lactamases qui contribuent à la résistance naturelle des mycobactéries aux β -lactamines, ou la mauvaise affinité de la cible (protéines liant la pénicilline, ADN gyrase) [1].

La résistance acquise aux antituberculeux chez *M. tuberculosis* est liée à des mutations qui modifient la séquence nucléotidique de gènes chromosomiques qui codent soit pour des protéines cibles de certains antibiotiques (ADN gyrase et fluoroquinolones, ribosome et streptomycine, ARN polymérase et rifampicine), soit pour des enzymes impliquées dans l'activation de l'antibiotique en substance active (catalase et isoniazide, pyrazinamidase et pyrazinamide) [55 ; 56]. Dans le premier cas, les mutations acquises entraînent une diminution de l'affinité de la cible pour l'antibiotique, alors que dans le deuxième, elles empêchent l'activation de l'antibiotique.

II-6-2. Détection des résistances.

On peut distinguer deux types et donc deux méthodes de détermination des résistances aux antituberculeux des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* : une résistance phénotypique et une résistance génétique. La méthode des proportions est la méthode de référence pour la détermination de la résistance phénotypique des bactéries du complexe *M. tuberculosis* aux antituberculeux [57]. Elle s'effectue généralement sur milieu de culture solide contenant les antibiotiques à tester, par inoculation d'une suspension bactérienne et comparaison de la croissance bactérienne avec un milieu de culture sans antibiotique. Une souche sera déclarée

résistante à l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF), la streptomycine (SM) ou l'éthambutol (EMB), si la proportion de bacilles résistants, donc se développant sur milieu avec antibiotique, est supérieure à 1% de la population bacillaire totale. Il est aussi possible de déterminer la résistance phénotypique des bacilles du complexe *M. tuberculosis* sur milieu de culture liquide en y ajoutant l'antibiotique à tester à la concentration critique (ou concentration définie comme étant la plus faible concentration minimale inhibitrice, CMI, permettant de différencier les souches résistantes des souches sensibles).

La détection de la résistance génétique aux antituberculeux implique la mise en évidence de mutations au niveau de la séquence de gènes codant pour la cible des principaux antibiotiques. Différents outils de détection de ces mutations ont été mis au point, et se basent sur l'amplification par PCR puis l'hybridation inverse des produits de PCR avec une sonde préalablement fixée sur une bandelette (INNOLiPA Rif TB Assay, Innogenetics ; GenoType MTBDRPlus et GenoType MTBDRsl, Hain Lifescience), la real-time PCR (GeneXpert MTB/RIF Assay, Cepheid), le séquençage des gènes de résistance, ou encore les puces à ADN [58]. Le séquençage des gènes de résistance reste la méthode moléculaire la plus fiable puisqu'elle permet d'identifier l'ensemble des mutations au sein des gènes étudiés et de détecter les mutations silencieuses ou synonymes ne conférant à priori pas de résistance à la bactérie [58]. Une souche sera déclarée multirésistante (MDR) si elle présente une résistance à la fois à INH et RIF, et extrêmement résistante (XDR) si en plus d'être MDR elle a développé une résistance à une fluoroquinolone quelle qu'elle soit, et à au moins un antituberculeux injectable sur les trois utilisés pour le traitement de la tuberculose (CPM, KAN, AMK) [59].

II-6-3. Résistance aux antibiotiques de première ligne.

Isoniazide.

L'isoniazide (INH) est l'antibiotique le plus largement utilisé pour le traitement de la tuberculose maladie aussi bien que de la tuberculose latente, les souches de *M. tuberculosis* étant naturellement sensibles à l'INH [60]. L'INH nécessite d'être activée par une catalase peroxydase (codée par le gène *KatG*) pour être efficace. Une fois activée, elle inhibe alors la synthèse des acides mycoliques de la paroi en interagissant avec l'enzyme enoyl-ACP réductase codée par le gène *inhA*, et favorise ainsi l'accumulation de radicaux libres par la bactérie. Les mutations ponctuelles du gène *KatG*, en empêchant l'activation de l'INH, sont

un mécanisme principal de résistance à cet antibiotique et concernent de 50 à 95% des souches résistantes à INH [60]. Bien que de nombreuses mutations aient été décrites pour le gène *katG* [61 ; 62], c'est la mutation du codon 315 qui prédomine avec une occurrence comprise entre 60 et plus de 90% des souches résistantes à l'INH [63 ; 64 ; 65 ; 66].

Rifampicine.

Utilisée depuis 1966, la rifampicine (RIF) est avec l'isoniazide un des antibiotiques majeurs du traitement de première intention de la tuberculose. L'essentiel de la résistance à RIF est associé à des mutations ponctuelles intervenant dans une région cible de 81 paires de bases (pb) ou région RRD (RIF Resistance Determining) du gène *rpoB* codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase [67]. En effet, plus de 95% des souches résistantes à RIF montrent une mutation dans cette région RRD [68 ; 48]. Les mutations les plus fréquentes interviennent au niveau des codons 531, 526 et 516 et sont généralement associées à de hauts niveaux de résistance tandis que celles intervenant au niveau des codons 511, 516, 518, et 522, ont été associées à de faibles niveaux de résistance [60].

Éthambutol.

L'éthambutol (EMB) inhibe la croissance bactérienne en interrompant la synthèse d'arabinogalactane, composant indispensable de la paroi bactérienne [69]. Les mutations de l'opéron *embCAB*, codant pour une arabinosyl transférase impliquée dans la synthèse d'arabinogalactane, sont les principaux mécanismes actuellement identifiés de résistance à EMB, notamment la mutation du codon 306 d'*embB* [70, 71]. Cette mutation a en effet été retrouvée chez 47 à 68% des souches de *M. tuberculosis* présentant de forts taux de résistance à EMB [70 ; 71 ; 67]. Cependant chez 25 à 35% des souches présentant une faible résistance à EMB aucune résistance n'a pu être détectée au sein de l'opéron *embCAB*, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes de résistance [72 ; 71 ; 60].

Pyrazinamide.

La PZA, un analogue de la nicotinamide, est une pro-drogue nécessitant d'être convertie par une pyrazinamidase en acide pyrazinoïque pour être effective [73]. Cet antibiotique est actif sur les bacilles tuberculeux semi-dormants ou persistants, et son inclusion au traitement de première ligne de la tuberculose a ainsi permis d'en réduire la durée à 6 mois [74 ; 75 ; 76]. Pléthore de mutations du gène *pncA*, codant pour la pyrazinamidase, a été associée à la résistance à PZA, ce qui complique notablement la mise au point de tests de détection de

résistance à cet antibiotique [77]. On estime qu'entre 72% et 97% des souches résistantes à PZA présentent au moins une mutation du gène *pncA* réparties sur l'ensemble du gène et de sa région promotrice [78 ; 79 ; 80 ; 60].

II-6-4. Résistance aux antibiotiques de deuxième ligne.

Les aminoglycosides (streptomycine, SM ; kanamycine, KM ; amikacine, AMK ; capreomycine, CPM) sont des inhibiteurs de la synthèse protéique des mycobactéries et interagissent avec les protéines ribosomales [60]. Des mutations au niveau des gènes *rpsL* et *rrs* codant respectivement pour les protéines ribosomales S12 et 16SrRNA constituent l'essentiel des mécanismes de résistance à SM. Elles sont retrouvées chez 50% et 20% des souches résistantes à SM [81 ; 82 ; 83 ; 67]. Les résistances à AMK et KM sont associées à des mutations au niveau des codons 1401, 1402 et 1484 du gène *rrs* tandis que la résistance à CPM a été associée à des mutations des gènes *rrs* et *tlyA* [84].

Les fluoroquinolones (FQ) agissent en inhibant l'ADN gyrase des mycobactéries [60]. Les mutations des codons 74, 83, 87, 88, 90, 91, 94 au sein d'une région QRD (Quinolones Resistance Determinant) du gène *gyrA* ont été identifiées comme majeures dans le phénomène de résistance des bacilles tuberculeux aux fluoroquinolones [85 ; 86 ; 87 ; 88 ; 89 ; 90]. Des mutations au sein du gène *gyrB* ont aussi été identifiées mais ne semblent pas conférer à elles seules une résistance aux FQ, elles pourraient compléter les mutations en *gyrA* et permettre à la bactérie de développer de hauts niveaux de résistance aux FQ.

L'éthionamide (ETH), de même que l'INH, agit en inhibant la production d'acides mycoliques, indispensables à la construction de la paroi de *M. tuberculosis* [91 ; 92]. Les mutations du gène *inhA* et de sa région promotrice confèrent à la fois une résistance à ETH et à INH tandis que les mutations du gène *ethA* confèrent une résistance à ETH et autres thioamides [92 ; 93 ; 94 ; 95].

II-7. Prévention.

Compte tenu du nombre de décès causé par la tuberculose et les moyens mis en œuvre par les gouvernements pour lutter contre ce fléau, la première barrière contre maladie est la prévention.

La prévention de la tuberculose se base sur plusieurs éléments :

II-7-1. La stratégie DOTS.

En 1995, soit 2 ans après avoir reconnu la tuberculose comme urgence mondiale, et devant l'ampleur de l'épidémie, l'OMS met en place une stratégie de lutte contre la tuberculose reposant sur le traitement chimio-prophylactique standardisé de courte durée des patients ou stratégie DOTS (Directly Observed Treatment, Short-course). Les objectifs principaux annoncés de ce plan de lutte étaient la détection de 70% des cas de tuberculose maladie et la guérison de 85% d'entre eux d'ici l'an 2000 lequel reposait sur 5 principes :

- L'engagement des gouvernements et des pouvoirs public
- Un dépistage de qualité reposant sur l'examen direct de frottis
- Un traitement normalisé des patients avec surveillance directe de la prise du traitement
- L'approvisionnement ininterrompu en antituberculeux de qualité
- Le suivi et l'évaluation des effets de la mise en place du programme DOTS.

En 2001, après des résultats encourageants obtenus avec la stratégie DOTS mais face à la dégradation de la situation épidémique dans certains pays d'Afrique et d'Europe de l'est notamment, l'OMS décide de renforcer la stratégie DOTS et lance le plan mondial « halte à la tuberculose » visant « un monde sans tuberculose » et dont l'objectif principal est de réduire drastiquement l'incidence de la maladie dans le monde d'ici 2015.

II-7-2. Vaccination par le BCG.

Les premiers essais de vaccination par le Bacille de Calmette et Guérin (BCG) datent de 1921.

Le BCG est une souche de *Mycobacterium bovis* rendue avirulente par un grand nombre de repiquages sur milieu bilié et glyciné.

Le BCG confère une immunité cellulaire relative. De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer l'efficacité de cette vaccination [18] :

- Le BCG protège surtout les enfants contre les méningites tuberculeuses. Deux méta-analyses ont repris l'essentiel des résultats publiés concernant les nourrissons et les enfants : il ressort que la protection apportée par le BCG est légèrement supérieure chez le nourrisson que chez l'enfant, de l'ordre de 80% pour les formes graves (miliaires et méningites) et de 55% pour les formes pulmonaires

- Chez l'adulte, la vaccination par le BCG réduit de 50% le risque de tuberculose pulmonaire et extra- pulmonaire, avec cependant des disparités puisque la protection conférée par le BCG varie énormément selon les études et les populations concernées par ces études.

Globalement, le vaccin protège pendant au moins 10 à 15 ans avec une efficacité variant de 50 à 60% contre les formes pulmonaires [96].

II-7-3. Autres modes de prévention.

L'investigation autour d'un cas de tuberculose est le plus souvent une méthode efficace pour prévenir des risques de contamination de la tuberculose. En effet les personnes de l'entourage proche des malades contagieux sont les plus exposées au risque de tuberculose et, lorsqu'elles ont été infectées, c'est dans la période qui suit immédiatement l'infection qu'elles ont le plus grand risque de développer une tuberculose maladie. Il est donc impératif de dépister rapidement les cas de tuberculose. Le dépistage doit se dérouler au sein de la famille bien sûr mais également au sein de collectivités, en particulier d'enfants, de personnes âgées ou de sujets immunodéprimés [97].

Il faut aussi une prévention et surveillance de la tuberculose parmi les personnels exposés. La tuberculose est reconnue comme maladie professionnelle pour les personnels de soins et de laboratoires (maladie n040 inscrite au tableau des maladies professionnelles). Entre 30 et 50 cas sont déclarés chaque année par les services de médecine du travail, dont 90% de formes pleuro pulmonaires.

Aussi, une prévention dans les établissements de santé doit être une des priorités de la prévention contre la tuberculose car le regroupement dans les mêmes services hospitaliers de patients immunodéprimés et de patients tuberculeux crée les conditions favorables à la survenue d'infections nosocomiales, et le risque est accru lorsque le bacille est multi résistant car la période de contagiosité est alors plus longue [97]. Il convient, dans un premier temps, de prendre des mesures de protection respiratoire ou d'isolement respiratoire.

Notons aussi que des campagnes de sensibilisation font partie du programme de prévention contre la tuberculose.

Partie II :

Etude pratique.

Chapitre I :

Matériel et méthodes.

Chapitre I : Matériels et méthodes

I-1. Population cible, période et type d'étude.

Notre étude est essentiellement réalisée sur des individus gabonais et étranger des deux sexes, vivants au Gabon, dont l'âge est compris entre 15 et 75 ans et elle se déroule sur une période de trois mois, allant du mois de juillet au mois d'octobre 2016 (Tableau 2).

C'est une étude qui consiste à établir la prévalence de la tuberculose multirésistante aux antituberculeux au Gabon, notamment par l'utilisation de tests de susceptibilité moléculaires et phénotypiques.

Tableau 2 : caractéristiques des patients prélevés.

ID Labo	Sexe	Age	Date Prél.	Centre Prél.
2092	M	60	19/04/2016	SOS Med.
2095	M	43	04/05/2016	CDT/NK
2096	M	33	10/05/2016	CDT/NK
2098	M	40	12/05/2016	CDT/NK
2105	M	30	31/05/2016	CDT/NK
2106	M	48	01/06/2016	CDT/NK
2109	F	26	07/06/2016	CDT/NK
2122	M	38	08/06/2016	CDT/NK
2124	F	75	14/06/2016	CDT/NK
2125	F	16	21/06/2016	CDT/NK
143	F	22	27/06/2016	CDT/NK
202	M	37	30/06/2016	CDT/Ste Ma
259	M	58	05/07/2016	CDT/NK
384	M	21	06/07/2016	CDT/NK
403	M	39	06/07/2016	CDT/NK
413	F	26	06/07/2016	CDT/NK

ID Labo	Sexe	Age	Date Prél.	Centre Prél.
497	F	27	07/07/2016	CDT/NK
516	M	48	11/07/2016	CDT/NK
533	M	32	12/07/2016	CDT/NK
635	M	38	14/07/2016	CDT/NK
677	M	15	18/07/2016	CDT/NK
774	F	17	18/07/2016	CDT/NK
830	M	25	18/07/2016	CDT/NK
987	F	26	21/07/2016	CDT/NK
1795	F	45	27/07/2016	CDT/NK
2280	F	16	03/08/2016	CDT/NK
2331	M	25	08/08/2016	CDT/NK
2986	M	28	11/08/2016	CDT/NK
8	M	27	22/08/2016	CDT/Ste Ma
14	M	23	22/08/2016	CDT/Ste Ma
23	M	32	22/08/2016	CDT/Ste Ma
33	F	27	22/08/2016	CDT/Ste Ma

Nous aurons à utiliser les méthodes moléculaires *MTBDR_{sl}* et *MTBDR_{plus}*, puis l'antibiogramme *SIRE* en ce qui concerne la méthode Phénotypique.

Ainsi, nous auront à comparer la performance de la méthode phénotypique vis-à-vis de la méthode moléculaire (génotypique).

I-2. Echantillonnage et lieux de collecte.

Notre étude se fait obligatoirement dans un laboratoire de biosécurité de niveau 3 (P3) pour minimiser tout danger pour le personnel et l'environnement (selon la directive 93/88/CEE).

Toutes les conditions de sécurité en laboratoire de niveau P3 doivent être respectées.

Nos échantillons nous sont parvenus principalement du Centre de Diagnostic de la Tuberculose de l'hôpital de Nkembo à Libreville où les prélèvements sont faits sur des patients atteints de tuberculose et sous traitement ou sur des personnes présentant des signes cliniques de tuberculose, mais aussi sur des personnes ayant fait des rechutes après avoir été guéris de la tuberculose. Ces prélèvements ont été effectués dans la période allant du mois d'avril au mois d'août 2016 et avaient ensuite été envoyés au CIRMF à Franceville puis conservés après avoir subi une décontamination et fluidification puis une mise en culture liquide et solide.

I-2-1. Prélèvement, transport et conservation.

➤ Prélèvement des échantillons.

Les prélèvements les plus fréquemment reçus au laboratoire sont les crachats issus des expectorations.

Il convient, chaque fois que possible, de faire trois prélèvements chez un malade suspect de tuberculose pulmonaire, selon les modalités suivantes :

Après la consultation, le premier échantillon, appelé spot spécimen, est recueilli sous la supervision de l'infirmier dans un crachoir rigide à ouverture large, avec couvercle à vis, fermant hermétiquement. L'infirmier confie un deuxième crachoir au malade et lui demande de recueillir un deuxième prélèvement durant la nuit ou le matin au réveil et de le ramener le plus rapidement possible au laboratoire. Lorsque le malade revient, un troisième prélèvement peut être fait sur place. Le prélèvement doit être réalisé à l'extérieur, dans une pièce isolée ou devant une fenêtre ouverte et loin de toute autre personne pour éviter les risques de contamination.

Après avoir fourni le premier échantillon de crachat, l'infirmier prélève le sang du patient qu'il récolte dans un tube sec, bien identifié, pour la conservation de son sérum à -20°C [98].

Chapitre I : Matériels et méthodes

➤ transport et conservation des échantillons.

En allant au centre de traitement de la tuberculose (CDT) pour les prélèvements du jour, se munir d'une glacière. Charger la glacière, 10 minutes avant le départ pour le CDT, d'accumulateurs de froids, fermer la glacière hermétiquement avant de sortir du laboratoire. Les échantillons prélevés doivent être bien identifiés et stockés dans la glacière jusqu'à leur transport vers le CIRMF. A l'arrivée de la glacière au CIRMF, si les échantillons ne sont pas traités immédiatement, les ranger dans le congélateur pour une conservation à une température de -20°C.

I-2-2. Décontamination et fluidification.

Le but de cette procédure de rendre l'échantillon plus fluide et homogène, donc facilement manipulable, et d'éliminer tous autres germes non *Mycobacterium* par la décontamination à base soude.

La décontamination et de la fluidification des crachats se fait selon le protocole suivant :

Pour des échantillons dont le volume est inférieur à 5 ml contenu dans des tubes Falcon de 50 ml, transférer un volume équivalent de la solution de digestion. Pour des échantillons de 6 à 7 ml, ajouté 5 ml de la solution de digestion. Pour les échantillons de 8 à 10 ml, ajouté un volume égal de la solution de digestion.

Vortexer pendant 30 secondes toutes les 5 minutes trois fois de suite.

Neutraliser avec le NPC-67 en verser goutte à goutte avec une pipette la solution de NPC-67, jusqu'à ce que la solution vire du rouge/orange à l'incolore. Refermer le tube et secouer à la main pour mélanger.

Centrifuger à 3000xg pendant 15 minutes (avec une centrifugeuse réfrigérée : recommandé, mais pas obligatoire).

Verser le surnageant dans un récipient anti-projections contenant un désinfectant approprié.

Resuspendre le culot avec 0,5 ml de tampon de resuspension (pellet resuspension)

Bien mélanger le culot et tampon, puis procéder à l'examen Microscopique aussi tôt, puis à l'extraction d'ADN qui servira pour les tests moléculaires ou alors conserver cet échantillon à une température comprise entre 2 et 6°C [98].

Chapitre I : Matériels et méthodes

I-2-3. Examen microscopique.

Nous avons commencé notre examen microscopique d'échantillons issus d'expectoration décontaminés par la réalisation d'un frottis. C'est ainsi qu'avec les réactifs que sont, la Fuchsine de Ziehl (RAL), l'Acide nitrique au 1/5, Alcool à 95°, Bleu de méthylène, nous avons appliqué le protocole suivant :

Graver au crayon, sur la lame le N° du prélèvement correspondant. A partir du culot de centrifugation, faire un frottis sur une surface de 1 x 2 cm. Laisser sécher le frottis (sur une plaque chauffante à température moyenne). Fixer à l'alcool méthylique. Couvrir la lame de fuchsine phéniquée. Chauffer trois fois en 10 minutes jusqu'à émission de vapeurs (le colorant ne doit pas bouillir ou se dessécher sur la lame ; en ajouter si nécessaire). Rincer à l'eau. Couvrir la lame d'acide nitrique dilué au 1/3. Laisser agir 45 secondes. Rincer à l'eau. Couvrir la lame d'alcool éthylique à 95°. Laisser agir 5 mn. Rincer à l'eau et recouvrir la lame de bleu de méthylène. Laisser agir 2mn. Rincer à l'eau. Laisser sécher à l'air libre.

La lecture microscopique des lames colorées à la fuchsine par la méthode de Ziehl-Neelsen s'est faite à l'immersion objectif 100 x et avec des oculaires de 10 (1000). Il faut examiner au moins 100 champs, ce qui requiert environ 15 minutes avant de déclarer une lame négative. Trois balayages du frottis doivent être réalisés.

I-2.4. Extraction d'ADN.

L'extraction de l'ADN s'est faite à partir d'échantillons de crachats décontaminés. Pour cette extraction, nous avons utilisé le kit GenoLyse version 1.0 de HAIN LIFESCIENCE (Figure 13).

Figure 10. Kit GenoLyse.



Chapitre I : Matériels et méthodes

L'extraction se fait selon le protocole suivant :

Transférer 500 μ L de la solution de crachat décontaminé dans un tube à centrifuger de 1,5mL bien identifié au préalable. Centrifuger à 10.000xg pendant 15 minutes dans une centrifugeuse munis de nacelle contre aérosol. Verser le surnageant et suspendre le culot avec 100 μ L de la solution alcaline de tampon de lyse (A-Lyse), puis vortexer pendant 5 secondes. Incuber dans un bain marie sec à 95°C pendant 15 minutes puis centrifuger brièvement pour récupérer les gouttes qui tapissent la paroi du tube. Neutraliser la réaction en y ajoutant 100 μ L de tampon de neutralisation (A-NB) et vortexer pendant 5 secondes. Centrifuger à vitesse maximale pendant 5 minutes et recueillir le surnageant dans un nouveau tube pour augmenter la quantité de l'ADN par PCR. L'ADN extrait peut être conservé à -20°C pour une longue durée [98].

I-2-5. Amplification par PCR des extraits d'ADN.

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est une technique qui permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique, permettant ainsi d'augmenter considérablement la quantité d'ADN dont on dispose initialement.

Pour notre étude, nous avons utilisé deux kits distincts ; le kit GenoType MTBDR*plus* qui est utilisé pour la PCR dans le cas du test MTBDR*plus* 96 et le kit GenoType MTBDR*sl* qui est utilisé pour la PCR dans le cas du test MTBDR*sl* 96.

La réalisation de la PCR. Tous les réactifs requis pour l'amplification tels que polymérase et amorces sont contenus dans les Mélanges d'Amplification et sont optimisés pour le test. Pour la préparation du mix, bien homogénéiser les réactifs après leur décongélation. Le pipetage de ces réactifs à l'aide d'une pipette automatique et des cônes correspondants doit se faire dans une pièce exempte d'ADN contaminant.

Déterminer le nombre d'échantillons à amplifier (nombre d'échantillons à analyser + contrôles), puis préparer le nombre de tubes requis.

Préparer une solution mère de mélange réactionnel (mix PCR) de la manière suivante :

Tableau 3 : Mix pour PCR MTBDR *plus* [98].

Réactifs	Volume par unité (en μ L)	N=2	N=3	N=4	N=5	N=n
AM-A	10	20	30	40	50	10 \times n
AM-B	35	70	105	140	175	35 \times n
Mix	45	90	135	180	225	45 \times n

Chapitre I : Matériels et méthodes

Tableau 4 : Mix pour PCR MTBDR *sl* [98].

Réactifs	Volume par unité (en μL)	N=2	N=3	N=4	N=5	N=n
PNM	35	70	105	140	175	35×n
Tampon 10x	5	10	15	20	25	5×n
MgCl ₂	2	4	6	8	10	2×n
H ₂ O	3	6	9	12	30	3×n
Hot Star Taq	0,2(IU)	0,4	0,6	0,8	1	0,2×n
Mix	45,2	90,4	135,6	180,8	226	45,2×n

N : Nombre total d'extrait à amplifier (tous les contrôles inclus).

Bien mélanger le mix mais ne pas le vortexer puis distribuer 45 μL du mix MTBDRplus par tube de PCR ou 45,2 μL du mix MTBDRsl par tube de PCR. Le mix doit être préparé fraîchement et n'est de ce fait pas conservable.

Sortir du frigo le portoir contenant les extraits d'ADN à amplifier, faire une brève centrifugation pour faire descendre les éventuelles gouttes restées sur le bouchon.

Ajouter 5 μL d'extrait d'ADN à amplifier par tube de mix correspondant et bien mélangé le tout.

Reconstituer le plan de la plaque de PCR selon la distribution des échantillons dans les puits.

Etablir le programme d'amplification des cycles de la PCR.

Sélectionner le protocole MDR DIR sur le Thermocycleur T100 Thermal cycler de Bio Rad puis lancer la PCR.

A la fin de la PCR, procéder à l'hybridation et Révélation [98].

I-2-6. Hybridation et révélation.

L'hybridation est une technique permettant de mettre en évidence au sein d'une cellule ou un tissu, une séquence d'ADN. La technique se base sur le principe de la complémentarité des bases nucléiques, plus particulièrement entre l'ADN et le brin d'ARN de séquence complémentaire.

Chapitre I : Matériels et méthodes

Le protocole d'hybridation est le même dans les cas du test GenoType MTBDR *plus* 96 et du test GenoType MTBDR *sl* 96, mais avec des kits différents. L'hybridation pour la réalisation du test GenoType MTBDR *plus* 96 s'est faite avec le kit GenoType MTBDR *plus* 96 version 2.0. Par contre, l'hybridation pour la réalisation du test GenoType MTBDR *sl* 96 s'est faite avec le kit GenoType MTBDR *sl* 96 version 1.0.

Avant de procéder à l'hybridation proprement dite, il faut d'abord réaliser la préparation des réactifs, pour ce faire, nous avons préchauffé le bain-marie agitateur (Twincubator) à 45°C (dérivation maximale : +/-1°C) et préchauffer les solutions HYB et STR à 27-45°C avant utilisation.

Dans un tube approprié, diluer le Conjugué Concentré (CON-C, orange) et le Substrat Concentré (SUB-C, jaune) au 1/100 dans un volume adéquat du tampon correspondant (CON-C avec CON-D, SUB-C avec SUB-D). Bien homogénéiser et laisser à température ambiante.

Pour chaque échantillon testé, ajouter 10µl de concentré à 1ml de tampon. Diluer CON-C avant chaque utilisation. Une fois dilué, SUB-C reste stable pendant 4 semaines conservé à température ambiante et à l'obscurité.

Pour procéder à l'hybridation proprement dit, nous avons déposé 20µl de Solution de Dénaturation (DEN, bleu) à une extrémité de chaque puits utilisé. Nous avons ajouté 20µl d'échantillon amplifié et mélanger les deux solutions par pipetages répétés. Incuber 5mn à température ambiante. Puis il a fallu ajouter dans chaque puits 1ml de Tampon d'Hybridation (HYB, vert) préchauffé et homogénéisé et agiter doucement le bac jusqu'à ce que le mélange prenne une coloration homogène. Eviter les éclaboussures vers les autres puits.

Déposer une bandelette préalablement numéroté dans chaque puits utilisé. Les bandelettes doivent être entièrement recouvertes par le liquide, avec la face marquée (identifiable par le marquage coloré) tournée vers le haut. Les bandelettes mal orientées doivent être remises en position à l'aide de pincettes propres. Afin d'éviter toute contamination, bien nettoyer les pincettes après chaque utilisation. Cela vaut aussi pour toutes les étapes suivantes.

Placer le bac dans le bain-marie agitateur (TwinCubator) et incuber 30mn à 45°C puis aspirer le Tampon d'Hybridation Utiliser par exemple une pipette Pasteur reliée à une pompe vide.

Ajouter à chaque puits 1ml de Solution de Lavage Stringent (STR, rouge) et incuber 15mn à 45°C dans le bain-marie agitateur (TwinCubator) puis vider la Solution de Lavage Stringent.

Chapitre I : Matériels et méthodes

Eliminer tout le liquide résiduel en retournant la plaque sur du papier absorbant (effectuer de même pour les autres étapes du lavage).

Laver chaque puits avec 1ml de Solution de Rinçage (RIN) et incuber pendant 1mn sous agitation (TwinCubator/plateau agitateur). Vider la Solution de Rinçage par retournement de la plaque sur un container à déchets.

Ajouter à chaque puits 1ml de Conjugué dilué (voir ci-dessus) et incuber 30 mn sous agitation (TwinCubator/plateau agitateur). Vider le contenu des puits et rincer sous agitation 1minute à l'aide de 1ml de Solution de Rinçage (RIN) puis vider et répéter ce rinçage une nouvelle fois, puis rincer une fois avec environ 1ml d'eau distillée à l'aide d'une pissette.

Ajouter 1ml de Substrat dilué (voir ci-dessus) dans chaque puits et incuber sans agitation à l'obscurité (recouvrir d'un papier d'aluminium). Le temps de révélation peut varier en fonction des conditions de déroulement du test (de 3 à 20 mn), notamment de la température de la pièce. Des temps de révélation trop longs peuvent entraîner un bruit de fond qui peut gêner l'interprétation des résultats. Arrêter la réaction en rinçant brièvement deux fois à l'eau distillée.

A l'aide de pincettes, récupérer les bandelettes et les sécher entre deux couches de papier absorbant.

Scotcher les bandelettes sur la feuille de résultats et faire la lecture et interprétation selon les abaques [98].

I-2-7. Test GenoType MTBDR_{plus} 96.

Le test GenoType MTBDR_{plus} 96 version 2.0 est un test Moléculaire qui a pour but de permettre la détection génétique des mutants de *Mycobacterium tuberculosis* résistant à la Rifampicine et à l'Isoniazide par la révélation des gènes KatG (120pb), rpoB (166pb) et inhA (110pb).

Ce test est basé sur l'utilisation de bandelettes auxquelles des sondes d'ADN sont fixées, et permet l'identification moléculaire du complexe M. tuberculosis et sa résistance à la rifampicine et à l'isoniazide à partir de culture positive ou de prélèvements pulmonaire à examen microscopique positif.

Chapitre I : Matériels et méthodes

La détection de la résistance à la rifampicine est réalisée à travers la détection des principales mutations au niveau du gène *rpoB* qui code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase.

La résistance de haut niveau à l'isoniazide est détectée à travers l'analyse du gène *KatG*, codant pour la catalase peroxydase.

Pour ce qui est de la résistance de bas niveau à l'isoniazide, on s'intéresse à l'analyse du promoteur du gène *inhA*, codant pour le NADH-énoyl-ACP-réductase.

La procédure du test *MTBDRplus* 96 comporte les trois phases décrites précédemment : l'extraction de l'ADN à partir de crachats décontaminés, l'amplification de l'ADN par PCR à l'aide d'amorces biotinylées et l'hybridation inverse sur des bandelettes [98].

I-2-8. Test GenoType MTBDR*sl* 96.

Le test GenoType MTBDR*sl* 96 version 1.0 est un test Moléculaire qui permet la détection génétique des mutants de *Mycobacterium tuberculosis* résistant aux Fluoroquinolones, aux aminoglycosides (streptomycine) et à l'éthambutol par la révélation des gènes *gyrA*, *rrs* et *embB*.

Ce test est lui aussi basé sur l'utilisation de bandelettes auxquelles des sondes d'ADN sont fixées, il permet l'identification moléculaire du complexe M. tuberculosis et sa résistance aux Fluoroquinolones, aux aminoglycosides et à l'éthambutol à partir de culture positive ou de prélèvements pulmonaire à examen microscopique positif.

La détection de la résistance aux fluoroquinolones est réalisée par l'analyse du gène *gyrA*, codant pour la sous unité A de l'ADN gyrase.

L'analyse du gène *rrs*, codant pour la boucle de l'ARN 16S qui interagit avec la protéine ribosomale S12, permet de détecter la résistance à la streptomycine qui est un aminoglycoside.

La résistance à l'éthambutol est mise en évidence par analyse du gène *embB* qui code pour l'arabinosyl transférase.

La procédure du test MTBDR*sl* 96, comporte tout comme celle du test *MTBDRplus* 96, les trois phases décrites plus haut : l'extraction de l'ADN à partir de crachats décontaminés,

Chapitre I : Matériels et méthodes

l'amplification de l'ADN par PCR à l'aide d'amorces biotynilées et l'hybridation inverse sur des bandelettes [98].

I-2-9. Test BACTEC MGIT 960 S.I.R.E.

Le test BACTEC MGIT 960 S.I.R.E est commercialisé par la société Becton, Dickinson and Company sous forme de kit. Le kit BACTEC MGIT 960 SIRE sert à la réalisation du test de sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux antimycobactériens. C'est un test de sensibilité qualitatif rapide de *Mycobacterium tuberculosis* en culture, à la streptomycine (STR), l'isoniazide (INH), la rifampicine (RIF) et l'éthambutol (EMB).

Le test de sensibilité aux antimycobactériens est précieux pour un traitement approprié des patients atteints de tuberculose. Il importe que les antimycobactériens prescrits démontrent une activité spécifique contre *Mycobacterium tuberculosis* vérifiée par la sensibilité de l'isolat à ces antibiotiques. La détection rapide des isolats résistants est essentielle pour une prise en charge efficace des patients [99].

Également appelée méthode des proportions, cette méthode communément utilisée pour le test de sensibilité aux antimycobactériens utilise la gélose de Middlebrook et Cohn 7H10. Elle compare le nombre de colonies sur gélose contenant l'antibiotique à celui obtenu sur milieu sans antibiotique. La résistance à un antibiotique est détectée lorsque 1% ou plus d'une population bactérienne est résistante à la concentration d'antibiotique testé.

La trousse BACTEC MGIT 960 SIRE est un test qualitatif de 4-13 jours. Le test est basé sur une comparaison de la croissance d'un isolat de *M. tuberculosis* dans un tube contenant un antibiotique avec celle obtenue dans un tube sans antibiotique (témoin de croissance). L'instrument BACTEC MGIT contrôle les tubes pour déceler toute augmentation de fluorescence. L'instrument compare la fluorescence du tube contenant l'antibiotique à celle du tube témoin de croissance pour établir les résultats de sensibilité. L'instrument BACTEC MGIT interprète automatiquement ces résultats et donne un résultat de sensibilité ou de résistance.

Les réactifs contenues dans la trousse BACTEC MGIT 960 SIRE sont un flacon de streptomycine, un flacon d'isoniazide, un flacon de rifampicine et un flacon d'éthambutol, tous lyophilisés, et huit flacons de supplément SIRE. La formule approximative par flacon

Chapitre I : Matériels et méthodes

d'antibiotique lyophilisé est : Streptomycine 332 µg, Isoniazide 33,2 µg, Rifampicine 332 µg, Éthambutol 1660 µg.

Le supplément BACTEC MGIT 960 SIRE contient 20 mL de supplément d'enrichissement Middlebrook OADC dont la formule approximative par litre d'eau distillée est : Albumine bovine 50,0 g ; Catalase 0,03 g ; Dextrose 20,0 g ; Acide oléique 0,6 g.

La première étape dans la réalisation de l'antibiogramme avec le kit BACTEC MGIT 960 SIRE consistait à reconstituer chacun des réactifs avec 4 mL d'eau distillée/désionisée stérile afin d'obtenir une solution mère (voir tableau 5). Une fois reconstituées, les solutions d'antibiotique peuvent être congelées et conservées à -20°C ou à une température inférieure jusqu'à 6 mois, sans dépasser la date de péremption d'origine.

Ensuite, nous avons fait la préparation de l'inoculum à partir d'un tube BACTEC MGIT 7 mL positif selon le protocole suivant :

Le premier jour d'un tube MGIT positif dans l'instrument est considéré comme Jour 0. Pour la préparation de l'inoculum pour le test, un tube MGIT 7 mL positif doit être utilisé le jour suivant celui où il a été déterminé comme positif par l'instrument BACTEC MGIT (Jour 1) et au plus dans les cinq jours (Jour 5) suivant l'apparition de la positivité. Un tube positif depuis plus de cinq jours doit être repiqué dans un nouveau tube MGIT 7 mL contenant le supplément de croissance BACTEC MGIT et testé sur l'instrument BACTEC MGIT jusqu'à ce qu'il soit déterminé comme positif, puis utilisé dans les cinq jours qui suivent. Se reporter à « Préparation d'un tube MGIT d'ensemencement à partir de milieux liquides. »

S'il s'agit d'un tube positif au Jour 1 ou au Jour 2, utiliser la suspension de bouillon MGIT pour procéder à l'ensemencement. Bien mélanger. Passer à la « Méthode d'ensemencement pour le test de sensibilité ».

S'il s'agit d'un tube positif au Jour 3, Jour 4 ou Jour 5, bien mélanger puis diluer 1 mL de bouillon positif dans 4 mL de sérum physiologique stérile (dilution 1:5). Bien mélanger le contenu du tube. Utiliser la suspension diluée pour procéder à l'ensemencement. Passer à l'ensemencement pour le test de sensibilité.

La méthode d'ensemencement pour le test de sensibilité avec la trousse BACTEC MGIT 960 SIRE est le suivant :

Chapitre I : Matériels et méthodes

1. Étiqueter cinq tubes MGIT 7 mL pour chaque isolat à tester. Étiqueter un tube TC (témoin de croissance), un tube STR, un tube INH, un tube RIF et un tube EMB. Placer les tubes dans l'ordre indiqué dans un support de module AST de taille appropriée (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument BACTEC MGIT).
2. Ajouter stérilement 0,8 mL de supplément BACTEC MGIT SIRE à chaque tube (il importe d'utiliser le supplément fourni avec la trousse).
3. À l'aide d'une micropipette, pipeter stérilement 100 µL de la solution mère de MGIT STR à 83 µg/mL dans le tube MGIT convenablement étiqueté. Pipeter stérilement 100 µL de la solution mère de MGIT INH à 8,3 µg/mL dans le tube MGIT convenablement étiqueté. Pipeter stérilement 100 µL de la solution mère de MGIT RIF à 83 µg/mL dans le tube MGIT convenablement étiqueté. Pipeter stérilement 100 µL de la solution mère de MGIT EMB à 415 µg/mL dans le tube MGIT convenablement étiqueté. Il importe d'ajouter l'antibiotique qui convient dans le tube correspondant. N'ajouter aucun antibiotique dans le tube MGIT TC.

Tableau 5. Volumes de préparation des antibiotiques [99].

Antibiotiques	Concentration de l'antibiotique après reconstitution*	Volume à ajouter aux tubes MGIT pour le test	Concentration finale dans les tubes MGIT
MGIT STR	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT INH	8,3 µg/mL	100 µL	0,1 µg/mL
MGIT RIF	83 µg/mL	100 µL	1,0 µg/mL
MGIT EMB	415 µg/mL	100 µL	5,0 µg/mL

* Ces antibiotiques doivent être reconstitués avec 4 mL d'eau stérile/désionisée afin d'obtenir les concentrations indiquées.

4. Préparation et ensemencement du tube de témoin de croissance : Pipeter stérilement 0,1 mL de la suspension de microorganismes (voir « Préparation de l'inoculum ») dans 10 mL de sérum physiologique stérile afin de préparer une suspension de témoin de croissance au 1/100. Mélanger soigneusement la suspension de témoin de croissance. Ensemencer 0.5 mL de la suspension de témoin de croissance au 1/100 dans le tube MGIT étiqueté « TC ».

Chapitre I : Matériels et méthodes

5. Ensemencement d'un tube contenant un antibiotique : Pipeter stérilement 0,5 mL de la suspension de microorganismes (voir « Préparation de l'inoculum ») dans chacun des 4 tubes d'antibiotique restants (STR, INH, RIF, EMB).
6. Bien reboucher les tubes. Mélanger soigneusement en renversant délicatement les tubes trois ou quatre fois.
7. Entrer le module AST dans l'instrument BACTEC MGIT en utilisant la fonction d'entrée de module AST (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument BACTEC MGIT). S'assurer que l'ordre des tubes dans le support de module AST est conforme aux définitions de support de module sélectionnées lors de l'exécution de la fonction d'entrée de module AST.
8. Strier 0,1 mL de la suspension de microorganismes sur une gélose de Trypticase de soja additionnée de 5 % de sang de mouton (TSA II) en boîte de Pétri. Enfermer dans un sac plastique. Incuber à une température comprise entre 35 et 37 °C.
9. Rechercher la présence de contamination bactérienne sur la gélose au sang au bout de 48 h. Si la gélose au sang ne présente aucune trace de développement bactérien, laissé le test AST se poursuivre. Si la gélose au sang présente un développement bactérien, jeter le module AST (se reporter au manuel d'utilisation de l'instrument BACTEC MGIT) et répéter le test avec une culture pure [99].

Chapitre II :

Analyse et

interprétation

des résultats

Chapitre II : Analyse et interprétation des résultats

II-1. Présentation des résultats

Notre étude ayant été faite sur des échantillons prélevés sur des personnes ayant la tuberculose, nous avons tenu à procéder à toutes les étapes d'un diagnostic de la tuberculose. Pour ce faire, nous avons d'abord procédé à la décontamination et fluidification des expectorations afin d'éliminer tout autre germe non mycobactérien à travers la décontamination. La fluidification quant à elle facilitera la manipulation du crachat.

Une partie du crachat décontaminé est utilisée pour la réalisation du frottis sur lame. L'observation au microscope de la lame après coloration de Ziehl-Neelsen révèle la présence des champs présentant certains amas de cellule en forme de chainettes, colorées en rouge sur fond bleu dû au bleu de méthylène, qui sont des BAAR clairement visibles.

La seconde étape consistait à faire l'extraction de l'ADN. Elle se réalise afin de permettre une éventuelle amplification par PCR qui nous conduira à la réalisation de tests moléculaires pour l'obtention du diagnostic mais aussi de la susceptibilité aux antituberculeux.

L'amplification de l'ADN par PCR nous permet, comme son nom l'indique, d'amplifier la quantité d'ADN extrait des Mycobactéries contenue dans le produit de décontamination issu d'expectorations. La PCR s'est faite en préparant mix PCR pour le test MTBDR*plus* et un autre mix pour le test MTBDR*sl*, avec pour chacun des profils de PCR différents.

Le test MTBDR*plus* nous a permis à la fois de diagnostiquer génotypiquement la tuberculose et de tester la susceptibilité de celle-ci aux antituberculeux que sont la rifampicine et l'isoniazide (Tableau 6).

Chapitre II : Analyse et interprétation des résultats

Tableaux 6 : Résultats du test MTBDR_{plus}.

ID Labo	Sexe	Age	Frottis Ziehl N.	Culture Liquide	MTBDR Plus	Résistance RMP	Résistance INH
2092	M	60	5BAAR	POS	POS	R	R
2095	M	43	2+	POS	POS	R	R
2096	M	33	1+	POS	POS	R	R
2098	M	40	2+	POS	POS	R	R
2105	M	30	2+	POS	POS	R	R
2106	M	48	1+	POS	POS	R	R
2109	F	26	2+	POS	POS	R	R
2122	M	38	3+	POS	POS	R	R
2124	F	75	2+	POS	POS	R	R
2125	F	16	1+	POS	POS	R	R
143	F	22	2+	POS	POS	R	R
202	M	37	2+	POS	POS	R	R
259	M	58	2+	POS	POS	R	R
384	M	21	4BAAR	POS	POS	R	R
403	M	39	3+	POS	POS	R	R
413	F	26	1+	POS	POS	R	R
497	F	27	1+	POS	POS	R	R
516	M	48	2BAAR	POS	POS	R	R
533	M	32	2+	POS	POS	R	R
635	M	38	3+	POS	POS	R	R
677	M	15	1+	POS	POS	R	R
774	F	17	7BAAR	POS	POS	R	R
830	M	25	3+	POS	POS	R	R
987	F	26	3BAAR	POS	POS	R	R
1795	F	45	2BAAR	POS	POS	R	R
2280	F	16	1+	POS	POS	R	R
2331	M	25	1+	POS	POS	R	R
2986	F	28	3BAAR	POS	POS	R	R
8	M	34	2+	POS	POS	R	R
14	M	19	1+	POS	POS	R	R
23	M	61	3+	POS	POS	R	R
33	F	45	3+	POS	POS	R	R

La réalisation de ce test nous a révélé un taux de 100% des échantillons positifs à la tuberculose parmi les 32 échantillons étudiés avec tous les cas présentant une double résistance à la rifampicine et à l'isoniazide (soit 100%) (Tableau 6).

Le test moléculaire MTBDR_s quand à lui nous a permis aussi de diagnostiquer la tuberculose mais cette fois ci il teste la susceptibilité aux antituberculeux éthambutol, fluoroquinolones et aminoglycosides (streptomycine) (Tableau 7).

Chapitre II : Analyse et interprétation des résultats

Tableaux 7 : Résultats du test MTBDRsl.

ID Labo	Sexe	Age	Frottis Ziehl N.	Culture Liquide	MTBDRsl	Résistance EMB	Résistance FLQ	Résistance AG/CP
2092	M	60	5BAAR	POS	POS	S	S	S
2095	M	43	2+	POS	POS	S	S	S
2096	M	33	1+	POS	POS	S	S	S
2098	M	40	2+	POS	POS	S	S	S
2105	M	30	2+	POS	POS	S	S	S
2106	M	48	1+	POS	POS	S	S	S
2109	F	26	2+	POS	POS	S	S	S
2122	M	38	3+	POS	POS	S	S	S
2124	F	75	2+	POS	POS	S	S	S
2125	F	16	1+	POS	POS	S	S	S
143	F	22	2+	POS	POS	S	S	S
202	M	37	2+	POS	POS	R	S	S
259	M	58	2+	POS	POS	S	S	S
384	M	21	4BAAR	POS	POS	S	S	S
403	M	39	3+	POS	POS	S	S	S
413	F	26	1+	POS	POS	S	S	S
497	F	27	1+	POS	POS	S	S	S
516	M	48	2BAAR	POS	POS	R	S	S
533	M	32	2+	POS	POS	S	S	S
635	M	38	3+	POS	POS	S	S	S
677	M	15	1+	POS	POS	S	S	S
774	F	17	7BAAR	POS	POS	S	S	S
830	M	25	3+	POS	POS	R	S	S
987	F	26	3BAAR	POS	POS	S	S	S
1795	F	45	2BAAR	POS	POS	S	S	S
2280	F	16	1+	POS	POS	S	S	S
2331	M	25	1+	POS	POS	S	S	S
2986	F	28	3BAAR	POS	POS	S	S	S
8	M	34	2+	POS	POS	S	S	S
14	M	19	1+	POS	POS	R	S	S
23	M	61	3+	POS	POS	S	S	S
33	F	45	3+	POS	POS	S	S	S

Parmi les 32 échantillons étudiés, tous se sont avérés être tuberculose positif. Pour ce qui est de la susceptibilité à l'éthambutol, 4 échantillons (12,5%) se sont révélés résistants alors que les 28 autres sont sensibles (soit 87,5%) (Tableau 7). Aucune souche n'a présenté une résistance aux fluoroquinolones et aux aminoglycosides, c'est-à-dire 100% des cas ayant une tuberculose sensible aux fluoroquinolones et les aminoglycosides (Tableau 7).

Chapitre II : Analyse et interprétation des résultats

L'antibiogramme SIRE est le test phénotypique qui permet de mettre en évidence la susceptibilité des mycobactéries aux antituberculeux que sont streptomycine, isoniazide, rifampicine et éthambutol (Tableau 8).

Tableaux 8 : Résultats de l'antibiogramme SIRE.

ID Labo	Sexe	Age	Frottis Ziehl N.	Culture Liquide	Résistance SM	Résistance INH	Résistance RMP	Résistance EMB
2092	M	60	5BAAR	POS	S	R	R	S
2095	M	43	2+	POS	S	R	R	S
2096	M	33	1+	POS	S	R	R	R
2098	M	40	2+	POS	S	R	R	S
2105	M	30	2+	POS	S	R	R	S
2106	M	48	1+	POS	S	R	R	R
2109	F	26	2+	POS	S	R	R	S
2122	M	38	3+	POS	S	R	R	S
2124	F	75	2+	POS	S	R	R	S
2125	F	16	1+	POS	S	R	R	S
143	F	22	2+	POS	S	R	R	S
202	M	37	2+	POS	S	R	R	R
259	M	58	2+	POS	S	R	R	S
384	M	21	4BAAR	POS	S	R	R	S
403	M	39	3+	POS	S	R	R	S
413	F	26	1+	POS	S	R	R	S
497	F	27	1+	POS	S	R	R	S
516	M	48	2BAAR	POS	S	R	R	R
533	M	32	2+	POS	S	R	R	S
635	M	38	3+	POS	S	R	R	R
677	M	15	1+	POS	S	R	R	S
774	F	17	7BAAR	POS	S	R	R	R
830	M	25	3+	POS	S	R	R	R
987	F	26	3BAAR	POS	S	R	R	S
1795	F	45	2BAAR	POS	S	R	R	S
2280	F	16	1+	POS	S	R	R	S
2331	M	25	1+	POS	S	R	R	R
2986	F	28	3BAAR	POS	S	R	R	S
8	M	34	2+	POS	S	R	R	S
14	M	19	1+	POS	S	R	R	R
23	M	61	3+	POS	S	R	R	S
33	F	45	3+	POS	S	R	R	S

Sur les 32 échantillons soumis au test SIRE, tous se sont révélés être sensible à la streptomycine (soit 100%). Ils sont aussi, tous, résistantes à l'isoniazide et à la rifampicine (100%) (Tableau 8). Pour ce qui est de l'éthambutol, 28% seulement présentent une résistance, soit un total de 9 cas, les 72% restant étant sensible (soit 23 cas) (Tableau 8).

II-2. Analyse et interprétation des résultats.

De l'analyse de nos résultats, il en ressort que les 32 échantillons étudiés nous ont donnés des frottis qui se sont avérés être positifs à l'examen microscopique par coloration de Ziehl-Neelsen au regard de la présence de BAAR révélés par le microscope.

La présence de BAAR sur les frottis confirme que les patients à l'origine des échantillons sont belle et bien atteints de tuberculose pulmonaire. Toutefois, l'absence de BAAR sur un frottis ne signifie pas nécessairement que les patients soit seins. Cela peut s'expliqué par le fait que la quantité de bacille présent dans l'expectoration qui a servi d'échantillon initiale eut été très faible. Ce qui est souvent le cas des expectorations de personnes dont la maladie dans sa forme pulmonaire, n'ait pas encore atteint sa plus grande contagiosité [44]. D'où la nécessité de faire des tests moléculaires.

Sur les 32 échantillons étudiés par les deux méthodes moléculaires, *MTBDRplus* et *MTBDRsl*, nous retrouvons 32 cas de tuberculose double résistante aux médicaments antituberculeux rifampicine et isoniazide, et parmi ces cas présentant une double résistance, 4 cas présentent une résistance à l'éthambutol. Par contre ces résultats nous montrent qu'aucun cas présentant une résistance à l'un et l'autre des antituberculeux de seconde ligne, c'est-à-dire fluoroquinolones et streptomycine, n'a été révélé par la méthode moléculaire (génomique).

La présence de ces cas de résistances signifie que tous ces patients sont porteurs de souches multirésistantes et ont par conséquent une TB-MDR. Ce qui peut être la conséquence d'un traitement non respecté.

Les tests de susceptibilité ayant été fait de manière génomique, nous avons jugé nécessaire de procéder à un test phénotypique. C'est ainsi que nous avons réalisé l'antibiogramme SIRE. Il en ressort que sur tous les échantillons testés, c'est-à-dire les 32, nous avons 100% de cas sensible à la streptomycine, 100% de cas sensible à la rifampicine et à l'isoniazide et 71,87% de cas sensibles à l'éthambutol (contre 28,13% de résistants).

Tous ces 32 échantillons ayant été soumis à aux tests Moléculaires et phénotypique, notamment par les méthodes *MTBDRplus*, *MTBDRsl* et l'antibiogramme MGIT SIRE, il en ressort que les formes de résistances les plus rencontrés sont les résistances à la rifampicine et à l'isoniazide, avec 100% des cas que ce soit pour le test moléculaires que phénotypique. Les résistances à l'éthambutol sont aussi présentes mais à une fréquence moindre, soit 12,5% dans le cas des tests génomiques et 28,13% dans le cas du test phénotypique.

Chapitre III :

Discussion

L'observation principale de cette étude est que nous avons travaillé avec des souches qui avaient au préalable été diagnostiqué comme étant des souches de *Mycobactérium tuberculosis* par une étude antérieure à la nôtre [43], ce qui a été confirmé par notre étude, notamment par les tests *MTBDRplus* et *MTBDRsl* qui ont la faculté de diagnostiquer la tuberculose mais aussi de tester la susceptibilité aux antituberculeux, qui révèle que 100% de ces échantillons sont des souches de *Mycobactérium tuberculosis*.

Dans le cadre de l'étude de la susceptibilité par le test *MTBDRplus*, aucun cas de monorésistance à la rifampicine seule ou à l'isoniazide uniquement n'a été révélé. Le résultat de 100% des souches double résistantes à la rifampicine et à l'isoniazide sur les 32 échantillons soumis au diagnostic moléculaire par ce test est observé. C'est également le cas pour les tests réalisés par la méthode phénotypique (test SIRE) où nous retrouvons les mêmes résultats, c'est-à-dire 100% des souches double résistantes, en ce qui concerne la rifampicine et l'isoniazide. Ce résultat est compréhensible car il corrobore les dires de Zhang Y. & Yew W.W., 2009 [60], qui soutiennent que la monorésistance à rifampicine est rare chez *M. tuberculosis* et que la résistance à la rifampicine sert généralement de « marqueur » pour la double résistance à la rifampicine et à l'isoniazide, c'est-à-dire pour la TB à germes multi résistants (TB-MDR).

Ainsi, les tests moléculaires et phénotypique montrent que la corésistance à la rifampicine et à l'isoniazide est la forme de TB à germes multi résistants (TB-MDR) la plus répandue. Des résultats montrant la grande incidence de (TB-MDR) à la rifampicine et à l'isoniazide ont également été obtenus lors d'études menées précédemment [100 ; 53 ; 43 ; 101 ; 97].

La présence de cette double résistance peut être expliquée par le fait que les patients auraient suivi des traitements inadéquats, comme une monothérapie directe ou indirecte, c'est-à-dire la prise d'un seul antituberculeux ou de plusieurs médicaments à des concentrations trop faibles. Cette double résistance peut être aussi due au non-respect du traitement par les patients (une adhésion médiocre des patients au traitement) [60].

Pour le cas de l'étude de la susceptibilité par le test *MTBDRsl*, nous avons 4 cas de résistance à l'éthambutol soit 12,5%, les 28 cas restants (87,5%) étant tous sensibles. Par contre, le test SIRE nous révèle un tout autre résultat avec 9 cas de résistance (28,13%) contre 23 cas sensible (71,87%). Cette différence peut être expliquée par le fait que le test moléculaire *MTBDRsl* ne révèle la résistance à l'éthambutol que si celle-ci est causée par la mutation du gène *embB*, ce qui fait que ce test présente des limites quand on sait que d'autres gènes ou

mécanismes peuvent être impliqués dans la résistance à l'éthambutol. Car comme le souligne Zhang Y. & Yew W.W., 2009 [60], 35% des souches résistantes à l'éthambutol ne comportent pas de mutations embB. Ce qui suggère que d'autres mécanismes de résistance à l'éthambutol pourraient exister. D'ailleurs, la mutation du gène embC a été identifiée comme étant occasionnellement responsable de la résistance à l'éthambutol.

La présence de ces souches mutantes de *Mycobacterium tuberculosis*, résistantes à l'éthambutol au sein de cette population d'étude serait dues au fait que ces patients n'ont pas suivi un traitement adéquat ou alors qu'ils auraient interrompu le traitement à un moment ou à un autre avant d'être guéri. Il faut noter que l'éthambutol est, tout comme la rifampicine et à l'isoniazide, un antibiotique de première ligne et qui est le plus souvent administré au patients pour un traitement de première intention.

Toutes les souches étudiées par le test MTBDRsl ne présentent pas de résistance aux aminoglycosides. Ce même résultat nous est révélé par le test SIRE qui nous donne 100% des souches sensibles à la streptomycine. C'est aussi le cas des fluoroquinolones pour qui le test MTBDRsl a révélé 100% de souches sensibles. En effet, les 32 souches sont toutes sensibles aux antituberculeux de deuxième ligne. Ces résultats nous semblent compréhensibles, car la présence des résistances pour ces antituberculeux aurait été incohérente quand on sait que la multirésistance spontanée est extrêmement rare et que ces patients n'ont pas reçu un traitement à base d'antituberculeux de deuxième ligne.

Ainsi, ces patients, n'ayant reçu qu'un traitement à base d'antibiotique de première ligne, l'absence de résistance aux antituberculeux de deuxième ligne paraît normale.

Conclusion et **perspectives**

Conclusion et perspectives

La tuberculose est une des maladies les plus meurtrières de la planète avec un taux de mortalité de 3 millions chaque année. Causé par *Mycobacterium tuberculosis* qui est un agent pathogène redoutable, responsable de ce taux de morbidité et de mortalité élevés. Ses caractères bactériologiques et de résistance font que son élimination nécessite des traitements longs. La tuberculose est une maladie dont on peut en guérir si un traitement adéquat est administré. Mais la présence de souches multirésistantes rend ce traitement difficile et inefficace. De ce fait, il est primordial de se pencher véritablement sur la question vu le nombre d'individus atteints de tuberculose multirésistante. C'est pour cette raison que notre étude qui consiste à réaliser des tests de susceptibilité aux antituberculeux prend toute son importance. Ainsi, au cours de cette étude, nous avons évalué la performance de quelques tests, notamment MTBDRplus, MTBDRsl et SIRE. Il en ressort que ces tests nous permettent d'établir un diagnostic rapide de la susceptibilité de souches de *Mycobacterium tuberculosis* face aux antituberculeux.

Les tests MTBDRplus et MTBDRsl qui sont des tests moléculaires sont basés sur une détection de quelques gènes mutés responsables de la résistance après amplification par PCR alors que le test SIRE qui lui est phénotypique se base sur la comparaison de la croissance bactérienne sur milieu de culture liquide contenant les antibiotiques à tester, par inoculation d'une suspension bactérienne avec la croissance bactérienne sur milieu de culture sans antibiotique (témoin).

Cette étude nous a permis de constater que la double résistance à l'isoniazide (INH) et à la rifampicine (RIF) est très élevée et est la plus répandue au Gabon, et quelques rares cas présentent, en plus d'être double résistants à l'isoniazide et à la rifampicine, une résistance à l'éthambutol.

Ces multirésistances observées proviendraient d'une sélection de souches résistantes causées par un traitement inadéquat, car il faut le souligner, la présence de souches mutantes naturellement résistantes est très faible, ce qui rend quasi impossible la présence de souches multirésistantes par le seul biais de la nature.

Cette étude nous a permis de constater les limites des deux tests moléculaires utilisés (tests MTBDRplus et MTBDRsl). Cette limite est due au fait que ces tests ne ciblent que quelques gènes seulement. Le test MTBDRplus ne s'intéresse qu'aux gènes *katG* et *inhA* pour la révélation de la résistance à l'isoniazide et *rpoB* pour la révélation de la résistance à la rifampicine, alors que d'autres gènes et mécanismes de résistance à ces médicaments

Conclusion et perspectives

existent. De même, le test MTBDR_s ne cible que les gènes *gyrA* pour la détection de la résistance aux fluoroquinolones, *rrs* pour détecter la résistance à la streptomycine qui est un aminoglycoside et *embB* qui sert à mettre en évidence la résistance à l'éthambutol, alors que ce ne sont pas les mutations de ces gènes seulement qui peuvent être à l'origine des résistances à ces médicaments.

De ce fait, des études ultérieures s'imposent pour identifier ces nouveaux mécanismes potentiels de résistances à l'égard de ces antituberculeux.

La mise en place d'un diagnostic moléculaire prenant en compte le maximum de gènes impliqués dans la résistance aux médicaments antituberculeux s'impose pour minimiser les risques de diagnostiquer des faux sensibles.

Aussi, pour la réalisation d'un meilleur diagnostic, l'utilisation combinée des tests moléculaires et phénotypiques nous paraît être judicieuse afin de minimiser les risques d'établir un faux diagnostic.

Malheureusement, tout cela nécessite d'importantes ressources financières pour doter les laboratoires de recherche et de diagnostic d'équipements adéquats.

Ainsi, pour faire face au défi mondial de la TB-MDR et de la TB-XDR, une injection massive de ressources financières et une extension majeure des ressources humaines s'imposent pour la prévention et la prise en charge des scénarios redoutables de la résistance à l'égard des antituberculeux. Parmi les priorités qui permettent d'y faire face, la détection rapide de la résistance aux médicaments antituberculeux, l'utilisation de régimes appropriés pour le traitement et le développement de nouveaux médicaments sont d'une importance capitale.

Références

Bibliographique

Références bibliographique

- 1- **Dye C., 2006.** Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet*. 367: 938–940.
- 2- **World Health Organization (WHO), 2010.** Global Tuberculosis Control : WHO report 2010 [en ligne]. Genève : World Health Organization. 204 p. [Consulté en juillet 2016]. <http://www.who.int/tb/country/en/index.html>
- 3- **World Health Organization (WHO), 2009.** Global Tuberculosis Control –epidemiology, strategy, financing [en ligne]. Genève : World Health Organization. 303 p. [Consulté en juillet 2016]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/
- 4- **World Health Organization, 2003.** Le traitement de la tuberculose : principes à l’information des programmes nationaux [en ligne]. Genève : World Health Organization. 110 pages. [Consulté en juillet 2016]. <http://www.who.int/tb/publications/tbtreatmentguidelines/en/index.html>
- 5- **Programme National de Lutte Contre la Tuberculose (PNLT), 2013.** Libreville.
- 6- **Deschaseaux C., 2005.** Epidémiologie moléculaire de la tuberculose : Etude des souches de *Mycobacterium tuberculosis* par la technique IS611 O-RFLP. UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1. 120 pages.
- 7- **Millet J., 2011.** Evaluation de marqueurs génétiques du complexe *Mycobacterium tuberculosis* combinée à l’utilisation d’outils bio-informatiques : apport en épidémiologie et phylogénie de la tuberculose. Université des Antilles et de la Guyane, GUYANE. 171 pages.
- 8- **Ait-Khaled N., Enarson D., 1999.** Tuberculose : Manuel pour les Etudiants en Médecine. WHO/CDS/TB/99.272, GENEVE. 192 pages.
- 9- **Nouvel L.X.M., 2005.** Recherche de marqueurs génétiques de souches de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes aux antibiotiques en République Centrafricaine. Université Paul Sabatier de Toulouse, TOULOUSE. 106 pages.
- 10- **Wayne L.G., Kubika G.P., 1986.** The mycobacteria, p. 1435-1457. In SNEATH P. H. A., MAIR N. S., SHARPE M. E., et HOLT J. G. (Ed.), *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, BALTIMORE.
- 11- **Noll H., Bloch H., Asselieno J., Lederer E., 1956.** The chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim Biophys Acta* 20:299-309.
- 12- **Bishop P.J., Neumann G., 1970.** The history of the Ziel-Neelsen stain. *Tubercle* 51:196-206.
- 13- **David H., Levy-Frebault V., Thorel M.F., 1989.** Méthodes de laboratoire pour mycobactériologie clinique. Institut Pasteur. PARIS. Pages.
- 14- **Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C., 1994.** Manuel de Bactériologie Clinique, 2ème édition. Paris : Elsevier Option Bio, 1994.-3, 1756 pages.
- 15- **Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T.G., 2004.** Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, second edition. Release 5.0. New-York : Springer-Verlag. 399 pages.

Références bibliographique

- 16- Tortoli E., 2006.** The new Mycobacteria : an update. FEMS Immunol Med Microbiol 48:159-178.
- 17- Le Minor L., Veron M., 1990.** Bactériologie médicale. Flammarion. Paris. 1107 pages.
- 18- Ayele W.Y., Neill S.D., Zinsstag J., Weiss M.G., Pavlik I., 2004.** Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int J Tuberc Lung Dis 8:924-937.
- 19- De La Rua-Domenech R., 2006.** Human Mycobacterium bovis infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 86:77-109.
- 20- O'reilly L.M., Daborn C.J., 1995.** The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man : a review. Tuber Lung Dis. 76 Suppl 1:1-46.
- 21- Bonard D., Msellati P., Rigouts L., Combe P., Coulibaly D., Coulibaly I.M., Portaels F., 2000.** What is the meaning of repeated isolation of Mycobacterium africanum? Int J Tuberc Lung Dis. 4:1176-1180.
- 22- De Jong B.C., Adetifa I., Walther B., Hill P.C., Antonio M., Ota M., Adegbola R.A., 2010.** Differences between tuberculosis cases infected with Mycobacterium africanum, West African type 2, relative to Euro-American Mycobacterium tuberculosis : an update. FEMS Immunol Med Microbiol. 58:102-105.
- 23- De Jong B.C., Antonio M., Awine T., Ogungbemi K., De Jong Y.P., Gagneux S., De Riemer K., Zozio T., Rastogi N., Borgdorff M., Hill P. C., Adegbola R.A., 2009.** Use of spoligotyping and large sequence polymorphisms to study the population structure of the Mycobacterium tuberculosis complex in a cohort study of consecutive smear-positive tuberculosis cases in The Gambia. J Clin Microbiol. 47:994-1001.
- 24- De Jong B.C., Antonio M., Gagneux S., 2010.** Mycobacterium africanum—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. PLoS Negl Trop Dis. 4:744.
- 25- De Jong B.C., Hill P.C., Brookes R.H., Otu J.K., Peterson K.L., Small P.M., Adegbola R.A., 2005.** Mycobacterium africanum: a new opportunistic pathogen in HIV infection? AIDS. 19:1714-1715.
- 26- Haas W.H., Bretzel G., Amthor B., Schilke K., Krommes G., Rusch-Gerdes S., Sticht Groh V., Bremer H.J., 1997.** Comparison of DNA fingerprint patterns of isolates of Mycobacterium africanum from east and west Africa. J Clin Microbiol. 35:663-666.
- 27- Meyer C.G., Scarisbrick G., Niemann S., Browne E.N., Chinbuah M.A., Gyapong J., Osei I., Owusu-Dabo E., Kubica T., Rusch-Gerdes S., Thye T., Horstmann R.D., 2008.** Pulmonary tuberculosis : virulence of Mycobacterium africanum and relevance in HIV co infection. Tuberculosis. 88: 482-489.
- 28- Frota C.C., Hunt D.M., Buxton R.S., Rickman L., Hinds J., Kremer K., Van Sollingen D., Colston M.J., 2004.** Genome structure in the vole bacillus, Mycobacterium microti, a member of the Mycobacterium tuberculosis complex with a low virulence for humans Microbiology. 150, 5, 1519-1527.

Références bibliographique

- 29- Aranaz A., Liebana E., Gomez-Mampaso E., Galan J.C., Cousins D., Ortega A., Blazquez J., Baquero F., Mateos A., Suarez G., Dominguez L., 1999.** Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the Mycobacterium tuberculosis complex isolated from goats in Spain. *Int J Syst Bacteriol.* 49:1263-1273.
- 30- Daniel T.M., 2005.** Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 9:1181-1182.
- 31- Daniel T.M., 2006.** The history of tuberculosis. *Respir Med.* 100:1862-1870.
- 32- Mathers C.D., Loncar D., 2006.** Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3(11), e442.
- 33- Schaible U. E., Kaufmann S.H., 2007.** Malnutrition and infection : complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med* 4(5), e115.
- 34- Moret Y., Schmind-Heempl P., 2001.** Immune defence in bumble-bee offspring. *Nature* 414(6863), 506.
- 35- Gordon S., Rylance J., 2009.** Where there's smoke... there's tuberculosis. *Thorax* 64(8), 649-50.
- 36- Lin H.H., Ezzati M., Murray M., 2007.** Tobacco smoke, indoor air pollution and tuberculosis : a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 4(1), e20.
- 37- Kolappan C., Subramani R., 2009.** Association between biomass fuel and pulmonary tuberculosis : a nested case-control study. *Thorax* 64(8), 705-8.
- 38- Adams L.B., Mason C.M., Kolls J.K., Scollard D., Krahenbuhl J.L., Nelson, S., 1995.** Exacerbation of acute and chronic murine tuberculosis by administration of a tumor necrosis factor receptor-expressing adenovirus. *J Infect Dis* 171(2), 400-5.
- 39- Marais B.J., Gie R.P., Schaaf H.S., Beyers N., Donald P.R., Starke, J.R., 2006.** Childhood pulmonary tuberculosis : old wisdom and new challenges. *Am J Respir Crit Care Med* 173(10), 1078-90.
- 40- Marais B.J., Gie R.P., Schaaf H.S., Hesselning A.C., Obihara C.C., Nelson L.J., Enarson D.A., Donald P.R., Beyers N., 2004.** The clinical epidemiology of childhood pulmonary tuberculosis : a critical review of literature from the prechemotherapy era. *Int J Tuberc Lung Dis* 8(3), 278-85.
- 41- Nelson L.J., Wells C.D., 2004.** Global epidemiology of childhood tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 8(5), 636-47.
- 42- Neyrolles O., Quintana-Murci L., 2009.** The Many Faces of Sexual Inequality in Tuberculosis. In Press.
- 43- Nguema Ondo G. W., 2014.** Evaluation d'un test de diagnostic rapide de la tuberculose. Université des sciences et techniques de Masuku. FRANCEVILLE. 82 pages.
- 44- Saltini C., 2006.** Chemotherapy and diagnosis of tuberculosis. *Respir Med* 100:2085-2097.

Références bibliographique

- 45- Richter E., Weizenegger M., Rusch-Gerdes S., Niemann S., 2003.** Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates, *J. Clin. Microbiol.* 41,6,2672-2675.
- 46- Richter E., Weizenegger M., Fahr A.M., Rusch-Gerdes S., 2004.** Usefulness of the Genotype MTBC assay for differentiating species of the Mycobacterium tuberculosis complex in cultures obtained from clinical specimens. *1. Clin. Microbiol.* 42,9,4303-4306.
- 47- Sreevatsan S., Pan X., Zhang Y., Deretic V., Musser J.M., 1997.** Analysis of the oxyR-ahpC region in isoniazid-resistant and -susceptible Mycobacterium tuberculosis complex organisms recovered from diseased humans and animals in diverse localities. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:600-606.
- 48- Zhang Y., Heym B., Allen B., Young D., Cole S., 1992.** The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. *Nature.* 358:591-593.
- 49- Carbonnelle R, Dailloux M., Lebrun L., Maugein J., Pernot C., 2003.** Mycobactéries. Mycobactérioses. Cahier de formation Bioforma. Paris. 159 pages.
- 50- Mouton Y., Deboscker Y., Dubreuil L., Thabaut A., 1997.** Antibiotiques, antiviraux, anti-infectieux. John Libbey Eurotext. Paris. 261 pages.
- 51- Almeida da Silva P., Ainsa J.A., 2007.** Drugs and Drug Interactions. In J.C. Palomino (éd.), S.C. Leao (éd.), and V. Ritacco (éd.). Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. [Disponible sur : www.TuberculosisTextbook.com].
- 52- Lobue P., Menzies D., 2010.** Treatment of latent tuberculosis infection : An update. *Respirology.* 15:603-622.
- 53- Caminero J.A., Sotgiu G., Zumla A., Migliori G.B., 2010.** Best drug treatment for multidrug resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 10:621-629.
- 54- Zhang Y., Post-Martens K., Denkin S., 2006.** New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug Discov Today.* 11:21-27.
- 55- Miesel L., Weisbrod T.R., Marcinkeviciene J.A., et Coll, 1988.** NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in Mycobacterium smegmatis, *J. Bacterial.* 180 : 2459-2467.
- 56- Musser J.M., 1995.** Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights, *Clin. Microbiol. Rev.* 8 (4) 496-514.
- 57- Canetti G., Froman S., Grosset J., Hauduroy P., Langerova M., Mahler H.T, Meissner G., Mitchison D.A., Sula L., 1963.** Mycobacteria : laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Health Organ.* 29: 565–578.
- 58- Van Deun A., Martin A., Palomino J.C., 2010.** Diagnosis of drug-resistant tuberculosis : reliability and rapidity of detection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 14:131-140.
- 59- World Health Organization (WHO), 2009.** Guidelines for surveillance of drug-resistance in tuberculosis – Fourth Edition [en ligne]. Genève : World Health Organization. 83 pages. [Consulté en juillet 2016]. http://www.who.int/tb/publications/mdr_surveillance/en/.

Références bibliographique

- 60- Zhang Y., Yew W.W., 2009.** Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 13:1320-1330.
- 61- Slayden R.A., Barry 3rd. C.E., 2000.** The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect.* 2:659-669.
- 62- Vilcheze C., Jacobs Jr. W.R., 2007.** The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol.* 61:35-50.
- 63- Marttila H.J., Soini H., Eerola E., Vyshnevskaya E., Vyshnevskiy B.I., Otten T.F., Vasilyef A.V., Viljanen M.K., 1998.** A Ser315Thr substitution in KatG is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2443-2445.
- 64- Marttila H.J., Soini H., Huovinen P., Viljanen M.K., 1996.** katG mutations in isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates recovered from Finnish patients. *Antimicrob. Agents Chemother* 40:2187-2189.
- 65- Mokrousov I., Narvskaya O., Otten T., Limeschenko E., Steklova L., Vyshnevskiy B., 2002.** High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:1417-1424.
- 66- Musser J.M., Kapur V., Williams D.L., Kreiswirth B.N., Van Soolingen D., Van Embden J.D., 1996.** Characterization of the catalase-peroxidase gene (katG) and inhA locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of Mycobacterium tuberculosis by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis.* 173:196-202.
- 67- Zhang Y., Telenti A., 2000.** Genetics of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. In G.F. Hatfull (éd.), W.R. Jacobs, Jr. (éd.). *Molecular genetics of mycobacteria.* Washington, D.C. : ASM Press. p. 235-253.
- 68- Telenti A., Imboden P., Marchesi F., Lowrie D., Cole S., Colston M.J., Matter L., Schopfer K., Bodmer T., 1993.** Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. *Lancet.* 341:647-650.
- 69- Takayama K., Kilburn J.O., 1989.** Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in Mycobacterium smegmatis. *Antimicrob Agents Chemother.* 33 :1493-1499.
- 70- Sreevatsan S., Stockbauer K.E., Pan X., Kreiswirth B.N., Moghazeh S.L., Jacobs W.R. Jr., Telenti A., Musser J.M., 1997.** Ethambutol resistance in Mycobacterium tuberculosis : critical role of embB mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:1677-1681.
- 71- Telenti A., Philipp W.J., Sreevatsan S., Bernasconi C., Stockbauer K.E., Wiele B., Musser J.M., Jacobs W.R. Jr., 1997.** The emb operon, a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol. *Nat Med.* 3:567-570.
- 72- Alcaide F., Pfyffer G.E., Telenti A., 1997.** Role of embB in natural and acquired resistance to ethambutol in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:2270-2273.

Références bibliographique

- 73- Konno K., Feldmann F.M., McDermott W., 1967.** Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am Rev Respir Dis.* 95:461-469.
- 74- Davies A.P., Billington O.J., McHugh T.D., Mitchison D.A., Gillespie S.H., 2000.** Comparison of phenotypic and genotypic methods for pyrazinamide susceptibility testing with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 38:3686-3688.
- 75- Wade M.M., Volokhov D., Peredelchuk M., Chizhikov V., Zhang Y., 2004.** Accurate mapping of mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a scanning-frame oligonucleotide microarray. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 49:89-97.
- 76- Zhang Y., Mitchison D., 2003.** The curious characteristics of pyrazinamide : a review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 7:6-21.
- 77- Sreevatsan S., Pan X., Zhang Y., Kreiswirth B.N., Musser J.M., 1997.** Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:636-640.
- 78- Louw G.E., Warren R.M., Donald P.R., Murray M.B., Bosman M., Van Helden P.D., Young D.B., Victor T.C., 2006.** Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis.* 10:802-807.
- 79- Portugal I., Barreiro L., Moniz-Pereira J., Brum L., 2004.** *pncA* mutations in pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:2736-2738.
- 80- Scorpio A., Lindholm-Levy P., Heifets L., Gilman R., Siddiqi S., Cynamon M., Zhang Y., 1997.** Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41:540-543.
- 81- Finken M., Kirschner P., Meier A., Wrede A., Böttger E.C., 1993.** Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol.* 9:1239-1246.
- 82- Honoré N., Cole S.T., 1994.** Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:238-242.
- 83- Nair J., Rouse D.A., Bai G.H., Morris S.L., 1993.** The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 10:521-527.
- 84- Maus C.E., Plikaytis B.B., Shinnick T.M., 2005.** Mutation of *tlyA* confers capreomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:571-577.
- 85- Alangaden G.J., Manavathu E.K., Vakulenko S.B., Zvonok N.M., Lerner S.A., 1995.** Characterization of fluoroquinolone-resistant mutant strains of *Mycobacterium tuberculosis* selected in the laboratory and isolated from patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 39:1700-1703.

Références bibliographique

- 86- Cheng A.F., Yew W.W., Chan E.W., Chin M.L., Hui M.M., Chan R.C., 2004.** Multiplex PCR amplimer conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:596-601.
- 87- Perdigao J., Macedo R., Malaquias A., Ferreira A., Brum L., Portugal I., 2009.** Genetic analysis of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Lisbon, Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 65:224-227.
- 88- Ramaswamy S., Musser J.M., 1998.** Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : 1998 update. *Tuber Lung Dis.* 79:3-29.
- 89- Sun Z., Zhang J., Zhang X., Wang S., Zhang Y., Li C., 2008.** Comparison of *gyrA* gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents.* 31:115-121.
- 90- Takiff H.E., Salazar L., Guerrero C., Philipp W., Huang W.M., Kreiswirth B., Cole S.T., Jacobs W.R. Jr., Telenti A., 1994.** Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 38:773-780.
- 91- Banerjee A., Dubnau E., Quemard A., Balasubramanian V., Um K.S., Wilson T., Collins D., De Lisle G., Jacobs W.R. Jr., 1994.** *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 263:227-230.
- 92- Basso L.A., Zheng R., Musser J.M., Jacobs Jr. W.R., Blanchard J.S., 1998.** Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. *J Infect Dis.* 178:769-775.
- 93- Baulard A.R., Betts J.C., Engohang-Ndong J., Quan S., McAdam R.A., Brennan P.J., Locht C., Besra G.S., 2000.** Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J Biol Chem.* 275:28326-28331.
- 94- De Barber A.E., Mdluli K., Bosman M., Bekker L.G., Barry C.E. 3rd., 2000.** Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:9677-9682.
- 95- Morlock G.P., Metchock B., Sikes D., Crawford J.T., Cooksey R.C., 2003.** *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:3799-3805.
- 96- Bifani P.J., Mathema B., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N., 2002.** Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. *Trends Microbiol.* 10:45-52.
- 97- Ghebremichael S., Petersson R., Koivula T., Pennhag A., Romanus V., Berggren I., Petrini B., Hoffner S., Källenius G., 2008.** Molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis in Sweden. *Microbes Infect.* 10:699-705.
- 98- Bivigou Mboumba B., Onanga R., 2012.** *Mycobacterium tuberculosis* Approved protocol. Centre International de Recherches Médicales de Franceville. Franceville. 63 pages.

Références bibliographique

- 99- Becton, Dickinson and Company (BD), 2015.** Trousse BACTEC MGIT 960 SIRE Pour le test de sensibilité de Mycobacterium tuberculosis aux antimycobactériens. Becton, Dickinson and Company. Sparks. 91 Pages.
- 100- Cambau E., Lemaître N., 1998.** Mecanismes de résistance aux antituberculeux chez Mycobacterium tuberculosis, in: Pons G., Gendrel D. Grosset J., Les médicaments de la tuberculose chez l'enfant, Springer Verlag, pp. 85-97.
- 101- Pablo-Mendez A., Raviglione MC., Laszlo A., 1998.** Global surveillance for antituberculosis drug resistance, 1994-1997, N. Engl. J. Med. 338 (23) 1641-1649.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Hotte pour la manipulation des échantillons à risques infectieux



Annexes

Annexe 2 : Centrifugeuse pour la décontamination et fluidification



Annexe 3 : Centrifugeuse et bain-marie sec pour l'extraction d'ADN



Annexes

Annexe 4 : Thermocycleur (T100 Thermal cycler)



Annexe 5 : Bain-marie agitateur (TwinCubator)




Annexes

Annexe 6 : BACTEC MGIT 960



Annexes

Annexe 7 : Exemple de la fiche de résultats du test MTBDRplus



GenoType MTBDRplus 96

VER 2.0
8304A-0311-03-1

01 08 2016
 dd mm yyyy

#					TUB	rpoB-WT	rpoB-MUT	katG-WT	katG-MUT	inhA-WT	inhA-MUT	RMP	INH
												sensitive	resistant
												sensitive	resistant


#	Date	Sample ID	Result	TUB	rpoB-WT	rpoB-MUT	katG-WT	katG-MUT	inhA-WT	inhA-MUT	RMP	INH
1	01/08/16	50										
3	01/08/16	51										
4	01/08/16	52										
5	01/08/16	53										
6	01/08/16	54										
7	01/08/16	55										
8	01/08/16	56										
9	01/08/16	57										
10	01/08/16	58										
11	01/08/16	59										
12	01/08/16	60										
13	01/08/16	61										
14	01/08/16	62										
15	01/08/16	63										
16	01/08/16	64										
17	01/08/16	65										
18	01/08/16	66										
19	01/08/16	67										
20	01/08/16	68										
21	01/08/16	178										
/	/	/										

LOT _____

HYB 30 min STR 15 min SUB 5 min

Annexes


Annexe 8 : Exemple de la fiche de résultats du test MTBDRsl

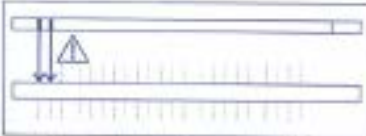


enoType MTBDRsl 96


IR 1.0
157-0209-03-1

20/07/2016
dd mm yyyy







TUB	gpa-WT	rfs-WT	emb-WT	emb-MUT	FLD	AD/CP	ENG
					sensitive		
					resistant		
					sensitive		
					resistant		
					sensitive		
					resistant		



DT	HYB	min	STR	min	SUB	min
19-7-16	533					
19-7-16	830					
19-7-16	2125					
19-7-16	774					
19-7-16	2092					
19-7-16	2095					
19-7-16	2096					
19-7-16	23					
19-7-16	2105					
19-7-16	497					
19-7-16	403					
19-7-16	2124					
20-7-16	2106					
20-7-16	2098					
20-7-16	384					
20-7-16	2109					
20-7-16	506					
20-7-16	094					
20-7-16	033					
20-7-16	203					
20-7-16	2122					
20-7-16	147					
20-7-16	259					
20-7-16	H ₂ O					





Annexes

Annexe 9 : Exemple de la fiche de résultats du test SIRE

BACTEC MGIT 960 Instrument Inventory Report							
Instrument Number	Current Date/Time	Temperature			Software Version	Page Number	Drawer
		A	B	C			
1	07/25/16 08:29	36.7°C	37.0°C	36.7°C	V6.01B	1	B

Tube Position	Accession Number	Sequence Number	Growth Unit	Tube Status	TIP/TTD	Protocol Length	Start of Protocol	
B/A02		430128107887	503	+	4;19	42	07/18/16	10:12
B/A03		430128107783	511	+	5;5	42	07/18/16	10:12
B/A04		430128107805	817	+	4;16	42	07/18/16	10:12
B/A05		430128107813	6784	+	4;2	42	07/18/16	10:12
B/A06		430128107911	494	+	4;21	42	07/18/16	10:12
B/A07		430128107902	156	+	6;9	42	07/18/16	10:12
B/A08		430128107903	30	=	6;22	42	07/18/16	10:12
B/A09		430128107798	214	+	6;2	42	07/18/16	10:12
B/A10		430128107910	0	=	6;22	42	07/18/16	10:12
B/A11		430128107918	0	=	6;23	42	07/18/16	10:12
B/A12		430128107926	0	=	6;22	42	07/18/16	10:12
B/A13		430128107919	0	=	6;22	42	07/18/16	10:12
B/A14		430128107895	0	=	6;22	42	07/18/16	10:12
B/A15		430128107760	340	+	5;23	42	07/18/16	10:12
B/A16		430128107896	0	=	6;22	42	07/18/16	10:12
B/A17		430128107888	896	+	6;20	42	07/18/16	10:12
B/A18		430128107744	0	=	6;22	42	07/18/16	10:12
B/A19		430128107752	0	=	6;22	42	07/18/16	10:12
B/B01		430128107767	5	=	6;22	42	07/18/16	10:14
B/B02		430128107768	964	+	5;4	42	07/18/16	10:14
B/B03		430128107872	0	=	6;22	42	07/18/16	10:14
B/B04		430128107790	158	+	6;10	42	07/18/16	10:14
B/B05		430128107789	5132	+	4;13	42	07/18/16	10:14
B/B06		430128107775	0	=	6;22	42	07/18/16	10:14
B/B07		430128107927	370	+	5;20	42	07/18/16	10:14

Annexes

Annexe 10 : Tableau récapitulatif des résultats de l'étude

ID Labo	Sexe	Age	Date Prélèv Labo	Centre	Motif Exam	Forme TB	Frottis Ziel N.	Culture Liquide	Résistance SM	Résistance INH	Résistance RMP	Résistance EMB	Culture Solide	MTBDR Plus	Résistance RMP	Résistance INH	MTBDRsl	Résistance EMB	Résistance FLQ	Résistance AG/CP
2092	M	60	19/04/2016	SOS Med	D	Pulmonaire	5BAAR	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
2095	M	43	04/05/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	2+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
2096	M	33	10/05/2016	CDT/NK	C2	Pulmonaire	1+	POS	S	R	R	R	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
2098	M	40	12/05/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	2+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
2105	M	30	31/05/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	2+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
2106	M	48	01/06/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	1+	POS	S	R	R	R	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
2109	F	26	07/06/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	2+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
2122	M	38	08/06/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	3+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
2124	F	75	14/06/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	2+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
2125	F	16	21/06/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	1+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
143	F	22	27/06/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	2+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
202	M	37	30/06/2016	CDT/Ste Ma	D	Pulmonaire	2+	POS	S	R	R	R	RAS	POS	R	R	POS	R	S	S
259	M	58	05/07/2016	CDT/NK	C6	Pulmonaire	2+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
384	M	21	06/07/2016	CDT/NK	C6	Pulmonaire	4BAAR	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
403	M	39	06/07/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	3+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
413	F	26	06/07/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	1+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
497	F	27	07/07/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	1+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
516	M	48	11/07/2016	CDT/NK	C8	Pulmonaire	2BAAR	POS	S	R	R	R	RAS	POS	R	R	POS	R	S	S
533	M	32	12/07/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	2+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
635	M	38	14/07/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	3+	POS	S	R	R	R	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
677	M	15	18/07/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	1+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
774	F	17	18/07/2016	CDT/NK	C8	Pulmonaire	7BAAR	POS	S	R	R	R	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
830	M	25	18/07/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	3+	POS	S	R	R	R	RAS	POS	R	R	POS	R	S	S
987	F	26	21/07/2016	CDT/NK	C2	Pulmonaire	3BAAR	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
1795	F	45	27/07/2016	CDT/NK	C3	Pulmonaire	2BAAR	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
2280	F	16	03/08/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	1+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
2331	M	25	08/08/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	1+	POS	S	R	R	R	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
2986	F	28	11/08/2016	CDT/NK	D	Pulmonaire	3BAAR	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
8	M	34	22/08/2016	CDT/Ste Ma	D	Pulmonaire	2+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
14	M	19	22/08/2016	CDT/Ste Ma	D	Pulmonaire	1+	POS	S	R	R	R	RAS	POS	R	R	POS	R	S	S
23	M	61	22/08/2016	CDT/Ste Ma	D	Pulmonaire	3+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S
33	F	45	22/08/2016	CDT/Ste Ma	D	Pulmonaire	3+	POS	S	R	R	S	RAS	POS	R	R	POS	S	S	S

Résumé

La tuberculose, est l'une des maladies infectieuses ayant le plus fort taux de contagiosité au monde. Elle est causée par les bactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* qui attaque majoritairement les poumons, mais qui peut aussi attaquer d'autres organes chez l'homme ou certains animaux. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 2 milliards d'humains seraient infectés par *Mycobacterium tuberculosis*, dont, chaque année, environ 9 millions d'humains sont malades de la tuberculose, avec 3 millions de morts. Les chiffres sont plus alarmants en Afrique où le taux est de 1500 morts par jour en moyenne. Cette augmentation est en majorité due à la co-infection au VIH, qui est le facteur principal limitant l'éradication de cette maladie en Afrique. Un autre des facteurs limitants l'éradication de la tuberculose est la présence de souches multirésistantes aux médicaments antituberculeux. C'est pourquoi notre étude qui consiste à réaliser des tests de susceptibilité aux antituberculeux au Gabon est très important. Au cours de cette étude, nous avons évalué la performance de quelques tests, notamment MTBDRplus, MTBDRsl et SIRE. Il en ressort que ces tests nous permettent d'établir un diagnostic rapide de la susceptibilité des souches de *Mycobacterium tuberculosis* face à certains médicaments antituberculeux.

Mots clés : Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, Multirésistance, Antituberculeux, Tests de susceptibilité, MTBDRplus, MTBDRsl, SIRE.

Summary

Tuberculosis is one of the most infectious diseases with the highest rate of contagiousness in the world. It is caused by bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, which predominantly attacks the lungs, but can also attack other organs in humans or certain animals. The World Health Organization (WHO) estimates that 2 billion people are infected with *Mycobacterium tuberculosis*, with about 9 million people each year sick with tuberculosis, with 3 million deaths. The figures are more alarming in Africa where the rate is 1,500 deaths per day on average. This increase is mainly due to co-infection with HIV, which is the main factor limiting the eradication of this disease in Africa. Another factor limiting the eradication of tuberculosis is the presence of multidrug-resistant strains of anti-tuberculosis drugs. This is why our study, which consists in carrying out tests of susceptibility to anti-tuberculosis drugs in Gabon, is very important. In this study, we evaluated the performance of some tests, including MTBDRplus, MTBDRsl and SIRE. It emerges that these tests allow us to establish a rapid diagnosis of the susceptibility of strains of *Mycobacterium tuberculosis* to certain antituberculous drugs.

Key words : Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Multiresistance, Antituberculosis, Tests of susceptibility, MTBDRplus, MTBDRsl, SIRE.

ملخص

مرض السل هو أحد الأمراض المعدية التي تشهد أعلى معدلات العدوى في العالم. وهو ناتج عن بكتيريا من مجمع المتفطرة السلية الذي يهاجم بشكل أن 2 مليار نسمة مصابون المتفطرة السلية، (WHO) رئيسي الرئتين ولكن يمكن أيضا مهاجمة الأجهزة الأخرى في البشر وبعض الحيوانات. وتقدر منظمة الصحة العالمية والتي، في كل عام، حوالي 9 مليون من مرضى السل البشري، مع 3 ملايين حالة وفاة. وأكثر بالذعر الأرقام في أفريقيا حيث معدل 1500 حالة وفاة يوميا في المتوسط. ومن المقرر أساسا إلى التعاون العدوى بفيروس نقص المناعة البشرية، الذي هو العامل الرئيسي الذي يجد من القضاء على هذا المرض في أفريقيا هذه الزيادة. الحد من القضاء على المخدرات في الغابون مهم جدا. في هذه TB المخدرات. هذا هو السبب في دراستنا هي إجراء اختبار الحساسية TB آخر عوامل السل هو وجود مقاومة للأدوية المتعددة فإنه يدل على أن هذه الاختبارات تسمح لنا لإجراء التشخيص. SIRE و MTBDRsl، MTBDRplus الدراسة، قمنا بتقييم أداء العديد من الاختبارات بما في ذلك TB السريع لحساسية سلالات السل المتفطرة أمام بعض الأدوية.

SIRE، MTBDRsl، MTBDRplus، أدوية السل، اختبار الحساسية، MDR-TB الكليات الرئيسية: السل، المتفطرة السلية.