

SOMMAIRE

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : RAPPELS.....	1
I. HISTORIQUE	3
II. GENERALITE SUR L'ULCERE DE BURULI CHEZ L'HOMME	4
II.1. DEFINITION	4
II.2. AGENT ETIOLOGIQUE : <i>Mycobacterium ulcerans</i>	4
II.2.1. TAXONOMIE ET CLASSIFICATION.....	4
II.2.2. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES	4
II.2.3. CARACTERISTIQUE DU GENOME DE <i>M. ulcerans</i>	6
II.2.4. DIVERSITE GENETIQUE DE <i>M. ulcerans</i>	7
II.2.5. MYCOLACTONE.....	8
II.3. EPIDEMIOLOGIE DE L'ULCERE DE BURULI CHEZ L'HOMME	9
II.3.1. REPARTITION GEOGRAPHIQUE.....	9
II.3.2. ECOLOGIE ET TRANSMISSION	10
II.3.3. FACTEURS FAVORISANTS	11
II.4. PATHOGENIE ET SYSTEME IMMUNITAIRE.....	12
II.5. ASPECTS CLINIQUES DE L'ULCERE DE BURULI CHEZ L'HOMME.....	12
II.6. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL	14
II.7. DIAGNOSTIC	14
II.7.1. EXAMEN DIRECT DES FROTTIS CUTANES.....	14
II.7.2. CULTURE	15
II.7.3. HISTOPATHOLOGIE	15
II.7.4. AMPLIFICATION GENIQUE (PCR)	15
II.8. TRAITEMENT	15
II.9. PREVENTION ET LUTTE	16
III. INFECTION A <i>M. ulcerans</i> CHEZ LES ANIMAUX	17
III.1. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A <i>M. ulcerans</i> CHEZ LES ANIMAUX	17
III.2. DETECTION DE <i>M. ulcerans</i> CHEZ LES ANIMAUX SAUVAGES....	19

III.2.1.	DETECTION DE <i>M. ulcerans</i> CHEZ LES VERTEBRES	19
III.2.2.	DETECTION DE <i>M. ulcerans</i> CHEZ LES INVERTEBRES	20
III.3.	INFECTION NATURELLE DES ANIMAUX	21
III.3.1.	MANIFESTATIONS CLINIQUES.....	21
III.3.2.	DIAGNOSTIC	25
III.3.3.	DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL	26
III.3.4.	TRAITEMENT	27
III.4.	INFECTION EXPERIMENTALE	28
I.	DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS	30
I.	MATERIELS ET METHODES	30
I.1.	CADRE, DUREE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	30
I.2.	MATERIELS	30
I.2.1.	MATERIEL BIOLOGIQUE.....	30
I.2.2.	EQUIPEMENTS.....	30
I.2.3.	REACTIFS.....	33
I.3.	METHODES.....	35
I.3.1.	MESURES DE SECURITE AU LABORATOIRE.....	35
I.3.2.	REPIQUAGE DES SOUCHES DE <i>M. ulcerans</i>	35
I.3.3.	EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE PAR LA METHODE DE VAN EMBDEN.....	36
I.3.4.	PREPARATION DES ADN DE TRAVAIL.....	38
I.3.5.	PCR CLASSIQUES.....	43
I.3.6.	PCR EN TEMPS REEL TAQMAN	51
I.3.7.	REPRODUCTIBILITE DES TESTS PCR.....	64
II.	RESULTATS	65
II.1.	RESULTATS DES PCR CLASSIQUES.....	65
II.1.1.	MISE EN PLACE DES PCR CLASSIQUES	65
II.1.2.	SENSIBILITE DES PCR CLASSIQUES	67
II.2.	RESULTATS DE LA PCR EN TEMPS REEL TAQMAN	72
II.2.1.	MISE AU POINT DE LA PCR EN TEMPS REEL.....	72
II.2.2.	MISE EN PLACE ET SENSIBILITE DE LA PCR EN TEMPS REEL TAQMAN	73
II.3.	REPRODUCTIBILITE	82

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION	83
I. DISCUSSION	83
II. RECOMMANDATIONS	88
CONCLUSION	91
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

LISTE DES TABLEAUX

	Pages
Tableau I. Exemple de quantification des ADN extraits sur Nanodrop 2000.....	41
Tableau II. Quantité d'ADN dans chaque réaction PCR correspondante pour les deux séries de dilutions d'ADN à tester.....	42
Tableau III. Amorces sens et anti-sens des PCR classiques	45
Tableau IV. Composition et volume des réactifs pour PCR classique, protocole de l'OMS.....	47
Tableau V. Composition et volume des réactifs pour PCR classique, protocole selon Sara EYANGO.....	49
Tableau VI. Amorces sens, antisens et sonde pour la PCR en temps réel	57
Tableau VII. Composition du mix du protocole modifié pour la mise au point de la PCR en temps réel.....	59
Tableau VIII. Composition et volume des réactifs pour PCR en temps réel TaqMan.....	60
Tableau IX. Valeurs de Ct des échantillons de la dilution au 1/2.....	76
Tableau X. Valeurs de Ct des échantillons de la dilution au 1/10.....	79
Tableau XI. Résultats de l'amplification des ADN des différentes espèces bactériennes testées.....	82

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1. Vue schématique de l'organisation générale de la paroi mycobactérienne.....	5
Figure 2. Représentation circulaire du génome Agy 99 de <i>M. ulcerans</i> : chromosome et plasmide pMUM001	7
Figure 3. Evolution généalogique simplifiée de <i>M. marinum</i> , <i>M. ulcerans</i> et d'autres souches MPM	9
Figure 4. Distribution géographique de l'ulcère de Buruli dans le monde en 2011	10
Figure 5. Localisation des cas chez les animaux par rapport à des cas humains dans l'Etat de Victoria en Australie depuis les années 1940	18
Figure 6. Photographie des ulcères et lésions à <i>M. ulcerans</i> au niveau de la tête chez les animaux	23
Figure 7. Photographie des ulcères et lésions à <i>M. ulcerans</i> au niveau de la patte chez les animaux	23
Figure 8. Photographie des formes ulcératives de l'infection à <i>M. ulcerans</i> au niveau de la partie caudale chez les animaux	24
Figure 9. Multiples nodules blancs jaunâtres sur la surface du poumon d'une tortue (<i>Lissemys punctata punctata</i>) dues à <i>M. ulcerans</i>	24
Figure 10. Photographie d'une série des lésions à <i>M. ulcerans</i> sur la partie caudale de la patte arrière d'un cheval	28
Figure 11. Thermocycleur MultiGene, Labnet® pour PCR classique	31

Figure 12. Thermocycleur StepOne Real-Time PCR systems, Applied Biosystems® pour PCR en temps réel	31
Figure 13. Illustration des différentes étapes de la PCR classique	45
Figure 14. Principe de la PCR en temps réel TaqMan	53
Figure 15. Cinétique d'amplification d'une PCR en temps réel	55
Figure 16. Illustration d'une courbe standard issue d'une dilution en série d'un échantillon standard	56
Figure 17. Représentation graphique des données de PCR en temps réel	62
Figure 18. Gel d'agarose des produits d'amplification obtenus lors de la mise en place des PCR classiques	66
Figure 19. Gel d'agarose obtenu à partir de la série de dilution au 1/2. Protocole de PCR classique de l'OMS	68
Figure 20. Gel d'agarose obtenu à partir de la série de dilution au 1/10. Protocole de PCR classique de l'OMS	69
Figure 21. Gel d'agarose obtenu à partir de la série de dilution au 1/2. Protocole de PCR classique de Sara EYANGO	70
Figure 22. Gel d'agarose obtenu à partir de la série de dilution au 1/10. Protocole de PCR classique de Sara EYANGO	71
Figure 23. Gel d'agarose obtenu en PCR classique pour la mise au point de la PCR en temps réel	72
Figure 24. Courbe standard obtenue à partir de la série de dilution d'ADN de <i>M. ulcerans</i> au 1/10 avec la PCR en temps réel TaqMan	73

Figure 25. Courbes d'amplification obtenues avec les échantillons d'ADN	
de la série de dilutions au 1/2.	75
Figure 26. Courbes d'amplification obtenues avec les échantillons	
d'ADN de la série de dilutions au 1/10	78
Figure 27. Gel d'agarose obtenu par la migration des amplicons de la	
PCR en temps réel (série de dilution au 1/10)	81

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

µl	: Microlitre
µM	: Micromolaire
10X	: Concentrée 10 fois à la normale
ADN	: Acide désoxyribonucléique
BAAR	: Bacille Acido-alcool-résistant
BCG	: Bacille de Calmette-Guérin
BET	: Bromure d'éthidium
CDS	: Coding DNA Sequence
cm	: Centimètre
CPC	: Centre Pasteur de Cameroun
CSB	: Centre de Santé de Base
Ct	: Cycle Threshold
CTAB	: Bromure de cetyltriméthylammonium
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
dNTP	: Désoxynucléoside-triphosphate
EDTA	: Ethylène Diamine Acide Tétracétique
fg	: Femtogramme
g	: Gramme
GBUI	: Global Buruli Ulcer Initiative
HPLC	: High-performance liquid chromatography
IFN	: Interféron

IL	: Interleukine
IPM	: Institut Pasteur de Madagascar
IS	: Insertion Sequence
kPa	: Kilopascal
LAMP	: Loop mediated isothermal AMPLification
LJ	: Löweinsten-Jensen
M	: Molaire
mg	: Milligramme
MgCl₂	: Chlorure de magnésium
ml	: Millilitre
mm	: Millimètre
mM	: Millimolaire
MOTT	: Mycobacterium Other Than Tuberculosis
MPM	: Mycobacteria Producing Mycolactone
NaCl	: Chlorure de Sodium
ng	: Nanogramme
nm	: Nanomètre
NSB3	: Niveau de Sécurité Biologique 3
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
pb	: Paire de bases
PCR	: Polymerase Chain Reaction ou Réaction en Chaîne par Polymérase
pmol	: Picomole

pO₂	: Pression partielle de l'oxygène
PSM	: Poste de Sécurité Microbiologique
pwLAMP	: pocket warmer LAMP
qsp	: Quantité suffisante pour
rpm	: Rotation par minute
SDS	: Sodium Dodécyl Sulfate
TBE	: Tris Borate EDTA
TE	: Tris EDTA
T_m	: Melting Temperature
TNF	: Tumor Necrosis Factor
UV	: Ultra-violet
VIH	: Virus de l'immunodéficience humaine
VNTR	: Variable Number of Tandem Repeat
WHO	: World Health Organization

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'ulcère de Buruli est une maladie infectieuse cutanée, non contagieuse, touchant à la fois l'homme [1] et les animaux [2, 3]. Elle est due à une mycobactérie atypique appelée *Mycobacterium ulcerans* [1-4]. C'est la troisième mycobactériose humaine après la tuberculose (*M. tuberculosis*) et la lèpre (*M. leprae*) [1]. La notification des cas d'infection naturelle chez les animaux reste jusqu'à présent rare [2, 3]. La bactérie produit une toxine, la mycolactone [5] qui provoque des lésions tissulaires et inhibe la réponse immunitaire [6]. La maladie est caractérisée par des lésions nécrotiques de la peau et du tissu sous-cutané qui peuvent atteindre les os adjacents, entraînant des incapacités fonctionnelles permanentes des membres [7-9].

L'ulcère de Buruli sévit dans plus de 33 pays dans le monde, essentiellement dans les zones à climat tropical, sub-tropical et tempéré. La majorité des cas humains notifiés sont en Afrique ; Aussi, l'Australie, l'Asie et l'Amérique latine sont également affectées [8]. L'Australie est le seul pays dans le monde à avoir déclaré la maladie chez les animaux domestiques et sauvages [8, 10].

La maladie tire son nom du comté de Buruli, Ouganda (aujourd'hui appelé District de Nakasongola), où des flambées ont été signalées dans les années 1960 [4, 11]. En 1998, l'OMS a considéré l'ulcère de Buruli comme une maladie réémergente qui a connu son essor en Afrique de l'Ouest et sub-saharienne constituant une grande menace pour la santé publique [12]. Aujourd'hui, elle est classée parmi les dix-sept maladies tropicales négligées qui touchent majoritairement les populations pauvres dont l'accès aux soins est limité [13]. Cette maladie est endémique dans certains pays comme le Bénin, la Côte d'Ivoire, le Ghana et considérée comme un problème majeur de santé publique entraînant un grand impact socio-économique [14] avec une incidence estimée à plus de 10.000 nouveaux cas par an [1]. Dans certaines régions, la prévalence peut atteindre jusqu'à 22%, dépassant celle de la lèpre et de la tuberculose [15-16]. Cependant, beaucoup de cas ne sont pas diagnostiqués car la maladie reste mal connue par la population [4, 17].

Madagascar, pays tropical en voie de développement, a une forte incidence de la tuberculose, environ 25.000 cas déclarés chaque année [18] et de la lèpre, 1.577 nouveaux cas dépistés en 2011 [19]. Jusqu'ici, peu de recherches ont été effectuées sur les mycobactérioses aussi bien chez l'homme que chez les animaux. En effet, l'ulcère de Buruli, bien que fréquente dans plusieurs pays tropicaux, reste méconnu par les personnels de santé, médecins, vétérinaires et la population à Madagascar. Selon l'OMS « la méconnaissance de cette maladie, sa répartition focale et le fait qu'elle touche principalement les communautés rurales démunies font que les cas sont peu notifiés » [20]. A cela, il faut ajouter sa présence probable dans les pays où il n'est pas reconnu ni recensé en tant qu'ulcère de Buruli [21].

En zone d'endémie, le diagnostic de l'infection à *M. ulcerans* est basé sur la clinique. La confirmation bactériologique se heurte à la difficulté de la culture et la lenteur de croissance de cette bactérie. Cela a conduit au développement des techniques rapides en biologie moléculaire dont l'amplification génique par la « Polymerase Chain Reaction » ou PCR. La PCR est considérée comme une technique très sensible et spécifique pour le diagnostic de *M. ulcerans* [22, 23]. En 2013, les experts de l'OMS ont recommandé qu'au moins 70% des cas notifiés soient confirmés par PCR positive d'ici fin 2014. Pour les pays exempts de cette maladie ou de situation inconnue comme Madagascar, la mise en place de cette technique dans un laboratoire équipé est fortement recommandée [8, 23].

L'objectif de cette étude est de mettre en place la technique de diagnostic moléculaire de *M. ulcerans* par la méthode PCR à l'Institut Pasteur de Madagascar.

Après la description de la maladie ulcère de Buruli chez l'homme et chez les animaux, nous rapportons la méthodologie et les résultats de l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité des deux techniques de diagnostic moléculaire, PCR classique et PCR en temps réel, reposant sur la détection de la séquence d'insertion IS2404, et qui seront suivi par les discussions. Cette étude nous permettrait d'acquérir plus d'expériences en biologie moléculaire, d'autant plus que c'est le premier travail effectué à Madagascar concernant *M. ulcerans*. Ces outils de diagnostic mis en place seront disponibles pour de futures investigations et des recherches dans le pays et qui apporteront de nouvelles connaissances sur cette pathologie.

PREMIERE PARTIE : RAPPELS

PREMIERE PARTIE : RAPPELS

I. HISTORIQUE

En 1897, Sir Albert Cook a décrit chez des habitants de la vallée de Buruli en Ouganda des ulcères cutanés d'évolution chronique [24]. De 1923 à 1935, Kleinschmidt, médecin missionnaire dans le nord-est du Congo, a lui aussi observé des lésions cutanées à bords creusés contenant de nombreux bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) [25]. Ce n'est qu'en 1948 que le professeur MacCallum et ses collègues ont publié la première description d'un ulcère chronique appelé « ulcère de Bairnsdale » chez six fermiers Australiens. Ceci après avoir décrit l'agent causal en découvrant des BAAR dans une biopsie prélevée à partir d'un ulcère de la jambe chez un enfant de Bairnsdale (Australie) en 1940 [24]. Cette bactérie dénommée *Mycobacterium ulcerans* fut identifiée en 1958, après une étude expérimentale chez l'animal de laboratoire [26] et description de ses principaux caractères culturels [27]. Faisant référence à la vallée de Buruli en Ouganda où Sir Cook avait observé les premiers cas d'ulcère en 1897, Dodge et Lunn (1962) vont attribuer à cette infection l'appellation : « ulcère de Buruli » [28].

En 1998, l'OMS lança l'initiative mondiale contre l'ulcère de Buruli (« Global Buruli Ulcer Initiative », GBUI). Cette coalition mondiale avait comme objectif principal de contrôler et de coordonner les efforts de recherche [4]. S'est tenue la réunion des experts de l'OMS sur l'ulcère de Buruli : lutte et recherche, organisée à Genève en 2013 recommandant de mettre en œuvre plusieurs activités dont la confirmation d'au moins 70% des cas au laboratoire par la méthode de PCR [8].

II. GENERALITE SUR L'ULCERE DE BURULI CHEZ L'HOMME

II.1. DEFINITION

L'ulcère de Buruli est une maladie infectieuse cutanée, endémique, provoquée par *Mycobacterium ulcerans*. Commencant généralement par un nodule ou une papule cutanée indolore qui, en l'absence de traitement, évolue vers une ulcération massive à bords creusés de la peau et aboutit à des séquelles invalidantes. Il arrive parfois que les os soient détruits. Ce sont les extrémités qui sont les plus souvent touchées [4, 8].

L'ulcère de Buruli est aussi connu sous plusieurs noms, le plus souvent, suivant la région du foyer d'origine comme « Mbasu » à Congo, « Maladie Mystérieuse de Daloa » en Côte d'Ivoire, « Abi » au Togo, « Atom » au Cameroun, « Ulcère de Daintree » ou « Ulcère de Bairnsdale » en Australie, « Infection à *Mycobacterium ulcerans* » ... [29, 30].

II.2. AGENT ETIOLOGIQUE : *Mycobacterium ulcerans*

II.2.1. TAXONOMIE ET CLASSIFICATION

M. ulcerans appartient à la famille des *Mycobacteriaceae*, ordre des *Actinomycetales*, classe des *Schizomycètes* [31]. Cette famille contient un seul genre : *Mycobacterium* [32]. On compte actuellement plus de 130 espèces mycobactériennes, avec une majorité d'espèces environnementales. *M. ulcerans* appartient au groupe des « *Mycobacterium Other Than Tuberculosis* » (MOTT) ou mycobactéries atypiques ou mycobactéries environnementales [33], et au groupe III de la classification de Runyon : mycobactéries achromogènes, qui ne se pigmentent ni à la lumière, ni à l'obscurité [34].

II.2.2. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

M. ulcerans est un bacille immobile, non sporulé, aérobic stricte, rectiligne ou plus ou moins incurvé [35], atteignant 4 à 5 μ dans les lésions cliniques ou expérimentales mais de taille plus réduite en culture : 2 à 4 μ [36].

Il se colore difficilement à la fuchsine, mais est capable de conserver cette coloration malgré l'action combinée de l'acide et de l'alcool. D'où l'appellation de bacille acido-alcool-resistant (BAAR) [37]. Cette propriété est liée à la présence d'une paroi très riche en lipides spécifiques, les acides mycoliques, qui est mise à profit dans la coloration de Ziehl-Neelsen : coloration différentielle des mycobactéries [38]. *M. ulcerans* s'organise en biofilm et sa paroi confère une résistance à la plupart des agents physico-chimiques [35, 39, 40] (Figure 1).

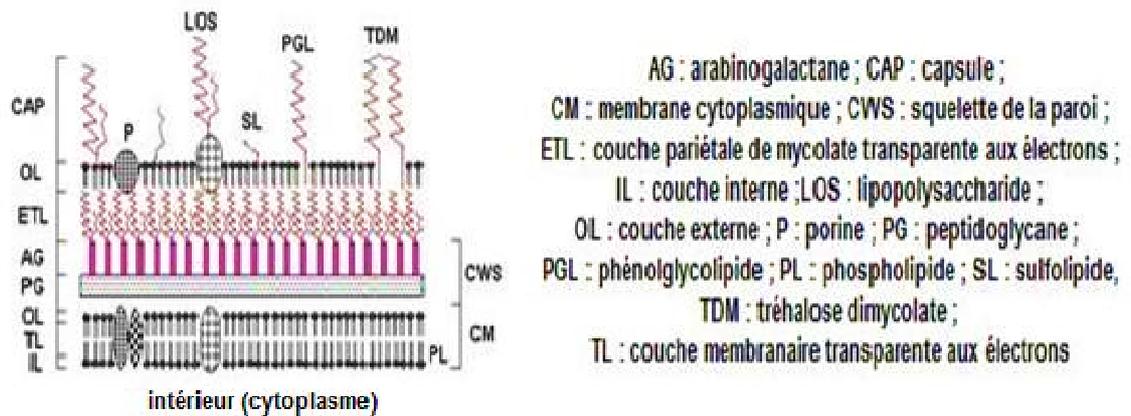


Figure 1. Vue schématique de l'organisation générale de la paroi mycobactérienne

Source : Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffé M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol.* 2008;190(16):5672-80.

C'est une mycobactérie à croissance lente (temps de génération environ 20 heures) qui se cultive à des températures comprises entre 30 et 33°C [41]. Le milieu de Löwenstein-Jensen est le milieu de culture le plus favorable pour *M. ulcerans* et le pH optimal varie de 5,4 à 7,4 [42]. Pour son isolement en culture primaire, il faut une incubation à 32 °C. Une teneur réduite en oxygène ($pO_2 < 2,5$ kPa) est propice à sa croissance, ce qui laisse supposer une préférence microaérophile [43]. Les cultures primaires peuvent prendre 6 à 8 semaines, comme le bacille tuberculeux, mais les sous-cultures deviennent en général positives en deux semaines, suivant le nombre de mycobactéries dans l'inoculum [4].

II.2.3. CARACTERISTIQUE DU GENOME DE *M. ulcerans*

La séquence génomique complète de *M. ulcerans* a été publiée en Février 2007 (<http://genolist.pasteur.fr/BuruList/>). Elle a été obtenue et isolée en France à partir d'un isolat clinique d'une lésion d'ulcère de Buruli provenant du Ghana en 1999. Le génome complet de 5.805.761 pb appelé Agy 99 comprend deux réplicons circulaires, un chromosome de 5.631.606 pb et un plasmide de virulence pMUM001 de 174.155 pb (Figure 2). Le chromosome est riche en séquences d'insertion (« insertion sequence », IS), en particulier IS2404 (1.368 pb, 209 copies) et IS2606 (1.438 pb, 83 copies) et il contient deux bactériophages (*phiMU01* et *phiMU02*) et de multiples délétions et réarrangements d'ADN. Le plasmide contient quatre copies de IS2404 et huit copies de IS2606 [44-46]. Auparavant, l'IS2404 était considérée comme spécifique pour *M. ulcerans*, mais elle est également présente dans d'autres espèces de mycobactéries *M. liflandii*, *M. pseudoshottsii* et un groupe inhabituel de souches de *M. marinum*, *M. lentiflavum*. Les IS2404 et IS2606 sont aussi observés chez le genre *Streptomyces* [45, 47-49]. Diverses techniques en biologie moléculaire utilisent ces deux séquences d'insertion pour identifier *M. ulcerans* [47]. Le chromosome a une teneur en G + C de l'ordre de 65% [50] tandis que celle du plasmide de virulence est légèrement inférieure 62,5% [44].

Les comparaisons entre le génome de *M. ulcerans* et *M. marinum* (une mycobactérie pathogène pour l'homme et les poissons, génome complet de 6.636.827 pb) ont confirmé une relation très étroite entre ces deux espèces [44, 49].

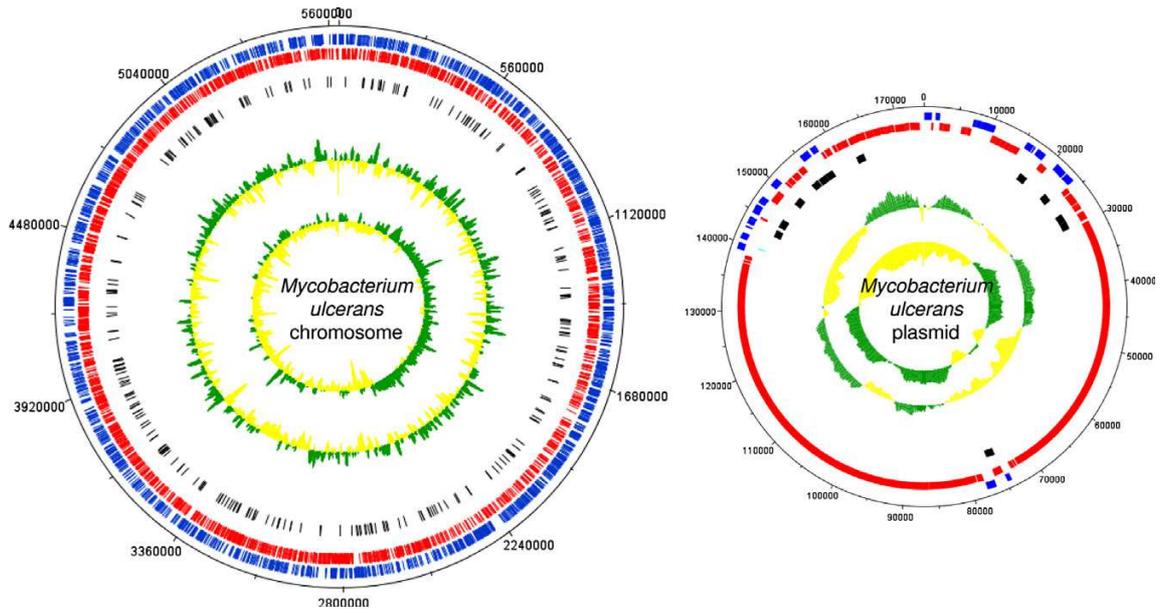


Figure 2. Représentation circulaire du genome Agy 99 de *M. ulcerans* : chromosome et plasmide pMUM001

Le cercle noir extérieur montre la taille en bases. Les deux prochains cercles intérieurs illustrent les brins sens et inverses CDS (séquences codant pour des protéines), respectivement en bleu et en rouge. Les régions de l'IS sont affichées dans le prochain cercle intérieur en noir. Les cercles les plus à l'intérieur représentent la teneur en G + C. Le graphique a été conçu en utilisant DNAPlotter Release 1.4.

Source : Röltgen K, Stinear T, Pluschke G. The genome, evolution and diversity of *Mycobacterium ulcerans*. Infect Genet Evol. 2012;12:522-9.

II.2.4. DIVERSITE GENETIQUE DE *M. ulcerans*

De nombreuses méthodes en biologie moléculaire ont été développées depuis une vingtaine d'années pour l'identification, le typage et le génotypage de *M. ulcerans* [51, 52]. Elles ont permis de révéler qu'au sein de cette espèce, il existe plusieurs sous-groupes qui peuvent également se différencier par des caractéristiques phénotypiques et génétiques :

- Les variations sur la région 3'-terminal du gène 16S ARNr sont liées à l'origine géographique des souches de *M. ulcerans* : africaine, américaine, asiatique et australienne [53].

- L'analyse du gène 16S ARNr a aussi permis d'identifier une autre sous-espèce nommée *Mycobacterium ulcerans* subsp. *Shinshuense*, provenant de Japon [54].
- Une espèce de mycobactérie auparavant appelée *Mycobacterium liflandii* est considérée actuellement comme un écotype de *M. ulcerans* et nommée *Mycobacterium ulcerans* ecovar *liflandii*. C'est une mycobactérie pathogène, létale pour une espèce d'amphibien africain, *Xenopus tropicalis* [55, 56].

II.2.5. MYCOLACTONE

La mycolactone, une exotoxine produite par le plasmide de virulence pMUM001 de *M. ulcerans* [5] est un polykétide dérivé de macrolides toxiques [57]. Les gènes codant pour les enzymes de sa voie de biosynthèse situés sur le plasmide (174 kb) sont susceptibles d'avoir été acquis par transfert horizontal des gènes au cours de l'évolution du complexe *M. marinum*/*M. ulcerans* [58].

Il existe cinq variantes de mycolactone produites par les souches de *M. ulcerans* et d'autres mycobactéries produisant de mycolactone (« mycobacteria producing mycolactone », MPM) qui se diffèrent par leurs structures chimiques (même noyau lactone mais chaîne latérale différente) et leur origine géographique. Ces variantes de mycolactone sont : mycolactone A/B produite par *M. ulcerans*, souche africaine ; mycolactone C formée par *M. ulcerans*, souche australienne ; mycolactone D produite par *M. ulcerans*, souche de la Chine ; mycolactones E et F formées par d'autres souches MPM [59] (Figure 3). Des chercheurs ont avancé que *M. ulcerans* et ces MPM doivent être considérés comme une seule espèce [60].

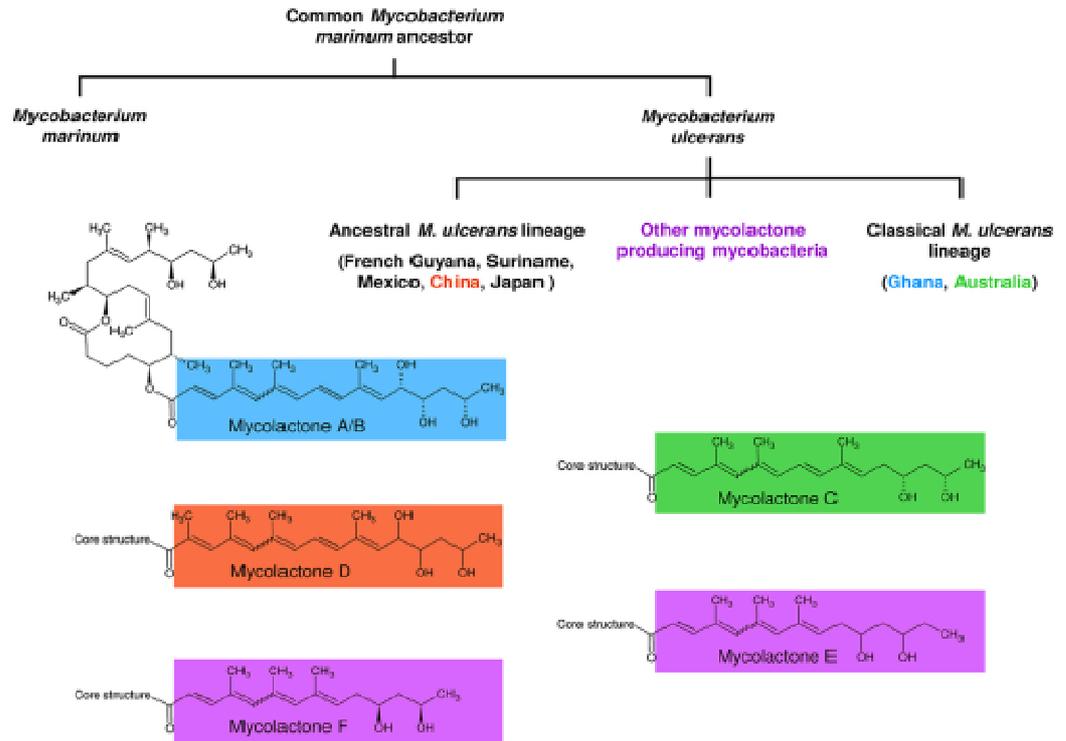


Figure 3. Evolution généalogique simplifiée de *M. marinum*, *M. ulcerans* et d'autres souches MPM

Source : Yip MJ, Porter JL, Fyfe JA, Lavender CJ, Portaels F, Rhodes M, et al. Evolution of *Mycobacterium ulcerans* and other mycolactone-producing mycobacteria from a common *Mycobacterium marinum* progenitor. J Bacteriol. 2007;189:2021-9.

II.3. EPIDEMIOLOGIE DE L'ULCERE DE BURULI CHEZ L'HOMME

II.3.1. REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Notifié dans plus de 33 pays dans le monde, l'ulcère de Buruli se répartit principalement dans les régions tropicales et subtropicales à climats chauds et humides (Figure 4). L'Afrique est le plus touché, cependant elle a été rapportée dans d'autres continents [1, 8, 20] :

- En Afrique : Bénin, Côte d'Ivoire, Ghana, Togo, Angola, Sierra Leone, Cameroun, Gabon, Soudan, Ouganda, Congo, Liberia, Guinée, Burkina Faso, Congo, Malawi, Mali, Nigeria, Sénégal, ...

- En Amérique latine : Mexique, Brésil, Pérou, Suriname, Guyane Française, Bolivie.
- En Asie : Malaisie, Inde, Sri Lanka, Japon, chine, Indonésie.
- En Pacifique occidental : Papouasie Nouvelle-Guinée, Australie, Kiribati.
- En Europe (Londres, France) et en Amérique du Nord : ce sont des rares cas chez des voyageurs de retour d’Afrique ou de Guyane [1, 61-63].

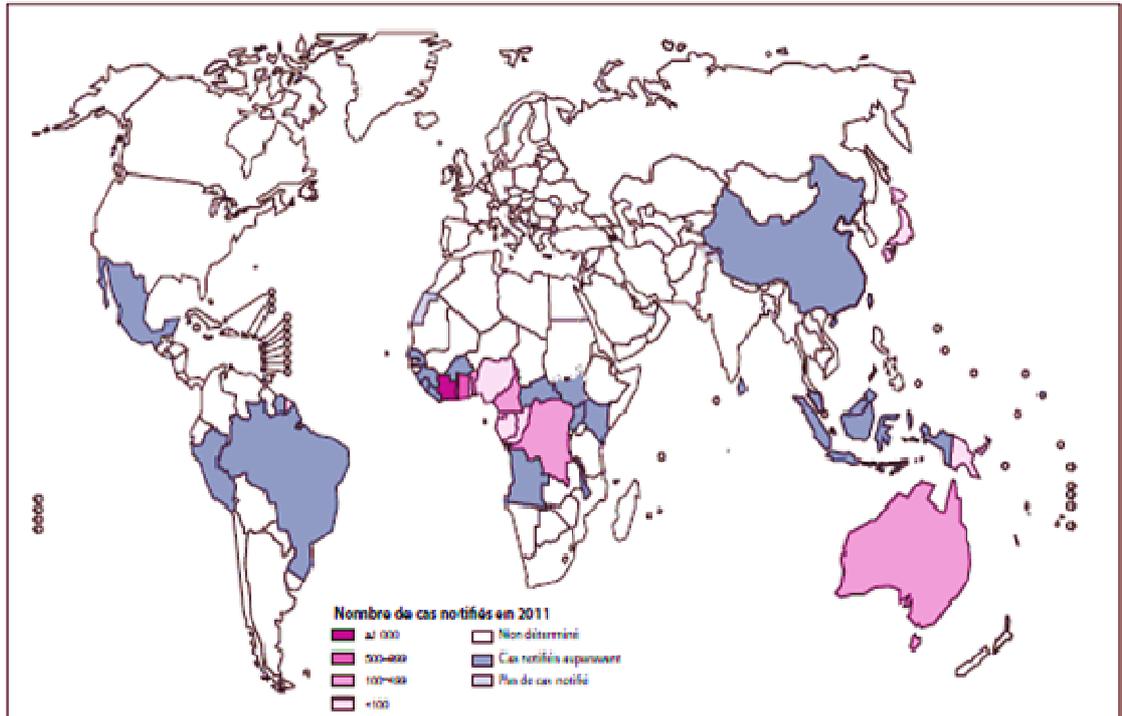


Figure 4. Distribution géographique de l’ulcère de Buruli dans le monde en 2011

Source : Organisation Mondiale de la Santé. Ulcère de Buruli. In : Savioli L, Daumerie D, eds. Continuer à agir pour réduire l’impact mondial des maladies tropicales négligées : deuxième rapport de l’OMS sur les maladies tropicales négligées. 2014 : 41-4. WHO/HTM/NTD/2013.1.

II.3.2. ECOLOGIE ET TRANSMISSION

Les réservoirs et le mode exact de transmission de *M. ulcerans* chez l’homme ne sont pas complètement élucidés [8, 64]. Jusqu’ici, aucune preuve évidente indique une transmission interhumaine [3, 4].

L'ulcère de Buruli apparait en général sous forme de foyers endémiques, le plus souvent localisés autour d'un écosystème aquatique (rivières, fleuves, lacs naturels et artificiels, marécages, périmètres irrigués) [4, 9, 65]. En effet, *M. ulcerans* a été mis en évidence par PCR dans l'environnement dont l'eau, la boue, les mollusques, les insectes (moustiques, punaises aquatiques), les végétaux aquatiques, les crustacés, les poissons et les mammifères terrestres (opossums, rats) qui pourraient ainsi constituer des réservoirs ou vecteurs potentiels pour l'homme [65-70]. La transmission pourrait se faire soit à la suite d'un contact direct avec l'environnement ou des poissons contaminés [9, 65, 71], soit par inoculation de *M. ulcerans* dans la peau à la faveur des microtraumatismes [72], des injections [71], des piqûres [73] ou des morsures [74]. D'autres chercheurs privilégient la notion de transmission par voie aérienne : les aérosols pourraient transporter *M. ulcerans* et infecter l'hôte par voie respiratoire ou contaminer la surface de la peau [73].

II.3.3. FACTEURS FAVORISANTS

Plusieurs facteurs pourraient favoriser l'apparition des foyers endémiques de l'ulcère de Buruli chez l'homme tels que : les modifications de l'environnement après des perturbations écologiques importantes (inondations, immigrations, déforestations), les variations saisonnières. Tandis que, la proximité de rivières et de plan d'eau à débit lent, l'utilisation de sources d'eau non protégées pour les activités domestiques, l'absence de vêtements protecteurs (pantalons, chemises à manches longues), la désinfection inadaptée des plaies constitueraient des facteurs de risque individuel [1, 4, 75]. Cependant, l'âge, le sexe, le groupe racial ou socio-économique ne sont pas des facteurs déterminants de la maladie [76]. Néanmoins, une variation en fonction des pays est observée, à l'exemple de l'Afrique, 48% des sujets atteints sont des enfants de moins de 15 ans [8].

Bien que l'infection au VIH ne soit pas un facteur de risque, elle affaiblit le système immunitaire et rend l'évolution de l'ulcère de Buruli plus agressive [8, 77], mais elle n'influence pas l'effet du traitement [4].

II.4. PATHOGENIE ET SYSTEME IMMUNITAIRE

M. ulcerans possède un tropisme principalement cutané et son pouvoir pathogène est dû à la production de la toxine mycolactone. Après avoir été introduit dans le derme sous cutané, *M. ulcerans* passe par une phase de latence de durée variable avant de proliférer et produire cette toxine [78]. La mycolactone dispose des propriétés cytotoxiques, produisant une mort cellulaire et l'apoptose des cellules épithéliales [79, 80] en activant de manière incontrôlée la synthèse de leur cytosquelette ; elle compromet donc à la fois la cohésion des tissus cutanés et leur potentiel de cicatrisation [81]. Ainsi que des propriétés immunosuppressives en inhibant la production des médiateurs inflammatoires (IL-2, TNF- α et d'autres cytokines), ce qui explique la faible réaction inflammatoire locale [6, 82, 83]. Les nerfs locaux sont envahis et lésés par *M. ulcerans*, ce qui justifie la nature indolore de la lésion de l'ulcère de Buruli [84]. La mycolactone est responsable de la nécrose de la graisse sous cutanée (adipocytes), constituant ainsi un milieu favorisant la prolifération de *M. ulcerans*.

Au cours de cette phase, la réponse cellulaire de l'hôte est très faible voire inexistante (en général l'intradermoréaction de la buruline, antigène dérivé de *M. ulcerans*, est négative) [85]. Les lésions osseuses métastatiques viennent probablement de la diffusion de *M. ulcerans* dans le sang ou par voie lymphatique [86]. A un certain moment, sans qu'on puisse expliquer, soit la toxine est neutralisée, soit les bactéries cessent de se proliférer ou de produire la toxine. La guérison par l'apparition de granulomes semble commencer dès lors que l'hôte développe une immunité à médiation cellulaire (augmentation de la production d'IFN- γ) contre des constituants de *M. ulcerans* (la réaction à la buruline devient positive) [87, 88].

II.5. ASPECTS CLINIQUES DE L'ULCERE DE BURULI CHEZ L'HOMME

L'incubation de l'ulcère de Burli varie de quelques semaines à plusieurs années (une moyenne estimée à 135 jours soit 4 à 5 mois en Australie) [1, 89]. Il évolue en général, sans fièvre et indolore, en trois stades caractéristiques (pré-ulcératif, ulcératif, cicatriciel) [1, 4]. Les lésions peuvent être localisées, diffuses ou multifocales.

Une même personne peut également présenter plusieurs atteintes identiques ou différentes sans altérer l'état général [7, 9, 71].

PHASE PREULCEREUSE : caractérisée par une tuméfaction sous-cutanée ferme qui peut se présenter sous quatre formes :

- le nodule est une lésion dure, bien délimitée, de 1 à 2 cm de diamètre, le plus souvent unique, indolore, froide, adhérente à la peau et mobile au plan profond, accompagnée d'une dépigmentation de la peau avoisinante.
- la papule apparaît sous la forme d'une lésion surélevée, indolore, de moins de 1 cm de diamètre, accompagnée d'une rougeur de la peau avoisinante.
- la plaque est une large lésion indurée, hyperpigmentée, surélevée, de plus de 2 cm de diamètre, aux bords irréguliers, indolore.
- l'œdème se manifeste par une tuméfaction sous-cutané froide, pouvant s'étendre à un membre entier englobant largement la zone où va débiter l'ulcération. Il peut être accompagné de signes inflammatoires locaux et de fièvre.

PHASE ULCEREUSE : les nodules et les papules évoluent le plus souvent vers une ulcération cutanée profonde d'extension progressive et chronique. Classiquement, cette perte de substance dermo-épidermique présente un fond nécrotique jaunâtre, des bords décollés et un pourtour oedémateux. Ce décollement peut atteindre plusieurs centimètres et faire communiquer des ulcères satellites.

PHASE DE CICATRISATION ET SEQUELLES : la guérison spontanée des lésions est possible. Le tissu cicatriciel est fibreux, scléreux et l'impotence fonctionnelle engendrée par les ulcères péri articulaires et la rétraction des cicatrices conduisent à des séquelles à type d'ankylose, de blocage en position vicieuse, d'amputation de membre ou de perte d'organe, de lymphœdème par striction cicatricielle.

LES FORMES PARTICULIERES ET COMPLICATIONS : une ostéomyélite, une atteinte multifocale, une surinfection bactérienne (tétanos, septicémie) [4], une association d'un large ulcère thoraco-abdominal et pleurésie massive [90, 91], une co-infection avec le VIH ou avec *Mansonella perstans* (filariose) [92], etc. Une localisation génitale est généralement secondaire à un foyer à distance [93].

II.6. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

Le diagnostic différentiel de l'infection à *M. ulcerans* chez l'homme repose sur plusieurs manifestations dermatologiques dont la confirmation ne peut être acquise qu'avec l'aide de la biologie [4, 22]. A l'instar :

- des nodules : piquûres, boutons, kystes, lipomes, furoncles, onchocercomes, adénite, mycose ;
- des plaques : lèpre, cellulite, mycoses, psoriasis ;
- des formes œdémateuses : cellulites, éléphantiasis, actinomycose ;
- des ulcères : ulcère tropical phagédénique, leishmaniose, pian, carcinome épidermoïde, stomatite gangréneuse (*Cancrum oris*), ecthyma à streptocoque ou à staphylocoque ;
- des ostéomyélites : tuberculose, les ostéites chroniques à pyogènes, mycétomes.

II.7. DIAGNOSTIC

Dans les zones endémiques le diagnostic repose surtout sur la clinique, le diagnostic microbiologique reste trop peu utilisé. Selon l'OMS, il faut au moins deux examens positifs parmi les quatre diagnostics bactériologiques pour affirmer formellement le diagnostic. Les prélèvements utilisés pour le diagnostic bactériologique de l'ulcère de Buruli sont : les écouvillons, l'aspiration à l'aiguille fine et la biopsie à l'emporte-pièce ou chirurgicale. Ils doivent être prélevés après le diagnostic clinique [22, 23].

II.7.1. EXAMEN DIRECT DES FROTTIS CUTANES

La mise en évidence de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) par examen direct des frottis au microscope (méthode de Ziehl-Neelsen ou coloration à l'Auramine) à partir d'écouvillons passés sur les bords décollés de l'ulcère est le test de diagnostic de première intention disponible dans la plupart des zones d'endémie. Sa sensibilité est faible, inférieur à 60% [22].

II.7.2. CULTURE

La culture sur milieux de Löwenstein-Jensen (LJ), Coletsos ou BACTEC pratiquée à partir des écouvillons ou des biopsies cutanées est difficile et longue (peut atteindre jusqu'à 12 mois pour devenir positive). Les colonies obtenues sont eugoniques, jaunâtres, rugueuses et à bords bien démarqués. Le diamètre est de 2 mm et peut atteindre 5 mm, la surface est irrégulière et il s'y développe en général un bouton central surélevé de 1 mm. Sa sensibilité est faible, de 20 à 60% [4, 22].

II.7.3. HISTOPATHOLOGIE

Elle nécessite une biopsie profonde (jusqu'à l'aponévrose) d'une lésion. Elle montre une nécrose de coagulation du tissu sous-cutané et de l'aponévrose avec une réaction inflammatoire modérée et parfois une vascularite et une minéralisation. Les BAAR sont en plus ou moins grand nombre (rares dans les ulcères, nombreux dans les nodules). Sa sensibilité est de 90% [22, 94].

II.7.4. AMPLIFICATION GENIQUE (PCR)

Cet examen est réalisé directement sur les échantillons cliniques ou bien à partir des milieux de culture. Son principe repose sur la recherche de l'ADN de *M. ulcerans* par la détection de la séquence d'insertion IS2404 par PCR. Sa sensibilité est de 98% et sa spécificité est proche de 100%. Les techniques PCR ne sont accessibles que dans de rares laboratoires alors qu'elles permettent un diagnostic rapide [22].

II.8. TRAITEMENT

La chirurgie et l'antibiothérapie sont les deux principaux traitements actuels de l'ulcère de Buruli. Avant la recommandation de l'OMS en 2004 tendant à utiliser l'antibiothérapie, les interventions chirurgicales constituaient le traitement de base [95, 96]. L'association Rifampicine-Streptomycine constitue le traitement standard [95], qui a montré des résultats prometteurs : guérison de la moitié des lésions précoces et ulcérées de moins de 5 cm, réduction du volume lésionnel et donc l'étendue de l'intervention chirurgicale, diminution du risque de rechute post-chirurgicale des formes évoluées ou compliquées (ostéomyélites) [97].

L'association Rifampicine-Clarithromycine est employée chez les femmes enceintes. L'association Rifampicine-Moxifloxacine est réservée uniquement pour les adultes [95].

La chirurgie consiste en une exérèse-suture des formes précoces nodulaires ou une chirurgie complexe à type d'excision large en zone saine associée à une greffe cutanée pour les formes évoluées visant à améliorer le pronostic fonctionnel [98].

Les mesures associées au traitement, la diffusion des règles d'asepsie et la qualité des pansements, sont essentielles pour favoriser la cicatrisation et limiter les surinfections bactériennes. La vaccination antitétanique doit être à jour [4]. La kinésithérapie et la rééducation fonctionnelle (appareillage) doivent être utilisées au plus tôt afin de limiter les séquelles invalidantes [95]. L'intérêt des techniques adjuvantes (thermothérapie, oxygénothérapie hyperbare, héparines de bas poids moléculaires) [99] et l'efficacité des plantes utilisées dans le traitement traditionnel sont discutés [100].

II.9. PREVENTION ET LUTTE

Actuellement, il n'existe pas de vaccin pour la prévention primaire de l'ulcère de Buruli [8]. La vaccination par le bacille de Calmette-Guérin (BCG) conférerait un certain degré de protection [101]. Il est nécessaire de renforcer l'éducation sanitaire des populations à risque sur l'hygiène personnelle et celle de l'environnement, ainsi que les soins à toute écorchure ou coupure [102]. La stratégie de lutte contre l'ulcère de Buruli menée par l'OMS, adoptée en mars 2009 à Cotonou (Bénin) est fondée sur la détection précoce, la mise au point d'outils de diagnostic simples et l'utilisation précoce des antibiotiques [103].

Il a été démontré que l'exposition à des piqûres répétées de punaises aquatiques saines conférerait une protection contre la formation des lésions à *M. ulcerans*. Cette hypothèse ouvre des perspectives pour la recherche de nouvelles stratégies préventives [104].

III. INFECTION A *M. ulcerans* CHEZ LES ANIMAUX

III.1. EPIDEMIOLOGIE DE L'INFECTION A *M. ulcerans* CHEZ LES ANIMAUX

L'épidémiologie de l'infection à *M. ulcerans* chez les animaux reste encore très mal connue en dépit des efforts de recherche sur la maladie. L'Australie est le seul pays à avoir déclaré la maladie chez les animaux [8] bien que la surveillance active soit en cours dans certaines zones d'endémie d'Afrique [105]. La maladie sévit dans plusieurs zones d'endémie en Australie mais pour des raisons inconnues, les cas chez les animaux domestiques et sauvages n'ont été signalés que dans l'Etat de Victoria [8, 10]. Une exception en 2011, un cas d'une infection à *M. ulcerans* a été diagnostiqué par PCR chez une tortue (*Lissemys punctata punctata*) importée d'Inde, qui est morte dans un aquarium au Japon [106].

La première infection naturelle chez les animaux était décrite par Mitchell PJ, et al. en 1984 chez des koalas (*Phascolarctos cinereus*) [107], puis d'autres infections ont été diagnostiquées chez des marsupiaux : phalangers-renards (*Trichosurus vulpecula*), possums à queue annelée (*Pseudocheirus peregrinus*), phalangers de montagne (*Trichosurus caninus*) d'Orbost [10, 108, 109], potorou (*Potorous longipes*) [110], et chez des chevaux [111], des chiens [112], des alpagas (*Lama pacos*) [113], un chat [114] et une tortue [106]. Tous ces cas, à l'exception du potorou et phalangers de montagne étaient localisés dans la même région côtière que celle où sont apparus les cas humains et ils étaient tous confirmés par PCR en laboratoire [8, 10] (Figure 5).

Les hôtes de diverses espèces sensibles expérimentalement sont : les lézards, les amphibiens, les tatous, les rats, les souris, les hamsters, les cochons d'Inde, les aulacodes et les bovins. D'autres animaux comme le cobaye, le lapin et la poule semblent réfractaires à l'infection [36]. Le poisson ne développe pas une infection mais son organisme peut être colonisé par *M. ulcerans* [115].

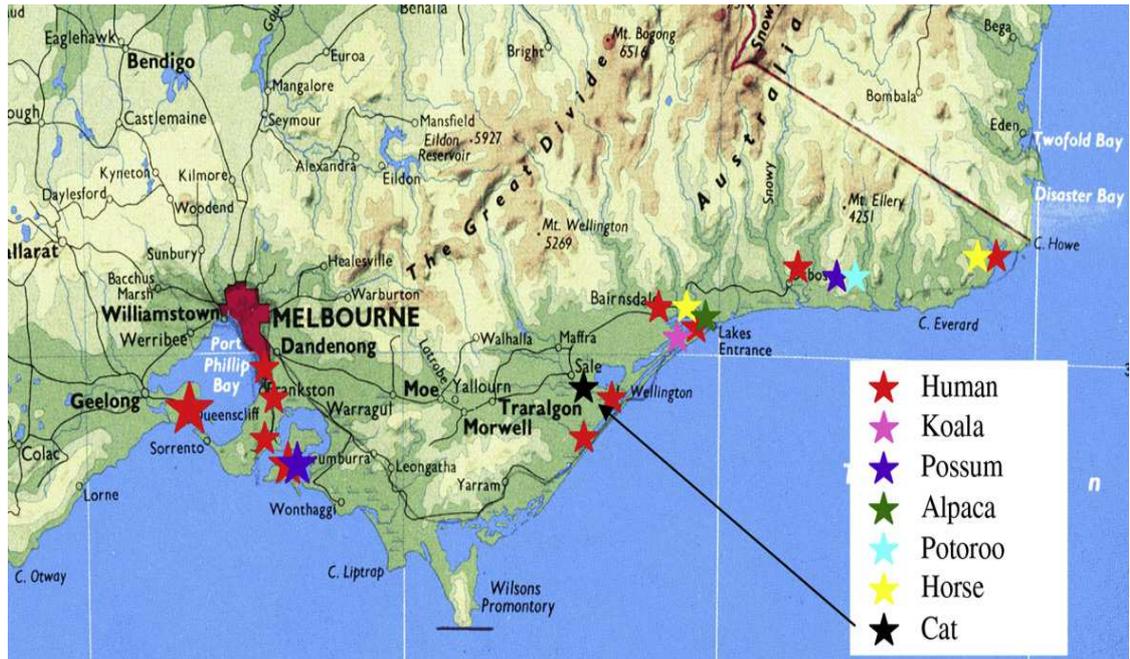


Figure 5. Localisation des cas chez les animaux par rapport à des cas humains dans l'Etat de Victoria en Australie depuis les années 1940

Source : Elsner L, Wayne J, O'Brien CR, McCoawan C, Malik R, Hayman JA, et al. Localised *Mycobacterium ulcerans* infection in a cat in Australia. J Feline Med Surg. 2008;10:407-12

Comme chez les humains, le mode d'infection, la transmission ou les réservoirs de *M. ulcerans* chez les animaux font l'objet de controverses. Il n'y a aucune preuve évidente indiquant une transmission d'un animal à l'autre. L'environnement constituerait la source d'infection [2]. En effet, des enquêtes environnementales ont été effectuées après la confirmation par PCR du diagnostic de l'infection à *M. ulcerans* chez les chiens et les alpagas. Divers échantillons ont été prélevés à partir d'une variété d'emplacements : l'eau des abreuvoirs, les matières fécales, les feuilles fraîches et feuilles mortes des plantes autour du lieu de détention des animaux, la végétation, la terre, etc. L'ADN de *M. ulcerans* a été mis en évidence dans tous ces prélèvements par la méthode de PCR [112, 113]. En 1987, l'équipe de Mitchell PJ a déjà constaté que les koalas et les humains sont initialement infectés d'une source commune dans l'environnement [116].

L'ADN de *M. ulcerans* a été détecté dans les fèces des animaux infectés (chiens, marsupiaux) et d'autres animaux apparemment sains résidants dans les régions d'endémie. Ils pourraient constituer donc des réservoirs et hôtes naturels de la bactérie dans l'environnement [2, 107-110].

Plusieurs hypothèses ont été émises sur le mode d'infection des animaux, telles que :

- Inoculation de *M. ulcerans* par l'intermédiaire d'une blessure cutanée au niveau de la région infectée. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les parties atteintes chez certains animaux sont souvent soumises à des microtraumatismes ou des blessures causées par les grattages et les combats [11-114].
- Contamination de l'animal par voie orale ou par voie respiratoire et propagation de *M. ulcerans* dans l'organisme par voie sanguine ou lymphatique. Ceci pourrait expliquer la présence d'infection systémique comme chez la tortue [106], infection respiratoire chez les koalas [117] et la présence de *M. ulcerans* dans certains organes internes des animaux autopsiés (foie, estomac, poumons, intestin) [10, 107, 110].
- Inoculation de *M. ulcerans* par l'intermédiaire d'une piqûre d'insectes vecteurs comme le moustique, à l'exemple d'un alpaga qui a présenté des ulcérations après avoir été piquée par des moustiques quelques semaines auparavant [111-114].

III.2. DETECTION DE *M. ulcerans* CHEZ LES ANIMAUX SAUVAGES

III.2.1. DETECTION DE *M. ulcerans* CHEZ LES VERTEBRES

Dans les zones endémiques, une grande variété de vertébrés aquatiques et non aquatiques qui partagent le même environnement que les humains ont été examinés.

Les mammifères, les grenouilles, les reptiles et les poissons ont été proposés comme réservoirs possibles de *M. ulcerans*. Auparavant, les enquêtes pour *M. ulcerans* chez ces animaux en Australie et dans certaines régions d'Afrique n'ont pas donné de résultats positifs [2, 116, 118-120].

Mais plus récemment, la biologie moléculaire a permis de détecter l'ADN de *M. ulcerans* dans certaines espèces animales :

- En Australie, l'ADN de *M. ulcerans* a été détecté dans les échantillons de matières fécales et dans le tractus gastro-intestinal des possums à queue annelée (*Pseudocheirus peregrinus*) et des phalangers-renards (*Trichosurus vulpecula*) en bonne santé apparente [65, 108-110, 121]. Ces animaux sont considérés comme des sentinelles potentielles dans la propagation de l'ulcère de Buruli dans plusieurs régions de l'Australie [122].
- L'analyse de plusieurs espèces de poissons récoltées au Ghana et au Bénin a pu montrer la présence de *M. ulcerans* dans cinq espèces de poissons appartenant à la famille des *Poecilidae*, *Aplocheilidae*, et *Cichlidae* dont le Tilapia [123]. Une autre étude a aussi révélée la présence de *M. ulcerans* et/ou *M. ulcerans* *ecovar liflandii* chez les poissons, têtards et amphibiens dans les plans d'eau au Ghana. Les amphibiens peuvent en être malades mais les poissons et têtards sont seulement infestés [115].

III.2.2. DETECTION DE *M. ulcerans* CHEZ LES INVERTEBRES

En Australie, plusieurs investigations ont abouti à la mise en évidence de *M. ulcerans* chez les moustiques qui sont proposés comme vecteurs potentiels de *M. ulcerans* [124-126]. En Afrique, c'est dans les insectes aquatiques comme la punaise d'eau (familles de *Belostomatidae* et *Naucoridae*), les coléoptères (famille de *Hydrophilidae*), l'escargot et dans les larves de luciole (ordre: *Odonata*, sous-ordre : *Anisoptères*) que l'ADN de *M. ulcerans* a pu être détecté. Il a été démontré que *M. ulcerans* se multiplie à l'intérieur des glandes salivaires de ces punaises aquatiques [68, 127-130]. Au Japon, trois membres d'une famille étaient atteints de l'ulcère de Buruli. L'ADN de *M. ulcerans* subsp *shinshuense* a été détecté dans les écrevisses capturées d'un canal d'eau stagnante dans la cour de leur maison. [131].

III.3. INFECTION NATURELLE DES ANIMAUX

III.3.1. MANIFESTATIONS CLINIQUES

La période d'incubation de la maladie chez les animaux est inconnue, mais des données suggèrent qu'elle peut être plus longue dans les cas des marsupiaux (opossums) que chez l'homme. Les symptômes chez les animaux imitent ceux des humains. La présentation clinique de l'infection à *M. ulcerans* la plus commune chez les animaux est un ulcère ou une lésion cutanée. Elle se localise en général sur la tête (nez, œil, oreille, sous le menton) (Figure 6), sur la patte (coussinets, tarse, métatarse, avant-bras, cuisse, aine) (Figure 7), et sur le scrotum, la croupe et la queue (Figure 8) [2, 113].

Généralement, la forme évolutive de l'infection chez les animaux se manifeste sous deux formes (non ulcérate et ulcérate). Les lésions peuvent être uniques ou multiples sous forme disséminée au niveau de la région atteinte. Elles sont souvent accompagnées d'une perte de poils [2, 10, 107, 111-114].

FORME NON ULCERATIVE :

Le nodule est une lésion ferme, indolore, souvent accompagnée d'un prurit, c'est pourquoi l'animal lèche parfois la partie atteinte. Environ 1 cm de diamètre, il est localisé dans les tissus sous-cutanés et en général adhérent à la peau.

L'œdème est une tuméfaction (gonflement) diffuse sous-cutanée, étendue, ferme, à bords mal définis. Elle peut s'étendre à une partie d'un membre ou à une grande partie de la face.

FORME ULCERATIVE :

C'est une lésion cutanée indolore, se caractérisant par une perte et encastré du tissu sous-cutané avec un centre nécrosé. Au début, l'ulcère est superficiel mais il évolue plus profondément avec des bords creusés et une induration environnante. En l'absence de surinfection, les ulcères restent indolores et n'ont pas d'odeur particulière.

AUTRES FORMES :

- Ostéomyélite : ce cas est apparu chez les koalas en se manifestant par une atteinte osseuse et un écoulement purulent au niveau de la mandibule et du radius [107].
- Infection systémique : chez les reptiles, l'infection à *M. ulcerans* chez une tortue n'a été diagnostiquée qu'en post mortem. La maladie a évolué sans signe d'infection externe. Le seul signe détecté était l'anorexie. A l'autopsie, la tortue a montré de multiples nodules blancs sur la surface de la capsule et le parenchyme de divers organes tels que le foie, la rate, l'intestin et les poumons [106] (Figure 9). D'autres membres inhabituels du complexe *M. marinum/M. ulcerans* étaient à l'origine de maladies chez des reptiles australiens : une tortue peinte, morte au Zoo Taronga (Sydney) avait été infectée, un python tapis présentait une granulomatose multifocale et un python tacheté souffrant d'anorexie et ayant une tendance à s'enrouler bizarrement, avait une infection systémique [132]. Chez les mammifères (potorou, koalas, marsupiaux) : les examens effectués à l'autopsie ont révélé la présence de *M. ulcerans* dans les organes internes ainsi que des lésions caractéristiques [10].
- Chez les amphibiens (*Xenopus tropicalis*), *M. ulcerans* ecovar *liflandii* peut entraîner un coelomitis (infection du cœlome / abdomen) et ultérieurement un œdème généralisé ou local (ballonnement) qui sont toujours mortels [56].



Figure 6. Photographie des ulcères et lésions à *M. ulcerans* au niveau de la tête chez les animaux

(A) Koala : ulcère au-dessus de l'œil gauche ; (B-D) Opossums : ulcères sur le nez ; (C) Alpagas : ulcère sur la face.

Source : adaptée par l'Auteur.



Figure 7. Photographie des ulcères et lésions à *M. ulcerans* au niveau de la patte chez les animaux

(A) Cheval : ulcère sur la cuisse ; (B-C-D) Chiens : ulcération extensive sur les tarses et métatarses ; (E) Potorou : ulcère sur le coussinet ; (F-G) Possums : ulcérations des métatarses.

Source : adaptée par l'Auteur.



Figure 8. Photographie des formes ulcératives de l'infection à *M. ulcerans* au niveau de la partie caudale chez les animaux

(A) Potoroo : ulcère sur la queue ; (B) Chien : ulcère sur la croupe ; (C) Possum à queue annelée : ulcères sur la queue et sur les oreilles.

Source : adaptée par l'Auteur.



Figure 9. Multiples nodules blancs jaunâtres sur la surface du poumon d'une tortue (*Lissemys punctata punctata*) dues à *M. ulcerans*

Source : Sakaguchi K, Iima H, Hirayama K, Okamoto M, Matsuda K, Miyasho T, et al. *Mycobacterium ulcerans* infection in an Indian Flap-Shelled Turtle (*Lissemys punctata punctata*). J Vet Med Sci. 2011;73(9):1217-20.

III.3.2. DIAGNOSTIC

Sur le plan clinique, il faut envisager une infection à *M. ulcerans* pour les animaux vivant en zone d'endémie connue qui présentent un ulcère sans autre cause apparente, généralement sur une extrémité et souvent avec des bords creusés. Le diagnostic biologique montre des BAAR dans les échantillons cliniques [133].

Au laboratoire, les méthodes de diagnostic biologique employées chez les animaux sont identiques à ceux des humains. Les types d'échantillons cliniques à prélever sont : les écouvillons (à sec ou en milieu de transport) qui sont prélevés notamment sous les bords décollés d'un ulcère, l'aspiration à l'aiguille fine qui peut être réalisée sur n'importe quelle lésion non ulcérate (les nodules, les formes œdémateuses) ou les ulcères qui n'ont pas de bords décollés [114], les tissus frais qui proviennent de la résection des lésions comportant tous les niveaux du tissu cutané et sous-cutané (conviennent le mieux en histopathologie), les coupes de tissus fixés inclus dans la paraffine et l'exsudat purulent (une exception dans le cas d'un cheval qui a donné des analyses positives en histopathologie et culture) [111].

L'examen direct des frottis : coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen qui met en évidence la présence de nombreux BAAR intracellulaires dans les macrophages et des BAAR extracellulaires. Ils sont plus nombreux au niveau de la zone de nécrose centrale [107, 111-114].

La culture in vitro : seuls les échantillons prélevés chez les chevaux et les koalas ont permis d'isoler *M. ulcerans* dans la culture sur le milieu de Löwenstein-Jensen. Dans le cas du cheval, l'incubation était à 30°C et la culture primaire était obtenue en 8 semaines. Pour les koalas, elle était à 32°C et 37°C [107, 111].

L'histopathologie : révèle également la présence de nombreux BAAR et permet de visualiser les modifications cutanées qui dépendent du stade d'évolution de la maladie. On observe des dégénérescences à divers stades avec l'infiltration d'un petit nombre de cellules inflammatoires. Il y a une nécrose de coagulation confluyente dans le derme profond, le tissu sous-cutané et l'aponévrose sous-jacente. La plupart des bacilles se trouvent dans les zones profondes de l'échantillon, on observe parfois une vascularite et les lésions s'étendent à la marge du tissu nécrosé.

La phase précoce de la guérison se caractérise par une réaction granulomateuse mal organisée dans le derme et le tissu sous-cutané. L'infiltration granulomateuse renferme des macrophages enflés (cellules épithéloïdes), des cellules géantes de Langhans et des lymphocytes, qui finissent par former des granulomes tuberculoïdes. On observe rarement les BAAR [112, 114].

L'amplification génique : la PCR (PCR classique ou PCR en temps réel) reposant sur la détection de la séquence d'insertion *IS2404* est la méthode de diagnostic moléculaire pour confirmer l'infection à *M. ulcerans* chez les animaux [10]. La fourniture d'un diagnostic étiologique rapide par PCR est extrêmement utile dans la formulation d'un pronostic et dans l'adoption d'un traitement adéquat [112]. Le typage moléculaire VNTR (nombre variable de répétition en tandem) pour 9 loci a permis de révéler que la souche de *M. ulcerans* infectant les animaux est de même profil génétique que celle infectant les humains [112].

III.3.3. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

Chez les animaux, à la phase d'ulcération établie, on pourra discuter plusieurs diagnostics, entre autres :

- Les autres infections mycobactériennes touchant principalement les chiens, les chats, les opossums ou les koalas : la tuberculose à localisation cutanée (*M. bovis*, *M. microti*), la panniculite causée par des mycobactéries à croissance rapide (*M. fortuitum*, *M. xenopi*), la lèpre féline et les granulomes léproïdes des chiens (*M. lepraemurium*), les infections cutanées aux membres du complexe *M. avium*, etc. [134-137] ;
- Les infections cutanées staphylococciques, streptococciques et autres germes atteignant souvent les extrémités. Elles se caractérisent par des lésions croûteuses et surtout par un état fébrile ;
- La phytiose (*Phytium insidiosum*) touchant les chevaux, les chiens et les chats : ce sont des granulomes d'évolution lente, caractérisée par un tropisme vasculaire, une atteinte systémique (vaisseaux), une atteinte des tissus mous (cellulite, abcès, ulcères) et une atteinte de l'œil (kératite) [138] ;

- L'ulcère phagédénique : il diffère de l'infection à *M. ulcerans* par son mode d'installation rapide et brutal et par son caractère douloureux ;
- Les ulcères traumatiques de la peau, les troubles circulatoires artério-veineux, diabète, affections malignes ;
- La maladie granulomateuse systémique causée par : *M. chelonei*, *M. marinum* et *M. kansasii* et l'ostéomyélite causée par *M. chelonae* chez la tortue [106].

Pour la phase pré-ulcérate, la présence d'un nodule sous-cutané, associé ou non à un œdème, fera évoquer de nombreuses hypothèses : lèpre, granulome à corps étranger, kyste sébacé, abcès, furoncle, réaction inflammatoire suite à une morsure ou piqûres par exemple. La biopsie, l'anatomopathologie et l'amplification génique sont nécessaires pour le diagnostic précoce de cette lésion pré-ulcérate qui ne provoque aucun trouble et passe ainsi souvent inaperçue chez l'animal [111-114].

III.3.4. TRAITEMENT

Il n'y a pas de traitement spécifique pour l'infection à *M. ulcerans* chez les animaux. Dans la faune sauvage, l'infection a été appelée à résoudre sans traitement comme dans le cas d'un phalanger renard et d'un phalanger de montagne [108]. Dans les cas graves, les animaux ont été euthanasiés. Après la confirmation du diagnostic par PCR, divers moyens thérapeutiques ont été utilisés chez les animaux domestiques, incluant l'antibiothérapie, le débridement chirurgical et la cryochirurgie. L'antibiothérapie consistait à utiliser l'association d'antibiotiques recommandés par l'OMS pour traiter l'ulcère de Buruli chez l'homme [139, 140]. Voici quelques exemples de schémas thérapeutiques qui ont été employés avec les résultats obtenus :

- Le traitement antibiotique seul, association Rifampicine - Ciprofloxacine, a permis de traiter avec succès un chien, alors qu'un cheval a été euthanasié après l'échec d'un traitement antibiotique non adapté (Gentamicine sulfate - Procaine Pénicilline) [111, 112] ;
- La combinaison de la chirurgie (débridement des ulcères) avec l'antibiothérapie (association Rifampicine - Clarithromycine) a permis de guérir un chien, un chat et des alpagas [112-114] ;

- La cryochirurgie : application de l'azote liquide sur toute l'étendue de la lésion ainsi qu'une marge de 1 cm autour de sa circonférence, suivi d'un traitement avec Sulfadimidine / Triméthoprime par voie orale a abouti à la guérison complète d'un cheval (Figure 10) [111] ;
- Sous peine de récurrence ou après un échec de traitement ou sans avoir traité l'infection, d'autres animaux ont été euthanasiés [111-114].

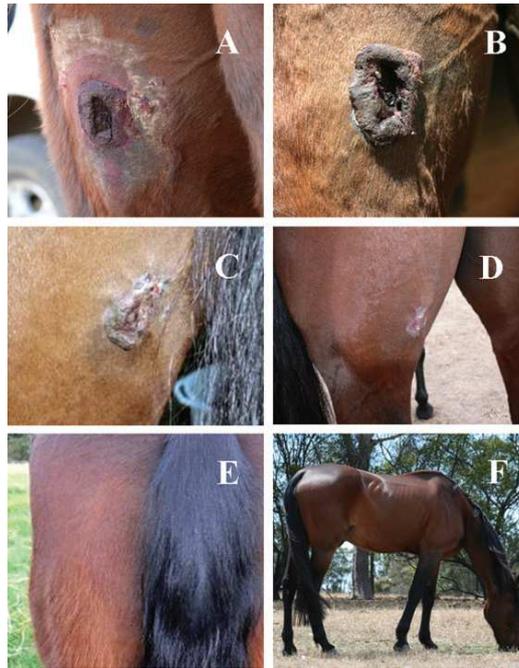


Figure 10. Photographie d'une série de lésions à *M. ulcerans* sur la partie caudale de la patte arrière d'un cheval

(A-E) : 2 semaines, 6 semaines, 3,5 mois et 4,5 mois, respectivement, après une biopsie et traitement de cryochirurgie ; (F) : le cheval suite à un rétablissement complet.

Source : van Zyl A, Daniel J, Wayne J, Mc Cowan C, Malik R, Jelfs P, et al. *Mycobacterium ulcerans* infections in two horses in south-eastern Australia. Aust Vet J. 2010;88:101-6.

III.4. INFECTION EXPERIMENTALE

Plusieurs études expérimentales ont été effectuées chez des animaux pour mieux comprendre l'épidémiologie, la pathogénie et connaître les modalités de traitement de l'ulcère de Buruli. L'inoculation expérimentale révèle les deux caractères de *M. ulcerans* : la nature nécrotique des lésions provoquées et le tropisme pour les endroits les plus froids de l'organisme [36, 141-144].

L'inoculation intradermique d'animaux sensibles provoque des lésions cutanées qui imitent celles décrites chez l'homme au site d'injection : apparition progressive d'érythème, papule, nodule, œdème, ulcère miné et contracture [36], et entraîne une infection systémique chez les lézards [141].

L'inoculation intraveineuse donne lieu à l'apparition des lésions au niveau des pattes, de la queue, du museau, des testicules, du tissu sous-cutané et aussi au niveau des poumons. Au niveau de la patte, la première manifestation est une nécrose du tissu conjonctif correspondant à des amas de BAAR très nombreux. Dans les poumons, on peut également trouver des endroits de nécrose de coagulation mais aussi des follicules, plus ou moins riches en BAAR et situés à côté d'une artériole [36].

Après injection intra péritonéale, une ascite, souvent hémorragique, peut s'installer après cinq à six mois. Le liquide est pauvre en BAAR mais à l'endroit de l'inoculation, on observe une escarre dont la structure histologique est en tout point comparable à celle des lésions humaines [36].

L'inoculation plantaire à la souris, au rat, au hamster produit en trois à six semaines (dépendant de la quantité de germes injectés) une rougeur et un gonflement évoluant vers l'ulcération et même l'amputation du membre. Souvent, il y a métastase à l'autre membre et aux testicules [36].

Après une injection, aussi bien dans la patte que dans les testicules, ou après une injection intraveineuse un certain nombre d'animaux développent un œdème sous-cutané considérable au niveau de l'abdomen et du thorax donnant à ces animaux un aspect très caractéristique « en boule ». L'examen histologique du tissu cutané révèle une nécrose du derme contenant des BAAR. Les résultats suggèrent que l'injection de *M. ulcerans* dans la peau facilite grandement l'infection et apporte son soutien pour le rôle d'un vecteur invertébré ou autre voie d'entrée comme une piqûre ou une lacération profonde où les bactéries seraient contenues dans la lésion. Une certaine quantité de *M. ulcerans* est nécessaire pour pouvoir provoquer une infection [36, 141-145].

DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

DEUXIEME PARTIE : METHODES ET RESULTATS

I. MATERIELS ET METHODES

I.1. CADRE, DUREE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de l'Unité des Mycobactéries de l'Institut Pasteur de Madagascar sis à Ambatofotsikely Antananarivo, dans le cadre d'une convention de stage entre l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM), la Faculté de Médecine de l'Université d'Antananarivo, le Département d'Enseignement des Sciences et de Médecine Vétérinaires (DESMV) et l'Auteur. Elle a été menée du 18 Novembre 2013 au 31 Juillet 2014.

L'objectif de cette étude est de mettre en place le diagnostic moléculaire de *M. ulcerans* par la méthode PCR.

I.2. MATERIELS

I.2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE

Deux souches de *M. ulcerans* ont été utilisées dans cette étude (Identifications : 12.26 et 12.29). Ces souches ont été isolées en 2012 au Centre Pasteur du Cameroun (CPC) puis repiquées au laboratoire de l'Unité des Mycobactéries à l'IPM.

I.2.2. EQUIPEMENTS

I.2.2.1. THERMOCYCLEURS

L'amplification génique par PCR est effectuée dans un appareil automatisé appelé « thermocycleur » :

- Les PCR classiques sont réalisées dans le thermocycleur « MultiGene, Labnet® » (Figure 11). L'appareil est muni d'un bloc thermique avec 96 puits où on incube les microtubes contenant le mélange réactionnel. Son couvercle chauffant presse les capuchons des tubes pour empêcher la formation de condensation. Il comporte un panneau d'affichage et un clavier qui permet de programmer, mémoriser et démarrer le programme d'amplification de la PCR.

- La PCR en temps réel est réalisée dans le thermocycleur «StepOne Real-Time PCR systems, Applied Biosystems®». Cet appareil dispose de 48 puits et il est relié à un ordinateur (Figure 12). En utilisant le logiciel «StepOne Software v.2.2.2® », les différents paramètres de l'amplification sont réglés et mémorisés sur l'ordinateur. Ce logiciel permet aussi d'enregistrer et d'analyser toutes les données tout au long de la réaction.



Figure 11. Thermocycleur MultiGene, Labnet® pour PCR classique

Source : Auteur.



Figure 12. Thermocycleur StepOne Real-Time PCR systems, Applied Biosystems® pour PCR en temps réel

Source : Auteur.

I.2.2.2. AUTRES MATERIELS

Plusieurs matériels de laboratoire et consommables ont été utilisés pour la réalisation de cette étude, voici quelques exemples :

- Bain-marie (Memmert)
- Incubateur (Dry bath FB 15103 Fischer Scientific)
- Vortex
- Microcentrifugeuse réfrigérée (Centrifuge 5402 Eppendorf)
- Microcentrifugeuse (Fisherbrand)
- Evaporateur Speed Vac
- Hotte
- Générateur (Consort) et cuve pour électrophorèse (Fisherbrand)
- Nanodrop Spectrophotometer 2000
- Scan gel
- Transilluminateur UV
- Micropipettes Pipetman P1000, P200, P100, P20, P10
- Microtubes 1,5 ml, 2 ml
- Microtubes 0,2 ml (PCR-React PP GE DECKEL FARBL 0,2 ML_DNA, RNA und RNase free, Life Science Products, réf. 06F/080321-179)
- Barrette (MicroAmpTM, PCR compatible DNA/RNA/Rnase Free, Applied Biosystems, réf. 4358293)

I.2.3. REACTIFS

La préparation des réactifs se fait en plusieurs étapes (annexe).

I.2.3.1. REACTIFS POUR L'EXTRACTION DE L'ADN GÉNOMIQUE

La méthode de VAN EMBDEN est la méthode d'extraction de l'ADN génomique standard employée au laboratoire de l'Unité des Mycobactéries à l'IPM. Les réactifs nécessaires pour cette méthode sont :

- Tris (Hydroxyméthyl aminométhane) (SIGMA, réf. 80K5412)
- EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) (SIGMA, réf. 070M0262V)
- TE 1X (Tris EDTA)
- Lysozyme 10mg/ml (SIGMA, réf. 53H7154)
- SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate) (SIGMA, réf. SLBH0710V)
- Protéinase K 10mg/ml (EUROBIO, réf. 069829)
- NaCl 5M (Chlorure de Sodium) (PROLABO, réf. 27810.295)
- CTAB (Bromure de cétylméthylammonium) 10% (SIGMA, réf. 036K0145) / NaCl 0,7M (PROLABO, réf. 27810.295)
- Chloroforme (SIGMA, réf. SZBA1320) / Alcool isoamylique (PROLABO, réf. 032BR) (24:1)
- Isopropanol (PROLABO, réf. 20842.298)
- Ethanol 70% (PROLABO, réf. 20821.296)

I.2.3.2. REACTIFS POUR L'AMPLIFICATION GENIQUE (PCR)

Les réactifs nécessaires pour l'amplification génique par PCR sont :

- Eau purifiée HPLC (High-performance liquid chromatography) Gradient Grade (réf. 1346537)
- Tampon d'amplification 10X (INVITROGEN, réf. 585060)
- MgCl₂ 25 mM (Chlorure de magnésium) (INVITROGEN, réf. 368998)
- DMSO (Diméthylsulfoxyde) (F-515, réf. 68 et 72)
- dNTP (Désoxynucléosides triphosphates : dATP, dGTP, dCTP et dTTP) 10 mM et 2 mM (SIGMA, réf. SLBF6924V)
- Taq polymérase 5 unités/μl (INVITROGEN, réf. 520169)
- Amorces sens (Forward) et anti-sens (Reverse):
 - MU1-new 20μM (SIGMA, réf. 8016324581-000010)
 - MU2 20μM (SIGMA, réf. 8016324581-000020)
 - MUF1 5pmol/μl (SIGMA, réf. 8016324581-000030)
 - MUR1 5pmol/μl (SIGMA, réf. 8016324581-000040)
- Sonde MUFT1 5pmol/μl (SIGMA, réf. 8016814903-000010)

I.2.3.3. REACTIFS POUR L'ELECTROPHORESE

Les réactifs nécessaires pour l'électrophorèse sur gel d'agarose sont :

- Poudre d'agarose (INVITROGEN, réf. 0000237816)
- Eau distillée stérile
- Tampon TBE 1X
- BET (Bromure d'éthidium) 10mg/ml (SIGMA, réf. E8751)
- Bleu 6X (Sucrose 40%, Blue bromophenol; SIGMA, réf. S-0389, B-6131)
- Marqueur de poids moléculaire λ DNA 50 ng/μl (SIGMA, réf. D 9780)
- Marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder 0,1 μg/μl (SOLIS BIODYNS, réf. 100pb BPB 0160)

I.3. METHODES

I.3.1. MESURES DE SECURITE AU LABORATOIRE

Toutes les manipulations au laboratoire nécessitent l'application stricte des règles d'hygiène et de sécurité. Chaque local est conçu pour une ou plusieurs activités précises. Le port de gants stériles, de blouse propre et de calot est indispensable pour protéger les manipulateurs contre les différents risques au laboratoire et pour éviter la contamination de la manipulation. Les gants doivent être changés de temps en temps durant les différentes manipulations. Les manipulations doivent se faire autant que possible dans la glace afin de préserver les réactifs et la préparation. Certaines de ces différentes étapes de la manipulation décrites ci-dessous ont été effectuées sous hotte Poste de Sécurité Microbiologique (PSM). Une lumière Ultra-violet (UV) est allumée pendant 15 minutes avant de quitter la salle après chaque manipulation sous hotte.

Les consommables et les autres matériels utilisés sont stériles et à usage unique, sinon, ils doivent être nettoyés, désinfectés et passés à l'autoclave avant chaque utilisation. Après chaque manipulation, la paillasse doit être rangée, nettoyée et désinfectée.

I.3.2. REPIQUAGE DES SOUCHES DE *M. ulcerans*

Les deux souches 12.26 et 12.29 ont chacune été repiquées en 4 tubes de culture. Le repiquage consiste à ensemercer les souches de *M. ulcerans* sur le milieu de Löweinsten-Jensen (LJ) afin d'obtenir assez de colonies homogènes. Pour favoriser la croissance des souches isolées, un bouillon DUBOS a été ajouté dans le milieu. Le traitement des micro-organismes vivants s'effectue dans un local réservé dont l'accès est règlementé, au laboratoire NSB3 (Niveau de sécurité biologique 3).

Protocole de repiquage :

Le repiquage se fait comme suit :

- Identifier les tubes LJ : identifiant de la souche et date de manipulation ;
- Verser 200 µl de Dubos dans les tubes LJ ;

- Prélever quelque colonies à l'aide d'une öese ;
- Ensemencer les colonies dans les tubes LJ : repartir les colonies à la surface du milieu incliné ;
- Ranger les tubes en position couchée et bouchon dévissé sur un plateau ;
- Incuber les tubes dans l'étuve à 30°C ;
- Surveiller régulièrement l'évaporation de liquide (3-6 jours) avant de revisser les tubes ;

La lecture est faite une fois par semaine. Les cultures ont donné des résultats positifs à la sixième semaine avec un nombre de colonies estimé entre 200 à 300 par tube.

I.3.3. EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE PAR LA METHODE DE VAN EMBDEN

I.3.3.1. PRINCIPE

La technique d'extraction d'ADN utilisée dans cette étude est celle décrite par van Embden, et al. [146]. Elle consiste à tuer les mycobactéries, puis extraire et purifier l'ADN génomique. Sous l'action de la chaleur, les souches mycobactériennes en suspension sont tuées. L'action combinée du lysozyme et de la protéinase K permet la lyse bactérienne et la libération de l'acide nucléique dans la solution.

Le lysozyme détruit la paroi bactérienne en catalysant l'hydrolyse des muropeptides qui forment la couche rigide de la paroi bactérienne. La protéinase K, une protéase active à 65°C, digère les protéines membranaires, intracellulaires, notamment celles qui sont liées à l'ADN. Cette action de la protéinase K est combinée avec le SDS, un puissant détergent qui est aussi un agent dénaturant. L'ADN libéré sera ensuite extrait ou isolé par l'action du chloroforme-alcool isoamylique en milieu hyper salé et en présence du CTAB. Le CTAB permet l'élimination des débris cellulaires, des protéines non digérées et des polysaccharides par précipitation et aussi par l'extraction sélective au chloroforme-alcool isoamylique. L'ADN est précipité en présence d'isopropanol, puis purifié par l'éthanol 70% qui permet l'élimination des sels.

I.3.3.2. TECHNIQUE

L'extraction de l'ADN génomique de *M. ulcerans* a été faite selon les étapes suivantes :

Première étape : Inactivation

Des colonies de *M. ulcerans* ont été prélevées sur le milieu LJ à l'aide d'une pipette et mises en suspension dans 500 µl de tampon TE 1X dans un microtube à vis 2 ml, puis incubées au bain marie sec à 80°C pendant 20 minutes.

Deuxième étape : Lyse – Purification – Précipitation

Après refroidissement à température ambiante, 50 µl de Lysozyme à 10 mg/ml ont été ajoutés dans la suspension. Le tout a été mélangé au vortex puis incubé à 37°C pendant au moins une heure au bain-marie. Après ajout de 75 µl de solution SDS (10%) / Protéinase K (10 mg/ml) [75µl/5µl], l'ensemble a été mélangé au vortex puis incubé à 65°C au bain marie pendant 10 minutes. La concentration en sel dans le tube a été augmentée avec 100 µl de NaCl 5M afin d'éviter la formation de précipité acide nucléique-CTAB. Ensuite, un volume 100 µl de solution CTAB/NaCl 0,7M préchauffée à 65°C a été ajouté, puis le mélange a été vortexé jusqu'à l'obtention d'une solution à aspect laiteux et incubé ensuite à 65°C pendant 10 minutes. Le mélange a été transvasé dans un microtube 1,5 ml et additionné d'un volume de 750 µl de chloroforme/alcool isoamylique [24/1]. Après mélange par inversion du tube, il a été centrifugé à 10 000 rpm, pendant 5 minutes à température ambiante (Centrifuge Eppendorf 5402). La centrifugation a permis d'obtenir deux phases : aqueuse et organique. L'ADN est soluble dans la phase aqueuse alors que les débris cellulaires se trouvent dans la phase organique.

Le surnageant aqueux contenant l'ADN a été ensuite récupéré dans un autre microtube. L'ADN a été précipité par addition de 500 µl d'isopropanol. Après agitation, le mélange a été incubé à – 20°C pendant au moins une heure.

Troisième étape : Lavage

Après une centrifugation à 10 000 rpm pendant 5 minutes à 27°C, le surnageant a été jeté. Le culot d'ADN a été ensuite rincé avec 1 ml d'éthanol 70°C, puis à la suite d'une nouvelle centrifugation à 10 000 rpm pendant 5 minutes à 27°C, le surnageant a été jeté. Pour bien éliminer le reste du surnageant, une centrifugation pendant quelques secondes a été effectuée et le surnageant aspiré à l'aide d'une micropipette. Le culot a été séché à 37°C pendant 10 minutes au Speed Vac, le tube ouvert. Enfin, le culot d'ADN a été remis en suspension dans 50 à 75 µl de TE 1X (en fonction du culot) pendant 24 heures à 4°C.

Les ADN extraits sont conservés à – 20°C.

I.3.4. PREPARATION DES ADN DE TRAVAIL

I.3.4.1. QUANTIFICATION DE L'ADN

I.3.4.1.1. ELECTROPHORESE SUR MINIGEL D'AGAROSE 0,8%

- **PRINCIPE**

L'électrophorèse sur gel à base d'agarose associée au bromure d'éthidium (BET) est une des techniques qui permet de quantifier l'ADN extrait. Comme l'ADN est une macromolécule chargée négativement, sous l'effet d'un champ électrique homogène, il migre de la cathode (-) vers l'anode (+) à travers la matrice du gel d'agarose dans un tampon de migration TBE 1X. Le BET est un réactif intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice. Cette molécule naturellement non fluorescente présente une fluorescence (rouge orangé) lorsqu'elle est intercalée entre les bases nucléiques et après excitation aux longueurs d'ondes ultraviolettes (UV). Le principe de la quantification consiste à mesurer l'intensité de la fluorescence émise par l'ADN sur le gel contenant du BET. La fluorescence est proportionnelle à la quantité de l'ADN. La quantité d'ADN est estimée à partir du marqueur de taille moléculaire.

- **TECHNIQUE**

Pour préparer un minigel d'agarose 0,8% (taille 65 × 90 mm), 0,2 g d'agarose ont été mélangés à 25 ml de tampon TBE 1X dans un erlenmeyer, puis le mélange a été chauffé au four micro-onde pour faire fondre l'agarose jusqu'à avoir une solution limpide. Après refroidissement à une température d'environ 55°C (température supportable au toucher), 2 µl de BET 10mg/ml ont été ajoutés, le tout mélangé doucement sans faire de bulles. Le gel a été coulé sur le moule à électrophorèse horizontale muni d'un peigne dont les dents formeront les puits pour le dépôt des échantillons, puis solidifié à température ambiante pendant 20 minutes. Une fois que le gel s'est solidifié, le peigne a été retiré et le moule a été placé dans la cuve à électrophorèse contenant le tampon de migration TBE 1X.

Un mélange de 3 µl d'eau distillée stérile, 1 µl de bleu 6X et 2 µl d'ADN a été déposé dans chaque puits du gel. 2 µl de marqueur de taille moléculaire λ DNA 50 ng/µl ont été déposés dans les deux puits se trouvant à chaque extrémité du gel. Le bleu de bromophénol 6X est un tampon de charge qui densifie et colore la solution, ce qui permet de suivre la migration.

La migration a été réalisée sous une tension de 120 volts pendant 30 minutes. Le gel a été visualisé et photographié sous un transilluminateur UV.

La quantité d'ADN extrait a été ensuite estimée pour chaque dépôt en comparant l'intensité de la bande d'ADN à celles des marqueurs de taille moléculaire λ DNA 50 ng/µl.

Il est à noter que le BET est un produit dangereux, il possède un effet mutagène et doit être manipulé avec précaution. Les indications recommandent pour sa manipulation de porter des gants en vinyle.

I.3.4.1.2. DOSAGE SUR LE SPECTROPHOTOMETRE, NANODROP 2000

L'appareil Nanodrop 2000 Spectrophotometer® permet de quantifier et évaluer la qualité des ADN extraits. Il est lié à un ordinateur et en utilisant le logiciel « NanoDrop 2000 Software® », différents paramètres peuvent être mesurés. Les acides nucléiques ont la propriété d'absorber les rayons UV à une longueur d'onde de 260 nm grâce aux composés aromatiques présents dans leur structure moléculaire.

La concentration des ADN est déterminée par une mesure effectuée à 260 nm (A_{260}) contre un échantillon appelé « blanc », à partir d'un volume de 1 μ l d'ADN.

Une unité d'absorbance à 260 nm correspond à 50 ng d'ADN par μ l de solution à pH neutre (1 DO = 50 ng/ μ l). La concentration C des ADN est obtenue par la relation :

$$C = 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times A_{260}$$

Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A_{260}/A_{280} est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN devrait avoir un ratio d'environ 1,8 (+ ou - 0,1). L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides ou les phénols. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A_{260}/A_{230} devrait être d'environ 1,8 - 2,2 (Tableau I).

Tableau I. Exemple de quantification des ADN extraits sur Nanodrop 2000

N°	ID	Concentration	A260	260/280	260/230
	échantillon	ADN			
1	26.1	141,7 ng/μl	2,834	1,8	0,97
2	26.2	171,2 ng/μl	3,42	1,34	1,34
3	26.3	234,3 ng/μl	4,69	1,87	1,54
4	29.1	26,7 ng/μl	0,534	1,57	0,25
5	29.2	30,2 ng/μl	0,6	1,56	0,5
6	29.3	24 ng/μl	0,48	1,65	0,53

I.3.4.2. DILUTION DES ADN EXTRAITS

La mise en place des deux méthodes de PCR a été effectuée à partir des ADN extraits dilués à 2 ng/μl. Mais pour connaître les seuils de détection des PCR, deux séries de dilutions des ADN dans l'eau distillée stérile ont été réalisés : dilution au demi (1/2) et dilution au dixième (1/10).

Première série de dilutions : dilution au ½

La première étape consiste à diluer la solution mère pour avoir 4 ng/μl. Ensuite, six dilutions successives ont été effectuées à partir de 4 ng/μl jusqu'à obtenir 0,125 ng/μl. Les concentrations finales seront donc : 4 ng/μl, 2 ng/μl, 1 ng/μl, 0,5 ng/μl, 0,25 ng/μl, 0,125 ng/μl.

Deuxième série de dilutions : dilution au 1/10

La dilution des solutions mères pour avoir 10 ng/μl a été effectuée, puis huit séries de dilution successives à partir de 10 ng/μl jusqu'à obtenir 10⁻⁶ ng/μl. Les concentrations finales seront donc : 10 ng/μl, 1 ng/μl, 1.10⁻¹ ng/μl, 1.10⁻² ng/μl, 1.10⁻³ ng/μl, 1.10⁻⁴ ng/μl, 1.10⁻⁵ ng/μl, 1.10⁻⁶ ng/μl.

Les ADN dilués sont conservés à - 20°C.

Pour chaque technique de PCR expérimentée, un volume de 5 μl d'ADN a été ajouté dans chaque mix correspondant. La quantité d'ADN dans chacune des réactions pour les deux séries de dilutions est donnée dans le tableau II.

Tableau II. Quantité d'ADN dans chaque réaction PCR correspondante pour les deux séries de dilutions d'ADN à tester

Dilution au 1/2			Dilution au 1/10		
N°	Quantité/μl (en ng)	Quantité/réaction (en ng)	N°	Quantité/μl (en ng)	Quantité/réaction (en ng)
1	4	20	1	10	50
2	2	10	2	1	5
3	1	5	3	1.10 ⁻¹	0,5
4	0,5	2,5	4	1.10 ⁻²	0,05
5	0,25	1,125	5	1.10 ⁻³	5.10 ⁻³
6	0,125	0,625	6	1.10 ⁻⁴	5.10 ⁻⁴
			7	1.10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁵
			8	1.10 ⁻⁶	5.10 ⁻⁶

I.3.5. PCR CLASSIQUES

Deux protocoles de PCR classique ou conventionnelle ont été testés : l'un est celui publié par l'OMS en 2001 [22], également repris dans son nouveau manuel « Diagnostic de l'ulcère de Buruli au laboratoire » en 2014 [23]. L'autre est celui mis au point par le Docteur Sara EYANGO du Centre Pasteur du Cameroun (protocole du CPC, communication personnelle) [147]. La mise en place de ces deux protocoles de PCR classique a été d'abord effectuée avec les échantillons d'ADN de *M. ulcerans* extraits dilués à 2 ng/μl. Ensuite, l'étude de la sensibilité des deux protocoles a été effectuée avec les deux séries de dilutions d'ADN.

I.3.5.1. PRINCIPE

La PCR (« Polymérase Chain Reaction » ou Réaction en Chaîne par Polymérase) est une technique de biologie moléculaire permettant l'amplification de séquences spécifiques d'ADN, mise au point par Kary Mullis dans les années 80. Elle permet de générer des dizaines de milliards d'exemplaires d'un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt, ADN d'intérêt ou ADN cible) à partir de séquences spécifiques d'oligonucléotides de synthèse, appelées amorces.

Ces amorces sont spécifiques de la séquence à amplifier et encadrent celle-ci. La PCR repose sur deux principes : la complémentarité des brins nucléotidiques de l'ADN (A avec T et C avec G) et l'activité enzymologique 5' → 3' de la Taq ADN polymérase thermostable permettant d'assembler à la chaîne les désoxynucléotides (dNTP) selon la complémentarité avec l'ADN à copier en fonction de la température et en présence de tous les composants nécessaires.

La PCR est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN (ADN matriciel), la Taq polymérase, les amorces et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP : dATP, dGTP, dCTP et dTTP) en excès dans une solution tampon. Les tubes contenant les mélanges sont soumis à des cycles de température réitérés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur.

La PCR comprend plusieurs étapes (Figure 13) :

Première étape : La dénaturation

- La dénaturation initiale : elle consiste à chauffer le mélange à 94 ou 95°C pendant quelques minutes au début de la PCR. Ce qui permet de déshybrider l'ADN double brin, de casser la structure de la double hélice, d'homogénéiser le milieu réactionnel par le phénomène d'agitation thermique, et enfin de dénaturer les autres enzymes qui pourraient se trouver dans la solution.
- La phase dénaturation proprement dite : c'est l'étape de chauffage qui se répète à chaque cycle de PCR. Elle permet de dénaturer le double brin d'ADN, de décrocher les polymérases qui sont encore fixées à la matrice, et d'homogénéiser le milieu réactionnel.

Deuxième étape : L'hybridation

Elle permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider à leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN matrice, grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable (généralement comprise entre 40 – 70°C). Cette diminution de température permet aux liaisons hydrogène de se former et donc aux brins complémentaires de s'hybrider.

Troisième étape : L'élongation (polymérisation)

Cette phase s'effectue à une température d'élongation de 72°C. A cette température, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténaux amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléotides présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées.

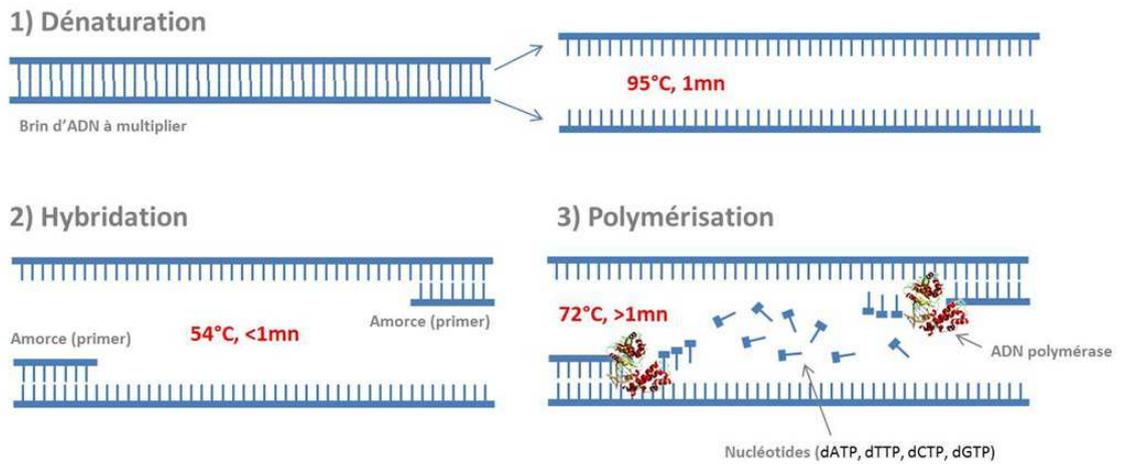


Figure 13. Illustration des différentes étapes de la PCR classique

Source : Auteur

I.3.5.2. LES AMORCES

Le gène de l'ADN cible de *M. ulcerans* dans cette étude est la séquence d'insertion IS2404. Les amorces sens MU1-new et anti-sens MU2 spécifiques de l'IS2404 sont celles décrites par l'OMS en 2001 (tableau III) [22, 23]. Les positions respectives de ces amorces sur le gène sont : positions 325 à 344 et positions 840 à 821 (numéro d'accèsion GenBank U38540). Ces amorces génèrent 515 paires de base (pb) d'amplicons.

Tableau III. Amorces sens et anti-sens des PCR classiques

Amorce	Séquence 5' → 3'	T _m ^o *
Sens : MU1-new	GAT CAA GCG TTC ACG AGT GA	64,1
Anti-sens : MU2	GGC AGT TAC TTC ACT GCA CA	61,6

* **T_m** : Température de fusion ou « Melting Temperature »

La préparation des amorces a été effectuée dans la salle mix, sous hotte et les réactifs ont été placés dans un bac à glace. La paire d'amorces a été fournie sous forme lyophilisée (SIGMA ALDRICH). Chaque amorce a été reprise dans de l'eau purifiée HPLC pour avoir une solution stock de concentration 100 μM .

Des aliquots de 50 μl de la solution stock 100 μM ont été conservés à -20°C . D'autres ont été dilués au 1/5 avec de l'eau purifiée HPLC pour avoir les solutions de travail 20 μM qui sont aussi conservés à -20°C .

I.3.5.3. PCR CLASSIQUE : PROTOCOLE DE L'OMS

I.3.5.3.1. PREPARATION DU «MIX» OU MELANGE REACTIONNEL

Pour éviter toute éventuelle contamination, la préparation de la réaction PCR a été effectuée dans 2 pièces différentes :

- La salle « mix » pour préparer le mélange de réactifs ;
- La salle où a été faite l'addition des ADN.

La préparation a été effectuée sous hotte et maintenue dans la glace pour éviter la dégradation des réactifs. La composition du mélange réactionnel est donnée dans le tableau IV.

Le mix nécessaire pour le nombre de tubes a été préparé dans un microtube de 1,5 ml. Il a été mélangé au vortex, puis centrifugé pendant quelques secondes. Ensuite, un volume réactionnel de 15 μl a été distribué dans chaque microtube de 0,2 ml avant l'ajout des ADN. Pour les témoins négatifs, 5 μl d'eau purifiée HPLC ont été ajoutés à la place des ADN, dans la salle mix.

Tableau IV. Composition et volume des réactifs pour PCR classique, protocole de l'OMS

Réactifs	Volume par réaction (μl)	Concentration finale (20 μl réaction)
Eau purifiée HPLC	9	
Tampon 10X	2	1X
MgCl ₂ 25 mM	1,2	1,5 mM
dNTP 2 mM	2	0,2 mM
MU1-new 20 μ M	1	1 μ M
MU2 20 μ M	1	1 μ M
Taq polymérase 5 unités/ μ l	0,2	0,05 unités/ μ l
Volume total	16,4	

I.3.5.3.2. AJOUT DE L'ADN

L'addition d'ADN a été faite dans la salle dédiée à cela et effectué sous hotte. Un volume de 5 μ l d'ADN a été ajouté dans chaque microtube correspondant contenant le mix.

I.3.5.3.3. AMPLIFICATION

Les microtubes bien fermés contenant la réaction (mix et ADN) ont été mis dans le thermocycleur MultiGene, Labnet®. L'amplification par PCR a été effectuée selon le programme suivant :

- Une dénaturation initiale de 94°C pendant 4 minutes ;
- 35 cycles comprenant chacun :
 - Une dénaturation de 94°C pendant 40 secondes ;
 - Une étape d'hybridation de 60°C pendant 40 secondes ;
 - Une étape d'extension de 72°C pendant 40 secondes ;
- Une élongation finale de 72°C pendant 5 minutes.

Les produits de la PCR ont été conservés à + 4°C avant l'électrophorèse.

La durée cette amplification sur le thermocycleur MultiGene est de 2 heures 30 minutes.

I.3.5.4. PCR CLASSIQUE : PROTOCOLE DE SARA EYANGO (CPC)

I.3.5.4.1. PREPARATION DU MIX ET AJOUT DE L'ADN

Les conditions de préparation du mix et d'addition d'ADN sont identiques à celles citées ci-dessus. Un volume réactionnel de 20 µl a été distribué dans les microtubes pour la PCR. Puis, un volume de 5 µl de chaque échantillon d'ADN a été ajouté.

La composition du mélange réactionnel est donnée dans le tableau V.

Tableau V. Composition et volume des réactifs pour PCR classique, protocole selon Sara EYANGO

Réactifs	Volume par réaction (μl)	Concentration finale (25 μl réaction)
Eau purifiée HPLC	11,3	
Tampon 10X	2,5	1X
MgCl ₂ 25 mM	2	2 mM
DMSO	2,5	
dNTP 10 mM	0,5	0,2 mM
MU1-new 20 μ M	0,5	0,4 μ M
MU2 20 μ M	0,5	0,4 μ M
Taq polymérase 5 unités/ μ l	0,2	0,04 unités/ μ l
Volume total	20	

I.3.5.4.2. AMPLIFICATION

La PCR a été réalisée dans le thermocycleur MultiGene, Labnet® selon le programme suivant, elle dure 3 heures 30 minutes :

- Une dénaturation initiale de 95°C pendant 5 minutes ;
- 40 cycles comprenant chacun :
 - Une dénaturation de 95°C pendant 1 minute ;
 - Une étape d'hybridation de 57°C pendant 1 minute ;
 - Une étape d'extension de 72°C pendant 1 minute ;
- Une élongation terminale de 72°C pendant 5 minutes ;

Les produits de la PCR ont été conservés à + 4°C avant l'électrophorèse.

I.3.5.5. ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE 2%

I.3.5.5.1. PRINCIPE

L'électrophorèse sur gel d'agarose est l'une des techniques qui permettent d'interpréter les résultats du diagnostic par PCR classique pour vérifier la présence et la taille des amplicons.

Elle permet la migration et la visualisation des molécules de poids moléculaire différents. Le résultat positif donne une bande correspondant à la taille des amplicons attendus en comparant avec le marqueur de poids moléculaire.

Dans cette étude, les mêmes préparations ont été effectuées pour les deux protocoles de PCR classique.

I.3.5.5.2. PREPARATION DU GEL D'AGAROSE 2%

L'électrophorèse a été effectuée dans la salle post-PCR.

Dans un erlenmeyer contenant 200 ml de TBE 1X, 4 g de poudre d'agarose ont été ajoutés. Le mélange a été chauffé au four à micro-ondes pendant quelques minutes jusqu'à l'obtention d'une solution parfaitement limpide, après disparition complète des bulles. La solution a été laissée refroidir jusqu'à environ 55°C, puis 10 µl de BET (10mg/ml) ont été ajoutés. Les peignes ont été installés et l'agarose a été coulée à l'horizontale dans le moule (taille 100 × 150 mm) puis laissée refroidir pour polymériser le gel pendant environ 30 minutes. Les peignes ont été ensuite retirés. Puis le moule contenant le gel a été baigné dans un tampon TBE 1X dans la cuve à électrophorèse en respectant la polarité lors du branchement (les puits du côté de l'électrode chargée négativement).

I.3.5.5.3. ELECTROPHORESE ET

VISUALISATION DES PRODUITS PCR

Les produits de la PCR ou amplicons ont été migrés sur le gel d'agarose 2% selon les étapes suivantes :

- Préparation des échantillons : un volume de 9 μl des produits de la PCR de chacun des échantillons a été bien mélangé avec 1,8 μl de bleu de bromophénol 6X sur un papier parafilm.
- Dépôt des échantillons : une fois tous les échantillons prêts, le mélange a été déposé délicatement dans chaque puits du gel correspondant suivant un plan de dépôt préétabli. Dans le premier et le dernier puits, 4 μl de marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ont été déposés.
- Migration : la cuve à électrophorèse a été branchée au générateur en respectant la polarité. La migration a été réalisée à 120 volts pendant 45 minutes.
- Visualisation : le gel a été récupéré et placé sur la plaque de l'appareil « Scan Gel» relié à un ordinateur. Il a été ensuite visualisé par transillumination aux UV (260 – 320 nm) en utilisant le logiciel « Infinity Capt ». La photo du gel a été prise et enregistrée sous format JPEG dans un fichier de l'ordinateur.

I.3.5.6. INTERPRETATION DES RESULTATS

Elle consiste à déterminer la présence ou non d'une bande correspondant à la taille du fragment attendue pour chacun des échantillons déposés en comparant avec le marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Chaque échantillon doit être interprété dans l'ordre de dépôt. Les résultats sont validés si le témoin négatif est bien négatif (pas de bande).

Pour les deux protocoles de PCR classique, la taille des amplicons attendue est de **515 pb**.

I.3.6. PCR EN TEMPS REEL TAQMAN

Le protocole de PCR en temps réel adopté dans cette étude est celui mis au point par le Dr Sara EYANGO du Centre Pasteur du Cameroun (protocole du CPC, communication personnelle) [147]. La gamme de dilution d'ADN au $\frac{1}{2}$ a été d'abord expérimentée puis la gamme de dilution au $\frac{1}{10}$.

I.3.6.1. PRINCIPE

La PCR en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique) avec pour différence une amplification mesurée non pas en fin de PCR mais tout au long de la réaction, donc en temps réel.

A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale. Plusieurs systèmes de détection sont utilisés pour la détection ou la quantification du signal fluorescent en temps réel.

Ils sont divisés en 2 groupes : les agents intercalants et les sondes. Dans cette étude, la méthode de PCR utilisant la sonde a été adoptée : la PCR en temps réel TaqMan ou hydrolyse de sondes. Cette sonde est une séquence d'oligonucléotides spécifiques du fragment d'ADN cible. La sonde est marquée à son extrémité 5' par un fluorochrome émetteur « reporter » FAM (6 carboxyfluorescéine), et à son extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur « quencher » fluorescent TAMRA (6-carboxy-N,N,N',N'-tetraméthylrhodamine), qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité l'un de l'autre. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase. Le reporter ainsi séparé du quencher émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation (Figure 14). La spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde réduisant significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mésappariements ou des dimères d'amorces.

Les différentes étapes de la PCR TaqMan sont :

- **La dénaturation :** elle permet de déshybrider l'ADN double brin, d'homogénéiser le milieu réactionnel ;
- **L'hybridation :** elle permet aux amorces sens et anti-sens, ainsi qu'à la sonde, de s'hybrider à leur séquence complémentaire sur les brins d'ADN matrice ;

- **L'élongation** : pendant cette phase, l'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire à partir du brin matrice, ceci grâce aux désoxyribonucléotides libres dans la réaction ainsi qu'à une température favorable. C'est également au cours de cette étape que l'ADN polymérase va cliver la sonde, entraînant libération du reporter permettant ainsi l'émission de fluorescence. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation.

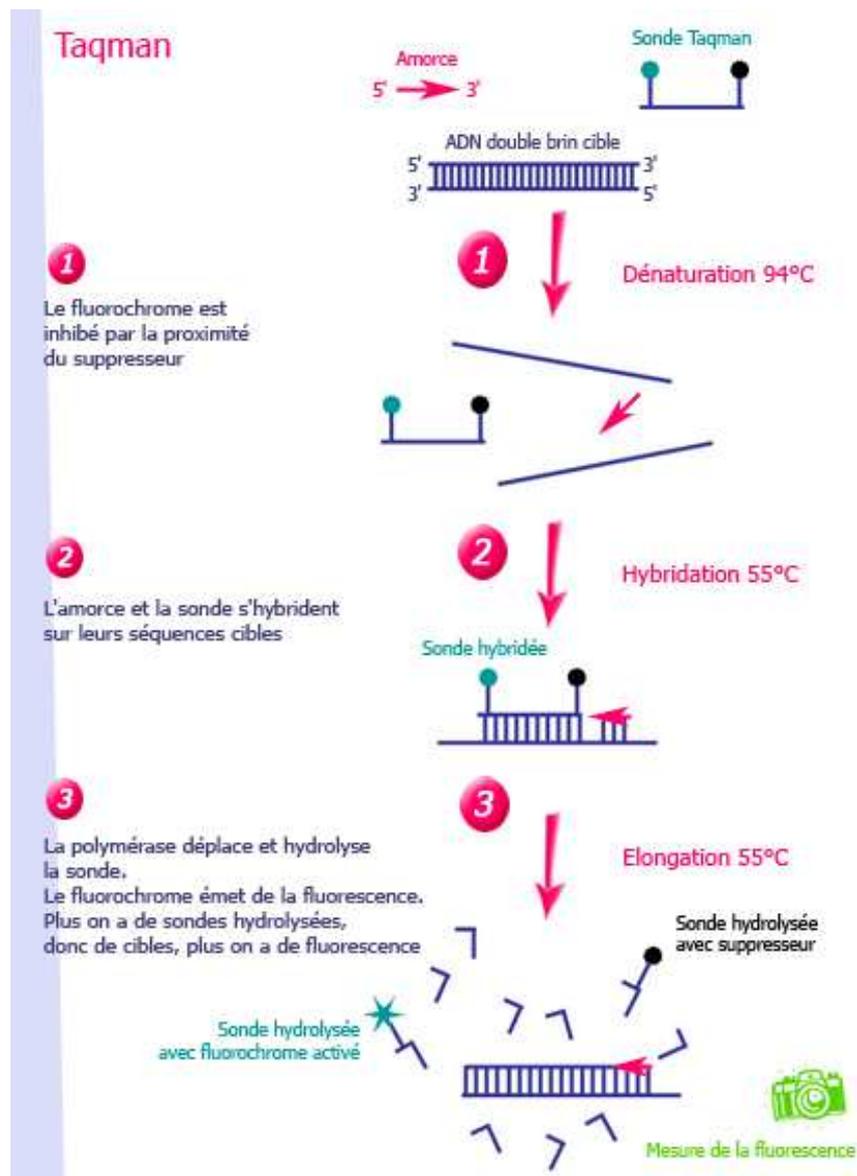


Figure 14. Principe de la PCR en temps réel TaqMan

Source : Institut Louis Malardé. PCR en temps réel. Disponible à <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel> (accès le 28 Novembre 2013).

Les résultats sont collectés et analysés au cours de l'amplification, dont l'évolution est représentée graphiquement sous forme de courbes sigmoïdes. C'est la courbe d'amplification qui représente l'intensité de la fluorescence émise par rapport au nombre de cycles de PCR. En général, la fluorescence est mise à l'échelle logarithmique dans la courbe d'amplification.

Les caractéristiques d'une courbe d'amplification typique de la PCR en temps réel sont les suivantes (Figure 15) :

- La phase d'initiation : la quantité de fragments amplifiés est encore insuffisante pour générer une fluorescence supérieure à la ligne de base. Les réactifs sont en excès mais à une concentration assez faible afin d'éviter que la renaturation des brins d'ADN n'entre en compétition avec l'hybridation des amorces.
- La phase exponentielle : les fragments amplifiés émettent des signaux fluorescents supérieurs au seuil de détection. L'amplification se fait de façon exponentielle ; cette phase est représentée sous forme de droite sur la courbe. La quantité d'ADN matrice est le seul facteur limitant.
- La phase plateau : les réactifs commencent à manquer et deviennent des facteurs limitants. L'ADN polymérase s'épuise en premier, puis les autres réactifs comme les dNTP, les amorces et sondes. De plus, les amplicons s'accumulent dans le milieu réactionnel, entrant en compétition avec l'hybridation des amorces. L'activité de l'ADN polymérase diminue peu à peu jusqu'à devenir nulle, donc la fluorescence également. Il en résulte un amortissement au niveau de la courbe, puis un plateau.

La ligne de base représente une ligne ajustée à l'intensité de fluorescence émise lors des premières étapes de la PCR. La fluorescence ne connaît encore que très peu de changement. La ligne seuil est une ligne juste supérieure à la ligne de base, correspondant au signal de fluorescence minimum et significatif pour le thermocycleur.

Dans cette étude, l'intensité de la fluorescence est représentée en fluorescence normalisée générée par le fluorochrome émetteur au cours de chaque cycle de la PCR (ΔR_n). Le ΔR_n est calculé automatiquement par la formule :

$$\Delta R_n = \text{fluorescence lors du cycle} - \text{fluorescence de la ligne de base}$$

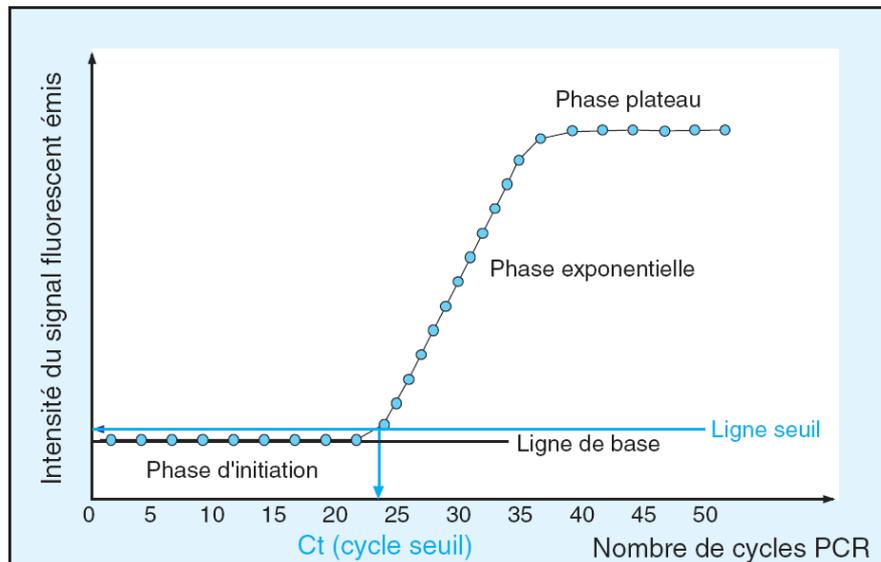


Figure 15. Cinétique d'amplification d'une PCR en temps réel

Source : Tse C, Capeau J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. Ann Biol Clin. 2003;61:279-93.

Le cycle seuil ou Ct (« cycle Threshold ») correspond à la valeur en abscisse (nombre de cycles) du point d'intersection de la courbe d'amplification et la ligne seuil.

La courbe standard est une droite qui va représenter les valeurs de Ct obtenues expérimentalement en fonction du log des concentrations d'ADN cibles fixés, issues de série de dilutions d'un échantillon standard (gamme de concentrations connue d'ADN) (Figure 16). La valeur de Ct est inversement proportionnelle au log de la concentration initiale en ADN cibles donc au nombre initial de copies d'ADN cibles.

Ainsi, la quantité initiale d'ADN cible d'un échantillon à analyser (de concentration inconnue) peut être déduite à partir des Ct de la courbe standard obtenue, selon la relation suivante, définissant un lien entre le nombre initial de copies d'ADN cible, l'efficacité de l'amplification et le cycle seuil (Ct) :

$$\boxed{\text{Log (No)} = \log (E+1) \text{ Ct} + \log (\text{Nt})}$$

Où:

No: nombre initial d'ADN cible

E : efficacité de l'amplification

Ct : cycle seuil de l'échantillon,

Nt : nombre total d'amplicons à Ct

Cette relation est déduite de l'équation décrivant la réaction PCR :

$\boxed{\text{Nt}=\text{No} (E+1)^{\text{Ct}}}$ où E = 1 quand l'amplification par PCR est parfaite.

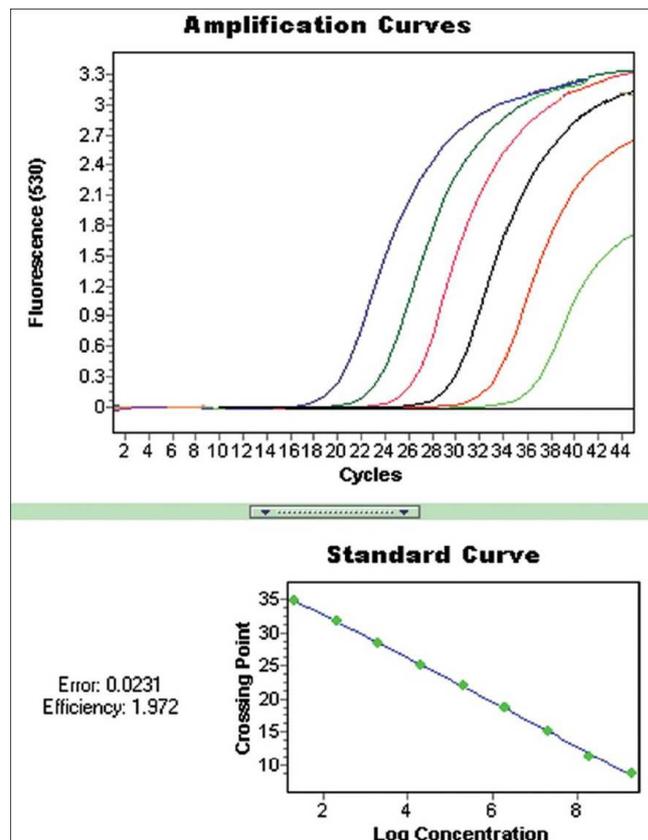


Figure 16. Illustration d'une courbe standard issue d'une dilution en série d'un échantillon standard

Source : Tse C, Capeau J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. Ann Biol Clin. 2003;61:279-93.

I.3.6.2. PCR EN TEMPS REEL TAQMAN : PROTOCOLE DE SARA EYANGO MODIFIE

I.3.6.2.1. LES AMORCES ET LA SONDÉ

Le fragment d'ADN cible dans cette étude est l'IS2404. Les amorces MUF1 et MUR1 et la sonde MUFT1 utilisées sont spécifiques de cette séquence (tableau VI). Elles ont été développées par Rondini, et al. (2003) [150], et ont été reprises par le Dr Sara EYANGO lors de la mise au point de PCR en temps réel TaqMan [147]. Les positions respectives de ces amorces sur le gène sont : positions 406 à 424 et positions 465 à 449 et celles de la sonde sont de 447 à 426 (numéro d'accèsion Genbank AF003002). Ce couple d'amorces a été conçu pour générer un fragment de 59 pb.

Tableau VI. Amorces sens, antisens et sonde pour la PCR en temps réel

Oligonucléotides		Séquence 5' → 3'	Tm° *
Amorces	Sens : MUF1	ATT GGT GCC GAT CGA GTT G	66,1
	Anti-sens : MUR1	TCG CTT TGG CGC GTA AA	66,6
Sonde	MUFT1	6FAM - CAC CAC GCA GCA TTC TTG CCG T - TAMRA	75,2

* **Tm** : température de fusion ou « Melting Temperature »

Les amorces et la sonde ont été fournies sous forme lyophilisées (SIGMA ALDRICH). Leurs préparations ont été effectuées dans la salle mix, sous hotte et placées dans un bac à glace. Chaque amorce (MUF1 et MUR1) a été reprise dans de l'eau purifiée HPLC pour avoir une solution stock de concentration 100 µM suivant la fiche technique. Des aliquots de 50 µl de la solution stock 100 µM ont été conservés à -20°C. D'autres ont été dilués au 1/5 avec de l'eau purifiée HPLC pour avoir les solutions de travail 5pmol/µl qui sont aussi conservés à -20°C.

La sonde (MUFT1) a été doublement marquée, avec un rapporteur, le FAM sur son extrémité 5', et un quencher, le TAMRA sur son extrémité 3'. Elle se dégrade très facilement à la lumière.

La sonde a été reprise dans 51 µl d'eau purifiée HPLC de manière à avoir la solution stock de 100 µM. Puis des aliquots de la solution mère ont été dilués à 5pmol/µl afin d'avoir les solutions de travail. Ces aliquots et la solution stock sont conservés à - 20°C, à l'abri de la lumière (en emballant les tubes avec du papier aluminium).

I.3.6.2.2. PREPARATION DU MIX OU MELANGE REACTIONNEL

La composition du mix du protocole original de Sara EYANGO a été modifiée et adaptée selon les réactifs disponibles au laboratoire. La réaction a été d'abord mise au point selon un protocole de PCR classique en utilisant les concentrations et quantités des réactifs selon le tableau VII. Un volume de 5 µl d'ADN a été ajouté dans 20 µl de mix. L'amplification a été effectuée dans le thermocycleur MultiGene, Labnet® selon le programme suivant : activation de l'enzyme à 95°C pendant 3 min, suivie de 40 cycles d'amplification de 95°C pendant 15 sec (dénaturation) et 60°C pendant 45 sec (hybridation et polymérisation) et une élongation finale 60°C pendant 3 min.

Puis les produits de la PCR ont été migrés sur le gel d'agarose 3% pendant une heure à 120 volts, et visualisés sous la lumière UV. En comparant les bandes observées avec le marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder, la taille des fragments obtenus correspondait à celle attendue : **59 pb**.

Tableau VII. Composition du mix du protocole modifié pour la mise au point de la PCR en temps réel

Mix modifié	Volume/réaction (μl)	Concentration finale/25 μl
Eau purifiée HPLC	11,8	
Tampon 10X	2,5	1X
MgCl ₂ 25mM	2	2mM
dNTP 10mM	0,5	0,2mM
Taq polymérase 5 unités/ μ l	0,2	0,04unités/ μ l
MUF1 5pmol/ μ l	1,5	0,3pmol/ μ l
MUR1 5pmol/ μ l	1,5	0,3pmol/ μ l
Volume total	20	

Ensuite, le mélange réactionnel (tableau VIII) pour la PCR en temps réel TaqMan a été préparé dans la salle mix, sous hotte.

Toutes les manipulations ont été effectuées dans la glace. La quantité de chaque réactif nécessaire en fonction du nombre de tubes réactionnels a été préparée.

Le mix a été préparé dans un microtube 1,5 ml emballé dans un papier aluminium afin de le mettre à l'abri de la lumière. Après avoir bien mélangé le mix au vortex, 20 μ l ont été distribués dans chaque cupule des barrettes destinée à l'amplification en prenant soin de respecter le plan de plaque initialement prévu. 5 μ l d'eau purifiée HPLC ont été ajoutés dans les cupules des témoins négatifs.

Tableau VIII. Composition et volume des réactifs pour PCR en temps réel TaqMan

Réactifs	Volume par réaction (μl)	Concentration finale (25 μl réaction)
Eau purifiée HPLC	11,3	
Tampon 10X	2,5	1X
MgCl ₂ 25 mM	2	2 mM
dNTP 10 mM	0,5	0,2 mM
MUF1 5 pmol/ μ l	1,5	0,3 pmol/ μ l
MUR1 5 pmol/ μ l	1,5	0,3 pmol/ μ l
Sonde MUFT1 5 pmol/ μ l	0,5	0,1 pmol/ μ l
Taq polymérase 5 unités/ μ l	0,2	0,04 unités/ μ l
Volume total	20	

I.3.6.2.3. AJOUT DE L'ADN

L'addition d'ADN a été effectuée dans la salle réservée pour cela et toujours sous hotte. Les expériences avec la série de dilutions au $\frac{1}{2}$ ont été effectuées en premier. Les secondes expériences ont été réalisées avec la gamme de dilution au $\frac{1}{10}$. Un mélange contenant 5 μ l d'échantillon d'ADN non dilué a été ajouté dans chaque expérience.

Pour chaque série de dilutions d'ADN (dilutions au $\frac{1}{2}$ et au $\frac{1}{10}$), un volume de 5 μ l d'ADN a été ajouté dans chaque cupule correspondante contenant le mix. Chaque échantillon a été fait en duplicate. Les barrettes ont été bien refermées après l'ajout d'ADN.

I.3.6.2.4. AMPLIFICATION

Les barrettes ont été déposées dans le thermocycleur StepOne Real-Time PCR systems (Applied Biosystems®). Les différents paramètres et le programme de l'amplification ont été réglés et mémorisés sur l'ordinateur relié au thermocycleur en utilisant le logiciel StepOne Software version 2.2.2®. L'amplification a été ensuite lancée selon le programme suivant (durée : 1 heure 30 minutes) :

- Dénaturation initiale : 95°C pendant 3 minutes ;
- 40 cycles comprenant chacun :
 - Dénaturation à 95°C pendant 15 secondes ;
 - Hybridation et élongation à 60°C pendant 45 secondes.

I.3.6.3. LECTURE ET ANALYSE DE LA PCR EN TEMPS REEL TAQMAN SUR LE LOGICIEL StepOne Software v.2.2.2®

Les données de la fluorométrie obtenues lors de la PCR en temps réel TaqMan ont été collectées et analysées sur le logiciel StepOne Software v. 2.2.2®. Ce logiciel permet de suivre l'évolution de l'amplification, par la mesure de fluorescence. Plusieurs données sont obtenues, à l'exemple de la courbe d'amplification telle que:

- ΔR_n vs Cycle : ΔR_n représente l'amplitude du signal de fluorescence normalisé généré par la réaction de PCR, ainsi que les données à partir desquelles la valeur C_t est calculée. Cette courbe affiche la valeur ΔR_n en fonction du nombre de cycles. Il permet d'identifier et d'examiner les amplifications irrégulières, ainsi que de visualiser les valeurs du seuil et de la ligne de base de la réaction.
- R_n vs Cycle : R_n représente la fluorescence du reporter normalisé. Cette courbe affiche la valeur R_n en fonction du nombre de cycles. Il permet d'identifier et d'examiner les amplifications irrégulières.

Chaque courbe peut s'afficher sous la forme d'un graphique du type linéaire ou logarithmique (Figure 17).

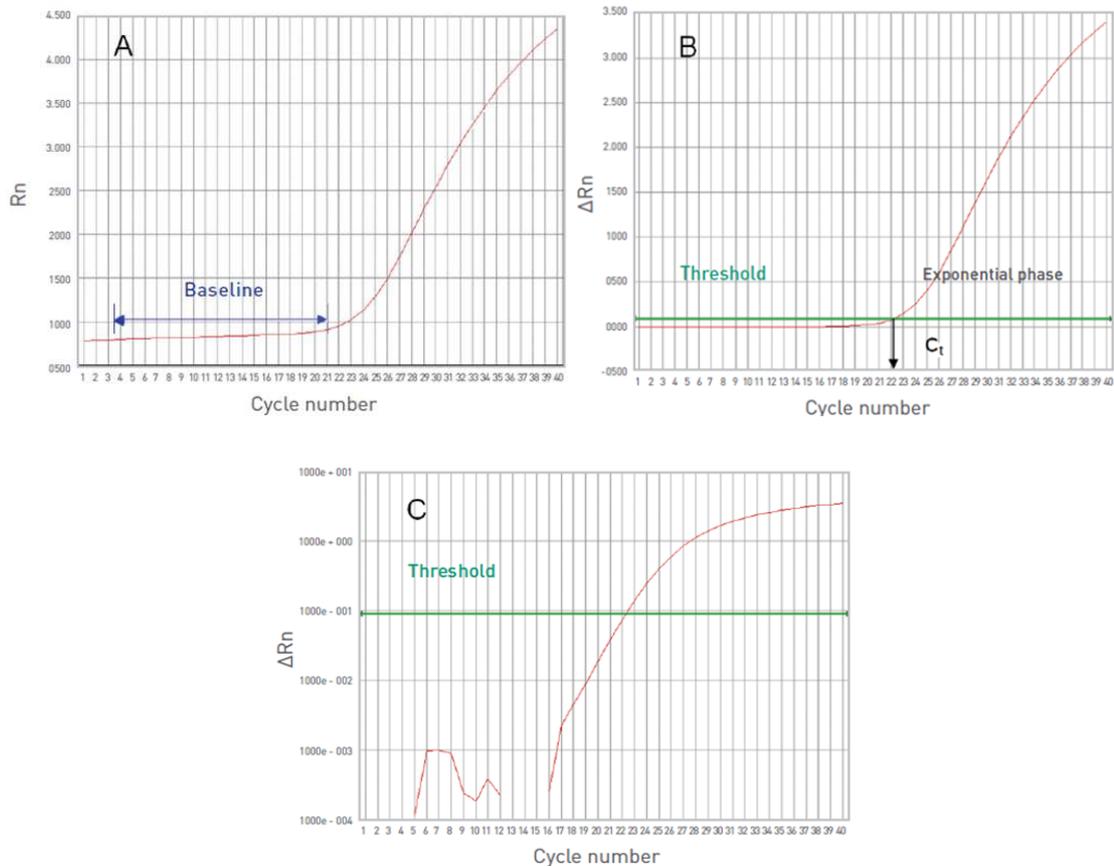


Figure 17. Représentation graphique des données de PCR en temps réel

R_n est la fluorescence du colorant rapporteur divisé par la fluorescence d'un colorant de référence passif ; c'est à dire R_n est le signal de rapporteur normalisé au signal de fluorescence de ROXTM. (A) R_n est tracée en fonction du nombre de cycles PCR. (B) ΔR_n est R_n moins la ligne de base ; ΔR_n est tracée par rapport au nombre de cycles de PCR. (C) Une courbe d'amplification montre la variation de $\log(\Delta R_n)$ avec le nombre de cycles de PCR. Baseline=ligne de base ; Threshold=ligne seuil ; C_t =cycle seuil ou « cycle Threshold ».

Source : Tse C, Capeau J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. Ann Biol Clin. 2003;61:279-93.

La courbe standard a été établie par le logiciel StepOne Software v. 2.2.2® lors de l'analyse d'une expérience de quantification absolue. Les caractéristiques de cette courbe sont :

- Valeurs de pente/efficacité : l'efficacité de l'amplification est calculée en utilisant la pente de la droite de régression dans la courbe standard.

La conversion « pente de courbe standard / efficacité PCR » est donnée par la relation : pente = $(1/\log E)$. Une pente proche de -3,3 indique une efficacité optimale (100%) de l'amplification par PCR.

- Ordonné à l'origine « Y-intercept » : il correspond théoriquement au temps mis par la PCR pour obtenir une quantité de fluorescence supérieur à la valeur seuil.
- Valeurs R^2 (coefficient de corrélation de Pearson) : la valeur R^2 indique la proximité entre la droite de régression et les points de données Ct des réactions standard. Par exemple, la valeur 1,00 indique une corrélation parfaite entre la droite de régression et les points de données. Une valeur $R^2 >$ ou égale à 0,99 est souhaitable.
- Valeurs Ct : le cycle seuil (Ct) est le nombre de cycles de PCR pour lequel le niveau de fluorescence atteint le seuil. Une valeur Ct >8 et <35 est souhaitable. Une valeur Ct <8 montre que la réaction contient trop de cible. Une valeur Ct >35 montre que la réaction ne contient pas assez de cible.

I.3.6.4. VERIFICATION DES AMPLICONS SUR GEL D'AGAROSE 3%

Un gel d'agarose à 3% (taille 190 × 205 mm) a été préparé, composé de 7,5g de poudre d'agarose, 250 ml de TBE 1X et 13 μ l de BET 10mg/ml. Un mélange de 10 μ l d'amplicons et 2 μ l de bleu 6X a été déposé dans chaque puits correspondant. La migration a été effectuée à 120 volts pendant 55 minutes. La taille des amplicons attendus étant de 59 pb, le marqueur de taille moléculaire 100pb DNA Ladder a été utilisé comme référence.

I.3.6.5. SPECIFICITE

Afin de vérifier la spécificité de la PCR basée sur la détection de la séquence d'insertion IS2404, les ADN de 12 espèces bactériennes ci-dessous ont été testés en PCR en temps réel TaqMan avec l'ADN de *M. ulcerans* :

- Complexe *Mycobacterium tuberculosis* : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* ;
- Agent de la lèpre : *Mycobacterium leprae* ;
- Mycobactéries atypiques : *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium xenopi* ;
- Autres bactéries : *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella spp.*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*.

Les ADN des mycobactéries ont été obtenus à partir des souches et isolats cliniques isolés et identifiés au laboratoire. L'extraction a été réalisée extraits selon le même protocole que pour *M. ulcerans*, par la méthode de van Embden. Les ADN des autres bactéries sont des témoins positifs pour des kits de diagnostic au laboratoire.

La PCR a été réalisée selon les mêmes conditions que celle des échantillons d'ADN de *M. ulcrerans* de la série de dilutions au 1/10.

I.3.7. REPRODUCTIBILITE DES TESTS PCR

Toutes les expériences décrites ci-dessus, aussi bien PCR classiques que PCR en temps réel TaqMan, ont été répétées au moins quatre fois au cours de cette étude, dans les mêmes conditions. Les échantillons d'ADN des deux souches de *M. ulcerans* (12.26 et 12.29) ont été utilisés en même temps dans chacune des expériences.

B]

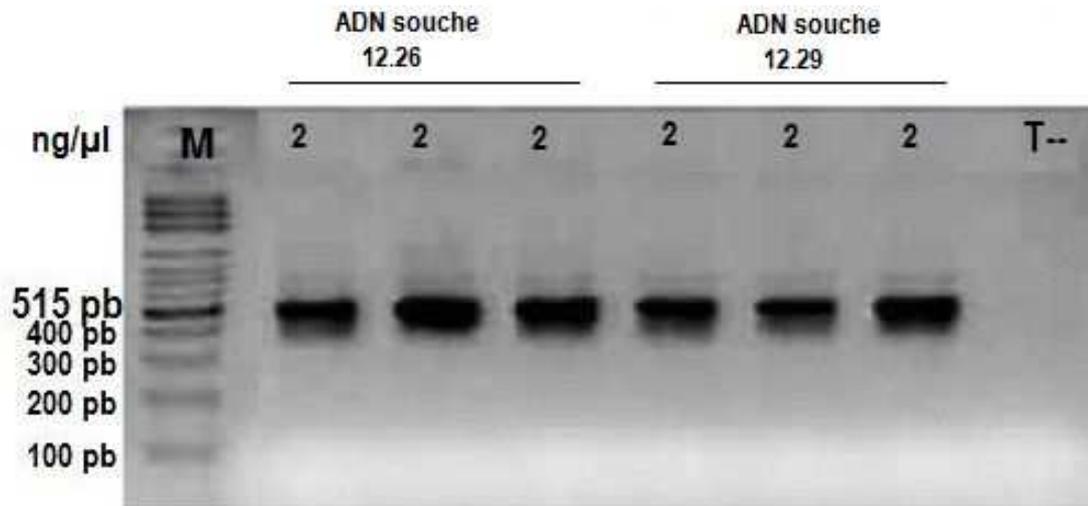


Figure 18. Gel d'agarose des produits d'amplification obtenus lors de la mise en place des PCR classique

[A] : protocole de Sara EYANGO

[B] : protocole de l'OMS

(M) : marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder ; (2) : concentration d'ADN dans une réaction en ng/μl ; (T-) : témoins négatifs.

En comparant les fragments des produits PCR avec le marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder, les migrations par électrophorèse des amplicons des deux protocoles de PCR classique sur gel d'agarose 2% ont donné des résultats positifs après visualisation à l'UV, avec une bande correspondant à un fragment de 515 pb. Les témoins négatifs ne présentent pas de bande (Figure 18).

II.1.2. SENSIBILITE DES PCR CLASSIQUES

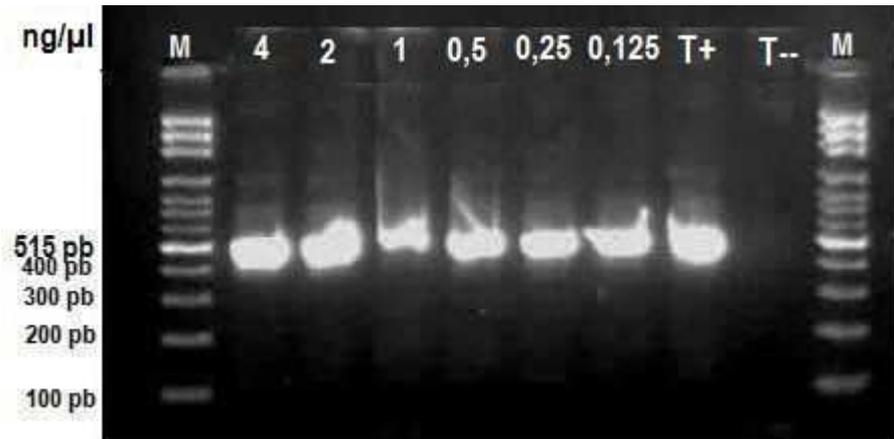
Après que les deux protocoles des PCR classique aient été mis en place, l'étude de leur sensibilité (seuil de détection) a été effectuée en utilisant les échantillons d'ADN des deux séries de dilutions au 1/2 et au 1/10 (tableau II). La série de dilutions au 1/2 (4 à 0,125 ng/μl) a été testée en premier, ensuite, après avoir obtenu leurs résultats, les tests avec la série de dilutions au 1/10 (10 à 1.10⁻⁶ ng/μl) ont été effectués. Le témoin négatif est constitué de 5 μl d'eau purifiée HPLC. Une réaction contenant 5 μl d'ADN non dilué a été ajoutée dans chaque expérience constituant le témoin positif.

II.1.2.1. SENSIBILITE DE LA PCR CLASSIQUE SELON LE PROTOCOLE DE L'OMS

Le protocole de PCR classique de l'OMS est sensible avec tous les échantillons de la série de dilution au 1/2, jusqu'à la concentration d'ADN à 0,125 ng/μl (figure 19). Par contre, avec la série de dilutions au 1/10, seuls les échantillons à 10 ng/μl et 1 ng/μl présentent des bandes correspondant à la taille attendue, 515 pb. A partir de la concentration d'ADN à 0,1 ng/μl, la PCR n'est plus détectable (figure 20). Le seuil de détection du protocole de PCR classique de l'OMS est donc une concentration d'ADN à 0,125 ng/μl soit 0,625 ng dans 20 μl de réaction.

Les échantillons d'ADN des deux souches de *M. ulcerans* 12.26 et 12.29 ont donné des amplicons correspondant à la taille attendue de 515 pb.

A]



B]

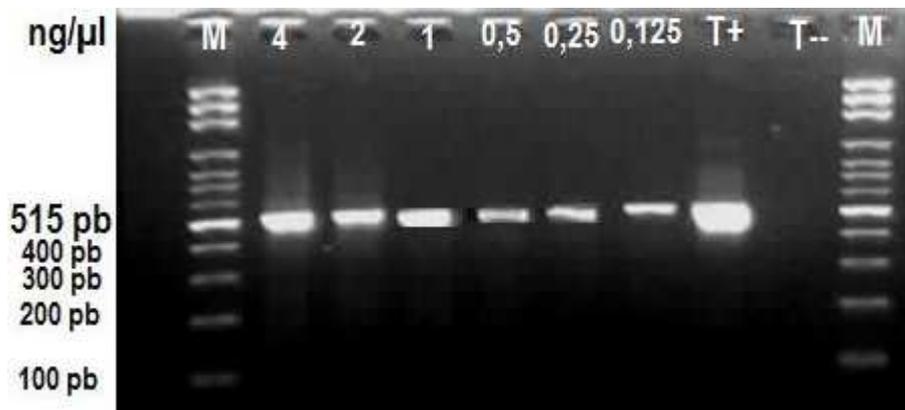


Figure 19. Gel d'agarose obtenu à partir de la série de dilutions au $\frac{1}{2}$. Protocole de PCR classique de l'OMS

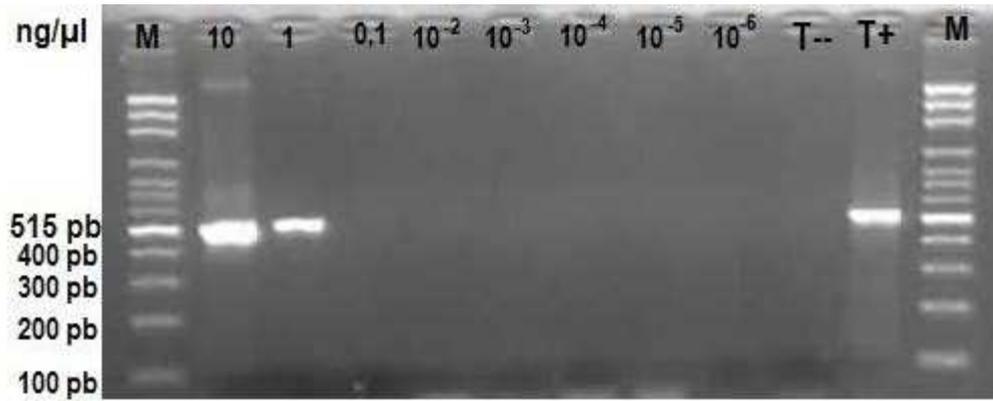
[A] : ADN de la souche 12.26

[B] : ADN de la souche 12.29

(M) : marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder ; (4 - 2 - 1 - 0,5 - 0,25 - 0,125) : concentration d'ADN dans une réaction en ng/ μ l ; (T-) : témoins négatifs ; (T+) : témoins positifs.

En comparant les fragments des produits PCR avec le marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder, tous les échantillons d'ADN de la série de dilution au $\frac{1}{2}$ ont donné des résultats positifs, présentant une bande qui correspond à la taille attendue de 515 pb. Les témoins positifs présentent une bande à 515 pb et les témoins négatifs ne présentent pas de bande (Figure 19).

A]



B]

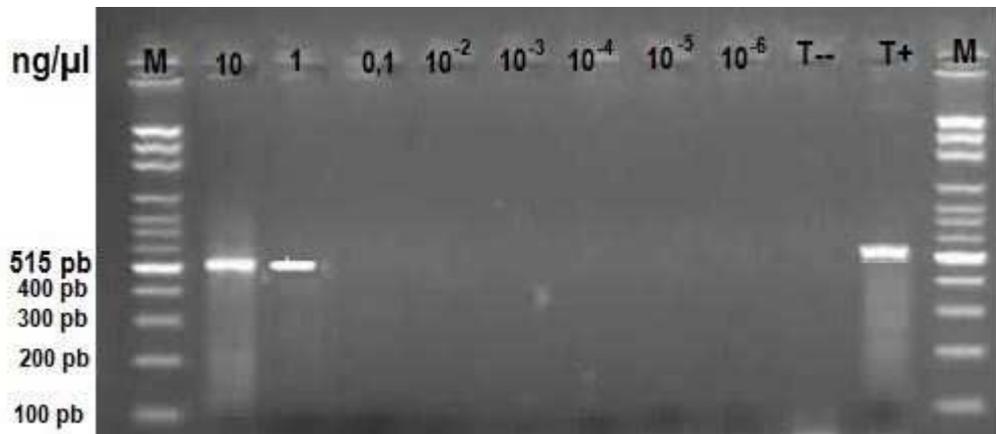


Figure 20. Gel d'agarose obtenu à partir de la série de dilutions au 1/10. Protocole de PCR classique de l'OMS

[A] : ADN de la souche 12.26

[B] : ADN de la souche 12.29

(M) : marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder ; (10 - 1 - 0,1 - 10^{-2} - 10^{-3} - 10^{-4} - 10^{-5} - 10^{-6}) : concentration d'ADN dans une réaction en ng/ μ l ; (T-) : témoins négatifs ; (T+) : témoins positifs.

En comparant les fragments des produits PCR avec le marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder, les échantillons d'ADN à 10 ng/ μ l et 1 ng/ μ l ont donné des résultats positifs, présentant une bande qui correspond à la taille attendue de 515 pb. Les échantillons aux concentrations au-dessous de 1 ng/ μ l sont négatifs, ils ne présentent pas de bande. Les témoins positifs présentent une bande à 515 pb et les témoins négatifs ne présentent pas de bande (Figure 20).

II.1.2.2. SENSIBILITE DE LA PCR CLASSIQUE SELON LE PROTOCOLE DE SARA EYANGO

Le protocole de PCR classique de Sara EYANGO est sensible avec tous les échantillons de la série de dilutions au $\frac{1}{2}$ (Figure 21) et de la série de dilutions au $\frac{1}{10}$ (Figure 22). Pour la série de dilution au $\frac{1}{10}$, à partir des échantillons à 1.10^{-6} ng/ μ l, l'intensité de la fluorescence des bandes a commencé à s'estomper mais les bandes sont encore visibles. Ainsi, le seuil de détection du protocole de PCR classique de Sara EYANGO est d'une concentration d'ADN de *M. ulcerans* inférieure à 1.10^{-6} ng/ μ l soit 5.10^{-6} ng dans 25 μ l de réaction.

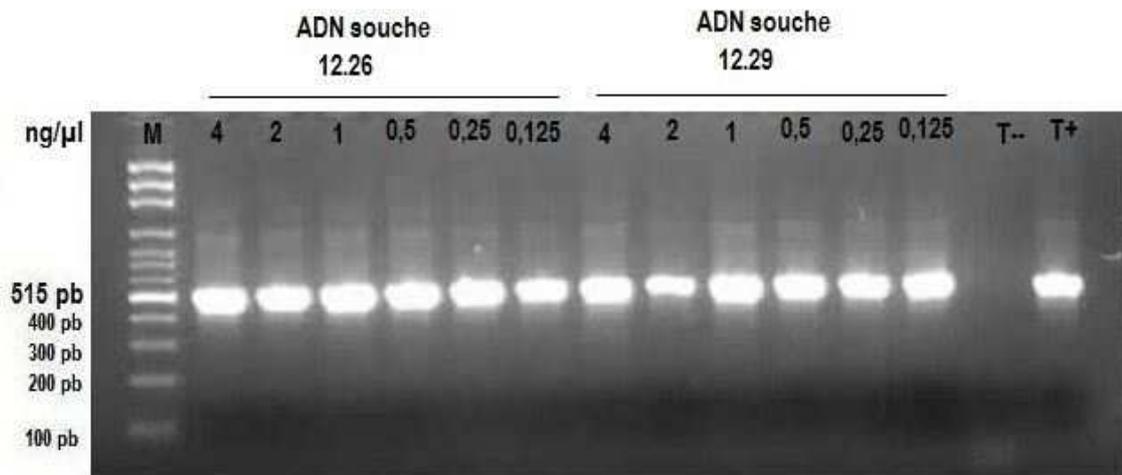


Figure 21. Gel d'agarose obtenu à partir de la série de dilutions au $\frac{1}{2}$. Protocole de PCR classique de Sara EYANGO

(M) : marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder ; (4 - 2 - 1 - 0,5 - 0,25 - 0,125) : concentration d'ADN en ng/ μ l ; (T-) : témoin négatif ; (T+) : témoin positif.

En comparant les fragments des produits PCR avec le marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder, tous les échantillons d'ADN de la série de dilution au $\frac{1}{2}$ ont donné des résultats positifs, présentant une bande qui correspond à la taille attendue de 515 pb. Le témoin positif présente une bande à 515 pb et le témoin négatif ne présente pas de bande (Figure 21).

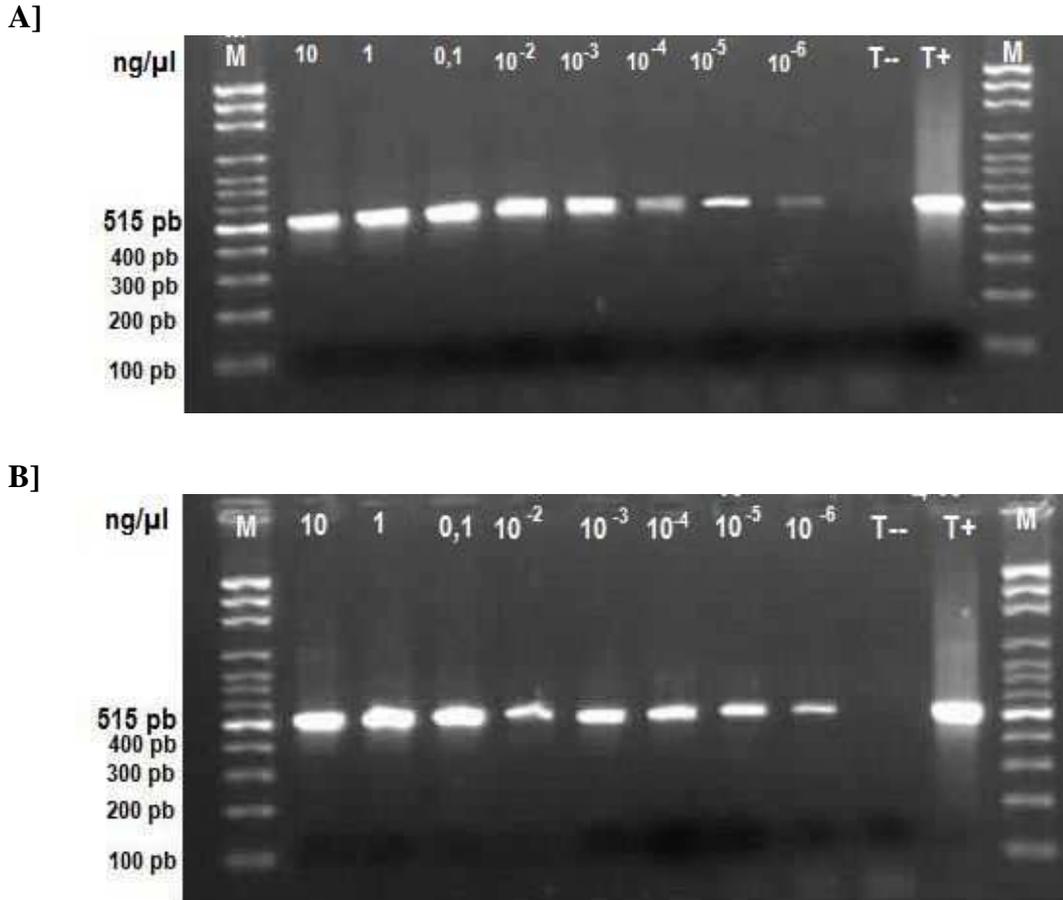


Figure 22. Gel d'agarose obtenu à partir de la série de dilutions au 1/10. Protocole de PCR classique de Sara EYANGO

[A] : ADN de la souche 12.26

[B] : ADN de la souche 12.29

(M) : marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder ; (10 - 1 - 0,1 - 10^{-2} - 10^{-3} - 10^{-4} - 10^{-5} - 10^{-6}) : concentration d'ADN dans une réaction en ng/μl ; (T-) : témoins négatifs ; (T+) : témoins positifs.

En comparant les fragments des produits PCR avec le marqueur de poids moléculaire 100 pb DNA Ladder, tous les échantillons d'ADN de la série de dilution au 1/10 ont donné des résultats positifs, présentant une bande qui correspond à la taille attendue de 515 pb. Toutefois, l'intensité de la fluorescence des bandes diminue progressivement au fur et à mesure que l'ADN soit dilué. Les témoins positifs présentent une bande à 515 pb et les témoins négatifs ne présentent pas de bande (Figure 22).

II.2. RESULTATS DE LA PCR EN TEMPS REEL TAQMAN

II.2.1. MISE AU POINT DE LA PCR EN TEMPS REEL

Dans cette étude, le protocole de PCR en temps réel développé par Sara EYANGO (protocole du CPC) a été modifié. Afin de mettre au point la PCR et de tester les amorces MUF1 et MUR1, le protocole modifié (sans la sonde MUFT1) a été testé dans un premier temps en utilisant les réactifs disponibles au laboratoire en PCR classique (tableau V). Les mêmes échantillons d'ADN à 2 ng/μl utilisés pour la mise en place des PCR classique ont été testés dans ce protocole. Après l'amplification génique dans le thermocycleur MultiGene, Labnet®, les amplicons ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose 3%. En comparant les amplicons avec le marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder, nous observons bien des bandes correspondant à 59 pb (Figure 23).

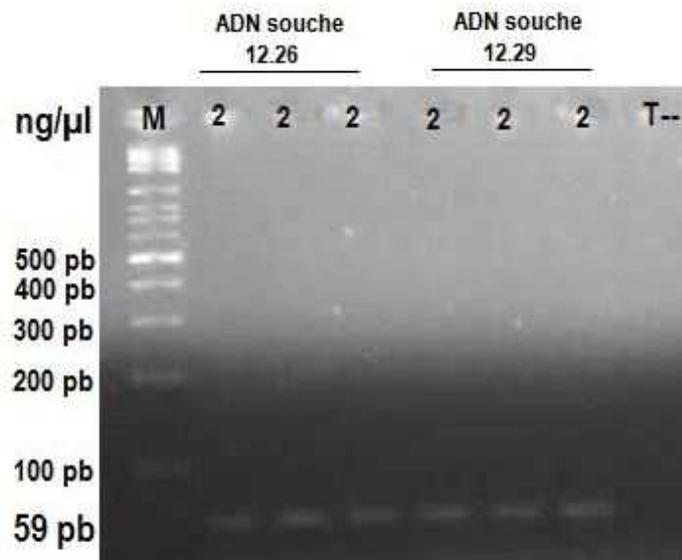


Figure 23. Gel d'agarose obtenu en PCR classique pour la mise au point de la PCR en temps réel

(M) : marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder ; (2) : concentration d'ADN dans une réaction en ng/μl ; (T-) : témoins négatifs.

En comparant les fragments des produits PCR avec le marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder, tous les échantillons d'ADN sont positifs, présentant une bande qui correspond à la taille attendue de 59 pb. Le témoin négatif ne présente pas de bande (Figure 23).

II.2.2. MISE EN PLACE ET SENSIBILITE DE LA PCR EN TEMPS REEL TAQMAN

Vu les résultats précédents (paragraphe II.2.1), le protocole modifié a été retenu pour la mise en place et l'étude de la sensibilité de la PCR en temps réel TaqMan.

II.2.2.1. COURBE STANDARD DE LA PCR EN TEMPS REEL TAQMAN

La courbe standard, représentant les valeurs de Ct obtenues en fonction des quantités d'ADN cibles issues d'une série de dilutions des échantillons au 1/10 (gamme de concentrations de 10 ng/μl à 1.10⁻⁵ ng/μl) a été construite (Figure 24). La valeur de Ct de chaque échantillon est inversement proportionnelle au nombre de copies initial de l'ADN cible : plus la quantité d'ADN dans l'échantillon augmente, plus la valeur de Ct est faible. Ainsi, si un échantillon de concentration inconnue doit être analysé, la quantité initiale d'ADN cible contenu dans cet échantillon peut être déduite à partir des Ct de cette courbe standard.

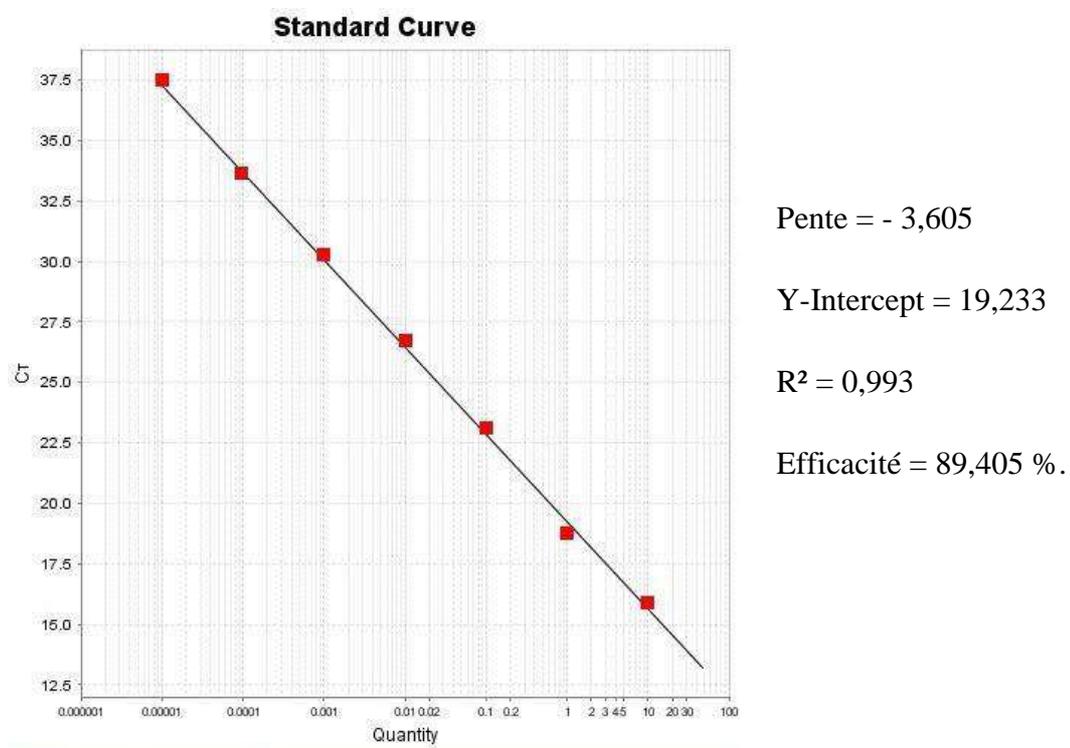


Figure 24. Courbe standard obtenue à partir d'une série de dilutions d'ADN de *M. ulcerans* au 1/10 avec la PCR en temps réel TaqMan

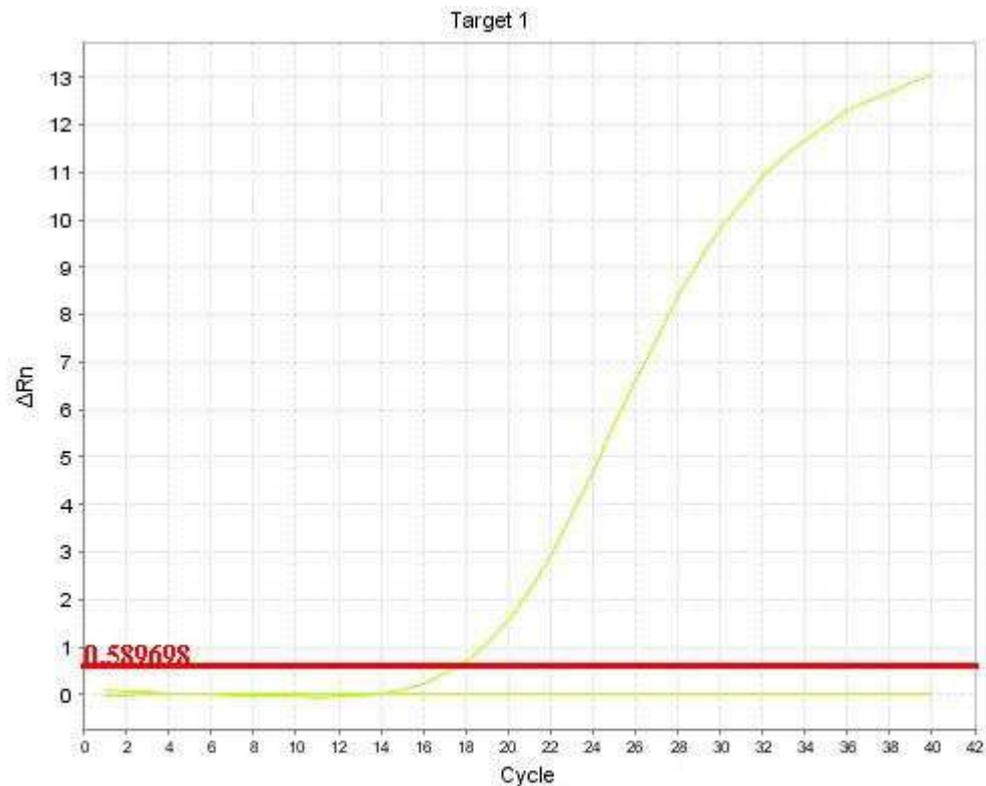
II.2.2.2. SENSIBILITE DE LA PCR EN TEMPS REEL TAQMAN

L'étude de la sensibilité de la PCR en temps réel a été effectuée en testant les échantillons d'ADN de deux séries de dilutions (au 1/2 et au 1/10). Les résultats ont été analysés sur le logiciel « StepOne Software v.2.2.2 ».

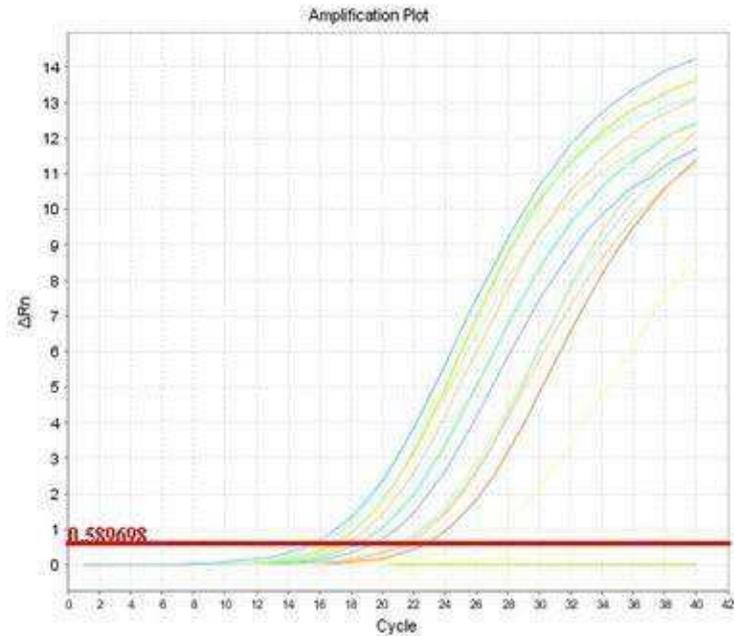
II.2.2.2.1. RESULTATS A PARTIR DE LA SERIE DE DILUTION AU 1/2

Les résultats donnés sur la figure 25 montrent des courbes d'amplification des PCR obtenues avec la série de dilutions au 1/2 des échantillons d'ADN des deux souches 12.26 et 12.29 (4 ng/μl à 0,125 ng/μl).

A]



B]



C]

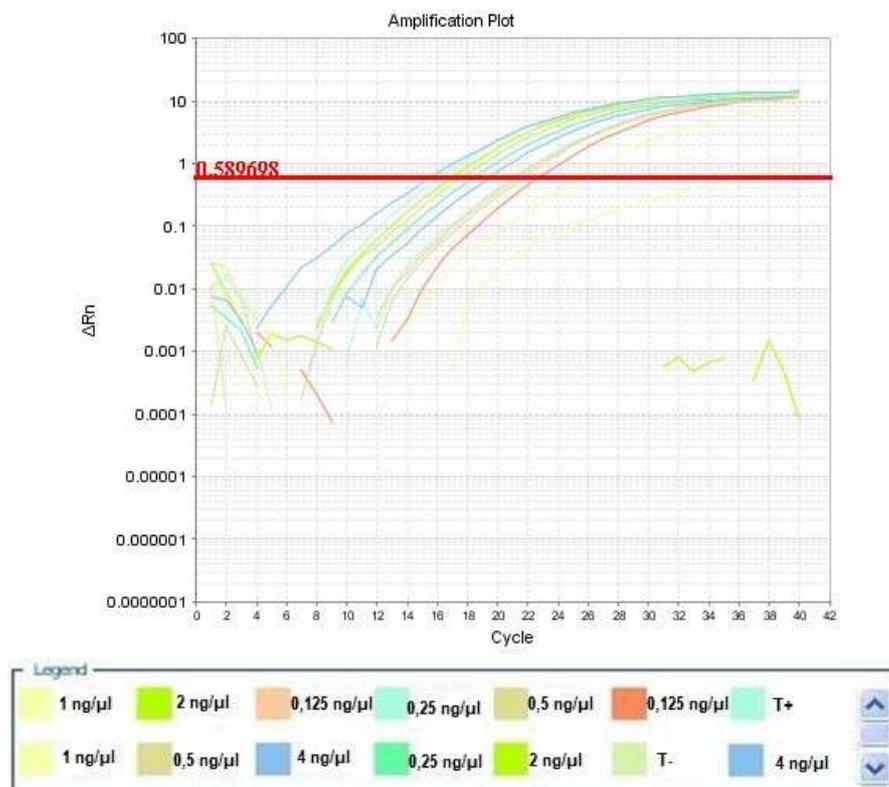


Figure 25. Courbes d'amplification obtenues avec les échantillons d'ADN de la série de dilutions au $\frac{1}{2}$

[A] : témoins positif et négatif - [B] : graphique linéaire - [C] : graphique logarithmique

La valeur de ligne seuil à partir de laquelle la valeur de Ct est calculée est représentée par la droite en rouge. Le témoin négatif donne une droite (Figure 25).

Les valeurs de Ct obtenus à partir des courbes d'amplification sont données dans le tableau IX ci-dessous.

Tableau IX. Valeurs de Ct des échantillons de la dilution au $\frac{1}{2}$

ADN	ID échantillon	Ct	Concentration d'ADN
ADN de la souche 12.26	26.1	15,52595	4 ng/ μ l
	26.2	16,09881	2 ng/ μ l
	26.3	17,57446	1 ng/ μ l
	26.4	19,40221	0,5 ng/ μ l
	26.5	20,41471	0,25 ng/ μ l
	26.6	21,98136	0,125 ng/ μ l
ADN de la souche 12.29	29.1	15,99343	4 ng/ μ l
	29.2	17,01503	2 ng/ μ l
	29.3	18,84280	1 ng/ μ l
	29.4	19,30546	0,5 ng/ μ l
	29.5	20,93322	0,25 ng/ μ l
	29.6	22,61841	0,125 ng/ μ l
Témoin négatif	neg	indéterminé	
Témoin positif	pos	16,91133	

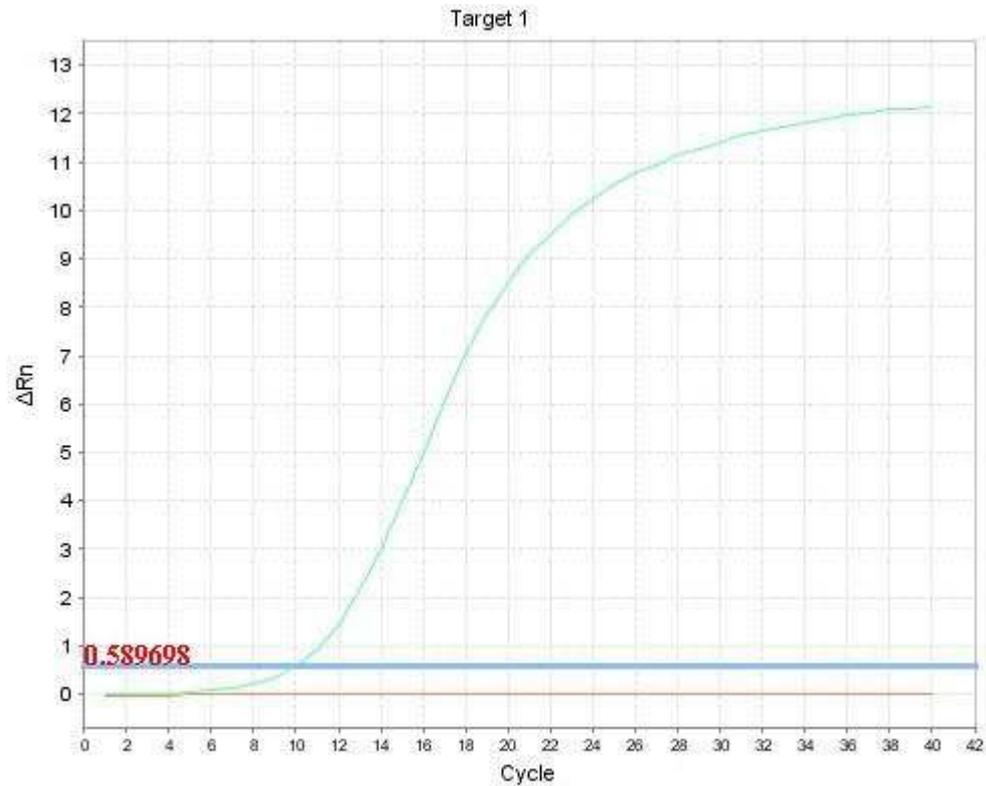
Les résultats sont validés : le témoin négatif est bien négatif (pas d'amplification) et la valeur du Ct du témoin positif est de 16,91. Toutes les valeurs de Ct des échantillons sont comprises entre 15 et 23, ils sont tous positifs.

Pour déterminer plus précisément le seuil de détection de la PCR en temps réel, nous avons effectué les expériences avec les échantillons d'ADN de la série de dilution au 1/10.

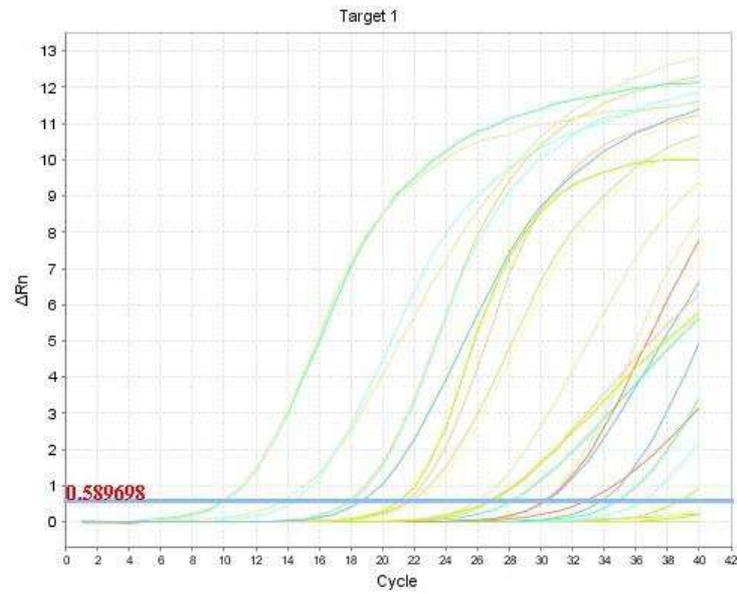
II.2.2.2.2. RESULTAT A PARTIR DE LA SERIE DE DILUTION AU 1/10

Les résultats de l'une des expériences avec la série de dilution au 1/10 des échantillons d'ADN des deux souches 12.26 et 12.29 (10 ng/μl à 1.10⁻⁶ ng/μl) sont montrées sur la figure 26. Le tableau X indique les valeurs de Ct correspondantes. Dans chaque expérience, les échantillons ont été faits en duplicate.

A]



B]



C]

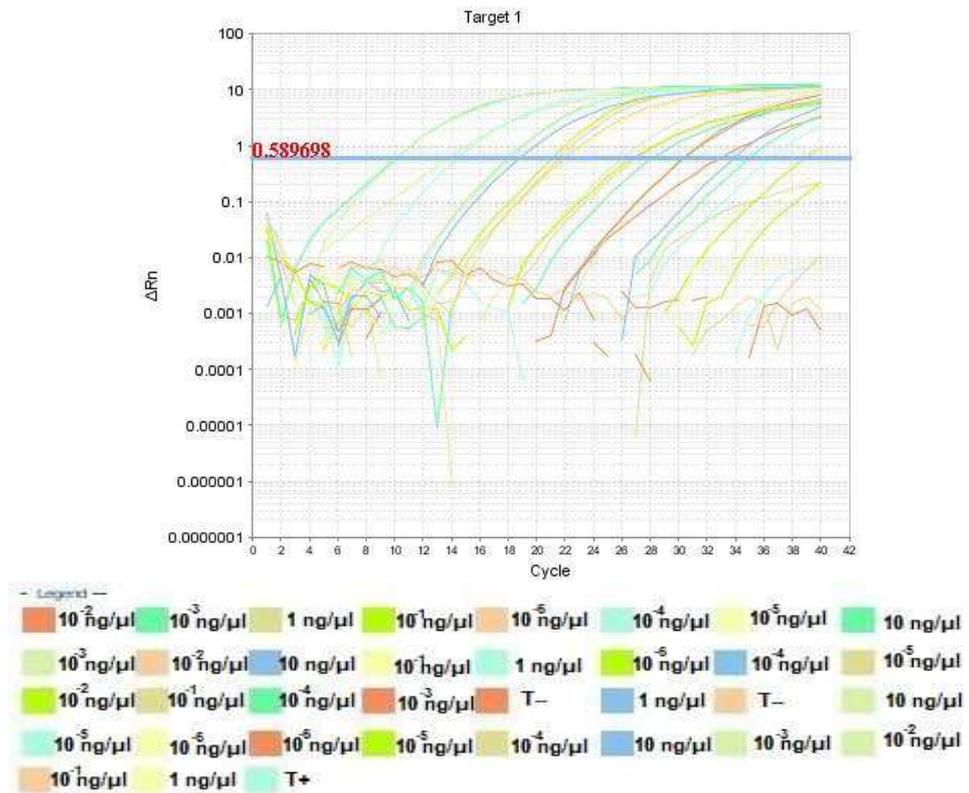


Figure 26. Courbes d'amplification obtenues avec les échantillons d'ADN de la série de dilutions au 1/10

[A] : témoins positif et négatif - [B] : graphique linéaire - [C] : graphique logarithmique

La valeur de ligne seuil à partir de laquelle la valeur de Ct est calculée est représentée par la droite en bleue. Les témoins négatifs donnent une droite (Figure 26).

Tableau X. Valeurs de Ct des échantillons de la dilution au 1/10

ADN	N°	ID échantillon	Ct	Concentration d'ADN
ADN de la souche 12.26	1	26.1	13,74937	10 ng/μl
	2	26-1	13,86628	
	3	26.2	16,54837	1 ng/μl
	4	26-2	16,75164	
	5	26.3	19,62732	0,1 ng/μl
	6	26-3	19,08838	
	7	26.4	23,72401	1.10 ⁻² ng/μl
	8	26-4	23,90712	
	9	26.5	27,51919	1.10 ⁻³ ng/μl
	10	26-5	27,25747	
	11	26.6	32,74375	1.10 ⁻⁴ ng/μl
	12	26-6	32,89143	
	13	26.7	36,46431	1.10 ⁻⁵ ng/μl
	14	26-7	37,50098	
	15	26.8	indéterminé	1.10 ⁻⁶ ng/μl
	16	26-8	indéterminé	
ADN de la souche 12.29	17	29.1	13,16993	10 ng/μl
	18	29-1	13,16955	
	19	29.2	16,14893	1 ng/μl
	20	29-2	16,95171	
	21	29.3	20,44284	0,1 ng/μl
	22	29-3	20,83961	
	23	29.4	23,92806	1.10 ⁻² ng/μl
	24	29-4	23,43889	
	25	29.5	27,28873	1.10 ⁻³ ng/μl
	26	29-5	27,40459	
	27	29.6	33,77584	1.10 ⁻⁴ ng/μl
	28	29-6	32,27387	
	29	29.7	38,84221	1.10 ⁻⁵ ng/μl
	30	29-7	37,01455	
	31	29.8	indéterminé	1. 0 ⁻⁶ ng/μl
	32	29-8	indéterminé	
Témoins négatifs	33	neg 1	indéterminé	
	34	neg 2	indéterminé	
Témoin positif	35	positif	10,04944	

Les résultats sont validés : les témoins négatifs sont bien négatifs (pas d'amplification) et la valeur du Ct du témoin positif est de 10,04. Les valeurs de Ct des échantillons d'ADN ayant eu des amplifications sont comprises entre >13 et <34, concentrations de 10 ng/μl à 1.10⁻⁴ ng/μl (N° 1 à 12 ; 17 à 28).

Ces échantillons contiennent assez de cible pour permettre une amplification. Les autres échantillons ont des valeurs de Ct > 35 ou indéterminées (N° 13 à 16 ; 29 à 32). Ainsi, le seuil de détection de la PCR en temps réel est d'une concentration d'ADN de *M. ulcerans* estimée à 1.10^{-4} ng/ μ l soit 5.10^{-4} ng dans un volume final de 25 μ l.

II.1.2.3. VERIFICATION SUR GEL D'AGAROSE

L'électrophorèse des produits PCR sur gel d'agarose n'est d'aucune utilité en PCR en temps réel. Mais dans cette étude, elle a été effectuée afin de vérifier si les courbes obtenues expriment vraiment la positivité du test.

Les produits de l'amplification des échantillons d'ADN de *M. ulcerans* de la série de dilutions au 1/10 ont été migrés par électrophorèse sur un gel d'agarose 3% . En PCR en temps réel, la positivité a été marquée par l'augmentation de la fluorescence sur la courbe d'amplification. Sur le gel, la positivité est marquée par la présence des bandes qui correspondent à la taille des amplicons attendue. Une concordance entre les courbes et les amplicons migrés sur gel a été observée : les résultats obtenus ont montré que les échantillons sensibles en PCR en temps réel présentent une bande correspondant à 59 pb sur le gel (Figure 27). Le seuil de détection de la PCR est d'une concentration d'ADN à 1.10^{-4} ng/ μ l.

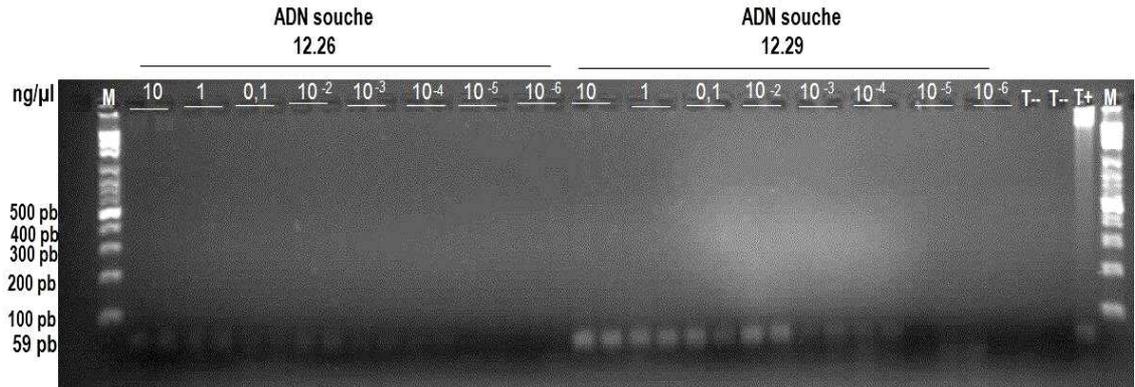


Figure 27. Gel d'agarose obtenu par la migration des amplicons de la PCR en temps réel (série de dilutions au 1/10)

(M) : marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder ; (10 - 1 - 0,1 - 10^{-2} - 10^{-3} - 10^{-4} - 10^{-5} - 10^{-6}) : concentration d'ADN dans une réaction en ng/ μ l ; (T-) : témoins négatifs ; (T+) : témoin positif.

En comparant avec le marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder, les échantillons aux concentrations d'ADN de 10 à 10^{-4} ng/ μ l présentent une bande qui correspond à la taille attendue 59 pb. A partir de 10^{-5} ng/ μ l, la PCR ne donne plus de réponse (Figure 27).

II.1.2.4. SPECIFICITE

La spécificité de la PCR IS2404 pour la détection moléculaire de *M. ulcerans* a été testée sur 12 bactéries en PCR en temps réel TaqMan. Les résultats obtenus n'ont montré aucune amplification avec les ADN de ces 12 bactéries (valeurs de Ct indéterminées) ; seul l'ADN de *M. ulcerans* s'est amplifié (tableau XI). Pour vérification, les produits PCR ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose à 3% et aucune bande correspondant à la taille du fragment attendue n'a été détectée pour les 12 bactéries. L'amplification de l'ADN de *M. ulcerans* a révélé la présence de bande (59 pb).

Tableau XI. Résultats de l'amplification des ADN des différentes espèces bactériennes testées

Espèces bactériennes	Amplification
<i>M. tuberculosis</i>	négatif
<i>M. bovis</i>	négatif
<i>M. leprae</i>	négatif
<i>M. intracellulare</i>	négatif
<i>M. fortuitum</i>	négatif
<i>M. xenopi</i>	négatif
<i>S. pyogenes</i>	négatif
<i>S. pneumoniae</i>	négatif
<i>Legionella spp.</i>	négatif
<i>L. pneumophila</i>	négatif
<i>M. pneumoniae</i>	négatif
<i>C. pneumoniae</i>	négatif
<i>M. ulcerans</i>	positif

L'amplification génique par PCR ciblant la séquence d'insertion IS2404 n'a donné de résultat positif qu'avec l'ADN de *M. ulcerans*. Cette séquence est donc absente dans les ADN des autres espèces bactériennes utilisées. Elle est spécifique du génome de *M. ulcerans*.

II.3. REPRODUCTIBILITE

Pour la détermination du seuil de détection de chaque méthode, les expériences ont été répétées au moins quatre fois. Pour la détermination de la spécificité de la PCR IS2404 TaqMan, l'expérience a été répétée trois fois. Dans tous les cas, les mêmes résultats ont été obtenus.

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

I. DISCUSSION

L'infection à *M. ulcerans* est une mycobactériose commune à l'homme et aux animaux. Ces dernières années, cette pathologie est rapidement apparue comme une cause de plus en plus importante de morbidité dans le monde. Du fait que l'ulcère de Buruli reste méconnu par la population, le nombre de cas peut être surestimé même si cette maladie émergente sévit dans plus de 33 pays dans le monde. Elle pose aussi des problèmes diagnostiques et thérapeutiques.

Chez les animaux, la maladie n'a été déclarée officiellement qu'en Australie. Le mode de transmission est obscur, mais certaines espèces animales sont impliquées dans l'épidémiologie de cette infection.

Jusqu'à présent, il n'y a pas de déclaration officielle concernant l'infection à *M. ulcerans* à Madagascar. Soit la maladie est méconnue des personnels de santé (médecins, infirmiers) et des vétérinaires, et la notification des cas, s'ils existaient, serait peu probable ; soit le pays est totalement indemne de la maladie. Les vétérinaires doivent être avisés du danger représenté par l'infection à *M. ulcerans* et ils sont sollicités à élaborer et appliquer les dispositions législatives et réglementaires, à prendre des mesures relatives à l'importation d'animaux pour éviter l'introduction de ce type de maladie à Madagascar.

Parmi les quatre diagnostics bactériologiques au laboratoire, la PCR est la méthode la plus sensible pour détecter *M. ulcerans* (sensibilité 98%, résultat disponible en 48 heures). Cependant, la faisabilité de ce test nécessite un laboratoire équipé et expérimenté. Jusqu'à ce jour, il n'existe pas de test diagnostique utilisable sur le lieu même des soins. L'OMS recommande actuellement qu'au moins 70% des cas cliniques suspects d'ulcère de Buruli soient confirmés par un test positif par PCR. D'où, un réseau de laboratoires effectuant la PCR a été mis en place dans les pays d'endémie et non endémiques [23]. Dans les pays où la maladie n'a pas encore été détectée, il est nécessaire de mettre en place au préalable la méthode PCR pour une éventualité de suspicion de cas.

L'objectif de cette étude était donc de mettre en place le diagnostic moléculaire de *M. ulcerans* par la méthode PCR à l'Institut Pasteur de Madagascar.

Deux techniques de diagnostic moléculaire de *M. ulcerans*, PCR classique et PCR en temps réel TaqMan ont été mises en place, reposant sur la détection de la séquence d'insertion IS2404, qui parmi plusieurs méthodes publiées, est considérée la meilleure actuellement [23].

Dans cette étude, des souches de *M. ulcerans* isolées à partir des cultures sur le milieu de Löwenstein-Jensen ont été utilisées pour la mise en place du diagnostic moléculaire au laboratoire.

La méthode d'extraction d'ADN de *M. ulcerans* qui a été employée dans cette étude est la méthode de van Embden [146]. Il existe plusieurs méthodes d'extraction d'ADN citées dans la littérature [151] en plus des différentes méthodes qui ont été proposées avec les protocoles de PCR pour cette étude ; mais la méthode de van Embden est la méthode courante d'extraction d'ADN des mycobactéries utilisée dans le laboratoire de l'Unité des Mycobactéries, où cette étude a été réalisée.

La bonne reproductibilité des tests PCR, aussi bien PCR classiques que PCR en temps réel TaqMan, a été assurée en répétant les expériences au moins quatre fois dans les mêmes conditions. Aussi, en incorporant dans chaque réaction les ADN extraits à partir des deux souches de *M. ulcerans* et en effectuant tous les échantillons en duplicate, les mêmes résultats ont été obtenus pour chaque protocole de PCR testé (même seuil de détection).

Deux protocoles de PCR classique ont été mis en place dans cette étude, le protocole de l'OMS [22, 23] et le protocole de Sara EYANGO [147]. Le même couple d'amorces a été utilisé pour ces deux protocoles : l'amorce sens MU1-new et l'amorce anti-sens MU2. Ces amorces ont été publiées par l'OMS, générant un amplicon de 515 pb, qui sont légèrement modifiées par rapport à celles de Ross BC, et al. (1997), MU1 et MU2 (positions respectives 272 à 291 et 840 à 821), générant un amplicon de 568 pb [152].

La comparaison des résultats des deux protocoles de PCR classique a montré que celui de Sara EYANGO, qui avait un seuil de détection à une concentration d'ADN estimée inférieure à 1.10^{-6} ng/ μ l soit 5.10^{-6} ng d'ADN dans le mélange réactionnel, était nettement plus sensible que celui de l'OMS (0,125 ng/ μ l). En supposant qu'une copie du génome de *M. ulcerans* corresponde à 5 fg d'ADN [153], ainsi ces limites de détection correspondent respectivement à moins d'une copie (1 copie) de génome soit environ 209 copies de IS2404 et 125 000 copies de génome, équivalent à 26 125 000 copies de IS2404 par mélange réactionnel.

Ces résultats du protocole de Sara EYANGO sont meilleurs que ceux de Ross BC, et al. (1997) avec le couple d'amorces MU1 et MU2 dont la limite de détection était de 2 copies de génome d'ADN de *M. ulcerans* [152], représentant environ 418 copies de IS2404.

La PCR 2426 développée par Stinear T, et al. (2000) détectant les séquences d'insertion IS2404 et IS2606 avec le couple d'amorces MU4 et MU9 (positions 1119 à 1138 et 1306 à 1326) est aussi moins sensible que la méthode de Sara EYANGO que nous avons utilisé, car sa limite de détection était de 100 génomes par mélange réactionnel [153]. Toutefois, en 1999, Stinear T, et al., a pu améliorer le seuil de détection à 0,1 copies de génome soit environ 20 copies de IS2404, en utilisant la technique PCR décrite par Ross BC, et al. (1997), avec le couple d'amorces MU5 et MU6 (positions respectives 383 à 401 et 852 à 871) [47].

A la différence de la PCR classique, la PCR en temps réel est une méthode quantitative qui permet de mesurer l'amplification tout au long de la réaction et de quantifier le nombre de génomes contenus dans les échantillons. Le protocole de PCR en temps réel TaqMan de Sara EYANGO a été modifié et mis en place dans cette étude avec le couple d'amorces MUF1 et MUR1 et la sonde MUFT1.

La courbe standard de l'amplification par PCR en temps réel a été obtenue à partir d'une série de dilutions des échantillons d'ADN de *M. ulcerans* au 1/10 (10 ng/ μ l à 1.10^{-5} ng/ μ l).

Le coefficient de corrélation R^2 étant de 0,993, la pente – 3,605 et l'efficacité de la PCR correspondante de 89,40%, qui est plus faible par rapport à celle de Rondini S, et al. (2003), supérieure à 90% avec le coefficient de corrélation R^2 0,999 et la pente – 3,51 [150]. Avec un seuil de détection à une concentration d'ADN de *M. ulcerans* estimée à 1.10^{-4} ng/ μ l soit 5.10^{-4} ng dans le mélange réactionnel, correspondant à 100 copies de génome et 20 900 copies de IS2404, cette méthode de PCR en temps réel TaqMan est moins sensible comparée à celle de Rondini S, et al. (2003), qui avait un seuil de détection à 0,2 génomes par mélange réactionnel soit environ 42 copies de IS2404 [150]. Cette faible sensibilité pourrait être expliquée par la faible efficacité de la PCR.

Dans cette étude, le protocole de PCR classique de Sara EYANGO est donc 100 fois plus sensible que le protocole de PCR en temps réel TaqMan. Ce qui est différent des résultats de Rondini S, et al. (2003) qui a montré que l'IS2404 Test TaqMan est 10 fois plus sensible que le test de diagnostic basé sur la PCR classique [150]. Egalement différent des résultats de Fyfe J, et al. (2007) dont les tests PCR Multiplex en temps réel utilisés par avec des échantillons cliniques étaient 100 à 1 000 fois plus sensibles que la PCR classique [154].

Les résultats que nous avons obtenus sont plutôt surprenants car la PCR en temps réel devrait être plus sensible que la PCR classique. Deux explications pourraient être discutées :

- Le fait que le protocole de PCR en temps réel de Sara EYANGO a été modifié. Les réactifs que nous avons utilisés sont différents. En effet, nous avons adapté le protocole avec les réactifs qui étaient disponibles au laboratoire. De même, ils sont différents de ceux utilisés par Rondini et al. avec un programme d'amplification différent ;
- La pureté des ADN joue un certain rôle sur le bon déroulement de la PCR. Nous pouvons constater que les résultats de la spectrophotométrie sur Nanodrop ont montré que certains échantillons d'ADN extraits présentaient une contamination, surtout celle reflétée par l'absorption à 320 nm.

Pour améliorer la sensibilité de la PCR en temps réel TaqMan, il serait préférable d'utiliser un kit commercial comme dans le protocole de Sara EYANGO [147] ou celui de Rondini S, et al. (2003) [150]. De même pour l'extraction d'ADN afin d'avoir des échantillons d'ADN plus purs. Il serait aussi intéressant de continuer le travail sur le protocole de PCR en temps réel TaqMan de l'OMS qui venait d'être publié [23].

Nous avons testé 12 espèces bactériennes pour l'étude de la spécificité de la PCR de *M. ulcerans* reposant sur la détection de la séquence d'insertion IS2404.

Ces bactéries sont des pathogènes susceptibles d'entraîner des infections cutanées aussi bien chez l'homme que chez les animaux, et/ou des microorganismes environnementaux. Aucun des ADN génomiques de ces autres espèces bactériennes testées n'a produit des amplicons, ce qui montre la grande spécificité de la PCR IS2404.

Bien que la séquence d'insertion IS2404 est aussi présente chez d'autres espèces de mycobactéries atypiques [45, 47-49], celles-ci ne sont pas présentes dans les lésions typiques, d'un point de vue clinique, de l'ulcère de Buruli. La PCR fondée sur la recherche de l'IS2404 dans les échantillons cliniques, reste donc une méthode spécifique pour la confirmation d'un cas d'ulcère de Buruli. Mais son application à l'analyse des échantillons environnementaux est moins spécifique car ces bactéries portant la séquence d'insertion IS2404 sont aussi présentes dans l'environnement [154].

La méthode PCR présente aussi des inconvénients pour la confirmation en laboratoire de l'ulcère de Buruli : elle nécessite un laboratoire bien équipé avec séparation des salles pour les différentes étapes, son exécution est coûteuse, elle nécessite un personnel qualifié et un contrôle rigoureux de la qualité, et elle ne permet pas la distinction entre organismes viables et non viables dans les échantillons [23].

Un autre outil de diagnostic moléculaire a été développé récemment pour la détection d'agents bactériens, viraux et parasitaires, l'amplification isotherme LAMP (« Loop mediated isothermal AMPLification »). Deux méthodes LAMP, basées sur la détection de la séquence d'insertion IS2404, ont été développées pour le diagnostic de *M. ulcerans* dans les échantillons cliniques, qui sont nettement plus sensibles que notre étude.

Celle de Njiru ZK, et al. (2012) avait une limite de détection équivalente à 2 à 20 copies de IS2404 (0,01 à 0,1 copies de génome) [155]. Les deux techniques, LAMP classique et pwLAMP (« pocket warmer LAMP ») développées par Ablordey A, et al. (2012) étaient capables de détecter à une limite de 300 copies la séquence d'insertion cible IS2404 (1,4 copies de génome) à 60°C après 60 minutes d'amplification. Cette limite a été améliorée à 30 copies de IS2404 lorsque la LAMP classique était effectuée à 65°C [156]. Il serait intéressant aussi de mettre en place et d'évaluer cette technique d'autant plus qu'elle est plus simple et facile que la PCR.

II. RECOMMANDATIONS

Les mycobactéries occupent une place importante dans la microflore de l'environnement. Bien que la tuberculose et la lèpre soient les maladies mycobactériennes les plus répandues, on ne peut pas sous-estimer l'importance en médecine humaine et vétérinaire des mycobactéries atypiques.

Notre étude a des intérêts sur le plan médical. C'est la première mise en place de la technique PCR pour la détection de *M. ulcerans* à Madagascar. Elle nous a permis l'obtention d'un outil de diagnostic et plus loin la détermination de la situation sanitaire de Madagascar vis-à-vis l'ulcère de Buruli. Et sur le plan scientifique, les résultats obtenus peuvent être utilisés par d'autres chercheurs comme références dans des recherches sur l'amélioration des techniques de diagnostic de l'infection à *M. ulcerans* aussi bien chez l'homme que chez les animaux.

Les travaux de recherches axés sur les mycobactéries atypiques et les mycobactérioses sont rares dans ce pays. Nous n'avons pu effectuer la mise en place de ce diagnostic moléculaire qu'avec des souches de *M. ulcerans* provenant de Cameroun. Aussi, l'application des tests PCR sur des échantillons cliniques n'a pas pu être réalisée car il n'existe pas encore de cas clinique suspect connu à ce jour à Madagascar.

Ainsi, nous recommandons :

- De rechercher *M. ulcerans* par ces techniques PCR dans les échantillons de l'environnement (eau, boue, insectes terrestres et aquatiques, végétaux terrestres et aquatiques, crustacés, poissons, mammifères terrestres etc.) prélevés dans les zones chaudes et humides surtout marécageuses de Madagascar.
- De multiplier les études sur les mycobactéries atypiques dont *M. ulcerans* et les mycobactérioses à Madagascar aussi bien chez l'homme que chez les animaux en instaurant un réseau de surveillance : signaler les suspicions, effectuer et envoyer les prélèvements nécessaires aux laboratoires pour analyses microbiologiques. Pour cela, il faudrait coordonner les efforts de recherches au niveau des services de santé humaine et vétérinaire (hôpital, CSB, poste vétérinaire, vétérinaire sanitaire, etc.) et au niveau des laboratoires dans toute l'Ile.

Cela permettrait de déterminer notre situation épidémiologique concernant l'ulcère de Buruli et *M. ulcerans*, s'ils existent à Madagascar ou bien que le pays demeure indemne. Ainsi, nous pourrions prendre les mesures relatives y afférentes telle que la réglementation des mouvements des animaux entrant sur le territoire malgache susceptibles d'être réservoirs de *M. ulcerans* dans l'environnement. Si la maladie existe à Madagascar, ces tests pourront être utilisés pour le dépistage actif de l'ulcère de Buruli chez l'homme dans les zones qui peuvent être considérées comme zones à forte suspicion.

La maladie ulcère de Buruli ou l'infection à *M. ulcerans* étant encore méconnue par la population, les médecins et les vétérinaires à Madagascar, nous recommandons :

- Une éducation sanitaire au niveau des communautés concernant cette maladie afin de prendre les mesures nécessaires dans une éventualité de suspicion ou notification de cas ;
- Une sensibilisation de la population à amener les malades présentant toute forme de plaie quel que soit la cause, dans les centres de santé le plutôt possible pour une meilleure prise en charge ;

- Une formation des agents de santé sur les maladies émergentes et les maladies tropicales négligées.

Nous proposons également, d'informer les vétérinaires aux frontières de l'existence de l'infection à *M. ulcerans*. Afin d'éviter l'introduction de cette maladie à Madagascar, un contrôle rigoureux de l'importation d'animaux est très important. Nous suggérons aussi, une surveillance active des animaux venant surtout des pays endémiques : mettre en quarantaine obligatoirement, signaler la présence d'une suspicion de la maladie aux autorités compétentes, effectuer un prélèvement adéquat pour envoi à un diagnostic de *M. ulcerans* par la méthode PCR pour confirmation rapide.

CONCLUSION

CONCLUSION

L'ulcère de Buruli ou infection à *M. ulcerans* est devenue une maladie de plus en plus préoccupante et répandue dans le monde, qui cause beaucoup de souffrances humaines. Elle atteint aussi les animaux domestiques et sauvages qui pourraient constituer des réservoirs potentiels de cette mycobactérie dans l'environnement.

La mise en place du diagnostic moléculaire de *M. ulcerans* a été réalisée avec succès. Deux méthodes de diagnostic PCR ont été mises place : la PCR classique et la PCR en temps réel TaqMan, reposant sur la détection de la séquence d'insertion IS2404. La PCR classique permet l'identification de *M. ulcerans* mais la PCR en temps TaqMan permet aussi sa quantification dans les échantillons.

Les résultats sur la sensibilité (seuil de détection) des tests PCR nous montrent que le protocole de PCR classique de l'OMS est moins sensible que le protocole de PCR en temps réel TaqMan. Mais le protocole de PCR classique de Sara EYANGO est jugé le plus sensible, son seuil de détection est une copie de génome de *M. ulcerans* par mélange réactionnel, soit environ 209 copies de la séquence d'insertion IS2404.

Cette étude apporte une contribution majeure au développement des outils de diagnostic rapide de l'ulcère de Buruli. Ces outils de diagnostic PCR mis en place permettront de faire des investigations plus approfondies et des recherches sur *M. ulcerans* à Madagascar. Sur le plan médical, ils sont disponibles pour la confirmation des éventuelles suspicions ou importations de cas d'infection à *M. ulcerans* aussi bien chez l'homme que chez les animaux.

D'autres travaux méritent d'être faits pour améliorer la sensibilité de la méthode PCR. La réalisation des tests PCR sur des échantillons cliniques ou environnementaux à Madagascar est souhaitée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rapp C. Infection à *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli). In : Gentlini M, dir. Médecine tropicale. 6^{ème} édition. Paris : Editions médecine sciences publications / Lavoisier ; Octobre 2012. p. 532-7.
2. Portaels F, Chemlal K, Elsen P. *Mycobacterium ulcerans* in wild animals. Rev Sci Tech. 2001;20:252-64.
3. Ashford DA, Whitney E, Raghunathan P, Cosivi O. Epidemiology of selected mycobacteria that infect humans and other animals. Rev Sci Tech Off Int Epiz. 2001;20(1):325-37.
4. World Health Organization. Buruli ulcer - *Mycobacterium ulcerans* infection. Geneva : Asiedu K, Scherpbier RW, Raviglione M. eds. 2000. WHO/CDS/GBUI/2000.1.
Disponible à http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_CDS_GBUI_2000.1_fre.pdf (accès le 28 Novembre 2013).
5. George KM, Chatterie D, Gunawaradana G, Welty D, Hayman J, Lee R, et al. Mycolactone : a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. Science. 1999;283:854-7.
6. Pimsler M, Sponsler TA, Meyers WM. Immunosuppressive properties of the soluble toxin from *Mycobacterium ulcerans*. J Infect Dis. 1988;157:577-80.
7. Dega H, Chosidow O, Barete S, Carbonnelle B, Grosset J, Jarlier V. Infection à *Mycobacterium ulcerans*. Paris. Ann Med Interne. 2000;151:339-44.
8. Organisation Mondiale de la Santé. L'ulcère de Buruli – Infection à *Mycobacterium ulcerans*. Centre des medias. Aide-mémoire. Juin 2013. N°199.
Disponible à <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs199/fr/> (accès le 28 Novembre 2013).

9. Darie H. Infection par *Mycobacterium ulcerans* : aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques. Bull Soc Path Exot. 2003;96:368-71.
10. Fyfe J, O' Brien C. Bairnsdale ulcer in humans and animals. Microbiology Australia. November 2013;189-91.
11. Clancey JK, Dodge OG, Lunn HF, Oduori ML. Mycobacterial skin ulcers in Uganda. Lancet. 1961;2(7209):951-4.
12. Asiedu K, Scherpbier R, Raviglion M. Rapport : Conférence internationale sur la lutte et la recherche relatives à l'ulcère de Buruli ; 6-8 juillet 1998 ; Yamoussokro (Côte d'Ivoire). Genève : OMS; 1998.
Disponible à http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_TB_98.252_fre.pdf (accès le 04 Décembre 2013).
13. Organisation Mondiale de la Santé. Agir pour réduire l'impact mondial des maladies tropicales négligées : premier rapport de l'OMS sur les maladies tropicales négligées. Genève : OMS; 2011. WHO/HTM/NTD/2010.
Disponible à http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789242564099_fre.pdf?ua=1 (accès le 05 Décembre 2013).
14. Asiedu K, Etuafu S. Socioeconomic implications of Buruli ulcer in Ghana : a three-year review. Am J Trop Med Hyg. 1998;59:1015-22.
15. Amofah G, Bonsu F, Tetteh C, Okrah J, Asamoah K, Asiedu K, et al. Buruli ulcer in Ghana : results of a national case search. Emerg Infect Dis. 2002;8:167-70.
16. Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM, Guedenon A, et al. *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) in rural hospital, Southern Benin, 1997-2001. Emerg Infect Dis. 2004;10:1391-8.
17. Pierre Aubry. Ulcère de Buruli. Actualités 2013. Med Trop, Mise à jour le 04 Novembre 2013.
Disponible à http://medecinetropicale.free.fr/cours/ulcere_buruli.pdf (accès le 08 Janvier 2014).

18. World Health Organization. Global tuberculosis report 2013. WHO. 2013. WHO/HTM/TB/2013.11.
Disponible à http://www.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf (accès le 15 Avril 2014).
19. World Health Organization. Global leprosy situation 2012. Wkly Epidemiol Rec. 2012;34(87):317-28.
20. Organisation Mondiale de la Santé. Ulcère de Buruli. In : Savioli L, Daumerie D, eds. Continuer à agir pour réduire l'impact mondial des maladies tropicales négligées : deuxième rapport de l'OMS sur les maladies tropicales négligées. 2014 : 41-4. WHO/HTM/NTD/2013.1.
21. Owusu A, Adamba C. Household perceptions, treatment-seeking behaviors and health outcomes for Buruli ulcer disease in a Peri-Urban District in Ghana. Appl Sociol. 2012;2:179-86. DOI: [10.4236/aasoci.2012.23024](https://doi.org/10.4236/aasoci.2012.23024)
22. Organisation Mondiale de la Santé. Ulcère de Buruli. Diagnostic de l'infection à *Mycobacterium ulcerans*. In: Portaels F, Johnson P, Meyers WM, eds. 2001: 42. WHO/CDS/4.
23. Organisation Mondiale de la Santé. Diagnostic de l'Ulcère de Buruli au laboratoire. Un manuel destiné au personnel de santé. In: Portaels F, eds. 2014 : 105. WHO/HTM/NTD/IDM/2014.1.
24. MacCallum PTJ, Buckle G, Sissons HA. A new mycobacterial infection in man. J Pathol Bacteriol. 1948;60:93-122.
25. Clancey J, Dodge R, Lunn HF. Study of a *mycobacterium* causing skin ulceration in Uganda. Ann Soci Belge Méd trop. 1962;42:585-90.
26. Tolhurst JC, Buckle G. A new mycobacterial infection in man: experimental investigations in laboratory animals. J Pathol Bacteriol. 1948;60:102-10.

27. Buckle G, Tolhurst JC. A new mycobacterial infection in man : cultivation in the mycobacterium. J Pathol Bacteriol. 1948;60:116-22.
28. Dodge OG, Lunn HF. Buruli ulcer : a mycobacterial skin ulcer in a Uganda child. J Trop Med Hyg. 1962;65:139-42.
29. Kibadi K, Aujoulat I, Meyers WM, Mokassa L, Muyembe T, Portaels F, et al. Étude des appellations et des représentations attachées à l'infection à *Mycobacterium ulcerans* dans différents pays endémiques d'Afrique. Med Trop. 2007;67(3):241-8.
30. Lavender CJ, Senanayake SN, Fyfe JA, Buntine JA , Globan M. First case of *Mycobacterium ulcerans* disease (Bairnsdale or Buruli ulcer) acquired in New South Wales. Med J Aust. 2007;186(2):62-3.
31. Nolte F, Metchock B. *Mycobacterium*. In : Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, dir. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington DC : Am Soc Microbiol. 1995. p. 400-37.
32. Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. Int J Syst Bacteriol. 1997;47:479-91.
33. American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med. 1997;156(2):S1-S25.
34. Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin N Amer. 1959;43:273.
35. Pettit JHS, Marchette NJ, Rees RJW. *Mycobacterium ulcerans* infection. Clinical and bacteriological study of the first cases recognized in South East Asia. Br J Dermatol. 1996;78:187-97.
36. Pattyn SN. Bactériologie et pathologie humaine et expérimentale des ulcères à *Mycobacterium ulcerans*. Ann Soc Belge Méd Trop. 1965;45(2):121-30.

37. Barksdale L, Kim KS. *Mycobacterium*. Bacteriol Rev. 1977;41:217.
38. Pilet CH, Bourdon JL, Toma B, Marchal N, Balbastre C. Bactériologie médicale et vétérinaire. 2ème édition. Paris: DOIN; 1979.
39. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. Annu Rev Biochem. 1995;64:29-63.
40. Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffé M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. J Bacteriol. 2008;190(16):5672-80.
41. Wayne LG. Mycobacterial speciation. In : Kubica GP, Wayne LG, dir. The mycobacteria. A sourcebook, Part A. New York : Marcel Dekker; 1984. p. 25:186.
42. Portaels F, Pattyn SR. Growth of mycobacteria in relation to the pH of the medium. Ann microbial. 1982;133:213-21.
43. Palomino JC, Obiang AM, Realini L, Meyers WM, Portaels F. Effect of oxygen on *Mycobacterium ulcerans* growth in the BACTEC system. J clin microbiol. 1998;36:3420-2.
44. Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reysset G, Garnier T, et al. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer, the causative agent of Buruli ulcer. Genome Res. 2007;17:192-200. DOI: [10.1101/gr.5942807](https://doi.org/10.1101/gr.5942807)
45. Röltgen K, Stinear T, Pluschke G. The genome, evolution and diversity of *Mycobacterium ulcerans*. Infect Genet Evol. 2012;12:522-9.
46. Stinear TP, Pryor MJ, Porter JL, Cole ST. Functional analysis and annotation of the virulence plasmid pMUM001 from *Mycobacterium ulcerans*. Microbiology. 2005;151:683-92.

47. Stinear T, Ross BC, Davies JK, Marino L, Robins-Browne RM, Oppedisano F, et al. Identification and characterization of IS2404 and IS2606: two distinct repeated sequences for detection of *Mycobacterium ulcerans* by PCR. J Clin Microbiol. 1999;37(4):1018-23.
48. Stragier P, Ablordey A, Durnez L, Portaels F. VNTR analysis differentiates *Mycobacterium ulcerans* and IS2404 positive mycobacteria. Syst Appl Microbiol. 2007;30:525-30.
49. Stinear TP, Jenkin GA, Johnson PD, Davies JK. Comparative genetic analysis of *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* reveals evidence of recent divergence. J Bacteriol. 2000;182:6322-30.
50. Marri PR, Bannantine JP, Golding GB. Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. FEMS Microbiol Rev. 2006;30:906-25.
51. Avannis-Aghajani, Holtzman EJK, Aronson T, Glover N, Holtzman A, Boian M, et al. Molecular technique for rapid identification of mycobacteria. J Clin Microbiol. 1996;34(1):98-102.
52. Narh CA, Mosi L, Quaye C, Tay SC, Bonfoh B, de Souza DK. Genotyping tools for *Mycobacterium ulcerans*-drawbacks and future prospects. Mycobact Dis. 2014 May 5;4(2):100-49.
53. Portaels F, Fonteyne PA, de Beenhouwer H, de Rijk P, Guedenon A, Hayman J, et al. Variability in 3' end of 16S rRNA sequence of *Mycobacterium ulcerans* is related to geographic origin of isolates. J Clin Microbiol. 1996;34:962-5.
54. Nakanaga K, Ishii N, Suzuki K, Kazunari T, Masamichi G, Tsutomu O, et al. "*Mycobacterium ulcerans* subsp. *Shinshuense*" isolated from a skin ulcer lesion : identification based on 16S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol. 2007;45:3840-3.

55. Trott KA, Stacy BA, Lifland BD, Diggs HE, Harland RM, Khokha MK, et al. Characterization of a *Mycobacterium ulcerans*-like infection in a colony of African tropical clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Comp Med*. 2004;54:309-17.
56. Tobias NJ, Doig KD, Medema MH, Chen H, Haring V, Moore R et al. Complete genome sequence of the frog pathogen *Mycobacterium ulcerans* Ecovar *Liflandii*. *J Bacteriol*. 2013;195(3):556-64.
57. Stinear TP, Mve-Obiang A, Small PL, Frigui W, Pryor MJ, Brosch R, et al. Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(5):1345-9.
58. Yip MJ, Porter JL, Fyfe JA, Lavender CJ, Portaels F, Rhodes M, et al. Evolution of *Mycobacterium ulcerans* and other mycolactone-producing mycobacteria from a common *Mycobacterium marinum* progenitor. *J Bacteriol*. 2007;189:2021-9.
59. Mve-Obiang A, Lee RE, Portaels F, Small PL. Heterogeneity of mycolactones produced by clinical isolates of *Mycobacterium ulcerans*: implications for virulence. *Infect Immun*. 2003 Feb;71(2):774-83.
60. Pidot SJ, Asiedu K, Kaser M, Fyfe, Stinear TP. *Mycobacterium ulcerans* and other mycolactone-producing mycobacteria should be considered a single species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:663.
61. Evans M, Mawdsley J, Bull R, Lockwood DN, Thangaraj H, Shanahan D, et al. Buruli ulcer in a visitor to London. *Br J Dermatol*. 2003;149:907-9.
62. McGann H, Stragier P, Portaels F, Gascoyne-Binzi D, Collyns T, Lucas S, et al. Buruli ulcer in United Kingdom tourist returning from Latin America. *Emerg infect dis*. 2009;15:18-27.
63. Ezzedine K, Pistone T, Guir V, Denis Malvy. Painful Buruli Ulcer in a Malian Visitor to France. *Acta DermVenereol*. 2010;90:424.
64. Marsollier L, Aubry J, Saint-André JP, Robert R, Legras P, AL Manceau, et al. Ecology and transmission of *Mycobacterium ulcerans*. *Pathol Biol*. 2003;51:490-5.

65. Portaels F. Epidémiologie des ulcères à *Mycobacterium ulcerans*. Ann Soc Belge Med Trop. 1989 ;69:91-103.
66. Slinear TP, Jenkin GA, Davies JK, Hayman JA, Oppidessmo F, Johnson PDR. Identification of *Mycobacterium ulcerans* in the environment from an endemic region in South Eastern Australia with sequence-capture PCR. Appl environ Microbio. 2000;6:3208-13.
67. Portaels F, Fonteyne PA, Meyers WM. Insects in transmission of *Mycobacterium ulcerans* infection. Lancet. 1999;353:986.
68. Ross BC, Johnson PD, Oppedisano F, Marino L, Sievers A, Stinear T, et al. Detection of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples during an outbreak of ulcerative disease. Appl Environ Microbiol. 1997;63:4135-8.
69. Durnez L, Suykerbuyk P, Nicolas V, Barrière P, Verheyen E, Johnson CR, et al. Terrestrial small mammals as reservoirs of *Mycobacterium ulcerans* in Benin. Appl Environ Microbiol. 2010 Jul;76(13):4574-7. DOI : [10.1128/AEM.00199-10](https://doi.org/10.1128/AEM.00199-10)
70. Morris A, Gozlan R, Marion E, Marsollier L, Andreou D, Sanhueza D, et al. First detection of *Mycobacterium ulcerans* DNA in environmental samples from South America. PLoS Negl Trop Dis 2014; 8(1):2660. DOI: [10.1371/journal.pntd.0002660](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002660)
71. Darie H, Le Guyadec T, Touze JE. Aspects épidémiologiques et cliniques de l'ulcère de Buruli en Côte d'Ivoire: à propos de 124 observations récentes. Bull Soc Pathol Exot. 1993;86:272-6.
72. Meyers WM, Shelly WM, Connor DH, Esther KM. Human *Mycobacterium ulcerans* infections developing at sites of trauma to skin. Am J Trop Med Hyg. 1974;23(5):919-23.
73. Hayman J. Postulated epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection. Int J Epidemiol. 1991;20:1093-8.

74. Hofer M, Hirschel B, Kirschner P, Beghetti M, Kaclin A, Siegrist CA, et al. Disseminated osteomyelitis from *Mycobacterium ulcerans* after a snakebite. N Engl J Med 1993; 328:1007-9. DOI: [10.1056/NEJM199304083281405](https://doi.org/10.1056/NEJM199304083281405)
75. Ahoua L, Guetta AN, Ekaza E, Bouzid S, N'Guessan R, Dosso M. Risk factors for Buruli ulcer in Côte d'Ivoire : Results of a case-control study, August 2001. Af J Biotechnol. 2009;8(4):536-46.
76. Debacker M, Aguiar J, Steunou C, Zinsou C, Meyers WM, Scott JT, et al. *Mycobacterium ulcerans* disease : role of age and gender in incidence and morbidity. Trop Med Int. 2004;9:1297-304.
77. Johnson RC, Ifebe D, Hans-Moevi A, Kestens L, Houessou R, Guedenon A, et al. Disseminated *Mycobacterium ulcerans* disease in an HIV-positive patient : a case study. Aids. 2002;16:1704-5.
78. Snyder DS, Small PL. Uptake and cellular actions of mycolactone, a virulence determinant for *Mycobacterium ulcerans*. Microb Pathog. 2003;34(2):91-101.
79. George KM, Pascopella L, Welty DM, Small LC. A *Mycobacterium ulcerans* toxin, mycolactone, causes apoptosis in guinea pig ulcers and tissue culture cells. Infect Immun. 2000;68(2):877-83.
80. Read JK, Heggie CM, Meyers WM, Connor DH. Cytotoxic activity of *Mycobacterium ulcerans*. Infect Immun. 1974;9(6):1114-22.
81. Guenin-Macé L, Veyron-Churlet R, Thoulouze MI, Romet-Lemonne G, Hong H, Leadlay PF, et al. Mycolactone activation of Wiskott-Aldrich syndrome proteins underpins Buruli ulcer formation. J Clin Invest. 2013;123(4):1501-12. DOI: [10.1172/JCI66576](https://doi.org/10.1172/JCI66576)
82. Torrado E, Adusumilli S, Fraga AG, Small PL, Castro AG, Pedrosa J. Mycolactone mediated inhibition of Tumor Necrosis Factor production by macrophages infected with *Mycobacterium ulcerans* has implications for the control of infection. Infect Immun. 2007;75:3979-88.

83. Adusumilli S, Mve-Obiang A, Sparer T, Meyers W, Hayman J, Small PL. *Mycobacterium ulcerans* toxic macrolide, mycolactone, modulates the host immune response and cellular location of *M. ulcerans* in vitro and in vivo. *Cell Microbiol.* 2005;7:1295-304.
84. Goto M, Nakanaga K, Aung T, Saito H, Ishii N, Yonezawa S. Nerve damage in *Mycobacterium ulcerans*-infected mice : probable cause of painlessness in buruli ulcer. *Am J Pathol.* 2006;168(3):805-11.
85. Stanford JL, Revill WD, Gunthorpe WJ, Grange JM. The production and preliminary investigation of Burulin, a new skin test reagent for *Mycobacterium ulcerans* infection. *J Hyg.* 1975;74(1):7-16.
86. Pzolla N, Sarkar MR, Strecker W, Kern P, Kinzl L, Meyers WM, et al. Buruli ulcer : a systemic disease. *Clin Infec Dis.* 2003;37:78-82.
87. Schipper HS, Rutgers B, Huitema MG, Etuaful SN, Westenbrink BD, Limburg PC, et al. Systemic and local interferon-gamma production following *Mycobacterium ulcerans* infection. *Clin Exp Immunol.* 2007;150(3):451-9.
88. Kiszewski AE, Becerril E, Aguilar LD, Kadir IT, Meyers W, Portaels F, et al. The local immune response in ulcerative lesions of Buruli disease. *Clin Exp Immunol.* 2006;143:445-51.
89. Trubiano JA, Lavender CJ, Fyfe JA, Bittmann S, Johnson PD. The incubation period of Buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* infection). *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Oct 3;7(10):2463.
90. Kibadi K, Muyembe T, Phanzu D, Mbala L, Meyers WM, Portaels F. Association large ulcère de Buruli thoraco-abdominal et pleurésie massive homolatérale : Aspects diagnostiques et difficultés de prise en charge, à propos d'un cas. *Méd Afr Noire.* 2004;51(12):643-8.
91. Ecra EJ, Gbery IP, Aka BR, Sangare A, Kouame K, Dion L, et al. Ulcère de Buruli : à propos de deux cas thoraco-abdominaux associés à une pleurésie. *Méd Afr Noire.* 2001;48(5):23-6.

92. Phillips RO, Frimpong M, Sarfo FS, Kretschmer B, Beissner M, Debrah A, et al. Infection with *Mansonella perstans* nematodes in Buruli ulcer patients, Ghana. *Emerg Infect Dis.* June 2014;20(6):1000-3.
93. Sica A, Dekou A, Kaba L, Ouattara D, Kouame B, Konan PG, et al. Localisations génitales de l'ulcère de Buruli (UB) : aspects cliniques et thérapeutiques. *Prog Urol.* 2005;15:736-8.
94. Guarner J, Bartlett J, Whitney EA, Raghunathan PL, Stienstra Y, Asamoah K, et al. Histopathologic features of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:651-6.
95. Organisation Mondiale de la Santé. Traitement de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli) : recommandations à l'intention des agents de santé. Italie : OMS ; 2012. WHO/HTM/NTD/IDM/2012.1.
96. Organisation Mondiale de la Santé. Recommandations provisoires pour certains antibiotiques dans la prise en charge de l'infection à *Mycobacterium ulcerans* (ulcère de Buruli). Genève : OMS ; 2004. WHO/CDS/CPE/GBUI.
97. Chauty A, Ardant MF, Adeye A, Euverte H, Guedenon A, Johnson C, et al. Promising clinical efficacy of streptomycin-rifampin combination for treatment of buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* disease). *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:4029-35.
98. Sizaire V, Nackers F, Portaels F. *Mycobacterium ulcerans* infection : control, diagnosis, and treatment. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:288-96.
99. Krieg RE, Wolcott JH, Meyers WM. *Mycobacterium ulcerans* infection : treatment with rifampin, hyperbaric oxygenation, and heat. *Aviat Space Environ Med.* 1979;50(9):888-92.
100. Guedenon A, Zinsou C, Josse R, Andele K, Pritze S, Portaels F, et al. Traditional treatment of Buruli ulcer in Benin. *Arch Dermatol.* 1995;131:741-2.

101. Nackers F, Dramax M, Johnson RC, Zinsou C, Robert A, Asamoah K, et al. BCG vaccine effectiveness against Buruli ulcer: a case control study in Benin. *Am Trop Med Hyg.* 2006;75:768-74.
102. Landier J, Boisier P, Fotso F, Noumen-Djeunga B, Sime J, Gaetan F, et al. Adequate wound care and use of bed nets as protective factors against Buruli ulcer: results from a case control study in Cameroon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:1392.
103. World Health Organization. Cotonou Declaration on Buruli Ulcer. Cotonou, Benin. 30 March 2009.
Disponible à
http://www.who.int/neglected_diseases/Benin_declaration_2009_eng_ok.pdf
(accès le 06 Février 2013).
104. Marsollier L, Deniaux E, Brodin P, Marot A, Wondje CM, Saint-André JP, et al. Protection against *Mycobacterium ulcerans* lesion development by exposure to aquatic insect saliva. *PLoS Med.* 2007;4(2):e64. DOI: [10.1371/journal.pmed.0040064](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0040064)
105. Durnez L, Eddyani M, Mgone GF, Katakweba A, Katholi CR, Macgang'u RR, et al. First detection of mycobacteria in African rodents and insectivores, using stratified pool screening. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:768-73.
106. Sakaguchi K, Iima H, Hirayama K, Okamoto M, Matsuda K, Miyasho T, et al. *Mycobacterium ulcerans* infection in an Indian Flap-Shelled Turtle (*Lissemys punctata punctata*). *J Vet Med Sci.* 2011;73(9):1217-20.
107. Mitchell PJ, Jerrett IV, Slee KJ. Skin ulcers caused by *Mycobacterium ulcerans* in koalas near Bairnsdale, Australia. *Pathology.* 1984;16:256-60.
108. Legione AR. The distribution and prevalence of *Mycobacterium ulcerans* in common ringtail possums (*Pseudocheirus peregrinus*) and common brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) in Victoria [Master of Science]. Zoology: Melbourne, The University of Melbourne; 2010. 125 p.

109. O'Brien CR, Handasyde KA, Hibble J, Lavender CJ, Legione AR, Mc Cowan C, et al. Clinical, microbiological and pathological findings of *Mycobacterium ulcerans* infection in three Australian Possum species. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(1): e2666. DOI : [10.1371/journal.pntd.0002666](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002666)
110. Fyfe JAM, Lavender CJ, Handasyde KA, Legione AR, O'Brien CR, Stinear F, et al. A major role for mammals in the ecology of *Mycobacterium ulcerans*. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4:e791. DOI : [10.1371/journal.pntd.0000791](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000791)
111. van Zyl A, Daniel J, Wayne J, McCowan C, Malik R, Jelfs P, et al. *Mycobacterium ulcerans* infections in two horses in south-eastern Australia. Aust Vet J. 2010;88:101-6.
112. O'Brien CR, McMillan E, Harris O, O'Brien DP, Lavender JC, Globan M, et al. Localised *Mycobacterium ulcerans* infection in four dogs. Aust Vet J. 2011;89:506-10.
113. O'Brien CR, Kuseff G, McMillan E, McCowan C, Lavender JC, Globan M, et al. *Mycobacterium ulcerans* infection in two alpacas. Aust Vet J. 2013;91:296-300. DOI : [10.1111/avj.12071](https://doi.org/10.1111/avj.12071)
114. Elsner L, Wayne J, O'Brien CR, McCoawan C, Malik R, Hayman JA, et al. Localised *Mycobacterium ulcerans* infection in a cat in Australia. J Feline Med Surg. 2008;10:407-12.
115. Willson SJ, Kaufman MG, Merritt RW, Williamson HR, Malakauskas DM, Benbow ME. Fish and amphibians as potential reservoirs of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer disease. Infect Ecol Epidemiol. 2013;3. <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v3i0.19946>
116. Mitchell PJ, McOrist, R Bilney. Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection in Koalas (*Phascolarctos cinereus*) on Raymond Island, Southern Australia. J Wildl Dis. 1987;23(3):386-90.

117. McOrist S, Jerrett IV, Anderson M, Hayman J. Cutaneous and respiratory tract infection with *Mycobacterium ulcerans* in two koalas (*Phascolarctos cinereus*). J Wildl Dis. 1985;21:171-3.
118. Buckle G. Notes on *Mycobacterium ulcerans*. Aust NZ J Surg. 1972;41:320-3.
119. Revill WDL, Morrow RH, Parson W, Kiryabwire JWM. *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer). In : Shaper AG, Kibukamusoke JW, Hutt MSR, dir. Medicine in a tropical environment; 27-28 September 1972; London. London : British Medical Association; 1972. p. 19-31.
120. Barker DJP, Clancey JK, Rao SK. Mycobacteria on vegetation in Uganda. East Afr med J. 1972;49:667-71.
121. Lavender CJ. Evaluation of VNTR typing for the identification of *Mycobacterium ulcerans* in environmental samples from Victoria, Australia. FEMS Microbiol Lett. 2008;287:250-5
122. Carson C, Lavender CJ, Handasyde KA, O'Brien CR, Hewitt N, Johson PDR, et al. Potential wildlife sentinels for monitoring the endemic spread of human Buruli ulcer in South-East Australia. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(1):2668-80. DOI: [10.1371/journal.pntd.0002668](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002668)
123. Eddyani M, Ofori-Adjei D, Teugels G, Weirtdt DD, Boakye D, Meyers M, et al. Potential role of fish in transmission of *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer) : an environmental study. Appl Environ Microbiol. 2004;70(9):5679-81.
124. Johnson PDR, Azuolas J, Lavender CJ, Wishart E, Stinear TP, Hayman JA, et al. *Mycobacterium ulcerans* in mosquitoes captured during outbreak of Buruli Ulcer, Southeastern Australia. Emerg Infect Dis. 2007;13:1653-60.
125. Johnson PDR, Lavender CJ. Correlation between Buruli ulcer and vector-borne notifiable diseases, Victoria, Australia. Emerg Infect Dis. 2009;15:4.
126. Quek TYJ, Athan E, Henry MJ, Pasco JA, Redden-Hoare J, Hughes A, et al. Risk factors for *Mycobacterium ulcerans* infection, southeastern Australia. Emerg Infect Dis. 2007;13(11):1661-6.

127. Marsollier L, Robert R, Aubry J, Saint-André JP, Kouakou H, Legras P, et al. Aquatic Insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:4623-8.
128. Marsollier L, Saint-André JP, Frigui W, Reysset G, Milon G, Aubry J, et al. Early trafficking events of *Mycobacterium ulcerans* within *Naucoris cimicoides*. *Cell Microbiol.* 2007;9:347-55. DOI : [10.1111/j.1462-5822.2006.00790.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00790.x)
129. Marsollier L, Severin T, Aubry J, Merritt RW, Saint-André JP, Legras P, et al. Aquatic snails, passive hosts of *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:6296-8.
130. Marsollier L, Aubry J, Coutanceau E, André J, Small P, Milon G, et al. Colonization of the salivary glands of *Naucoris cimicoides* by *Mycobacterium ulcerans* requires host plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone. *Cell Microbiol.* 2005;7:935-43.
131. Ohtsuka M, Kikuchi N, Yamamoto T, Suzutani T, Nakanaga K, Suzuki K, et al. Buruli ulcer caused by *Mycobacterium ulcerans* Subsp *shinshuense* : a rare case of familial concurrent occurrence and detection of Insertion Sequence 2404 in Japan. *JAMA Dermatol.* 2014;150(1):64-7. DOI: [10.1001/jamadermatol.2013.6816](https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2013.6816)
132. Fyfe J, Porter J, Reppas G, Malik R, Stinear T. Membres inhabituels du complexe *M. marinum*/*M. ulcerans* à l'origine de maladies chez les reptiles australiens. Réunion annuelle de l'OMS sur l'ulcère de Buruli. Résumés ; 31 Mars au 02 Avril 2008. p. 98.
Disponible à http://www.who.int/buruli/events/Abstract_FR_FINAL.pdf (accès le 23 Janvier 2014).
133. Australian Wildlife Health Network. *Mycobacterium ulcerans* disease (Buruli ulcer). FACT SHEET. 2013 March 18.
Disponible à [https://wildlifehealthaustralia.com.au/Portals/0/Documents/FactSheets/Mycobacterium%20ulcerans%2029%20Dec%202010%20\(2.0\).pdf](https://wildlifehealthaustralia.com.au/Portals/0/Documents/FactSheets/Mycobacterium%20ulcerans%2029%20Dec%202010%20(2.0).pdf) (accès le 28 Novembre 2013).

134. Malik R, Wigney DI, Dawson D, Martin P, Hunt GB, Love DN. Infection of the sub cutis and skin of cats with rapidly growing mycobacteria : a review of microbiological and clinical findings. *J Fel Med Surg.* 2000;2:29-34.
135. Malik R, Hughes MS, James G, Martin P, Wigney DI, Canfield PJ, et al. Feline leprosy : two different clinical syndromes. *J Fel Med Surg.* 2000;4:43-59.
136. Gunn-Moore D, Dean R, Shaw S. Mycobacterial infections in cats and dogs. *In Pract.* 2010;32:444-52.
137. Malik R, Smits B, Reppas G, Laprie C, O'Brien C, Fyfe F. Ulcerated and nonulcerated nontuberculous cutaneous mycobacterial granulomas in cats and dogs. *Vet Dermatol.* 2013;24:146-33. DOI: [10.1111/j.1365-3164.2012.01104.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01104.x)
138. DeCock A, Mendoza L, Pathye AA, Agello L, kaufman L. *Pythium insidiosum* sp. the Etiologic Agent of Pythiosis *J Clin Microbiol.* 1987;25:344-9.
139. O'Brien DP, Jenkin G, Buntine J, Steffen CM, McDonald A, Horne S, et al. Treatment and prevention of *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer) in Australia: guideline update. *Med J Aust.* 2014;200(5):267-70.
140. Johnson PD, Hayman JA, Quek TY, Fyfe J, Jenkin GA, Buntine JA, et al. Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and control of *Mycobacterium ulcerans* infection (Bairnsdale or Buruli ulcer) in Victoria, Australia. *Med J Aust.* 2007;186:64-8.
141. Marcus LC, Stottmeier KD, Morrow RH. Experimental infection of Anole Lizards (*Anolis Carolinensis*) with *Mycobacterium ulcerans* by the subcutaneous route. *Am J Trop Med Hyg.* 1975;24(4):649-55.
142. Tolhurst BJC, Buckle G. The Experimental infection of Calves with *Mycobacterium ulcerans*. *Hyg.* 1959;57(1):47-56.
143. Walsh DS, Meyers WM, Kreig RE, Walsh GP. Transmission of *Mycobacterium ulcerans* to the nine-banded armadillo. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(5):694-7.

144. Addo P, Adu-Addai B, Quartey M, Abbas M, Okang I, Owusu E, et al. Clinical and histopathological presentation of buruli ulcer in experimentally infected Grasscutters (*Thryonomys swinderianus*). Internet J Trop Med. 2006;3:2.
145. Williamson HR, Mosi L, Donnell R, Aqqad M, Merritt RW, Small PL. *Mycobacterium ulcerans* fails to infect through skin abrasions in a Guinea Pig infection model : implications for transmission. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(4):2770. DOI: [10.1371/journal.pntd.0002770](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002770)
146. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Giquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993;31(2):406-9.
147. Eyangoh S. Cours International M2U. Microbiologie de *Mycobacterium ulcerans*, agent responsable de l'ulcère de Buruli. Manuel de travaux pratiques. 28 Novembre – 3 Décembre 2011. Cameroun. [Communication personnelle].
148. Institut Louis Malardé. PCR en temps réel. Disponible à <http://www.ilm.pf/PCRtempsreel> (accès le 28 Novembre 2013).
149. Tse C, Capeau J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. Ann Biol Clin. 2003;61:279-93.
150. Rondini S, Mensah-Quainoo E, Troll H, Bodmer T, Pluschke G. Development and application of real-time PCR assay for quantification of *Mycobacterium ulcerans* DNA. J Clin Microbiol. 2003;41:4231-7.
151. Durnez L, Stragier P, Roebben K, Ablordey A, Leirs H, Portaels F. A comparison of DNA extraction for the detection of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer, in clinical and environmental specimens. J Microbiol Meth. 2009;76:152-8.
152. Ross BC, Marino L, Oppedisano F, Edwards R, Robins-Browne R, Johnson P. Development of a PCR assay for rapid diagnosis of *Mycobacterium ulcerans* infection. J Clin Microbiol. 1997;35(7):1696-700.

153. Stinear T, Davies JK, Jenkin GA, Portaels F, Ross BC, Oppedisano F. A Simple PCR method for rapid genotype analysis of *Mycobacterium ulcerans*. J Clin Microbiol. 2000 April;38(4):1482-7.
154. Fyfe JAM, Lavender CJ, Johnson PDR, Globan M, Sievers A, Azuolas, et al. Development and application of two Multiplex Real-Time PCR assays for the detection of *Mycobacterium ulcerans* in clinical and environmental samples. Appl Environ Microbiol. 2007;73(15):4733-6.
155. Njiru ZK, Yeboah-Manu D, Stinear TP, Fyfe JAM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium ulcerans* by use of a Loop-Mediated Isothermal Amplification test. J Clin Microbiol. 2012;50(5):1737-41. DOI: [10.1128/JCM.06460-11](https://doi.org/10.1128/JCM.06460-11)
156. Ablordey A, Amissah DA, Aboagye IF, Hatano B, Yamazaki T, Sata T, et al. Detection of *Mycobacterium ulcerans* by the Loop Mediated Isothermal Amplification method. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(4):e1590. DOI: [10.1371/journal.pntd.0001590](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001590)

ANNEXES

ANNEXES. PREPARATION DES REACTIFS ET TAMPONS

1- RÉACTIFS POUR L'EXTRACTION D'ADN GÉNOMIQUE

- **TE 10X** (solution stock)

Tris (hydroxyméthyl aminométhane) [Sigma, réf. 80K5412] 1,211g

EDTA (éthylène diamine acide tétraacétique) [Sigma, réf. 070M0262V] 0,3722g

Eau distillée (ED) qsp 100ml

Le tampon est stérilisé à l'autoclave 120°C pendant 15 min et conservé à température ambiante.

- **TE 1X**

TE 10X 50ml

ED qsp 500ml

- **Lysozyme 10mg/ml**

Lysozyme [Sigma, réf. 53H7154] 10mg

ED qsp 1ml

La solution de lysozyme est distribuée en aliquote de 50µl et conservée à -20°C.

- **SDS 10%**

SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) [Sigma, réf. SLBH0710V] 10g

ED qsp 100ml

- **Protéinase K 10 mg/ml**

Protéinase K [Eurobio, réf. 069829]..... 100mg

ED qsp..... 10ml

La solution de Protéinase K est distribuée en aliquote de 50µl et conservée à -20°C.

- **Protéinase K 10mg/ml / SDS 10%**

Protéinase K 10mg/ml 5µl

SDS 10% 70µl

- **NaCl 5M**

NaCl [Normapur, Prolabo, réf. 27810.295] 29,2g

ED 80ml

ED qsp 100ml

La quantité NaCl est ajoutée dans l'ED et le volume est ajusté à 100ml par de l'ED. La solution est stérilisée à l'autoclave 120°C pendant 15 min et conservée à température ambiante.

- **CTAB 10% /NaCl 0.7M**

NaCl [Normapur, Prolabo, réf. 27810.295] 2,05g

ED qsp 40ml

CTAB (Bromure de cetyltriméthylammonium) [Sigma, réf. 036K0145] 5g

ED qsp 50ml

Les deux réactifs sont préparés séparément et sont ensuite mélangés. Le mélange est conservé à température ambiante.

- **Chloroforme / Alcool isoamylique 24:1**

Chloroforme [Sigma, réf.SZBA1320] 96ml

Alcool isoamylique [Normapur, Prolabo, réf. 032BR] 4ml

- **Isopropanol [Rectapur, Prolabo, réf. 20842. 298]**

- **Ethanol 70%**

Ethanol [Rectapur, Prolabo réf. 20821.296] 70ml

ED qsp 100ml

2- AMORCES ET SONDE POUR L'AMPLIFICATION GENIQUE (PCR)

- **Solutions stocks 100 μ M**

Amorce/ sonde	Référence (SIGMA, réf.)	Sequence (5' → 3')	Eau purifiée HPLC pour 100 μM (solution stock)
MU1- new	8016324581-000010	GAT CAA GCG TTC ACG AGT GA	454 μ l
MU2	8016324581-000020	GGC AGT TAC TTC ACT GCA CA	439 μ l
MUF1	8016324581-000030	ATT GGT GCC GAT CGA GTT G	452 μ l
MUR1	8016324581-000040	TCG CTT TGG CGC GTA AA	411 μ l
MUFT1	8016814903-000010	6FAM - CAC CAC GCA GCA TTC TTG CCG T - TAMRA	51 μ l

Les solutions stocks d'amorces et de sonde sont distribuées en aliquote de 50 μ l et conservées à - 20°C.

- **Solutions de travail (20 μ M) : 100 μ l**

Amorce 100 μ M 20 μ l

Eau purifiée HPLC 80 μ l

- **Solutions de travail (5 pmol/μl) : 100 μl**

Amorce / Sonde 100 μM 5μl

Eau purifiée HPLC 95μl

Les amorces et la sonde sont conservées à - 20°C. Les tubes de la sonde sont enveloppés dans un papier aluminium afin de les mettre à l'abri de la lumière.

3- RÉACTIFS POUR L'ÉLECTROPHORÈSE

- **TBE 10X (solution stock)**

Tris [Sigma, réf. T-1378] 107,7g

Acide orthoborique [Normapur, Prolabo, réf. 20185.297] 55g

EDTA [Sigma, réf. E-5134] 9,3g

ED 800ml

ED qsp 1000ml

Le tris, l'Acide orthoborique et l'EDTA sont à la fois dissouts dans 800μl d'ED, puis le volume est ajusté à 1000ml. Le tampon TBE 10X est stérilisé à l'autoclave 120°C pendant 15 min et conservé à température ambiante.

- **TBE 1X**

TBE 10X 100ml

ED qsp 1000ml

- **BET (Bromure d'éthidium) (10mg/ml)**

Bromure d'éthidium [Sigma, réf. E-8751]..... 50mg

ED qsp 5ml

La solution de BET est conservée à +4°C.

- **Bleu 6X**

Sucrose 40% [Sigma, réf. S-0389]	4g
Bleu de bromophénol [Sigma, réf. B-6131]	25mg
ED qsp	10ml

Le Bleu 6X est aliquoté et conservé à +4°C.

- **Marqueurs de poids moléculaire λ DNA (50ng/ μ l) : pour le dosage**

λ DNA (500 μ g/ml) [SIGMA, Réf. D-9780]	10 μ l
TE 1X	157 μ l
Bleu 6X	33 μ l

Le λ DNA est conservé à +4°C.

- **Marqueur de poids moléculaire 100pb DNA Ladder 0,1 μ g/ μ l (SOLIS BIODYNS, réf. 100pb BPB 0160)**

Marqueur de poids moléculaire prête à l'emploi, pour l'électrophorèse, conservé à +4°C.

