

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
antibiotiques)

ARN : Acide ribonucléique

BAAR: Bacille Acido-Alcoolo Résistant

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

BK : Bacille de Koch

CFU : Colony Forming Unit (Colonies Formant Unité)

CMTB : Complexe MycobactériumTuberculosis

CTAB : Bromure d'hexadécyl triméthyl-ammonium

DC-SIGN: Dendritic cell-specific intercellular

ddNTP: Didéoxynucléotide triphosphate

dNTP: Déoxynucléoside triphosphate

EMB: Ethambutol

ETH: Ethionamide

FAD: Flavine Adénine Dinucléotide

FAS I: Fatty Acid Synthase de type I

IDR: Intradermoréaction

IFN : interféron

IKK : IkB Kinase

IL-1 : interleukine-1

INH: Isoniazide

IRAK-1 : IL-1 receptor-associated kinase

IS : Insertion Séquence

ITL: Infection Tuberculeuse Latente

MCTB : Mycobactéries du Complexe Tuberculosis

MDR-TB: Multidrug-Resistant Tuberculosis (Tuberculose multi-résistante aux

MGIT : Mycobacteria Growth Indicator Tube

MyD88 : Myéloïd différenciation protein 88

NaCl : Chlorure de sodium

NAD(P) : Nicotinamide Adénine Dinucléotide (Phosphate)

NF-κB : nuclear factor-κB

NLR : Nod-like Receptors

NOD: Nucleotide oligomerization domain

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAS : Acide p-amino salicylique

pb : Paire de bases

PCR : Chaine Réaction Polymerase

PPD : Dérivé de Protéine Purifié

PPR : pattern recognition receptors

PZA :Pyrazinamide

RIF : Rifampicine

SIDA : Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise

SM : Streptomycine

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

Taq: *Thermus aquaticus*

TB: Tuberculose

TLR: Toll-like receptor

TNF- α : tumor necrosis factor- α

TRAM : TRIF-related adaptor molecule

TRIF : TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

WHO : World Heath Organization

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Estimation du nombre absolu de cas de tuberculose (en millions par an), 1990-2013	3
Figure 2: Pourcentage de nouveaux cas de tuberculose-MDR dans le monde en 2013	4
Figure 3: Estimation du nombre de décès en millions par an des tuberculeux Séronégatifs et séropositifs de 1990 à 2013	5
Figure 4: Taxonomie des Mycobactéries	7
Figure 5: Morphologie des BAAR	8
Figure 6: structure de la paroi des mycobactéries	9
Figure 7: Colonies de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> sur milieu Lowenstein-Jensen	10
Figure 8: Différents cycles du carbone chez <i>M. tuberculosis</i>	11
Figure 9: représentation du génome de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	12
Figure 10: Appareil respiratoire et passage de <i>M. tuberculosis</i> au niveau des alvéoles pulmonaires	15
Figure 11: Voies de signalisation TLR-dépendantes et indépendantes de MyD88 intervenant dans la reconnaissance de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
Figure 12: Organisation du granulome	20
Figure 13: Région du gène <i>rpoB</i> et différents mutations	31
Figure 14: Région du gène <i>KatG</i>	32
Figure 15: Représentation des gènes de résistance sur le Génome de <i>M.tb</i>	33
Figure 16: Aspect des BAAR microscope après coloration de avec fuchsine	38
Figure 17: Aspect des BAAR microscope après coloration à l'auramine	39
Figure 18: Hybridation Appliquons/Sondes spécifiques et révélation colorimétrique	41
Figure 19: Bandelettes DNA-Strip	44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Groupes de médicaments antituberculeux et abréviations	28
Tableau II: Cibles des médicaments antituberculeux et fonctions cellulaires inhibées.....	29
Tableau III: Gènes et mutations conférant une résistance aux antituberculeux.	33
Tableau IV: Résistances enregistrées.....	46
Tableau V: Mutations associées à la résistance des souches	46

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	2
Chapitre I : La tuberculose	2
I.1 Définition	2
I.2 Histoire de la tuberculose.....	2
II Epidémiologie de la TB :	3
III Les Mycobactéries	5
IV- Physiopathologie de l'infection tuberculeuse :	14
V Diagnostic	20
VI-Traitemen.....	27
VII La résistance aux antituberculeux	
DEUXIÈME PARTIE : ETUDE DU PROFIL DE MUTATION ASSOCIÉE À LA RÉSISTANCE À LA RIFAMPICINE ET À L'ISONIAZIDE DES SOUCHES DE M.TUBERCULOSIS À HÔPITAL MILITAIRE DE OUAKAM.....	33
I-Contexte	34
II Objectifs	34
III Méthodologie :	35
IV- Résultats :	45
V- Discussion :	47
CONCLUSION.....	48
REFERENCES	49
ANNEXES.....	57

INTRODUCTION

Depuis la découverte du bacille de Koch par Robert Koch en 1882, la tuberculose demeure un problème de santé publique.

En effet, en 2013 il y'a 9 millions de personnes qui ont développées une tuberculose et 1.5 millions en sont mortes. Cela équivaut à 126 cas pour 100.000 habitants selon l'OMS. Les pays en développement sont les plus touchés du fait des facteurs socio-démographiques. La majorité des cas est enregistré en Asie 56% et en Afrique 29%(WHO).

Des avancés importants ont été faites dans le diagnostic et le traitement de la tuberculose. Cependant avec l'apparition du SIDA qui est une pathologie immuno-dépressive; il y'a eu une recrudescence des cas de tuberculose dans le monde. L'OMS estime qu'entre 2000 et 2020, près d'un milliard de personnes seront nouvellement infectées et 200 millions d'entre elle développeront la maladie et 35 millions mourront de la tuberculose si aucune amélioration n'est apportée dans la maîtrise de cette infection(WHO).

En outre il est apparu la résistance aux antituberculeux, ce qui suscite un intérêt pour l'épidémiologie moléculaire des souches de Mycobactéries et leur sensibilité aux molécules utilisées dans le traitement. Cette résistance est estimée à 500.000 pour les multi-résistants et à 27000 pour les ultrats-résistants. Ceci rend difficile la prise en charge de ces malades(IPF).

En effet c'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude. Le but est d'évaluer la fréquence des mutations de résistance à la Rifampicine et à l'Isoniazide au niveau des souches de Mycobactéries isolées par microscopie positive à la coloration de Ziehl et à l'auramine à l'hôpital militaire de Ouakam.

PREMIERE PARTIE :
RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I : La tuberculose

I .1 Définition

La tuberculose est une maladie bactérienne contagieuse causée par une mycobactéries appelée bacille de Koch (Bk). La maladie touche plusieurs organes mais affecte généralement les poumons.

I.2 Histoire de la tuberculose

L'ancienneté de la tuberculose est attestée par l'existence de lésions osseuses caractéristiques du mal de POTT, par l'analyse d'échantillons de tissus humains prélevés sur des momies égyptiennes datant de 3400 ans avant JC (Zink AR et al 2003).

La tuberculose est apparue probablement comme une maladie endémique chez l'animal bien avant qu'elle n'atteigne l'homme. La diffusion épidémique de *M. tuberculosis* a ensuite commencé lors des périodes progressives d'urbanisation avec l'augmentation de la densité des populations, c'est-à-dire la promiscuité.

Pendant longtemps, la tuberculose a été perçue comme une maladie héréditaire. Par la suite, les démonstrations expérimentales de JA Willemin en 1866 ont prouvé le caractère transmissible de la tuberculose. Il a fallu attendre jusqu'en 1882 pour que Robert KOCH, un microbiologiste allemand découvre l'agent responsable, communément dénommé Bacille de KOCH.

A la fin du XVIIIème siècle et au début du XIXème, la phtisie, de son nom grec, était devenue un véritable fléau car, jusqu'à cette période il n'existait aucun traitement médicamenteux. En 1924, Albert CALMETTE et Alphonse GUERIN mirent au point un vaccin contre la tuberculose : BCG (Bacille de Calmette et Guerin).

Le microbiologiste américain WAKSMAN découvrit en 1944 la streptomycine, le premier antibiotique actif sur le bacille tuberculeux.

II Epidémiologie de la TB :

II-1 Dans le monde :

La tuberculose reste l'une des maladies transmissibles la plus mortelle dans le monde. En 2013, on estime que 9 millions de personnes ont développé la tuberculose et 1,5 million en sont mortes dont 360 000 VIH-positifs. A l'échelle mondiale, cela équivaut à 126 cas pour 100.000 habitants. (WHO)

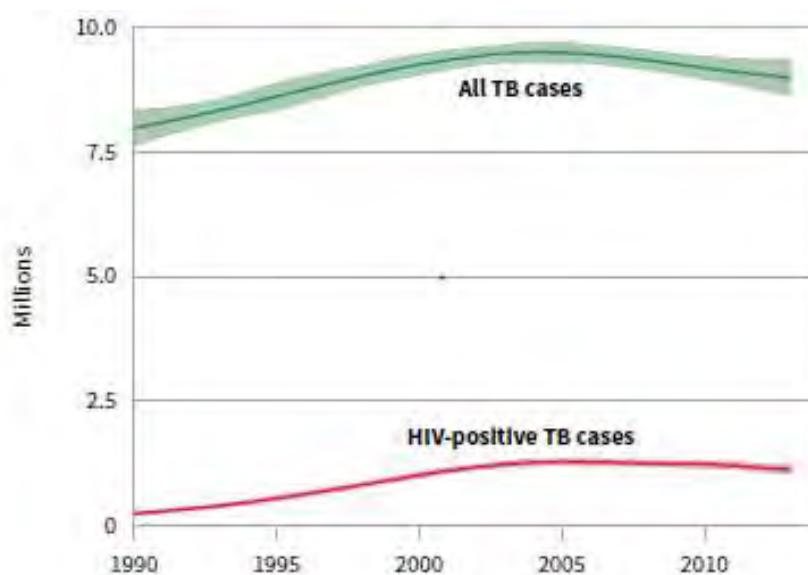


Figure 1: Estimation du nombre absolu de cas de tuberculose (en millions par an), 1990-2013 (WHO) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/percentage-tb-cases-mdrtb.jpg?ua=1>
consulté le 24 Mars 2015

La tuberculose ré-émerge en peu partout dans le monde, cela est dû en partie au SIDA qui compromet le système immunitaire des patients et crée un terrain favorable aux infections opportunistes telles que la tuberculose. Nombreux sont les séropositifs qui développent une tuberculose comme première expression du SIDA, dans la mesure où l'infection par le VIH constitue le plus fort facteur de risque de transformation d'une tuberculose latente en infection active, ou de rechute chez les patients ayant déjà subi un traitement. Par ailleurs, en cas de coinfection, chacune de ces maladies accélère le développement de l'autre, leur puissance

destructrice cumulée étant supérieure à leur impact indépendant. Ainsi, le nombre de malades tuberculeux séropositifs a augmenter au fil du temps (Fig1).

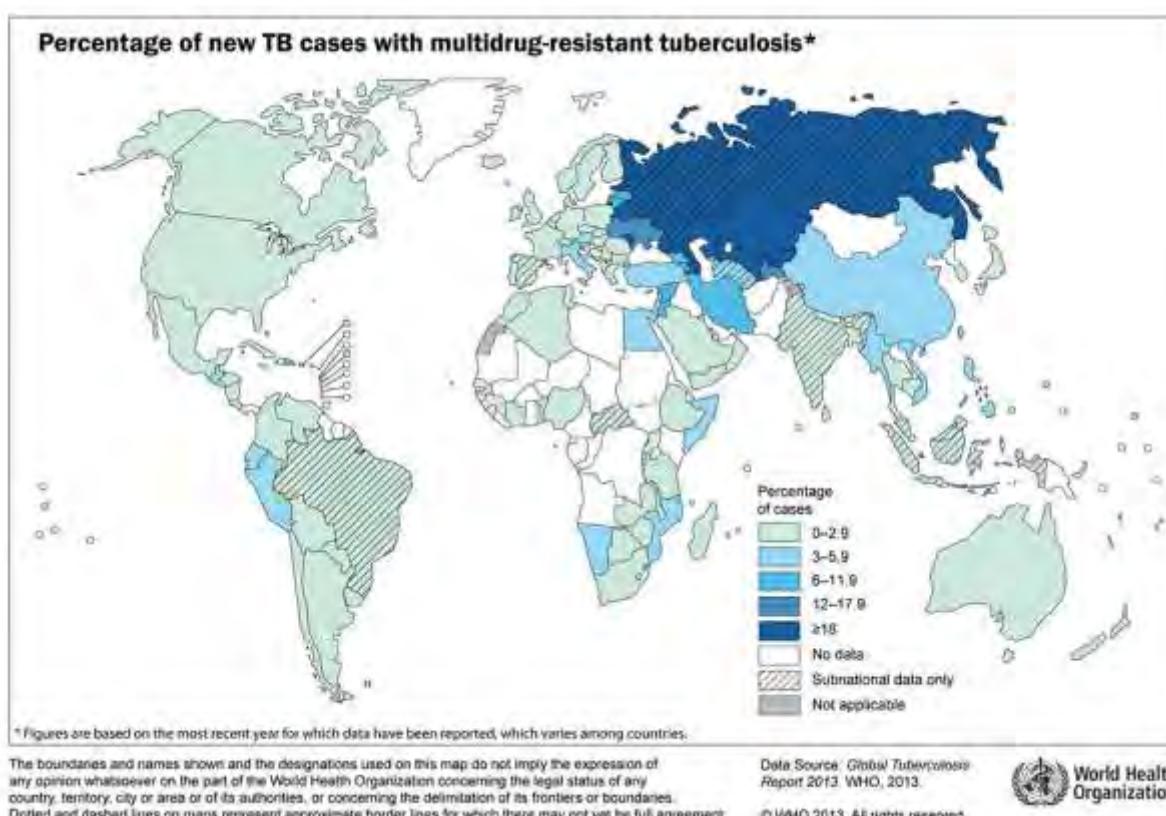


Figure 2: Pourcentage de nouveaux cas de tuberculose-MDR dans le monde en 2013

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/percentage-tb-cases-mdrtb.jpg?ua=1;consulté24>

Mars 2015

Environ 60% des cas de tuberculose et de décès surviennent chez les hommes, mais le fardeau de la maladie chez les femmes est également élevé.

En 2013, selon les estimations, 510 000 femmes sont mortes à la suite de TB, plus d'un tiers d'entre elles étaient séropositives (OMS).

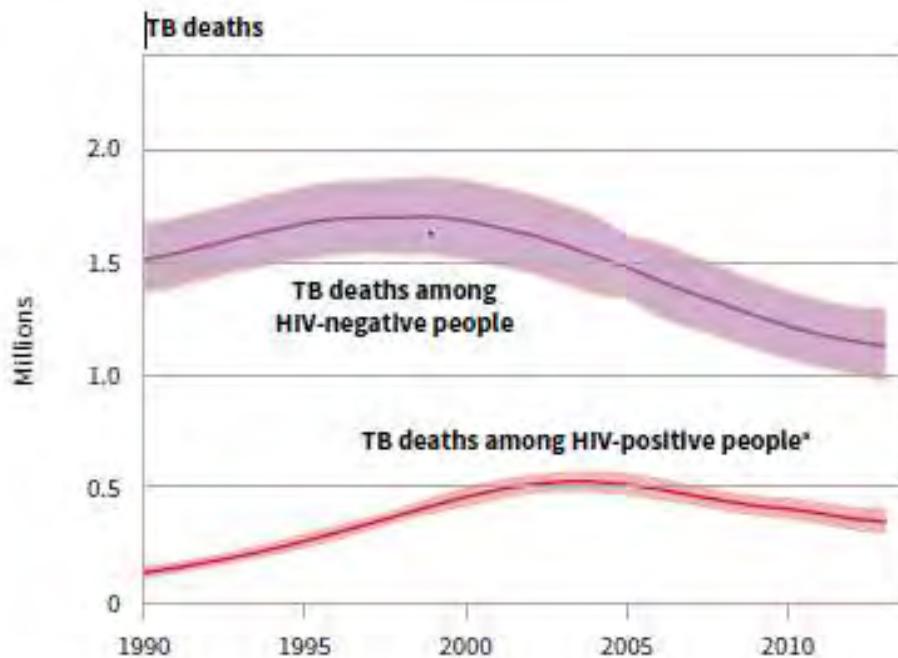


Figure 3: Estimation du nombre de décès en millions par an des tuberculeux Séronégatifs et séropositifs de 1990 à 2013 (WHO). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/percentage-tb-cases-mdrtb.jpg?ua=1> consulté le 24 Mars 2015

II-2 La tuberculose en Afrique :

La majorité du nombre estimé de cas est enregistrée en Asie (56%) et en africaine (29%).

La Région africaine, qui avait également le plus haut taux de décès par rapport à la population infectée enregistre 80% des tuberculeux VIH-positifs (WHO).

Le nombre de personnes qui meurent de la tuberculose associée au VIH est légèrement en baisse ces dernières années (Fig 3). Ce constat est lié à la réussite des traitements HIV et à la précocité du diagnostic et de la prise en charge de la tuberculose (WHO).

III Les Mycobactéries

III-1 Habitat

Les mycobactéries du complexe *tuberculosis* (MCTB) peuvent être retrouvés tant à l'intérieur qu'à l'extérieur des cellules, dans toutes les lésions tuberculeuses, et s'il y a une voie d'élimination, elles peuvent persister dans le milieu extérieur par exemple dans les crachats desséchés. L'excrétion du bacille par le malade explique qu'on puisse l'isoler de façon transitoire dans l'environnement.

Les BK ont principalement pour niche écologique les tissus infectés de l'homme malade. Dans l'environnement familial de l'homme, les mammifères peuvent s'infecter et devenir eux-mêmes vecteurs de la maladie.

III-2 Taxonomie

Les mycobactéries appartiennent à la famille des Mycobacteriaceae comprenant un seul genre, le genre *Mycobacterium*.

Les normes minimales pour inclure une espèce dans le genre sont :

- l'acido-alcoolo-résistance de la mycobactérie
- la présence d'acides mycoliques
- un contenu en GC élevé au niveau de la molécule d'ADN, compris entre 60 et 70%.

Le genre *Mycobactérium* est séparé en de nombreuses espèces dont certaines sont regroupées sur la base d'un parasitisme strict de l'homme et de l'animal et, d'une vitesse de croissance lente.

Ces espèces constituent un groupe dénommé Complex *tuberculosis* et sont responsables de la tuberculose. Il s'agit de *M. tuberculosis*, *M. africanum* et *M. bovis*.

A l'opposé, on a les mycobactéries atypiques ou non tuberculeux, qui ont une vitesse de croissance rapide. Ces mycobactéries atypiques sont classées en groupes selon qu'il soit parasite ou non et selon la vitesse de croissance et la pigmentation des colonies.

Certains sont des pathogènes vraies comme *M. avium-intracellulaire*, *M. ulcerans*, *M. marinum* et *M. abscessus*.

- *Mycobacterium avium-intracellulare* est responsable de maladies respiratoires.
- *Mycobacterium ulcerans* est à l'origine de l'ulcère de Buruli avec des nécroses chroniques de la peau.
- *Mycobacterium marinum* est responsable de la maladie des aquariums
- *Mycobacterium abscessus* responsable d'infections cutanées et pulmonaires chez les patients mucoviscidoses

Elles sont ubiquistes et sont considérées comme des pathogènes opportunistes par opposition à *M. tuberculosis* qui est un pathogène strict (Jonson et al, 2007).

Les MCTB sont étroitement liées au niveau de leur ADN par un ARNr 16S identiques mais qui diffèrent en termes de phénotypes et de préférence d'hôte (Brosch et al, 2001).

Le CMTB comprend les souches adaptées chez l'humain *M. tuberculosis* et *M. africanum*. Mais il ya également *M. bovis* qui est une souche animale adaptée à l'homme qui est la principale cause de la tuberculose chez de nombreuses espèces animales. (Smith et al, 2006).

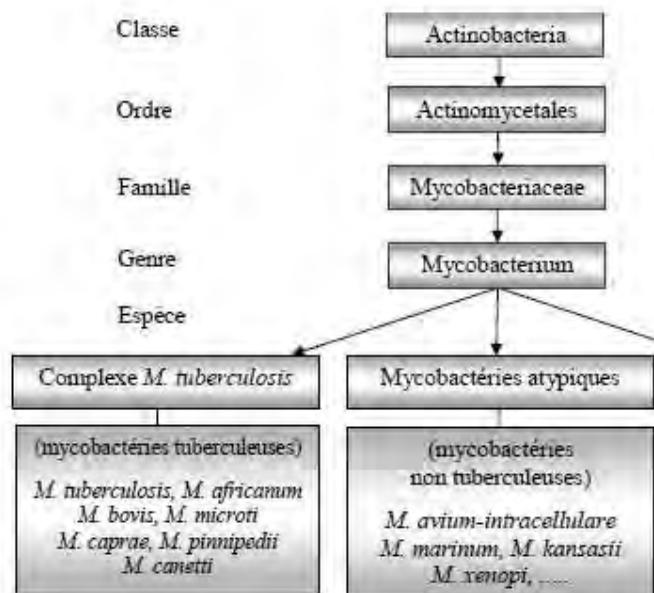


Figure 4: Taxonomie des Mycobactéries

III-3 Caractères généraux :

III-3-1 Morphologie:

Les mycobactéries se présentent sous la forme de bacilles fins, légèrement incurvés, pouvant présenter un aspect en échelle ou avoir une forme plus coccobacillaire. Ce sont des bacilles immobiles, non sporulés. La longueur des Mycobactéries varie entre 2 et 12 µm et leur diamètre est compris entre 0,2 et 0,3 µm.



Figure 5: Morphologie des BAAR (microscopie electronique a balayage)

<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp> consulté 07 Janvier 2015

III-3-2 Structure :

La paroi cellulaire de *M. tb* est particulière. Elle est composée de deux segments. Le noyau de la paroi cellulaire est composé de peptidoglycane (PG), l'arabinogalactane lié de manière covalente à des acides mycoliques. Cet ensemble forme le complexe arabinogalactane-mycolyl peptidoglycane (POP).

Les acides mycoliques sont des lipides alpha-ramifiés uniques trouvés dans les parois cellulaires de *Mycobacterium* et *Corynebacterium*. Ce sont des molécules hydrophobes solides qui forment une enveloppe lipidique autour de l'organisme et affectent les propriétés de perméabilité à la surface cellulaire. Cette particularité de la paroi mycobactérienne fait que les BK sont acido-alcoolo-résistant. C'est-à-dire la capaciter de résisté à la décoloration par les acides et alcools. C'est le principe de la coloration de Ziehl avec une première coloration avec la fuchsine puis une décoloration avec l'alcool-acide et une contre coloration avec du bleu de méthylène.

La partie supérieure est composée de lipides libres qui sont liées avec des acides gras et les différentes protéines dont les phosphatidylinositol mannosides (PIM), Lipomannane (LM), et lipoarabinomannane (LAM).

La membrane cytoplasmique est également particulière. Elle est asymétrique avec un feuillet externe plus dense que le feuillet interne. Ceci est dû à la présence de phosphatidylinositol-mannoside (PIM), localisé à la surface du feuillet externe.

Ces composés sont spécifiques aux bactéries de la lignée des Actinomycétales et favorisent l'ancrage du LAM et du lipomannane.

L'ensemble ainsi décrit concourt à une extrême rigidité et une très faible perméabilité de la paroi mycobactérienne d'où la résistance aux alcools et aux acides (Devinder Kaur et al 2011).

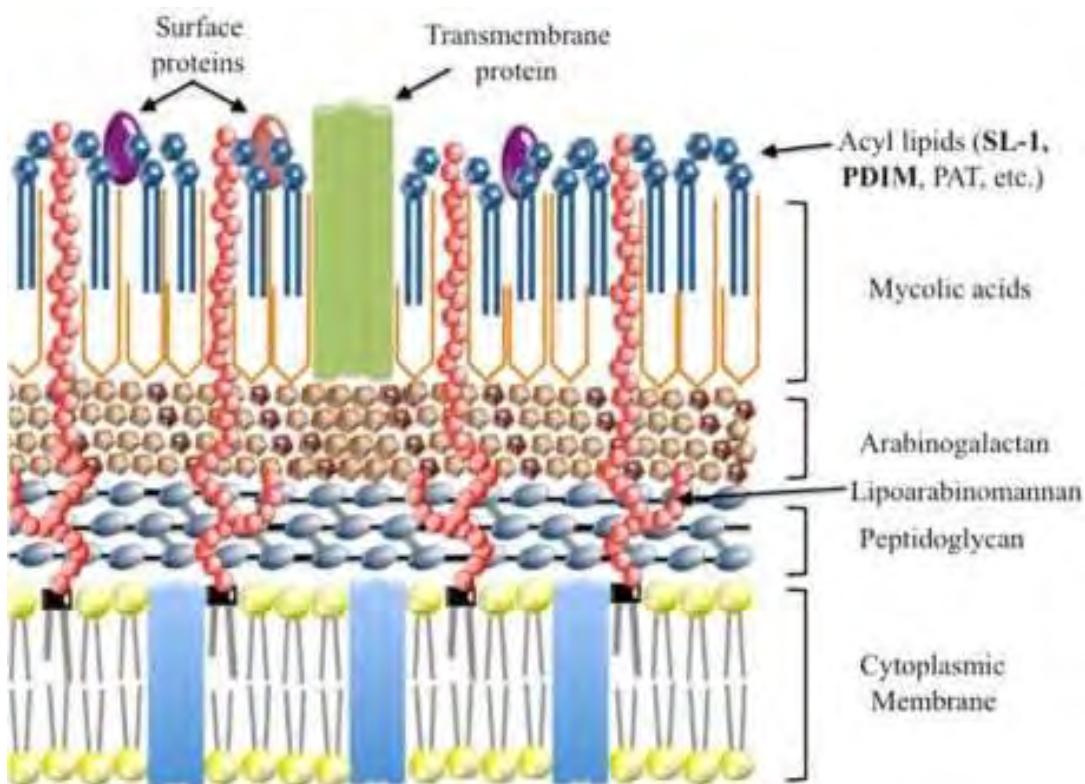


Figure 6: structure de la paroi des mycobactéries www.pixshark.com consulté 07 Janvier 2015

III-3-3 Caractères culturaux

L'espèce *M. tuberculosis* a une croissance très lente, deux milieux sont utilisés pour la culture.

Le milieu de Lowenstein-Jensen, qui est un milieu solide à base d'œuf et le milieu de Middlebrook MTB qui est un milieu à base de gélose. Les Mycobactéries ont besoin de plus de 7 jours pour former des colonies rugueuses avec un aspect en fleur de choux de couleur blanc cassé.

La culture de *M. bovis* sur Löwenstein-Jensen, donne de petites colonies lisses, avec une croissance dysgonique. *M. africanum* sur Löwenstein-Jensen, donne des colonies rugueuses, plates avec un bourgeon central, croissance dysgonique.

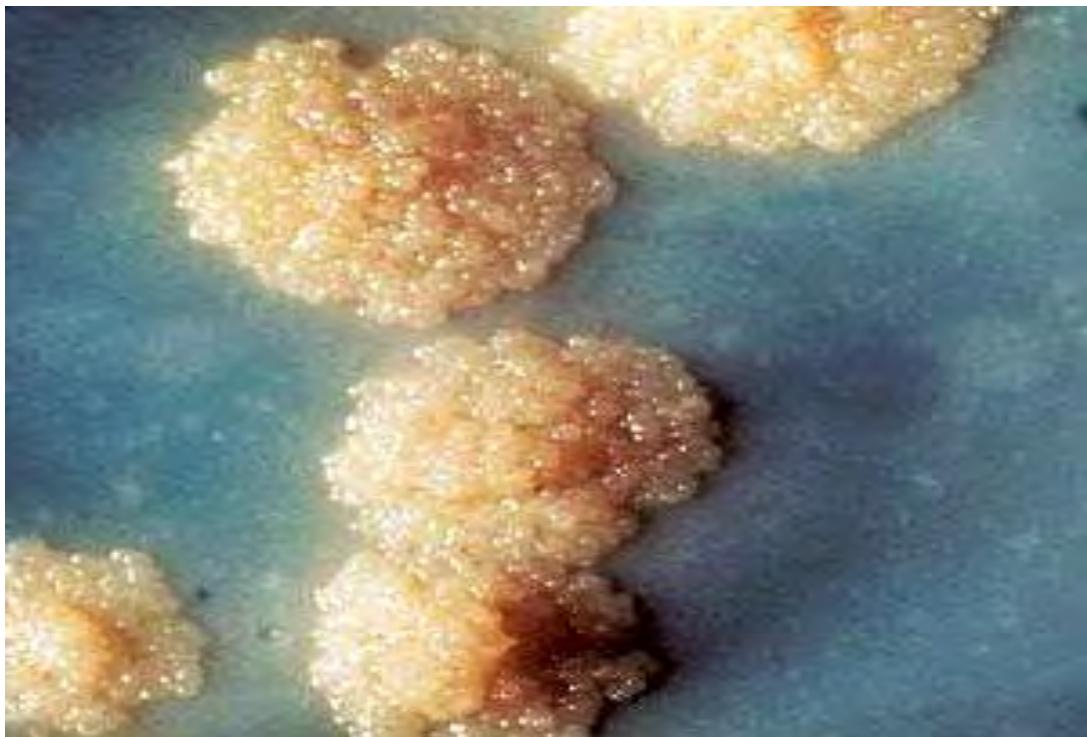


Figure 7: Colonies de *Mycobacterium tuberculosis* sur milieu Lowenstein-Jensen.

http://fundacionio.org/img/bacteriology/img/mycobacterium_tuberculosis_02.JPG consulté 07 Janvier 2015

III-3-4 Caractères biochimiques

Des activités enzymatiques sont retrouvées pour chaque espèce, servant de base aux tests biochimiques. *M.tuberculosis* a une activité catalasique thermolabile, une activité nitrate réductase et accumule de l'acide nicotinique, ce qui peut être révélé par l'épreuve à la niacine ou test de Konno.

Ces trois caractéristiques sont les trois propriétés biochimiques spécifiques de cette espèce. L'ensemble des produits du métabolisme azoté, carboné est présent, mais la particularité de *M. tuberculosis* est qu'elle possède plus de 250 enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique. Ces enzymes représentent de potentielles cibles thérapeutiques pour le futur développement d'antibiotiques antituberculeux (Christopher M et al 2003).

III-3-5 Métabolisme

M. tuberculosis a le potentiel de synthétiser tous les acides aminés qui lui sont essentiels, des vitamines et des enzymes, bien que quelques-unes des voies impliquées peuvent différer de ceux trouvés dans d'autres bactéries (Christopher M et al 2003).

M. tuberculosis peut métaboliser une variété d'hydrates de carbone, les alcools, les cétones et les acides carboxyliques. Les enzymes nécessaires pour la glycolyse, la voie des pentoses phosphates et l'acide tricarboxylique et des cycles glyoxylate sont tous présents. (Cole ST et al 1998)



Figure 8: Différents cycles du carbone chez *M. tuberculosis*. Adapté de Cole ST et al 1998

III-3-6 Caractères génétiques :

III.3.6.1 Le génome

La séquence complète du génome de *M. tuberculosis* H37Rv a été publiée en 1998 par Steward Cole. Le génome a une longueur de 4.411.529 bp, contient environ 4000 gènes, et a une teneur très élevée en GC environ 65% (Cole ST et al. 1998).

Il comprend un nombre important de séquences de désoxyribonucléiques (ADN) répétitifs, parmi lesquelles sont retrouvées les séquences d'insertion.

Les séquences d'insertion (IS6110, IS1081) sont utilisées dans les techniques de génotypage moléculaire des isolats cliniques de *M. tuberculosis*, et représentent le principal élément de variabilité entre les souches.

Un nombre de 3924 cadres de lecture ouverts ont été identifiés dans le génome. Ce qui représente 91% de la capacité de codage potentiel. Au moins deux prophages ont été détectés dans la séquence du génome de *M. tuberculosis*. Les Prophages phiRv1 et phiRv2 ont de 10 kb de longueur et sont organisés de manière similaire (Cole st et al 1998).

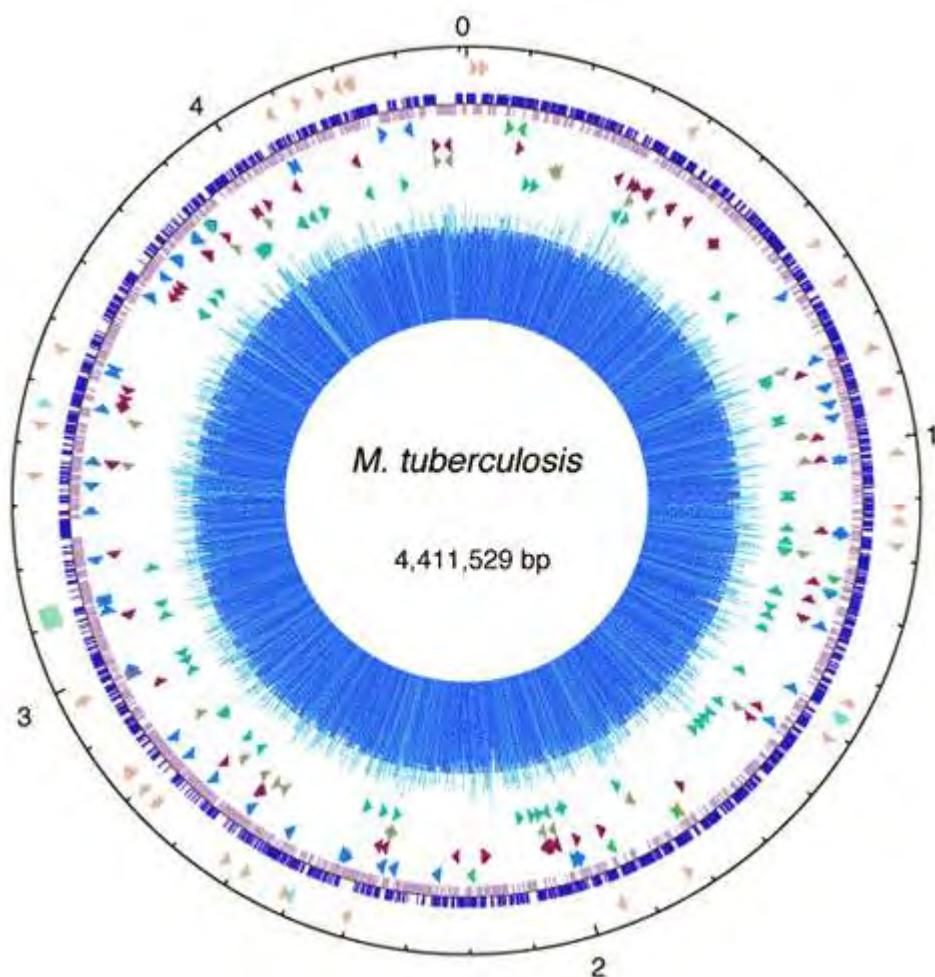


Figure 9: représentation du génome de *M. tuberculosis*H37Rv

www.flickr.com/photos/ajc1/5907816295 consulté 14 Mars 2015

Le cercle extérieur indique l'échelle en Mo, 0 représentant l'origine de réPLICATION. Le premier anneau de l'extérieure présente les positions des gènes de l'ARN stables (ARNt sont bleus, d'autres sont de couleur rose) et la région de répétition directe (cube rose).

Le second anneau montre l'intérieur de la séquence codante par mèche (dans le sens horaire, vert foncé ; le sens antihoraire, vert clair). Le troisième anneau représente ADN répétitif (des séquences d'insertion, orange ; 13E12 famille REP, rose foncé ; prophage, bleu). Le quatrième anneau montre les positions des membres de la famille de PPE (vert).

Une des particularités de *M. tuberculosis* est qu'il possède tout le matériel génétique nécessaire à sa survie en absence d'oxygène, d'où la persistance de cette bactérie chez l'hôte au sein des lésions granulomateuses (Christopher Met al 2003).

III.3.6.2 La diversité génétique et la phylogénie de *M.tuberculosis* :

La diversité génétique de *M. tuberculosis* est un caractère utilisé pour les études épidémiologiques, comme la transmission, la réinfection et la réactivation permettant de déchiffrer l'évolution de *M. tuberculosis*.

La variabilité génétique peut être traduit en phénotype différent, telles que la capacité de transmission, la virulence et la pathogénicité qui peut avoir des conséquences épidémiologiques diverses (Smith et al.2009).

En plus de la capacité de transmission, il est aussi actuellement accepté que génétiquement différentes les souches de *M. tuberculosis* produisent nettement des événements immuno-pathologiques différents. Dans une étude menée chez des patients vietnamiens, une association entre les lignées Euro-Américaines de *M. tuberculosis* et une tuberculose pulmonaire a été observée plutôt qu'une tuberculose méningée. Ceci suggère que ces souches sont moins capables d'une diffusion extra-pulmonaire que les autres souches de la population d'étude (Caws et al. 2008).

III-3-7 Pathogénicité :

Une fois dans l'organisme, *M. tuberculosis* ne produit pas de toxine, elle infecte les macrophages de l'hôte.

Il est intéressant de noter que les MCTB ont la même stratégie d'infection de l'hôte en survivant et se multipliant au sein des macrophages. Après la phagocytose, les MCTB

inhibent l'acidification et la fusion entre le phagosome et lysosome ce qui leur permet de prospérer à l'intérieur du phagosome. *M. tuberculosis* survit dans le macrophage grâce à un système de détoxification de radicaux libres et de chélation du fer.

Ce système implique les gènes *katG* codant pour la catalase peroxydase, le gène *furA* codant pour une protéine de captation du fer et le gène *sodA* codant pour la superoxyde dismutase. (Pym AS et al 2001)

D'autre part, *M. tuberculosis* survie dans le macrophage grâce à son enveloppe cellulaire. Des voies de biosynthèses spécifiques sont impliquées dans la formation de cette enveloppe cellulaire comme celle de l'acide mycolique. La synthèse des acides mycoliques est souvent liée à des gènes déterminants dans la virulence comme *fbpA*, *mmaA4*.

Les acides mycoliques jouent un rôle important dans la protection par l'enveloppe cellulaire chez *M. tuberculosis*. Ils assurent l'intégrité de l'enveloppe et protègent le bacille contre le stress oxydatifs généré par le phagosome (Sirakova TD et al 2003).

La croissance intracellulaire est un moyen efficace d'échapper au système immunitaire. Une fois *M. tuberculosis* est phagocyté, il peut inhiber la fusion phagosome-lysosome par modification de la membrane du phagosome. Il peut rester dans le phagosome ou échapper au phagosome, dans les deux cas, *M. tuberculosis* trouve un environnement favorable pour sa croissance dans le macrophage (Natarajan K et al 2011).

Les MCTB interfèrent avec les effets toxiques des réactifs intermédiaires de l'oxygène produits dans le procédé de la phagocytose par trois mécanismes :

1. Les glycolipides, les LAM régulent à la baisse le mécanisme oxydatif cytotoxique.
2. Absorption par les macrophages via les récepteurs du complément
3. Le burs oxydatif peut être contrecarré par la production de catalase et de superoxyde dismutase.

IV- Physiopathologie de l'infection tuberculeuse :

IV-1 Symptômes :

Les signes cliniques de la maladie sont dominés par une toux persistante notamment pendant des semaines. Elle peut être productive ou non.

Les douleurs thoraciques sont parfois notées. L'altération de l'état général est fréquente lors de la tuberculose. L'asthénie peut persister tout au long du traitement. Une perte de poids qui peut, dans les formes graves, dépasser 10 kg.

La fièvre est généralement peu élevée avec des frissons dans les formes sévères et des sueurs nocturnes.

IV-2 Transmission :

M. tuberculosis est très contagieux, sa transmission est toujours directe, d'un individu infecté à une personne saine. La transmission de la tuberculose est essentiellement aérienne à l'exception de *M. bovis* qui peut être transmis par ingestion de produits laitiers contaminés. Lorsque le malade souffrant d'une tuberculose pulmonaire tousse, parle ou éternue, il émet des microgouttelettes de mucus ou gouttelettes de Flugge qui contiennent des bacilles tuberculeux. Les gouttelettes infectieuses restent en suspension dans l'air et la contamination se fait lors par inhalation des particules infectieuses. Ce qui explique qu'environ 80% des cas de TB sont des formes pulmonaires (Pfyffer, G. E *et al* 2007).

Les gouttelettes ne sont pas éliminées par le tapis muco-ciliaire et traversent l'appareil respiratoire, les bacilles atteignent ainsi l'alvéole pulmonaire où ils seront phagocytés par les macrophages alvéolaires (fig 10).

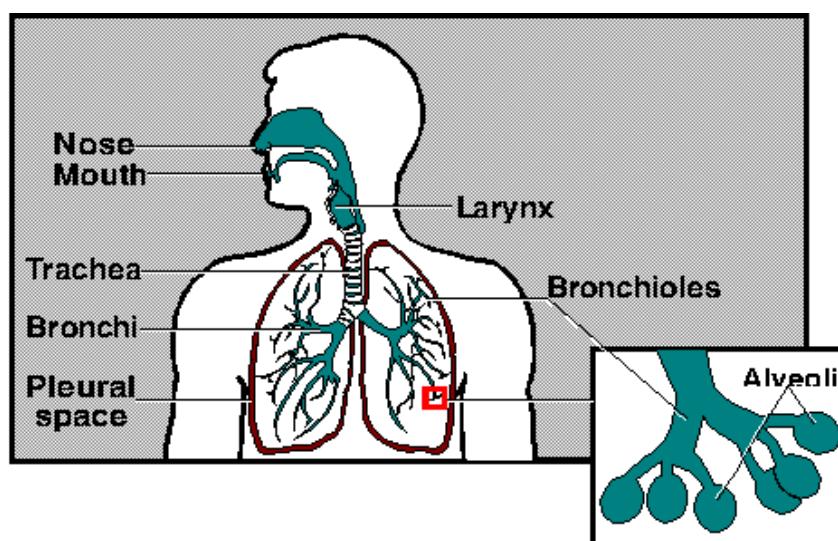


Figure 10: Appareil respiratoire et passage de *M. tuberculosis* au niveau des alvéoles pulmonaires www.textbookofbacteriology.net

Les patients au stade de primo-infection ne sont pas contagieux et une personne exposée à un patient tuberculeux n'est pas forcément contaminée.

La transmission dépend de trois facteurs :

- le statut bactériologique du malade

Les patients ayant une tuberculose pulmonaire à microscopie positive (TBM+) sont les plus contagieuses.

- la virulence du bacille tuberculeux

Certaines souches sont nettement plus contagieuses

- l'environnement dans lequel a lieu l'exposition et la durée.

La proximité entre l'entourage et le malade favorise la transmission de la maladie. Ainsi personnes en contact étroit avec les patients tuberculeux sont les plus à risque d'être infectées. Le plein air et l'ensoleillement sont des conditions dans lesquelles la transmission est moins susceptible de se produire.

IV-3 Immuno-pathologie de la tuberculose

IV-3-1 La tuberculose latente

C'est l'ensemble des manifestations anatomiques, cliniques et biologiques présentés par un organisme après le premier contact infectant avec le BK. Dans la minorité des cas, au cours de l'infection les bacilles atteignent les alvéoles pulmonaires. Ils entrent en contact avec les macrophages alvéolaires qui les phagocytent d'abord, les dégradent puis les éliminent.

Cependant, il arrive que des bacilles survivent dans les macrophages et s'y multiplient si les défenses immunitaires de l'individu sont réduites.

Les macrophages colonisés finissent par éclater et libérer un grand nombre de bacilles capables d'infecter, à leur tour, d'autres macrophages. Ainsi, un foyer infectieux se développe au niveau du poumon et provoque la formation d'une lésion ou « chancre d'inoculation ». (Flei Lui *et al*, 2014).

IV-3-2 La tuberculose active :

Généralement, l'infection par *M. tuberculosis* est contenue initialement par les défenses de l'hôte, et l'infection reste latente. Cependant, l'infection latente a le potentiel de se développer en maladie active à tout moment.

IV-3-2-1 Réponse immunitaire innée

M.tuberculosis a des mécanismes spéciaux pour l'entrée dans les cellules hôtes (Raja A. et al, 2004).

Dans les alvéoles pulmonaires, *M. tuberculosis* est principalement reconnu et phagocyté par les macrophages alvéolaires. Plusieurs classes de récepteurs de reconnaissance de forme pattern recognition receptors (PPR) sont impliquées dans la reconnaissance de *M. tuberculosis*.

Il s'agit des Toll-like récepteurs (TLR), des récepteurs de type C lectine (PLC), des récepteurs de Nod-like (NLR).

Parmi les TLR, on a TLR1, TLR2, TLR4 et TLR6 et leur molécule adaptatrice Myéloid differentiation protein 88 (MyD88) qui jouent un rôle important dans le déclenchement de la réponse immunitaire contre la tuberculose. La reconnaissance par les TLR est cruciale pour l'initiation et la coordination de la réponse immunitaire innée (Schreiber T et al. 2009). Les récepteurs TLR ont des voies de signalisation différentes selon le récepteur engagé. Une première dépendant de MyD88 et une seconde voie indépendante de MyD88 (fig 11). Par exemple le TLR2 signale uniquement par la voie utilisant l'adaptateur MyD88, alors que le TLR4 a la fois par la voie MyD88 et par une voie indépendante de MyD88. Pour la voie MyD88, TLR4 utilise des adaptateurs (TIRAP) qui vont recruter des kinases (IRAK1, 4). Ensuite il ya phosphorylation de ces kinases, ce qui aboutit à la phosphorylation et à la dégradation de l' inhibiteur IKB, puis à la libération et à la translocation du facteur de transcription NFKB. Cela conduit à l'expression des gènes qui codent pour des citokines (TNF, IL-12) fig 11.

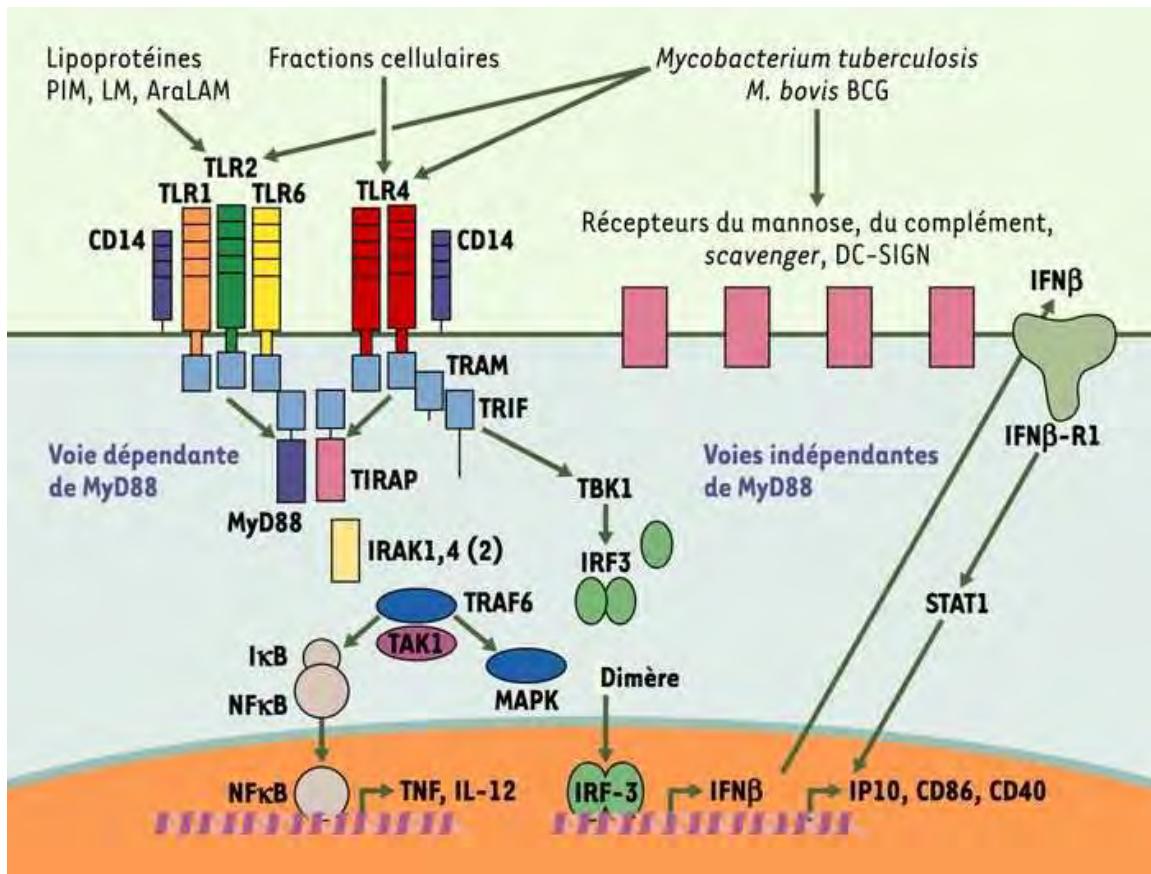


Figure 11: Voies de signalisation TLR-dépendantes et indépendantes de MyD88 intervenant dans la reconnaissance de *Mycobacterium tuberculosis* (Valérie Quesniaux et al. 2005)

En plus de TLR, d'autres PRR tels que Nucleotide oligomerization domain NOD2, les récepteurs de mannose, et Dendritic cell-specific intercellular DC-SIGN sont également impliqués dans la reconnaissance de *M. tuberculosis* (Kleinnijenhuis Jet al. 2011).

L'entrée du bacille par le CR3 nécessite tout d'abord l'activation du complément par des protéines de surface des mycobactéries, le complément activé est alors reconnu par le CR3. Les autres récepteurs PRR reconnaissent des motifs antigéniques bactériens, ce qui provoque l'activation d'une réponse immunitaire et la phagocytose de la bactérie.

Le DC-SIGN favorise l'entrée du bacille dans les cellules dendritiques, qui migrent alors jusqu'aux organes lymphoïdes pour la transition vers l'immunité acquise. Dans ce cas, le bacille ne se réplique pas à l'intérieur du macrophage (Kleinnijenhuis J et al 2011).

Après la phagocytose, il se produit une induction de la production de molécules inflammatoires par les macrophages, notamment l'interleukine-8 (IL-8), qui recrute les neutrophiles au site de l'infection et des chimiokines qui provoquent la migration depuis les vaisseaux sanguins environnents des monocytes, qui vont se différencier en macrophages.

Les lymphocytes « natural killer » (NK) présents sur le site de l'infection reconnaissent, éliminent les cellules infectées, activent les fonctions effectrices des macrophages (Kleinnijenhuis *et al.* 2011).

Dans la majorité des cas, la réponse innée à elle seule ne suffit pas à contrôler l'infection. Lorsque les cellules dendritiques ont phagocyté un élément étranger, elles migrent vers les ganglions lymphatiques locaux afin de présenter les antigènes aux lymphocytes naïfs et permettre le développement de la réponse adaptative.

IV-3-2-2 Réponse immunitaire adaptative

Les lymphocytes T reconnaissent les antigènes mycobactériens portés par des cellules présentatrices, telles que les cellules dendritiques. Les peptides antigéniques sont présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I et II, tandis que les antigènes lipidiques sont présentés par les molécules de type CD1. Les lymphocytes T CD4, reconnaissant les antigènes présentés par les molécules du CMHII que l'on retrouve au niveau des vacuoles, des phagosomes et des vésicules endocytiques.

Les CD4 sont donc les principaux lymphocytes activés lors de l'infection par *M.tuberculosis*. Les lymphocytes T CD8 reconnaissent les antigènes présentés par les molécules du CMHI, qui se forment dans le réticulum endoplasmique des cellules, et les lipides présentés par les molécules CD1.

Les cellules présentatrices d'antigènes deviennent apoptotiques, et libèrent des vésicules issues de la membrane plasmique. Les lymphocytes T ainsi activés subissent alors une expansion clonale, se différencient en cellules effectrices et migrent vers le site de l'infection. Elles sont guidées par des gradients de chimiokines. Les lymphocytes produisent de l'IFN γ , qui active les propriétés bactéricides des macrophages, du TNF α qui joue un rôle primordial dans la formation du granulome, et des perforines et granzymes qui provoquent la lyse des cellules et la destruction des bactéries intracellulaires (Hossain MM *et al* 2013).

Le recrutement successif de neutrophiles, lymphocytes NK, T CD4, T CD8 correspond au début de la formation du granulome. Le granulome caséux, restreint l'infection efficacement, et évolue en excluant les lymphocytes du centre qui se regroupent en anneau autour des macrophages. On a des cellules épithélioïdes qui sont des macrophages activés qui sécrètent des cytokines et des enzymes, des macrophages différenciés en cellules géantes multinucléées ou cellules de Langhans, qui correspondent à la fusion de cellules épithélioïdes et des

macrophages qui sont chargés de vacuoles lipidiques qui sont au bord du foyer de la nécrose caséuse (fig 12).

Au centre, *M. tuberculosis* est soumis à l'hypoxie et la privation en nutriments. (Smith *et al*, 2009). Il entre alors dans un état de dormance avec une activité métabolique faible et un taux de croissance quasiment nul. L'infection est alors contenue. (Peyron *et al*. 2008) (fig12).

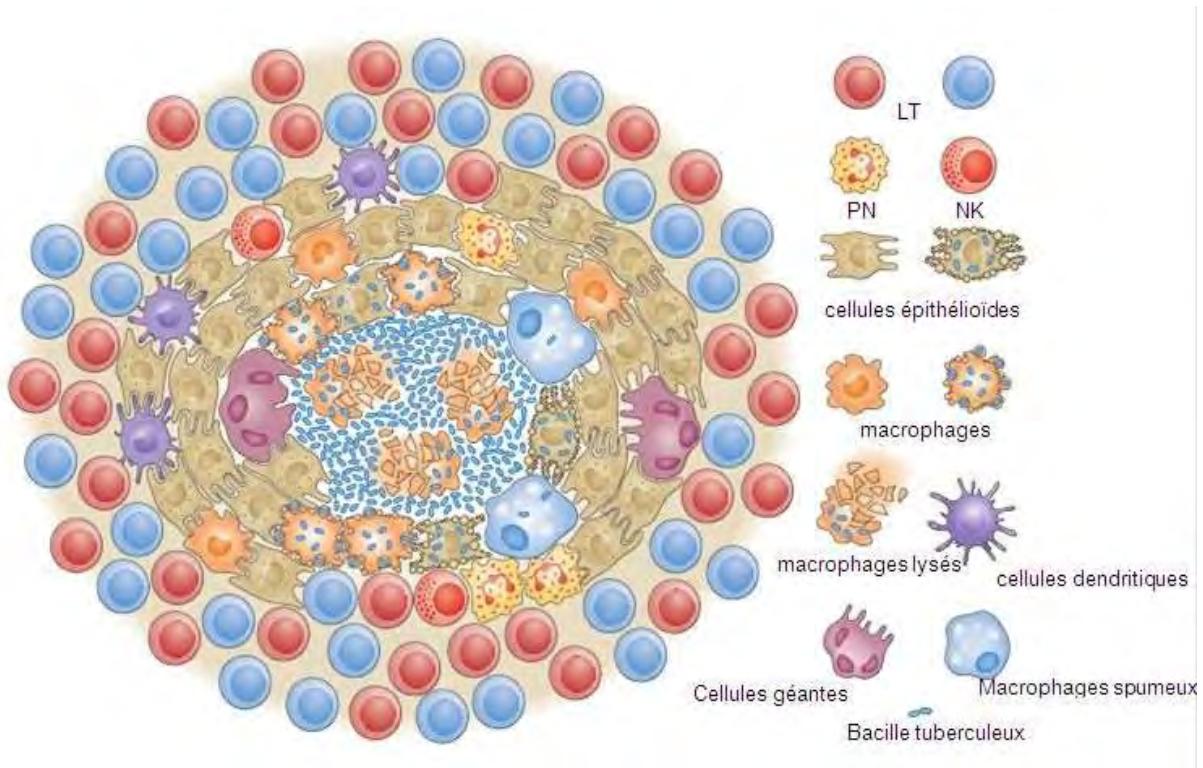


Figure 12: Organisation du granulome.

D'après Ramakrishnan, 2009

http://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie_3/site/html/2_2.html

V Diagnostic

Deux composantes essentielles de la lutte contre la tuberculose sont l'identification rapide des nouveaux cas et la mise en œuvre rapide d'un traitement efficace pour interrompre la chaîne de transmission. Le diagnostic de la tuberculose peut être réalisé par différents techniques selon la spécialité.

V-1 Diagnostic immunologique

Le diagnostic immunologique de la tuberculose est basé sur le principe antigène anticorps. Deux tests sont disponibles pour le diagnostic immunologique : le test cutané à la tuberculine (TCT) et le test de dosage de l'interféron gamma (IGRA).

Ces tests indiquent si une réponse immunitaire à médiation cellulaire est développée par l'hôte. Ainsi on peut savoir s'il ya eu exposition à *M. tuberculosis* ou non.

V.1 .1 L'intradermoréaction (IDR)

Il consiste en l'injection intradermique d'un volume de 0,1ml de tuberculine, dérivé protéinique purifié (PPD), obtenu à partir d'un surnageant de culture de *M.tuberculosis*. La tuberculine contient plusieurs antigènes communs à de nombreuses espèces mycobactériennes dont *M. bovis* utilisé pour le vaccin B.C.G et toutes les mycobactéries environnementales ou non tuberculeuses.

Ce test mesure la réponse *in vivo* de l'hypersensibilité à médiation cellulaire de type retardé (type IV de la classification de Gell et Coombs), après injection intradermique de tuberculine. C'est une réaction inflammatoire locale tardive, de durée prolongée et caractérisée par la migration des cellules immunocompétentes vers les tissus contenant l'antigène : dans les heures suivant l'injection, il se produit un afflux de monocytes-macrophages, la formation de cellules géantes multinucléées et l'afflux d'un grand nombre de lymphocytes T CD4 mémoires spécifiques de la tuberculine.

Chez une personne qui bénéficie d'une immunité à médiation cellulaire contre ces antigènes tuberculiniques, une réaction d'hypersensibilité de type retardé aura lieu dans 48 à 72 h. La réaction causera induration de la peau au site d'injection localisée, et le diamètre transversal est mesuré en millimètres (MadhukarPaiet al. 2014)

Il est important de noter que l'immunité à médiation cellulaire à la tuberculine peut parfois refléter une exposition à *M. bovis* bacille de Calmette-Guérin (BCG) ou d'une infection précédente qui a été effacé (MadhukarPaiet al. 2014 ; Tissot Fet al 2005) .

V.1.2 Les tests de détection de l'IFN γ

La réponse cellulaire est la composante majeure de la réponse immunitaire à l'égard de *M. tuberculosis*. L'IFN γ est produit suite à une stimulation antigénique in vitro de lymphocytes T contenus dans un prélèvement sanguin. L'induction d'une réponse protectrice se traduit par la synthèse de cytokines de type TH1, notamment d'interféron gamma (IFN γ).

Les tests de libération de l'interféron-gamma (IGRA) sont des analyses de sang in vitro de la réponse immunitaire à médiation cellulaire ; ils mesurent la libération par les cellules T de l'interféron (IFN) gamma après stimulation par des antigènes uniques à *M. tuberculosis*. (Marie-Thérèse Giorgio *et al* 2015)

Deux test kits sont commercialisés, le test QuantiFERON-TB Gold In-Tube® (Cellestis Limited, Carnegie, Australie) et le T-SPOT-TB assay® (Oxford Immunotec Ltd, Abington, Royaume-Uni).

Les deux tests utilisent les antigènes ESAT-6(EarlySecretionAntigen Target 6) et CFP-10(CultureFiltrateProtein 10), codés par la région RD1 du génome de *M.tuberculosis* absente chez *M. bovis* et chez les mycobactéries atypiques.

Le QuantiFERON utilise en plus l'antigène TB7.7 (Pai M *et al.* 2004).

➤Test QuantiFERON-TB ®

Le test QuantiFERON-TB ® est un système de dosage sur sang total qui permet de mesurer la libération d'interféron-gamma par ELISA dans le sang en réponse à une stimulation par l'ESAT-6 et CFP-10 qui ne sont pas présents dans les souches vaccinales BCG ou la grande majorité des mycobactéries non tuberculeux.

Le sang est prélevé sur tube hépariné. Les cellules mononucléées du sang périphérique sont incubées avec des protéines de *M. tuberculosis*. Après incubation pendant la nuit puis centrifugation, le plasma est décanté. L'IFN γ sécrété est quantifié par technique immuno-enzymatique (ELISA).Le résultat est donné en pg/ml d'IFN γ . Le résultat est rendu de façon qualitative : positif, négatif ou indéterminé.

➤Test T-SPOT.TB

Dans le test T-SPOT.TB, les cellules T activées par les antigènes ESAT-6 et CFP spécifiques de *M. tuberculosis* sont mises en utilisant la méthodologie ELISPOT (Enzyme-LinkedImmunospot).

Le test cutané tuberculinique (TCT) et les IGRA (Interferon-Gamma Release Assays) sont actuellement les seuls moyens d'identifier les infections latentes par *M. tuberculosis*. Au contraire des IGRA, la spécificité du TST est grandement affectée par une vaccination antérieure avec la souche atténuée de *M. bovis* (vaccin BCG). Par ailleurs, il existe des preuves suggérant que la sensibilité des IGRA est supérieure à celle du TCT, notamment dans la détection de la tuberculose latente chez les individus immunodéprimés (Moran-Mendoza O, et al 2007).

Cependant, ni le TCT ni les IGRA ne permettent de différencier une tuberculose latente d'une tuberculose active. En outre, il n'existe pour l'heure aucun test capable d'identifier si les mycobactéries présentes chez un individu infecté de manière latente sont des germes vivants ou morts et, de détecter qui est à risque de développer une tuberculose active (Pai M et al 2004).

V-2- Diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose maladie repose sur la mise en évidence des bacilles de la tuberculose, à savoir *M. tuberculosis*, *M. bovis* ou *M. africanum*, ces 3 espèces sont réunies sous le nom de « complexe *tuberculosis* ».

Les méthodes bactériologiques à mettre en œuvre comprennent la recherche de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) par l'examen microscopique, la mise en culture sur milieux spécifiques.

V-2-1 Examen microscopique

L'examen microscopique du produit pathologique est l'étape initiale, et souvent la seule possibilité dans nos pays en développement, pour effectuer le diagnostic bactériologique de la tuberculose. La qualité de l'examen bactériologique dépend avant tout de la qualité du prélèvement, qui doit être une expectoration en cas de TB pulmonaire ou un tubage gastrique

permettant de récupérer les sécrétions bronchiques ingérés durant le sommeil, ou une aspiration bronchique par endoscopie. En cas de TB extra-pulmonaire, les biopsies doivent être privilégiées et envoyées sans produit fixant pour une mise en culture (C. Truffotet *et al.* 2011).

Pour mettre en évidence les bacilles de la tuberculose à l'examen microscopique, on utilise la propriété d'acido-alcoolo-résistance des mycobactéries, après coloration.

L'examen microscopique met donc en évidence des bacilles acido-alcoolo résistants (BAAR) sans faire la distinction entre les MCTB et mycobactéries atypiques. L'examen microscopique est peu sensible. Il n'est positif que lorsque la concentration bacillaire est au moins égale à 10^3 à 10^4 /mL de produit soumis à l'examen. (Mase S.R *et al.* 2007)

La probabilité de mettre en évidence des mycobactéries dépend de la qualité et de la répétition des prélèvements ainsi que de leur transport jusqu'au laboratoire de bactériologie.

Deux méthodes de coloration sont applicables en routine, la méthode de Ziehl-Neelsen et la méthode fluorescente avec l'auramine.

➤ Coloration Ziehl-Neelsen :

Avec la méthode de Ziehl-Neelsen, les frottis sont colorés par la fuchsine phéniquée à chaud, puis, après décoloration par l'acide et l'alcool, contre colorés par le bleu de méthylène. Au microscope optique avec un objectif à immersion ($\times 100$) les bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) apparaissent comme des bâtonnets rouges sur fond bleu.

➤ Coloration à l'auramine :

Avec la méthode fluorescente, la fuchsine est remplacée par l'auramine, et au microscope à fluorescence sous lumière bleue, les BAAR apparaissent comme des bâtonnets jaunes-verts brillants sur fond sombre.

Nous développerons ce chapitre dans la deuxième partie de notre travail.

Le résultat de l'examen microscopique est exprimé quantitativement : 1 à 9 BAAR pour 100 champs microscopiques, 10 à 99 pour 100 champs, 1 à 10 BAAR dans au moins 50 champs et plus de 10 BAAR par champ dans au moins 20 champs.

Malgré ces faiblesses, l'examen microscopique est essentiel car il permet de faire, en quelques heures seulement, un diagnostic très probable des formes de tuberculose les plus contagieuses et donc de prendre très rapidement les mesures de prévention adéquates pour l'entourage.

V-2-2 Culture

La culture permet de faire l'identification de la mycobactérie isolée et de mesurer sa sensibilité aux antituberculeux. Elle est deux fois plus sensible que l'examen microscopique. Elle nécessite des milieux spécifiques, solides, de type Löwenstein-Jensen à base d'oeufs, ou des milieux liquides qui peuvent être automatisables de type MGIT, Bact/Alert MP.

Sur milieu solide, les colonies sont détectées en 3 à 4 semaines. Avec les milieux de culture liquides (milieu MGIT utilisé manuellement ou au sein de l'automate Bactec 960, Becton Dickinson, milieu Bact/Alert MP de l'automate Bact Alert3D BioMérieux), la détection de la multiplication bactérienne se fait au bout d'une semaine en moyenne.

La détection de la multiplication bactérienne est basée sur divers principes physicochimiques dont la consommation d'oxygène qui fait apparaître une fluorescence à partir d'un composé fixé au fond du tube, le métabolisme bactérien qui produit une acidification du milieu avec virage de l'indicateur coloré.

La culture permet de faire l'identification des mycobactéries isolées et de procéder aux tests de sensibilité aux antibiotiques.

V-3 Diagnostic moléculaire

Avec les techniques de biologie moléculaire, le diagnostic de la tuberculose peut se faire par : amplification génique (PCR) permettant la détection de séquences nucléiques spécifiques et par hybridation de l'ADN tuberculeux sur des sondes spécifiques (Kim *et al.* 2009)

V.3-1 L'amplification génique

Les tests d'amplification génique (TAG) ont pour finalité d'augmenter le nombre de copies d'un segment cible d'ADN de manière à permettre sa détection. Ce sont des tests puissants dont le seuil théorique de sensibilité est d'une molécule d'ADN ou d'ARN. Ce sont de plus des tests rapides appliqués au diagnostic de la tuberculose. Ils permettent donc théoriquement de détecter rapidement la présence de bacilles du complexe *M. tuberculosis* dans les prélèvements en cas d'examen microscopique négatif et par conséquent de pallier la lenteur de la culture. La première technique d'amplification employée consistait en une réaction simple de polymérisation en chaîne (PCR) de la séquence d'insertion IS6110 avec détection

du fragment amplifié sur gel d'agarose. Elle a été vite remplacée par des techniques standardisées, utilisant des réactifs prêts à l'emploi et basées sur diverses cibles et divers procédés d'amplification : amplification par PCR d'une séquence d'ADN codant l'ARN 16S des mycobactéries (Amplicor, Roche), amplification d'une séquence d'ARN ribosomal via un intermédiaire ADN (AMTDT, Gen Probe) ou encore amplification par déplacement de brin (BD Probe tec, Becton Dickinson).

Aujourd'hui, ces techniques sont devancées par l'automatisation, avec le Cobas Amplicor (Cobas Amplicor MTB Test) et la PCR temps réel. Mais le matériel requis, est sophistiqué très coûteux et n'est pas accessible à tous les laboratoires surtout dans nos pays en développement (Minion J *et al.* 2009).

➤ Le GeneXpert MTB / RIF :

Ce test est conçu pour être utilisé sur des échantillons provenant de patients avec des signes évocateurs d'une tuberculose et sans traitement tuberculeux.

Le GeneXpert MTB / RIF dosage (Cepheid, Sunnydale, CA), détecte simultanément la présence des bactéries du complexe *tuberculosis* et la résistance à la rifampicine directement à partir de spécimens respiratoires. Le test est une PCR semi-quantitative, niché, en temps réel conçu pour amplifier un segment de 192pb du gène *rpoB* en utilisant cinq sondes. Des travaux ont démontré que le test Xpert MTB affiche des pourcentages élevés de sensibilité et de spécificité pour la détection des Mycobactéries du *complexe tuberculosis*, en particulier dans les échantillons respiratoires à frottis positif (Catharina C. Boehme *et al.*, 2010). Les sensibilités précédemment rapportés pour les spécimens pulmonaires à frottis positif vont de 95% à 100%.(Miller MB *et al.*, 2011).

La sensibilité au niveau des spécimens pulmonaires à frottis négatif varient entre 55% et 75% (Marlowe E. M. *et al.* 2011 ; Theron G. *et al.* 2011).

Ce test est conçu pour être utilisé sur des échantillons provenant de patients avec des signes évocateurs d'une tuberculose et sans traitement tuberculeux (Theron G *et al.* 2011)

V-3-2 Les tests d'hybridation :

La technique d'hybridation sur bandelettes est simple à mettre en œuvre avec du matériel qui n'est pas très sophistiqué outre que le matériel d'extraction, il faut un thermocycleur et un incubateur. Elle est effectuée en quelques heures seulement (6h). Elle peut être appliquée

directement aux échantillons lorsqu'ils sont riches en bacilles acido-alcoolo-résistants avec un résultat de 1 à 3+ à l'examen microscopique.

On peut alors identifier les bacilles vus au microscope comme appartenant au complexe *M. tuberculosis* et détecter la présence de mutations conférant la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide dans les 48 heures qui suivent le prélèvement, ce qui est capital pour la prise en charge des malades.

L'hybridation sur bandelettes consiste à amplifier un fragment de gène, et à l'hybrider sur des sondes fixées sur une bandelette.

Les hybrides sont révélés par l'apparition d'une coloration. Deux bandelettes sont disponibles dans le commerce, la bandelette INNO-LiPARif.TB® (Innogenetics) et la bandelette GenoType®MTBDRplus (Hain Science) (Zhang Y *et al* 2009).

Le test GenoType®MTBDRplus permet l'identification du complexe *M. tuberculosis* et les résistances à la rifampicine et/ou à l'isoniazide à partir d'une culture ou de prélèvements pulmonaires présentant un examen direct positif. L'identification de la résistance à la rifampicine est réalisée par la détection des principales mutations au niveau du gène *rpoB* qui code pour la sous unité β de l'ARN polymérase.

L'identification de résistances de haut niveau à l'isoniazide est réalisée à travers l'analyse du gène *katG* qui code pour la peroxydase-catalase. L'identification de résistances de bas niveau à l'isoniazide est réalisée à travers l'analyse du promoteur du gène *inhA* qui code pour la NADH enoyl ACP reductase (Gupta R *et al* 2015).

Le test GenoType®MTBDRsl permet de détecter les résistances aux fluoroquinolones et ou aux aminoglycosides et ou à l'éthambutol à partir d'une culture. Le test détecte les mutations dans les *gyrA*, *RRS* et les gènes *embB* et, par conséquent, la résistance aux fluoroquinolones (FQ), l'amikacine (AM)/capréomycine (CM), et l'éthambutol (EMB) (Michael Felkelet *al.* 2013).

VI-Traitemet

La tuberculose est une maladie qui se distingue de la plupart des pathologies par la capacité du bacille tuberculeux à entrer dans une phase de dormance.

Cet état se caractérise par une activité métabolique réduite. Les thérapies antituberculeuses doivent donc être adaptées aux différents états physiologiques du bacille.

Les objectifs du traitement de la tuberculose sont d'obtenir une guérison permanente de la maladie tout en évitant l'apparition d'une quelconque résistance et de stopper la chaîne de transmission.

VI-1-Les antituberculeux

Le traitement actuel de la tuberculose active pulmonaire ou extra-pulmonaire suit un schéma thérapeutique d'une durée de 6 mois. Il comprend deux phases successives : une phase initiale intensive de 2 mois avec une quadrithérapie associant isoniazide, rifampicine, éthambutol et pyrazinamide. La seconde phase est une association isoniazide et rifampicine pour une durée de 4 mois. La prise des médicaments est orale et quotidienne.

Tableau I: Groupes de médicaments antituberculeux et abréviations

Groupes	Antituberculeux	Abréviations
GROUPE 1 Médicaments oraux de première ligne	Isoniazide Rifampicine Pyrazinamide Ethambutol Rifabutine	H R Z E Rfb
GROUPE 2 Médicaments injectables	Streptomycine Amikacine Kanamycine Capréomycine	S Amk Km Cm
GROUPE 3 Fluoroquinolones (FQ)	Moxifloxacine Lévofoxacine Ofloxacine	Lfx Mfx Ofx
GROUPE 4 Médicaments bactériostatiques oraux de deuxième ligne	Ethionamide Prothionamide Cydoséryne Acide para-aminosalicylique	Eto Pto Cs PAS
GROUPE 5 Médicaments pour lesquels les données d'efficacité et/ou d'innocuité pour un usage à long terme sont limitées dans le traitement de la tuberculose (TB) pharmacorésistante	Bédaquiline Linézolide Clofazimine Amoxicilline/acide clavulanique Isoniazide à forte dose Thioacétazone Imipénème/cilastatine Méropénème	Bdq Lzd Cfz Amx/Clv H forte dose Thz Ipm/Cln Mpm

Tableau II: Cibles des médicaments antituberculeux et fonctions cellulaires inhibées

Médicaments	La fonction cellulaire Inhibée	Cible
Isoniazide (INH)	Synthèse des acides mycoliques	Enoyl réductase
La rifampicine (RIF)	la synthèse d'ARN	ARN polymérase
Éthambutol (EMB)	Synthèse Arabinogalactane	Transférase arabinosyle
Fluoroquinolone (FLQ)	Surenroulement de l'ADN	ADN gyrase
Ethionamide (ETH)	Synthèse des acides mycoliques	Enoyl réductase
Streptomycine (STM)	Synthèse des protéines	Sous-unité ribosomale 30S
Kanamycine (KAN) amikacine (AMK)	Synthèse des protéines	Sous-unité ribosomale 30S
Capréomycine (PAC)	Synthèse des protéines	30S/50S sous-unité ribosomale

VII- La résistance aux antituberculeux:

La tuberculose multirésistante (tuberculose MR) demeure un véritable problème avec un taux de succès thérapeutique relativement faible dans de nombreuses régions du monde, ce qui est inquiétant.

La tuberculose ultrarésistante (tuberculose-UR) définie comme une tuberculose-MR plus une résistance à tous les fluoroquinolones et tous les médicaments injectables de deuxième intention a été identifiée dans 92 pays dans toutes les régions du monde (OMS).

L'émergence de souches de bacille tuberculeux résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques concerne aujourd'hui directement l'ensemble de la population mondiale. Les capacités de diagnostic de la tuberculose multirésistante augmentent plus rapidement que les capacités de traitement.

VII-1 Les données épidémiologiques de la résistance

La tuberculose multirésistante (tuberculose MR) demeure un véritable problème de santé publique avec, selon les estimations de l'OMS, 480 000 nouveaux cas répertoriés en 2013. Au niveau mondial, près de 3,5% des personnes ayant contracté la tuberculose en 2013 présentaient cette forme de la maladie, beaucoup plus difficile à traiter et dont les taux de guérisons sont bien inférieurs. Si le pourcentage estimatif des nouveaux cas de tuberculose présentant une forme multirésistante reste inchangé, des épidémies graves sévisseraient dans certaines régions, en particulier en Europe orientale et en Asie centrale (WHO).

La répartition des cas de TB-MDR varie d'une région à une autre. Une méta-analyse de la prévalence MDR-TB et les facteurs de risque associés en Afrique subsaharienne entre 2003 et 2013 a permis de déterminer sa prévalence dans cette région. Plusieurs études de tests de sensibilité aux médicaments (DST) ont rapporté pour un total de 13,465 nouveaux cas et 1776 précédemment traités. Parmi les patients tuberculeux, les prévalences de la MDR-TB étaient de 1, 5% parmi les nouveaux cas et 27,2% parmi les patients traités (Lukoye*et al*, 2015).

La prévalence déclarée de MDR-TB en Afrique subsaharienne est faible par rapport aux estimations de l'OMS. La MDR-TB dans cette région ne semble pas être entraîné par les taux élevés de prévalence du VIH (Lukoye*et al*, 2015).

VII-2-Pharmacorésistance

L'insuffisance du traitement avec des mutations de certains gènes ont été les principaux facteurs de risque de la tuberculose résistante aux médicaments (Yu-feng WEN *et al* 2015).

L'acquisition de la résistance aux antituberculeux de *M. tuberculosis* a été observée dès le début de l'utilisation de la streptomycine en 1944 ; elle est due à la sélection progressive, sous l'effet d'un antibiotique, de mutants résistants initialement présents parmi les bacilles sensibles au niveau de la lésion tuberculeuse.

La résistance acquise aux antibiotiques est toujours liée à des mutations des gènes chromosomiques qui codent soit pour des protéines cibles de certains antibiotiques soit pour des enzymes impliquées dans l'activation de l'antibiotique en substance active (Tableau III).

Il s'agit essentiellement de mutations, telles que les polymorphismes simple de nucléotides SNP, qui peuvent être acquises au cours du traitement et peuvent se propager au sein de la population.

➤ **Rifampicine**

Elle est l'un des antibiotiques clés de la polychimiothérapie de la tuberculose.

La cible de la rifampicine est la sous-unité beta de l'ARN polymérase, codée par le gène *rpoB*. Le mécanisme d'action est l'inhibition de la transcription des ARNm en interagissant avec la sous unité β de l'ARN polymérase codée par le gène *rpoB* chez *M. tuberculosis* (Loiez-Durocher *et al* 2000). La résistance à la rifampicine est liée à des mutations dans une région restreinte du gène *rpoB*, qui s'étend du codon 511 au codon 533 (fig 13).

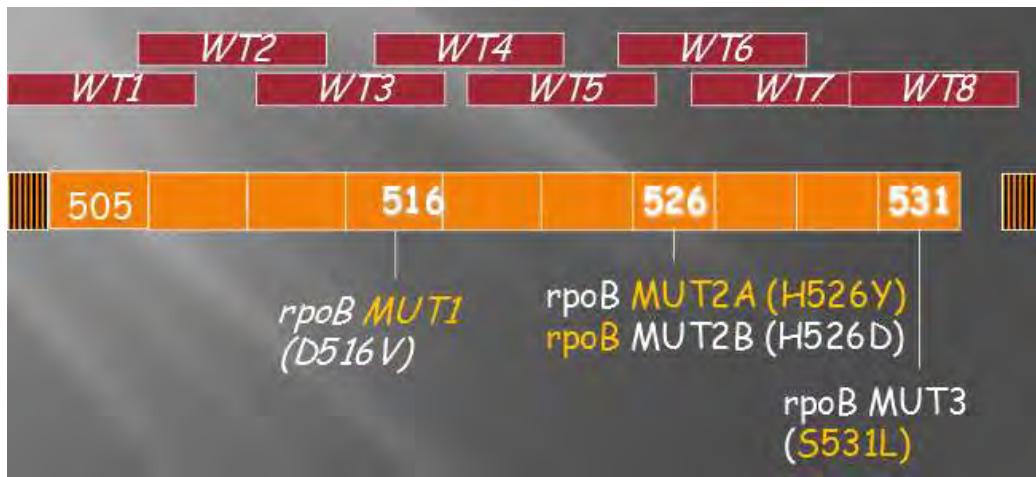


Figure 13: Région du gène *rpoB* et différents mutations

➤ Isoniazide

La résistance de *M. tuberculosis* à Isoniazide (INH) est associée à des mutations dans les gènes *katG*, *inhA* et *ahpC*.

L'INH est classé comme un précurseur de médicament et est activé par la catalase-peroxydase codée par le gène *katG*. La plupart des mutations identifiées correspondent à celles notées sur le gène *katG* en particulier au niveau du codon 315 (Barnard M et al 2008).

Elles entraînent une perte de l'activité de la catalase et une résistance à l'INH.

La cible de l'INH est activée aussi par l'énoyl-ACP réductase codée par le gène *InhA*, et une expression accrue de *inhA* en raison de mutations du promoteur de ce gène conduit à une résistance à l'INH.

La plupart des isolats de *M. tuberculosis* résistants à INH possèdent des mutations dans l'un ou les deux de ces régions. L'altération du locus *katG* le plus répandu est une substitution d'acide aminé résultant d'un changement de codon. Le remplacement de la thréonine par la serine au niveau de l'acide aminé 315 ; substitution de l'asparagine (AAC) par l'isoleucine (ATC). On peut avoir aussi une la substitution de la sérine (AGT) par la glycine (GGT) au codon 273 (W H Haas et al 1997).

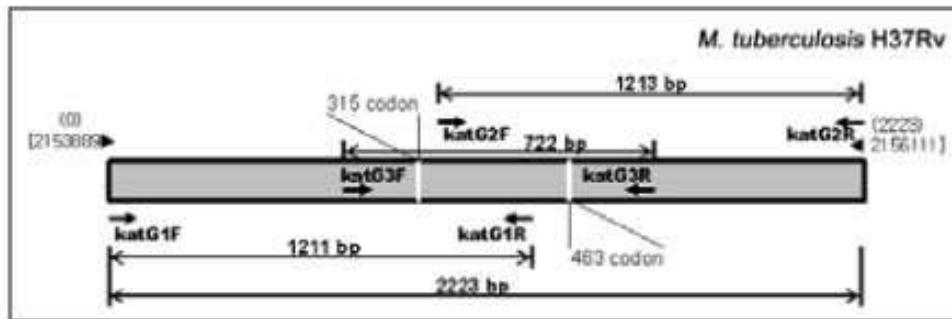


Figure 14: Région du gène gène KatG

➤ Éthambutol

L'objectif de ce médicament est d'inhiber la synthèse de l'arabinogalactane. Des mutations dans une région de *embB* désigné le ERDR ont été analysés, car des mutations dans cette région ont été signalés dans 50 à 60% des isolats résistants a l'ETH (Patricia J et al.2011).

➤ Pyrazinamide

La pyrazinamide, comme l'INH est un pro-médicament qui doit être activé.

Une Pyrazinamidase codée par *pncA* catalyse la formation de la molécule active : l'acide pyrazinoïque. Il cible le système FASI (Fatty Acid Synthase de type I) impliqué dans la biosynthèse des acides gras.

Des mutations dans *pncA* sont associées à la perte de l'activité enzymatique et les deux sont, à son tour, fortement corrélées à la résistance à la PZA (Zimhony et al.2000).

➤ Fluoroquinolones

La résistance aux FQ est attribuée à des mutations au sein de la sous-unité A de l'ADN gyrase (codée par *gyrA*), qui empêche une liaison efficace de la gyrase aux médicaments (Patricia J et al.2011).

➤ Amikacine

Les mutations associées à la résistance à AMK sont situés au niveau du gène *rrs*, qui code pour les ARNr 16S.

➤ Kanamycine

Les mécanismes connus de résistance KAN sont causées par des mutations dans *rrs* qui empêchent l'inhibition de la traduction du médicament (Patricia J et al.2011).

Tableau III: Gènes et mutations conférant une résistance aux antituberculeux Adapté de VegardEldholm et al 2010.

Antituberculeux	Gène	Sites de mutation au niveau des codons
Rifampicine (RIF)	<i>rpoB</i>	513, 526, 531, 533
Isoniazide (INH)	<i>inhA</i> , <i>katG</i> ,	8, 15 279, 315
Éthambutol (EMB)	<i>embB</i>	306, 406, 497
Pyrazinamide (PZA)	<i>pncA</i>	63, 138, 141, 162
Ethionamide (ETH)	<i>mabA</i> - <i>inhA</i>	94
Les fluoroquinolones (FLQ)	<i>GyrA</i>	74, 90, 91, 94, 102

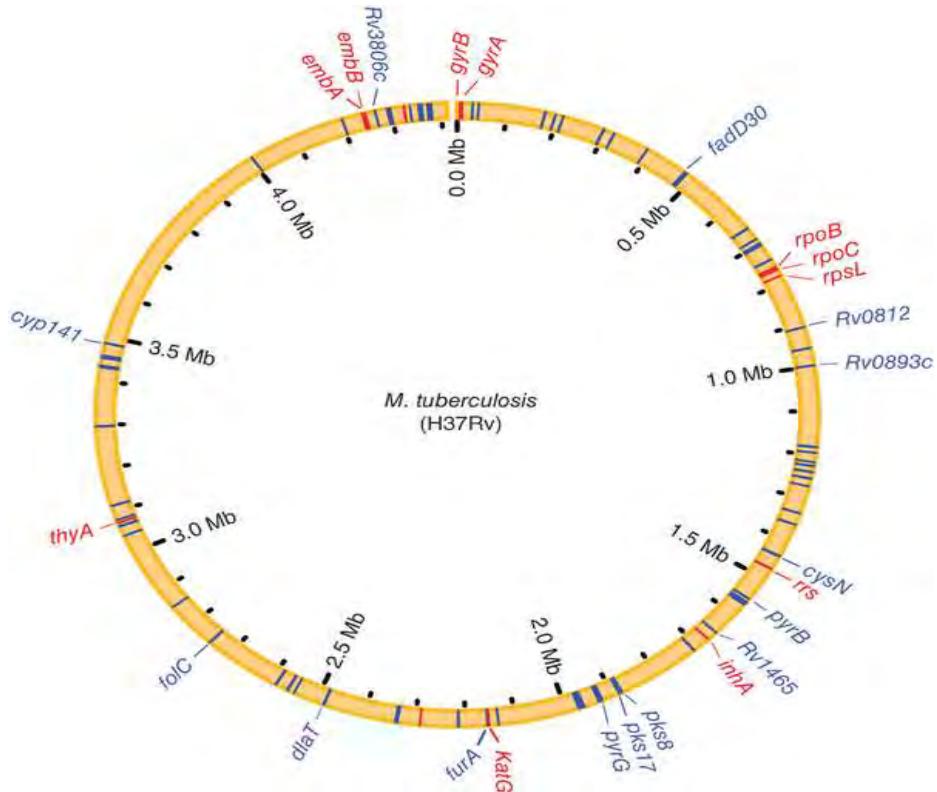


Figure 15: Représentation des gènes de résistance sur le Génome de *M.tb* wwwnc.cdc.gov

DEUXIÈME PARTIE :

ETUDE DU PROFIL DE MUTATION ASSOCIÉE À LA RÉSISTANCE À LA RIFAMPICINE ET À L'ISONIAZIDE DES SOUCHE DE *M.TUBERCULOSIS* À HÔPITAL MILITAIRE DE OUAKAM.

I-Contexte

Depuis la découverte du bacille de Koch par Robert Koch en 1882, la tuberculose demeure un problème de santé publique. Cette maladie tue près de 2 millions de personnes chaque année.

Des avancés importants ont été faites dans le diagnostic et le traitement de la tuberculose. Cependant avec l'apparition du SIDA qui est une pathologie immuno-dépressive; il y'a eu une recrudescence des cas de tuberculose dans le monde. En outre, il est apparu la résistance aux antituberculeux, ce qui suscite un intérêt pour l'épidémiologie moléculaire des souches de Mycobactéries et leur sensibilité aux molécules utilisées dans le traitement.

II Objectifs

II-1 Objectif général :

La résistance aux antituberculeux est due à des mutations génomiques particulières au niveau des gènes spécifiques de *M. tuberculosis*. Notre étude a pour but d'identifier les mutations associées à la résistance et de déterminer la fréquence des mutations des gènes conférant une résistance à l'isoniazide (INH), et à la rifampicine (RMP) au niveau des échantillons avec un résultat positif à la coloration de Ziehl à la microscopie optique.

II-2 Objectifs spécifiques :

- Déterminer le profil de mutations des souches
- Déterminer la fréquence de ces mutations
- Déterminer le niveau de résistance des souches par rapport a l'isoniazide et à la rifampicine

III Méthodologie :

III-1 Site et population d'étude

Cette étude a été menée à l'hôpital Militaire de Ouakam (HMO) qui est situé à la pointe ouest de la presqu'île du Cap Vert. Il partage le lotissement militaire Paul LAPEYRE avec le Bataillon du Train et l'Ecole de Formation des Officiers de la Gendarmerie nationale.

L'Hôpital Militaire de Ouakam (HMO) est un Etablissement Hospitalier Militaire (EHM). En dépit de sa tutelle exclusivement militaire, la structure est ouverte aux populations civiles sans restriction, leur consacrant 90% de ses activités.

Le laboratoire est un complexe polyvalent avec deux unités.

Au rez de chaussé on a le laboratoire biomédicale disposant de plusieurs salles réservées chacune à une spécialité en plus des bureaux.

On a :

- une salle de prélèvements génitaux.
- une salle de prélèvements sanguins
- le bureau du Major
- le bureau du Pharmacien Biogiste adjoint
- un secrétariat
- une salle Bactériologie/Parasitologie
- une salle Biochimie
- une salle d'accueil
- une salle de garde
- une salle Hématologie
- une salle pour la recherche de BAAR
- une salle sérologie

A l'étage, on a le laboratoire de biologie moléculaire disposant de 11 salles :

- le bureau du chef de service : Pharmacien Biogiste
- un secrétariat
- une salle CD4/Charge virale (Facscount et m2000)
- une salle de stérilisation
- 2bureau administratifs
- Une salle de préparation des Mix
- Une salle d'extraction d'ADN

- Une salle d'amplification
- Une salle de révélation

Le chef de service du laboratoire est pharmacien biologiste , ses adjoints sont des pharmaciens biologistes. Vient ensuite l'Adjudant Major et les techniciens relevant tous du corps militaire. L'étude a été menée d'Avril à Août 2015. Un nombre de 25 patients ont été inclus dans cette étude. Ces patients ont été sélectionnés sur la base de la détection de BAAR par microscopie avec deux techniques de coloration.

La coloration fluorescente avec l'auramine et la coloration de Ziehl Neelsen avec la fuchsine qui ont été faites en parallèle. Les patients qui ont un frottis positif au moment du diagnostic ont été inclus dans l'étude.

III-2 Matériels et Réactifs (en annexe) :

III-3- Prélèvement collecte et transport des échantillons

On a besoin de 2 échantillons de crachats pour le diagnostic de la tuberculose. Le meilleur échantillon provient des poumons et non des sécrétions nasales ou de la salive. Pour effectuer le prélèvement, le malade doit être dans un endroit aéré non fréquenté.

Un technicien chargé de cette collecte d'échantillons d'expectoration en vue d'une recherche de BAAR explique au malade :

- comment tousser pour que l'expectoration provienne du plus profond du thorax ;
- lui montrer comment ouvrir le crachoir et comment le fermer après avoir produit l'expectoration ;
- demande au malade d'inspirer profondément 2 à 3 fois et expirer totalement à chaque fois ; selon les normes requises pour l'obtention d'un bon prélèvement
- tousser profondément pour dégager les sécrétions pulmonaires ;
- placer le crachoir ouvert près des lèvres et cracher à l'intérieur les sécrétions pulmonaires sans souiller les rebords ;
- refermer en vissant hermétiquement le couvercle ;
- contrôler la qualité et la quantité du prélèvement : le crachoir étant en matière plastique transparente, l'on peut vérifier son contenu sans l'ouvrir ;
- donner au malade un crachoir neuf et lui expliquer qu'il doit produire une expectoration de la même manière que pour le premier échantillon, au réveil, et l'apporter au laboratoire.

Les échantillons sont collectés dans la salle de prélèvement puis acheminés au niveau de la paillasse de recherche de BAAR où les frottis sont effectués les frottis.

Les souches en provenance du PNT, sont acheminées et sécurisées dans un glacier et sont conservées en -4°C.

III-4- Techniques de décontamination et de coloration

III-4-1 Décontamination et concentration

Les échantillons d'expectorations sont traités avec le kit de Microprep *BBL NALC N-acétyl-L-cystéine 4% de NaOH 2,9% Citrate* selon le procédé qui suit :

- Transférer 3ml d'expectorations dans tube Falcon en plastique de 15ml.
- Ajouter 3ml de la solution NALC dans le tube.
- Mélanger par vortex jusqu'à liquéfaction de l'échantillon puis incuber à température ambiante pendant 15 min.
- Ajouter 9ml du tampon phosphate et centrifuger à 3.000g pendant 20 min.
- Eliminer le surnageant puis remettre le culot en suspension avec 2 ml du tampon phosphate stérile.

La suspension est utilisée pour effectuer deux frottis colorés par la méthode de Ziehl avec la fuchsine et avec l'auramine.

III-5-2 Coloration

A partir des crachats décontaminés on a fait un frottis fin sur les 2/3 de la lame. Les lames destinées à la coloration de Ziehl sont fixées à la flamme.

III-5-2-1 Coloration de ZIEHL-NEELSEN:

Pour la coloration de Ziehl il faut :

- Placer les lames sur le pont de coloration
- Recouvrir la lame de la solution de fuchsine à 1% filtrée
- Chauffer jusqu'à émission de vapeurs
- Laisser agir pendant 10 minutes
- Rincer sous un mince filet d'eau courante
- Egoutter complètement la lame

- Recouvrir la lame de la solution d'acide-alcool à 3%
- Laisser agir pendant 3 minutes
- Rincer sous un mince filet d'eau courante
- Egoutter la lame
- Recouvrir la lame de la solution aqueuse de bleu de méthylène filtrée à 0,3%
- Laisser agir pendant 1 minute
- Rincer sous un mince filet d'eau courante
- Egoutter complètement la lame
- Laisser sécher à température ambiante sur le portoir.

Au terme de cette coloration, les BAAR apparaissent rouges dans un fond bleu au grossissement 100.

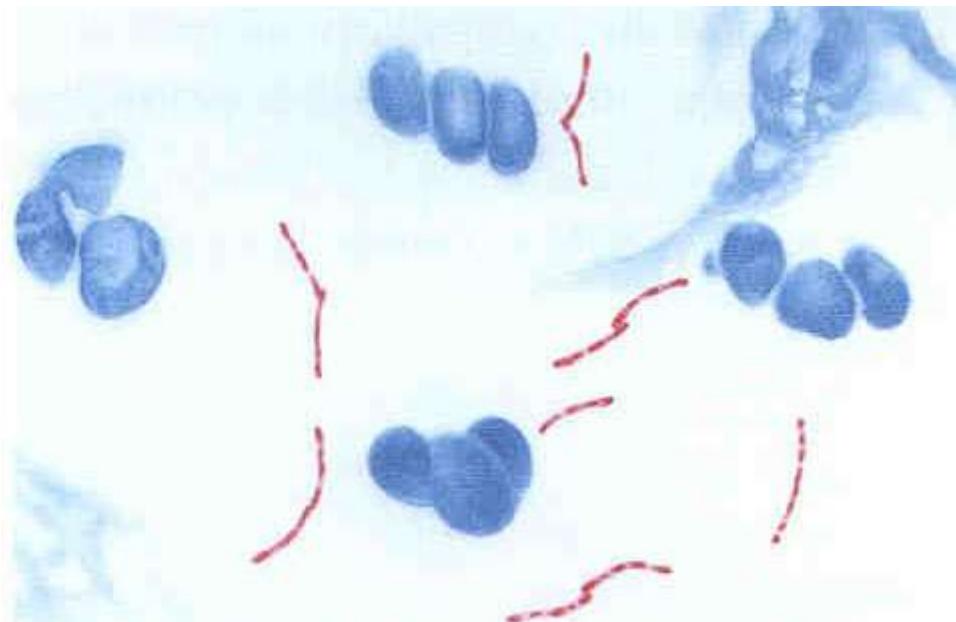


Figure 16: Aspect des BAAR microscope après coloration de avec fuchsine
<https://www.institutpasteur.nc%2Fla-tuberculose>

III- 5-2-2 Coloration à l'auramine

- Recouvrir la lame de la solution d'Auramine O filtrée à 0,1%
- Laisser agir pendant **15 minutes** (NE PAS CHAUFFER)

- Rincer sous un mince filet d'eau courante
- Egoutter complètement la lame
- Recouvrir la lame de la solution d'acide-alcool à 0,5%
- Laisser agir pendant **5 minutes**
- Rincer sous un mince filet d'eau courante
- Recouvrir la lame de la solution de bleu de méthylène à 0,3%
- Laisser agir pendant **1 minute 30 secondes**
- Rincer sous un mince filet d'eau courante
- Egoutter complètement la lame
- Laisser sécher à température ambiante à l'abri de la lumière blanche.
- Laisser sécher et lire au microscope à fluorescence à l'objectif 40.

Au terme de cette coloration les BAAR apparaissent fluorescents (vert jaune brillant) sur un fond rouge sombre.

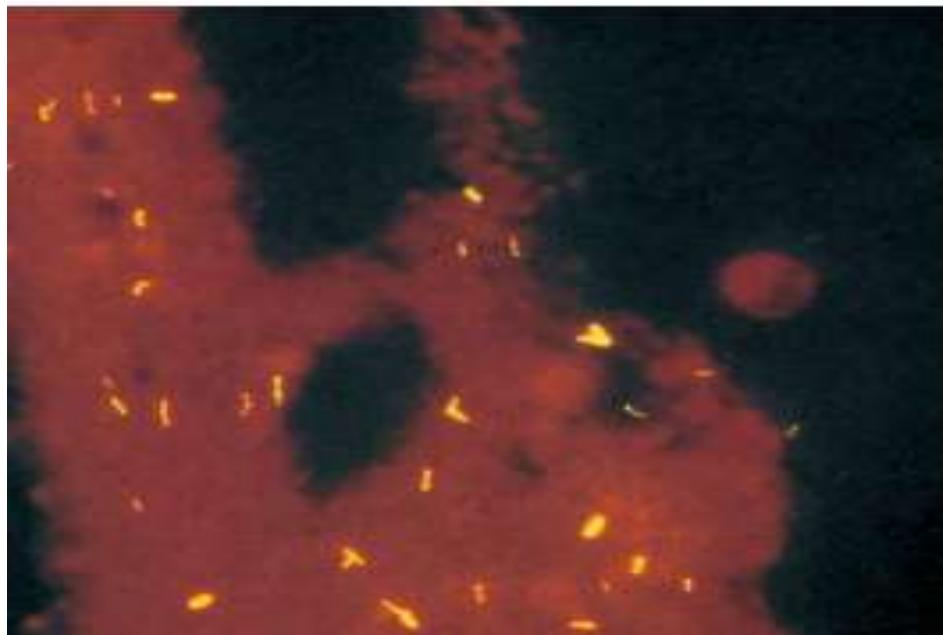


Figure 17: Aspect des BAAR microscope après coloration à l'auramine

III-6- Test moléculaire de mise en évidence de la résistance à la Rifampicine et à l'Isoniaside

C'est un test moléculaire utilisé pour mettre en évidence les mutations de résistance du complexe tuberculosis. En outre il permet de savoir si la souche en face est du complexe tuberculosis contrairement à la microscopie.

III-6-1 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN mycobactérien a été effectuée avec le kit d'extraction Genolyse (Hain) au niveau de la salle d'extraction PCR2 du laboratoire de biologie moléculaire.

Un volume de 500 μ l microlitres du culot décontaminé est transféré dans un tube Eppendorf.

La suspension est centrifugée à 10.000g pendant 15 minutes et le surnageant est éliminé, Ajouter 100 μ l de la solution de lyse Buffer (A-LYS) au culot. La suspension est homogénéisée par vortex puis inactivée par incubation dans un bloc chauffant à 95° pendant 5mn.

Ajouter 100 μ l de la solution Buffer neutralisante (A-NB) ensuite vortexer.

Centrifuger 15000g pendant 5mn. Le surnageant contenant l'ADN est récupéré.

L'ADN contenu dans le surnageant est transféré dans un tube conique de 1.5ml.

III-6-2 Amplification de l'ADN

L'amplification avec le kit génotype MTBDR *plus* ® version test 2.0 (Vie Hain science, Nehren, GmbH, Allemagne) a été réalisée selon les recommandations du fabricant.

Une étape de préparation du mélange master Mix a été effectuée au niveau de la salle PCR1. Cette salle est réservée exclusivement à la préparation du Mix. C'est une pièce propre.

Pour ce faire, on numérote d'abord les tubes avec un marqueur permanent qui résiste à la chaleur et les ranger dans un ordre précis. La préparation du mélange dans la salle de Mix se fait par ajout de 10ul Mix A à 35ul de Mix B pour avoir un volume final de 45ul correspondant au mélange d'amplification pour chaque prélèvement.

Le volume de 45 μ l est constitué de 35 μ l d'amorce nucléotidique (Mix B), d'un tampon d'amplification contenant 5 μ l de Mgcl₂, 2.5 μ l l'eau stérile, 2.5 μ l de la Taq polymérase (Mix A).

L'amplification est réalisée selon les étapes suivantes :

Au niveau de la salle PRC3, on a ajouté 5 μ l d'extrait d'ADN mycobactérien pour avoir un volume final de 50 μ l.

Les tubes ont été placés dans le thermocycleur. Ce dernier est lancé en appuyant sur F1, la méthode directe a été sélectionnée avec la dilution 50ul. Pour réaliser l'amplification on a fixé les paramètres suivants : 15 min de dénaturation à 95°C, suivi par 20 des cycles de 30 s à 95°C et 2 min à 65 ° C, suivie par 30 cycles supplémentaires de 25s à 95°C, 40 s à 53°C, et

40s à 70°C. L'option F4 indique l'heure de la fin de la procédure. Ces paramètres sont indiqués par le fabricant du kit (Hain).

III-6-3- Hybridation :

L'hybridation et la révélation sont effectuées avec le TwinCubator semi-automatisé au niveau de la salle de révélation. Cette partie révèle les résultats de la PCR,

III-6-3-1 Principe

L'hybridation a été réalisée avec le kit Génotype MTBDRplus version 2 de Hain avec des bandelettes revêtues de sondes hautement spécifiques qui sont complémentaires aux séquences d'acides nucléiques amplifiées de façon sélective. L'amplicon simple brin se lie spécifiquement aux sondes analogiques au cours de l'hybridation, tandis que des amplicons liés de manière non spécifique sont éliminés dans les étapes ultérieures de lavage. Lors de la réaction avec le conjugué, l'amplicon spécifiquement lié est marqué avec l'enzyme phosphatase alcaline et est ensuite rendue visible dans une réaction de détection colorimétrique.

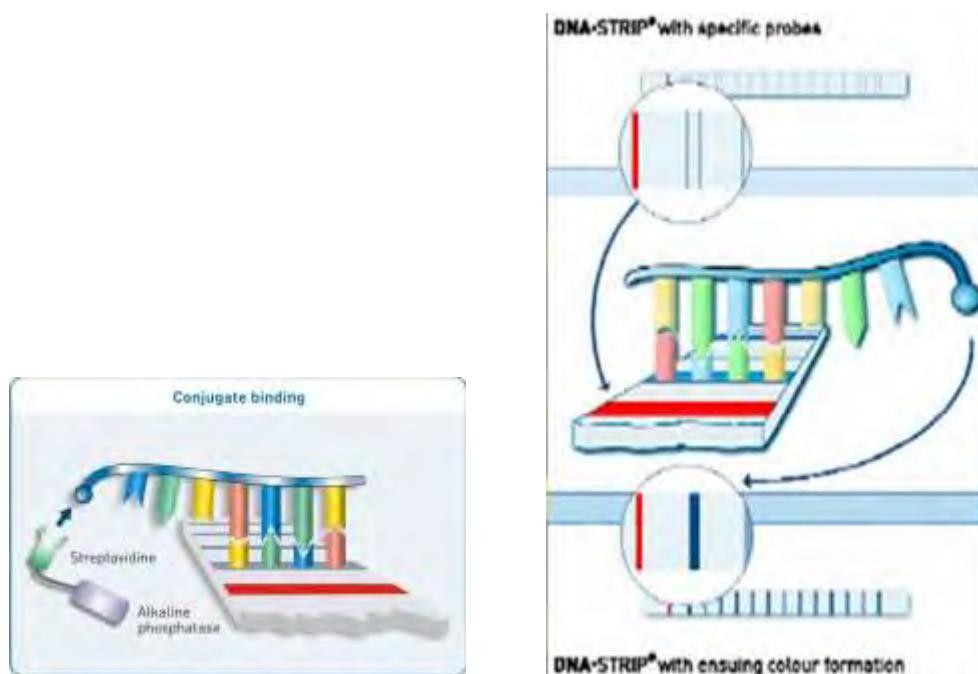


Figure 18: Hybridation Appliquons/Sondes spécifiques et révélation colorimétrique
<http://www.biocentric.com/index.php/tests-genetiques/gene-apoe/281.html>

III-6-3-2 Mode opératoire :

La Solution d'Hybridation (HYB, vert) est mise à température ambiante 30mn avant son utilisation et mélangée pour assurer sa dissolution complète avant utilisation.

On dépose 20µl de Solution de Dénaturation (DEN, bleu) à une extrémité de chaque puits utilisé et on ajoute 20µl d'échantillon amplifié. Ensuite on mélange les 2 solutions par pipetages répétés. Le mélange est incubé pendant 5 minutes à température ambiante.

Un volume de 1ml de Tampon d'Hybridation (HYB) est ajouté dans chaque puits.

Le bac est agité doucement jusqu'à ce que le mélange soit homogène en couleur en évitant les éclaboussures vers les autres puits afin d'éviter les contaminations croisées.

A l'aide d'une pince en plastique, les bandelettes sont retirées du tube.

On inscrit au marqueur permanent le numéro d'identification de l'échantillon sur chacune des bandelettes. Les bandelettes sont manipulées avec des gants.

Dans chaque puits une bandelette est déposée. Les bandelettes sont remises en position à l'aide de pinces propres afin d'être entièrement recouvertes par le liquide de lavage.

La plaque de puits est placée dans le TwinCubator pour une incubation de 30 minutes à 45°C. Le contenu des puits est vidé avec une pipette.

On ajoute dans chaque puits 1ml de Solution de Lavage Stringent (STR) avec beaucoup de précaution en évitant des éclaboussures vers les autres puits et incubé pendant 15 minutes à 45°C dans le TwinCubator. La Solution de Lavage Stringent est éliminée en retournant le bac sur du papier absorbant.

On ajoute 1ml de la solution de Rinçage (RIN) dans chaque puits et on incube pendant 1mn dans le TwinCubator. Le contenu des puits est vidé en retournant le bac sur du papier absorbant.

On ajoute 1ml de la solution Conjugué dilué dans chaque puits on incube pendant 30 minutes dans le TwinCubator.

Deux étapes de rinçage sont effectuées avec la de Solution de Rinçage (RIN).

On rince une dernière fois avec 1ml d'eau distillée et on incube pendant 1 minute dans le TwinCubator. Le contenu des puits est vidé en éliminant toute trace d'eau dans les puits.

On ajoute 1 ml de Substrat dilué (SUB) dans chaque puit et on incube pendant 5 minutes dans le TwinCubator.

Le contenu des puits est vidé et la réaction est arrêtée en ajoutant 1 ml d'eau distillée 2 fois dans chacun des puits en incubant pendant 1 minute à température ambiante.

Les bandelettes sont récupérées et séchées entre deux couches de papier absorbant à l'aide de pince.

Pour juger un test du kit Génotype MTBDRplus® valide et interprétable, il faut impérativement que les contrôles soient positifs. Il s'agit du contrôle d'amplification (AC) qui se matérialise par une bande bien nette, le contrôle conjugué (CC) pour la solution conjuguée et le contrôle (TUB) qui indique l'appartenance ou non de la souche au complexe *tuberculosis*.

Pour chaque série de test un contrôle négatif a été ajouté pour le contrôle qualité.

Les mécanismes de résistance aux antituberculeux sont en relation avec des mutations génétiques. Le test du kit de dosage Genotype® MTBDRplus prend en compte les gènes *rpoB*, *katG* et *inhA*. Pour chaque gène on a la présence de type sauvage ou Wild Type (WT) et des sondes mutantes(MUT).

Les sondes d'ADN membranaires inclus pour le gène *rpoB*, comporte huit sondes de type sauvage *rpoB*(WT1 à WT8) et quatre sondes mutante *rpoB* MUT1, *rpoB* MUT2A, *rpoB* MUT2B et *rpoB* MUT3 correspondant respectivement aux mutations D516V, H526Y, H526D et S531L.

Pour le gène *katG* on a une sonde de type sauvage WT et deux sondes mutantes *katGMUT1* et *katGMUT2* correspondant aux mutations S315T1 et S315T2.

En ce qui concerne le gène *inhA* on a deux sondes de type sauvage (WT1 et WT2) et quatre sondes mutantes *inhAMUT1*, *inhAMUT2*, *inhAMUT3A* et *inhAMUT3B* qui correspondent aux mutations C15T, A16G, T8C, et T8A.

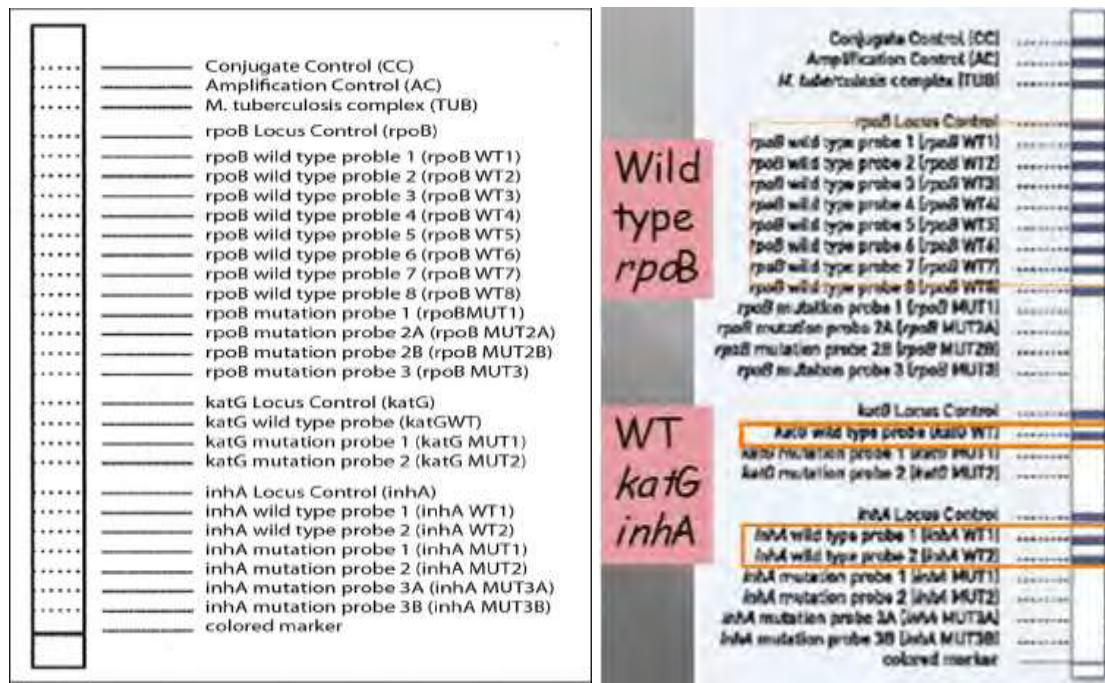


Figure 19: Bandelettes DNA-Strip adapté de Raveendran R et al 2012

IV- Résultats :

Un nombre de patients 25 patients ont été inclus dans cette étude. Selon le sexe, 15 étaient des hommes (60%) et 10 des femmes (40%), L'âge varie de 17 à 56 ans.

Tranche d'âge	Nombre
10-15	0
15-20	6
20-25	1
25-30	6
30-35	5
35-40	4
40-45	1
45-50	1
50-55	0
55-60	1
+60	0

L'examen microscopique des expectorations a montré que tous les échantillons avaient au moins 1 à 99 BAAR dans 100 champs microscopiques (1+). Deux échantillons avaient une faible bacilloscopie avec 7 et 5BAAR dans 100 champs.

Parmi les 25 échantillons reçus, 48% (12) ont été signalés sensibles à la Rif et l'INH et 12 présentaient une mutation au moins au niveau d'un des 3 gènes caractéristiques de la résistance à la Rif et à l'INH. Une souche résistante à la Rif mais n'appartenant pas au CMTB a été enregistré par absence de la bande TUB.

Tableau IV: Résistances enregistrées

Sexe	Nombre	Monorésistance	Monorésistance	Multirésistance
		RIF	INH	MDR
Homme	15	0	1	6
Femme	10	0	2	3
Total	25	0	3	9

Tableau V: Mutations associées à la résistance des souches

Antituberculeux	Nombre de souches résistantes	Gène Muté	Mutations / Absence Wild Type	Nombres	Fréquences
Rif	9	RpoB	S531L WT8(-)	7 3	77.77% 33,33%
INH	12	KatG	S315T1	9	64.28%
			S315T2 WT(-)	1 4	7.14% 28.57%
		InhA	T8C WT1(-)	3 1	75% 25%

V- Discussion :

Au Sénégal les efforts de lutte contre la tuberculose sont accentués dans la détection des nouveaux cas pour initier le traitement de façon précoce. La détection précoce de la résistance aux médicaments doit constituer une priorité. Le traitement de la TB est très long et difficile avec une combinaison de plusieurs médicaments. Ainsi, il se pose des fois un problème de bonne observance du traitement qui peut entraîner la résistance de certaines souches.

Le test de génotypage MTBDRplus a fait l'objet de plusieurs études (Mai Huyen NT et al 2010 ; Belay Tessema et al 2012 ; Vegard Eldholm et al 2014) avec une sensibilité et une spécificité dans la détection de la résistance à la Rif et à l'INH respectivement 100% et 83,3% (Asante-Poku A et al 2015).

Dans notre étude, 9 échantillons étaient résistantes à la Rifampicine et à l'Isoniazide (MDR) et 3 échantillons étaient résistants seulement à l'Isoniazide. Une mutation a été notée au moins au niveau de l'un des quatre sondes du gène *rpoB* dans 9 échantillons. La mutation S531L a été détectée dans 77.77% (7/9) moins élevée que dans une étude qui a été mené en Afrique du Sud (88,6%), un pays où la prévalence de la résistance est élevée (Barnard M et al. 2008).

En effet, il est admis que le profil et la fréquence des mutations responsable de la résistance aux médicaments antituberculeux peuvent varier d'une région à une autre (Dalla Costa ER et al. 2009). Nos résultats sont en accord avec une étude en Ouganda au cours de laquelle la mutation S531L est survenue plus fréquemment dans les isolats MDR en comparaison aux souches monorésistantes à la Rif (Albert H et al 2010).

Cependant la résistance à la Rifampicine peut être considérée comme un marqueur de multirésistance car une monorésistance à la Rif n'a pas été enregistrée dans notre étude.

La résistance de *M. tuberculosis* à Isoniazide (INH) est associée à des mutations dans les gènes *katG*, *inhA*. Les isolats de *M. tuberculosis* résistants à INH ont des mutations au niveau de ces deux régions du génome. La résistance à l'INH a été beaucoup plus fréquente avec 100% (12/12) des souches résistantes. En plus des souches MDR, une monorésistance a été enregistrée dans 25% des isolats (3/12).

Des mutations au niveau du gène *katG* ont été les plus fréquentes au niveau des souches résistantes à l'INH. L'altération au niveau du gène *katG* le plus répandu est une substitution d'acide aminé résultant d'un changement de codon. Il correspond au remplacement de la thréonine par la serine au niveau de l'acide aminé 315 (S315T1). Cette mutation a été trouvée

dans 83,33% (10/12) des isolats résistants à l'INH. Nos résultats sont supperposables ceux à de Huyen MN et *al.* 2010 dont 50 à 100% des souches résistantes à l'INH ont des mutations dans le codon 315 du gène *katG* et de Tessema et *al.* 2012 où la mutation S315T a été la plus observé dans les isolats de TB-MDR.

En effet, au niveau des souches monorésistantes à l'INH (3), seulement une souche avait une mutation au niveau du gène *katG*.

Quatre souches résistantes à l'INH présentaient une mutation dans le gène *inhA*. Trois de ces souches avaient une mutation T8C dans le gène et l'autre présentait une absence du type sauvage WT1. Deux souches étaient monorésistantes avec une résistance de bas niveau à l'isoniazide.

En effet, l'absence des amplicons séquences de types sauvages avec la présence ou l'absence de mutation, est interprétée comme une résistance.

L'absence des amplicons séquences de type sauvage a été notée dans 33,33% (3/9) des souches résistantes à la Rif et 41,66% (5/12) des souches résistantes à l'INH.

Dans notre étude les fréquences des mutations à la base de la résistance à l'INH étaient comme suit : pour le gène *katG* 76.92%, et 23.08% pour le gène *inhA*. Ces résultats sont similaires à ceux de Thakur C et *al* 2015.

Il est important de rappeler que la fréquence des mutations peut varier d'une région à une autre, ce qui rend important ce type d'étude pour une meilleure prise en charge.

Deux souches résistantes à l'INH (16%) avaient un niveau de résistance élevé avec des mutations de *inhA* associées à des mutations dans *katG*, conférant un niveau de résistance élevé. Deux souches monorésistantes avaient un niveau de résistance faible ; l'une des deux souches (2) avait une mutation T8C et l'autre absence du type sauvage WT1.

CONCLUSION

La résistance à l’Isoniazide a été plus fréquente avec une prédominance des mutations au niveau du gène *katG*. La mutation S315T1 a été la plus fréquente. Une monorésistance a été enregistrée que pour l’Isoniazide.

Des mutations du gène *rpoB* ont été enregistrées avec une prédominance de la mutation S531L. L’absence des amplicons séquences de type sauvage qui entraîne une résistance a été noté le plus au niveau des gènes *rpoB* et *katG*.

Ce type d’étude ne permet pas d’avoir un échantillonnage important en peu de temps. Il faut étaler l’étude sur une période relativement longue pour tirer des conclusions de santé publique définitives pour l’amélioration de la prise en charge de malades.

La prévention de la diffusion des souches résistantes nécessite une détection précoce de la résistance. Les mutations des gènes à la base de la résistance aux antituberculeux varient selon les régions géographiques dans le monde il serait très utile de déterminer le type et la distribution des mutations associées à cette résistance de manière beaucoup plus large. Le test MTBDRplus est une technique rapide de détection des mutations du génome bactérien responsables de la résistance aux deux principaux antituberculeux. L’utilisation du génotypage pourra être de taille si d’ambler tous les échantillons positifs à la microscopie sont testés et que le profil moléculaire de la résistance est connu. Ainsi, on peut augmenter les chances pour un succès thérapeutique. Cependant le test Genotypage MTBDRplus n’est pas accessible à tous les laboratoires vus l’équipement minimal et les conditions de travail requis. Il incombe à l’état à travers le PNT de développer des stratégies visant à fournir l’équipement nécessaire afin de réaliser le diagnostic et le suivi de la tuberculose avec les nouvelles techniques de pointes.

REFERENCES

1. <http://www.em-consulte.com/rmr/article/671730/#fig0005/29/04/2015>
2. <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/11/190>
3. <http://www.paseur.fr>
4. http://www.aurespneumo.com/index.php?option=com_content&view=article&id=72%3Ala-primo-infection-tuberculeuse&catid/29-04-2015
5. http://www.aurespneumo.com/index.php?option=com_content&view=article&id=72%3Ala-primo-infection-tuberculeuse&catid/29-04-2015
6. www.intechopen.com/ Comprendre la tuberculose - Décrypter la vie secrète des bacilles.
7. <http://www.who.int/>
8. Albert H, Bwanga F, Mukkada S, Nyesiga B, Ademun JP, Lukyamuzi G, Haile M, Hoffner S, Joloba M, O'Brien R. Rapid screening of MDR-TB using molecular Line Probe Assay is feasible in Uganda. *BMC Infect Dis.* **2010** Feb 26;10:41. doi: 10.1186/1471-2334-10-41. PMID:20187922
9. Asante-Poku A, Otchere ID, Danso E, Mensah DD, Bonsu F, Gagneux S, Yeboah-Manu D. Evaluation of GenoType(®) MTBDRplus for the rapid detection of drug-resistant tuberculosis in Ghana. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2015 Aug;19(8):954-9. doi: 10.5588/ijtld.14.0864. PMID: 26162362
10. Barnard, M., Albert, H, Coetzee, G, O'Brien, R., & Bosman, M. E. (2008). Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *177*(7), 787-792.
11. Behrends J, Renauld JC, Ehlers S, Hölscher C. IL-22 is mainly produced by IFN γ -secreting cells but is dispensable for host protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e57379. doi: 10.1371/journal.pone.0057379. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23460846
12. Brosch R¹, Pym AS, Gordon SV, Cole ST. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol.* 2001-Sep; 9(9):452-8. PMID:11553458 [PubMed]
13. C. Truffot-Pernot, N. Veziris Bacteriological tests for tuberculosis 1034-1047 Doi: 10.1016/j.rmr.2011.07.00 Revue des Maladies Respiratoires Volume 28, pages numéro 8

14. Catharina C. Boehme, M.D., Pamela Nabeta, M.D., Doris Hillemann, Ph.D., Mark P. Nicol, Ph.D., Shubhada Shenai, Ph.D. Rapid Molecular Detection of Tuberculosis and Rifampin Resistance. *N Engl J Med.* 2010 Sep 9; 363(11): 1005–1015. doi:10.1056/NEJMoa0907847
15. Caws M¹, Thwaites G, Dunstan S, Hawn TR, Lan NT, Thuong NT, Stepniewska K, Huyen MN, Bang ND, Loc TH, Gagneux S, van Soolingen D, Kremer K, van der Sande M, Small P, Anh PT, Chinh NT, Quy HT, Duyen NT, Tho DQ, Hieu NT, Torok E, Hien TT, Dung NH, Nhu NT, Duy PM, van Vinh Chau N, Farrar J. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2008 Mar 28; 4(3):e1000034. doi:10.1371/journal.ppat.1000034.
16. Christopher M. Sassetti¹, Dana H. Boyd² and Eric J. Rubin¹ Article Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis first published online: 25 MAR 2003 DOI: 0.1046/j.1365-2958.2003.03425. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.2003.03425.x/full>
17. Cole ST¹, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998 Nov 12; 396(6707):190
18. Dalla Costa ER, Ribeiro MO, Silva MS, Arnold LS, Rostirolla DC, Cafrune PI, Espinoza RC, Palaci M, Telles MA, Ritacco V, Suffys PN, Lopes ML, Campelo CL, Miranda SS, Kremer K, da Silva PE, Fonseca Lde S, Ho JL, Kritski AL, Rossetti ML. Correlations of mutations in katG, oxyR-ahpC and inhA genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol.* 2009; 9:39. Pubmed
19. Devinder Kaur, Marcelo E. Guerin, Henrieta Škovierová, Patrick J. Brennan, Mary Jackson. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Adv Appl Microbiol.* doi: 10.1016/S0065-2164(09)69002-X PMCID: PMC3066434
21. Dr Pere-Joan Cardona (Ed.) *La tuberculose Comprendre - Décrypter la vie secrète des bacilles* ISBN:978-953-307-946-2, <http://www.intechopen.com/books/understanding-tuberculosis>

tuberculosis-deciphering-the-secret-life-of-the-bacilli/genomic-variability-of-mycobacterium-tuberculosis/2015-03

22. Fei Liu, Yongfei Hu, Qi Wang, Hong Min Li, George F Gao, Cui Hua Liu, and Baoli Zhu Comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates PMCID: PMC4070564 Published online 2014 Jun 13. doi: 10.1186/1471-2164-15-469 *BMC Genomics*. 2014; 15(1): 469.
23. Gupta R¹, Thakur R¹, Gupta P¹, Jalan N¹, Kushwaha S², Gupta M³, Gupta P⁴, Aggarwal A⁵, Manchanda V Evaluation of Geno Type MTBDRplus Line Probe Assay for Early Detection of Drug Resistance in Tuberculous Meningitis Patients in India. *J Glob Infect Dis.* 2015 Jan-Mar; doi: 10.4103/0974-777X.150882 PMC
24. Hossain MM, Norazmi MN Pattern recognition receptors and cytokines in *Mycobacterium tuberculosis* infection--the double-edged sword? 2013;2013: 179174. doi: 10.1155/2013/179174. *Biomed Res Int* Pubmed 2013 Nov 12
25. Jonsson, B. E., M. Gilljam, A. Lindblad, M. Ridell, A. E. Wold & C. Welinder-Olsson, (2007) Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cysticfibrosis. *J ClinMicrobiol* 45: 1497-1504.
26. Kapata N, Mbulo G, Cobelens F, de Haas P, Schaap A, Mwamba P, Mwanza W, Muvwimi M, Muyoyeta M, Moyo M, Mulenga L, Grobusch MP, Godfrey-Faussett P, Ayles H The Second Zambian National Tuberculosis Drug Resistance survey - a comparison of conventional and molecular methods.. *Trop Med Int Health.* 2015 Jul 30. doi: 10.1111/tmi.12581. [Epub ahead of print] PMID:26224169
27. Kenneth Todar, PhD www.textbookofbacteriology.net
28. Kim, J. Y., M. J. Ferraro & J. A. Branda, (2009) False-negative Results with the Gen-Probe(R) AmplifiedTM *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test caused by Unrecognized Inhibition of the Amplification Reaction. *J ClinMicrobiol.*
29. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, Netea MG, Van Crevel R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol.* 2011;2011:405310. doi: 10.1155/2011/405310. Epub 2011 Apr 7. Review. PMID:21603213
30. Loiez-Durocher, C. Vachée, A., & Lemaitre, N. (2000, June). La résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux: méthodes diagnostiques. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 58, No. 3, pp. 291-7).

31. Lord Wasim Reza, SrinathSatyanarayna, Donald A. Enarson, Ajay M. V. Kumar, KarunaSagili LED-Fluorescence Microscopy for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis under Programmatic Conditions in India PLoS One. 2013; 8(10): e75566. Published online 2013 October 9. doi: 10.1371/journal.pone.0075566 PMCID: PMC3794029
32. Luis Eduardo Cuevas, Najla Al-Sonboli, Lovett Lawson, Mohammed Ahmed Yassin, Isabel ArbideLED Fluorescence Microscopy for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis: A Multi-Country Cross-Sectional Evaluation , PLoS Med. 2011 July; 8(7): e1001057. Published online 2011 July 12. doi: 10.1371/journal.pmed.1001057 PMCID: PMC3134458
33. Lukoye D, Ssengooba W, Musisi K, Kasule GW, Cobelens FG, Joloba M, Gomez GB. Variation and risk factors of drug resistant tuberculosis in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis.BMC Public Health. 2015 Mar 25;15(1):291. doi: 10.1186/s12889-015-1614-8. PMID: 25880829
34. Madhukar Pai , Claudia M. Denkinger , Sandra V. Kik ,Molebogeng X. Rangaka , Alice Zwerling Olivia Oxlade ,John Z. Metcalfe ,AdithyaCattamanchi ,David W. Dowdy KeertanDheda ,et NiazBanaei Gamma Interferon Release Assays for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Infection Clin MicrobiolRev 2014 Jan; 27 (1): 3-20. 10.1128 / CMR. 00034-13
35. Marie-Thérèse GiorgioDiagnostic d'une tuberculose-infection latente : détection de la production d'interféronhttp://www.atousante.com//diagnostic-tuberculose-infection-latente/ consulté 24Mars 2015 ;
36. Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, Sharp SE, Momeny MA, Babst A, Carlson JS, Kawamura M, Pandori M. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. J. Clin. Microbiol.49:1621–1623
37. Mase S.R., Ramsay A., Ng V., et al. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 485-495
38. Michael Felkel, Robert Exner, Regina Schleucher, HelgaLay, Ingo B. Autenrieth, Volkhard A. J. Kempf, and Julia-Stefanie Frick Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility in clinical specimens from Nigeria using genotype

MTBDRplus and MTBDRsl assays Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2013 Dec; 3(4): 252–257.

39. Miller MB¹, Popowitch EB, Backlund MG, Ager EP. Performance of Xpert MTB/RIF RUO assay and IS6110 real-time PCR for *Mycobacterium tuberculosis* detection in clinical samples J Clin Microbiol. 2011 Oct; 49 (10):3458-62. doi: 10.1128/ JCM. 05212-11.
40. Minion J., Zwerling A., Pai M. Diagnostics for tuberculosis: what new knowledge did we gain through *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* in 2008? *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 691-697
41. Molecular Detection of Mutations Associated with First- and Second-Line Drug Resistance Compared with Conventional Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* d 10.1128 / AAC.01550-10 PMCID: PMC3088277 *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 mai; 55 (5): 2032-2041.
42. Moran-Mendoza O, et al. *Tuberculin skin test size and risk of tuberculosis development: A large population-based study in contacts*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007 (11)
43. Natarajan K, Kundu M, Sharma P, Basu J. Innate immune responses to *M. tuberculosis* infection 10.1016/j.tube.2011.04.003. Epub 2011 May 7.
44. Pai M., Riley L.W., Colford J.M. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review *Lancet Infect Dis* 2004 ; 4 : 761-776 [inter-ref]
45. Patricia J. Campbell, Glenn P. Morlock, Peyron, P., J. Vaourgeix, Y. Poquet, F. Levillain, C. Botanch, F. Bardou, M. Daffe, J. F. Emile, B. Marchou, P. J. Cardona, C. de Chastellier & F. Altare, (2008) Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog* 4: e1000204 PMCID: PMC3838540 Published online 2013 Nov 21. doi: 10.1556/EuJMI.3.2013.4.3
46. Pym AS¹, Domenech P, Honoré N, Song J, Deretic V, Cole ST. Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by furA of *Mycobacterium tuberculosis*]MolMicrobiol. 2001 May;40(4):879-89
47. Raja A¹Immunology of tuberculosis Indian J Med Res. 2004 Oct;120(4):213-32.

NCBI Pubmed

48. Schreiber T, et al. Autocrine IL-10 induces hallmarks of alternative activation in macrophages and suppresses antituberculosis effector mechanisms without compromising T cell immunity. *J Immunol.* 2009;183(2):1301–1312
49. Raveendran R, Wattal C, Oberoi JK, Goel N, Datta S, Prasad KJ. Utility of GenoType MTBDR plus assay in rapid diagnosis of multidrug resistant tuberculosis at a tertiary care centre in India. *Indian J Med Microbiol.* 2012;30:58–63
50. Sirakova TD¹, Dubey VS, Cynamon MH, Kolattukudy PE Attenuation of *Mycobacterium tuberculosis* by disruption of a mas-like gene or a chalcone synthase-like gene, which causes deficiency in dimycocerosylphthiocerol synthesis *J Bacteriol.* 2003 May;185(10):2999-3008
51. Smith, N. H., Gordon, S. V., de la Rua-Domenech, R., Clifton-Hadley, R. S., & Hewinson, R. G. (2006). Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature Reviews Microbiology*, 4(9), 670-681.
52. Smith, N. H., R. G. Hewinson, K. Kremer, R. Brosch & S. V. Gordon, (2009) Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat RevMicrobiol*7: 537-544.
53. Thakur C, Kumar V Gupta AK Detecting mutation pattern of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Himachal Pradesh using GenoType® MTBDRplus assay Indian J Med Microbiol. 2015 Oct-Dec;33(4):547-53. doi: 10.4103/0255-0857.167336.
54. Theron G, Peter J, van Zyl-Smit R, Mishra H, Streicher E, Murray S, Dawson R, Whitelaw A, Hoelscher M, Sharma S, Pai M, Warren R, Dheda K. Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184:132–140
55. Tissot F¹, Zanetti G, Francioli P, Zellweger JP Influence of bacilleCalmette-Guérin vaccination on size of tuberculin skin test reaction: to what size? *ZyssetF Clin Infect Dis.* 2005 Jan 15 Pubmed
56. Tolani MP, D'souza DTB, Mistry NF. Drug resistance mutations and heteroresistance detected using the GenoTypeMTBDRplus assay and their implication for treatment outcomes inpatients from Mumbai, India. *BMC Infect Dis.* 2012;12:9.
57. Tuberculosis Clinical Diagnosis and Management of Tuberculosis, and Measures for Its Prevention and Control. *NICE Clinical Guidelines, No. 117* National Collaborating Centre for Chronic Conditions (UK); Centre for Clinical Practice at NICE (UK). 2011

Mar ISBN-13:978-1-84936-537-6//www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK97852/consulté
29 Mars 2015

58. Valérie Quesniaux Bernhard Ryffel Réponse adaptative à la tuberculose en l'absence de MyD88Fatal tuberculosis despite adaptive immune response in the absence of MyD88 médecine sciences Volume 21, numéro 4, avril 2005, p. 349-351
59. Vegard Eldholm*, Gunnstein Norheim, Bent von der Lippe, Wibeke Kinander, Ulf R Dahle, Dominique A Caugant, Turid Mannsåker, Anne Torunn Mengshoel, Anne Ma Dyrhol-Riise and Francois Balloux Evolution of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* from a susceptible ancestor in a single patient *Genome Biology* 2014, 15: 490 doi:10.1186/s13059-014-0490-3. <http://tuberculosis/by/publications/the-genome-of-mycobacterium-tuberculosis-and-resistance-mutations>
60. W H Haas, K Schilke, J Brand, B Amthor, K Weyer, P B Fourie, G Bretzel, V Sticht-Groh, and H J BremerMolecular analysis of katG gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Jul; 41(7): 1601–1603.PMCID: PMC163968
61. Yu-feng WEN, Chao JIANG , Xian-feng CHENG , Zhi-Ping ZHANG , Bai Feng Chen , and Yu ZHU. Predictive Power of ETRE Polymorphism and Katg 463 Mutation to INH-Resistance of *M.tuberculosis*. *Iran J Public Health*. 2015 Feb; 44(2):263-8 Pubmed
62. Zhang Y., Yew W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis**Int J Tuberc Lung Dis* 2009 ; 13:1320-1330
63. Zimhony O¹, Cox JS, Welch JT, Vilchèze C, Jacobs WR JrPyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. 2000 Sep;6(9):1043-7.Pubmed
64. Zink AR, Grabner W, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG. Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. *Epidemiol Infect*. 2003 Apr; 130(2):239-49. PMID:12729192

ANNEXES

Matériels

- Anse pour étalement
- Bec Bunsen
- blouse de laboratoire jetable, casquette infirmières, couvre-chaussures et des gants.
- Bocal contenant du sable de mer et de l'alcool à 70degré ou un récipient contenant du lysol
- Conteneurs déchets hospitaliers infectieux
- Crachoir
- Crayon
- embouts de pipettes stériles jetables avec filtre
- Gants
- Hotte d'extraction
- Lames de frottis
- Masques FFP2
- Micro tubes racks
- Microscope à Diode Electroluminescente (LED)
- papier absorbant
- Papier absorbant
- Papiers buvard
- pinces en plastique pour manipuler les bandelettes de test
- Pipettes 5, 20,200 et1000
- Plaque chauffante
- Portoir pour assécher les frottis.
- Pots de 5ml ou crachoirs
- Réfrigérateur pour les kits de génotype et la conservation de l'ADN amplifié (post PCR)
- Supports de pipettes
- Tubes coniques de 1,5ml pour contenir l'ADN
- Tubes coniques de 15ml pour la décontamination des crachats
- tubes Eppendorf de 1,5
- TwinCubator Lame

Réactifs :

- bleu de méthylène
- Conjugué (CON-C) concentré

- Eau distillée
- Mélange Amorces/Nucléotides
- rouge de thiazine
- solution Buffer neutralisante (A-NB)
- Solution d'auramine
- Solution d'alcool acide
- Solution de Dénaturation (DEN) prêt à l'emploi
- Solution de fuchsine phéniquée
- Solution de Lavage Stringent (STR)
- solution de lyse Buffer (A-LYS)
- Solution de Rinçage (RIN) prêt à l'emploi.
- Solution N-acétyl-L-cystéine
- Substrat (SUB-C) concentré.
- Tampon Conjugué (CON-D).
- tampon phosphate
- Tampon Substrat (SUB-D)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	2
Chapitre I : La tuberculose	2
I.1 Définition	2
I.2 Histoire de la tuberculose.....	2
II Epidémiologie de la TB :	3
II-1 Dans le monde :	3
II-2 La tuberculose en Afrique :.....	5
III Les Mycobactéries	5
III-1 Habitat	5
III-2 Taxonomie	6
III-3 Caractères généraux :.....	7
III-3-1 Morphologie:	7
III-3-2 Structure :	8
III-3-3 Caractères culturaux	9
III-3-4 Caractères biochimiques	10
III-3-5 Métabolisme	11
III-3-6 Caractères génétiques :	11
III.3.6.1 Le génome	11
III.3.6.2 La diversité génétique et la phylogénie de <i>M.tuberculosis</i> :	13
III-3-7 Pathogénicité	13
IV- Physiopathologie de l'infection tuberculeuse :	14
IV-1 Symptômes :	14
IV-2 Transmission :	15
V- Immuno-pathologie de la tuberculose	16
V-1 La tuberculose latente	16

V-2 La tuberculose active :	16
V-2-1 Réponse immunitaire innée	17
IV-2-2 Réponse immunitaire adaptative	19
VI Diagnostic	20
VI-1 Diagnostic immunologique	21
VI.1 .1 l'intradermoréaction (IDR)	21
VI.1.2 Les tests de détection de l'IFN γ	22
VI-2- Diagnostic bactériologique	23
VI-2-1 Examen microscopique	23
VI-2-2 Culture	25
VI-3 Diagnostic moléculaire	25
VI.3-1 L'amplification génique	25
VI-3-2 Les tests d'hybridation :	26
VII-Traitemen.....	27
VII-1-Les antituberculeux.....	28
VIII- La résistance aux antituberculeux:.....	29
VIII-1 Les données épidémiologiques de la résistance	29
VII-2-Pharmacorésistance	30
DEUXIÈME PARTIE : ETUDE DU PROFIL DE MUTATION ASSOCIÉE À LA RÉSISTANCE À LA RIFAMPICINE ET À L'ISONIAZIDE DES SOUCHES DE M.TUBERCULOSIS À HÔPITAL MILITAIRE DE OUAKAM.	34
I-Contexte	34
II Objectifs	34
II-1 Objectif général :	34
II-2 Objectifs spécifiques :	34
III Méthodologie :	35
III-1 Site et population d'étude.....	35
III-2 Matériels et Réactifs (en annexe) :	36

III-3- Prélèvement collecte et transport des échantillons.....	36
III-4- Techniques de décontamination et de coloration	37
III-4-1 Décontamination et concentration	37
III-5-2 Coloration	37
III-5-2-1 Coloration de ZIEHL-NEELSEN:.....	37
III- 5-2-2 Coloration à l'auramine	38
III-6- Test moléculaire de mise en évidence de la résistance à la Rifampicine et à l'Isoniaside	39
III-6-1 Extraction de l'ADN.....	40
III-6-2 Amplification de l'ADN.....	40
III-6-3- Hybridation :	41
III-6-3-1 Principe	41
III-6-3-2 Mode opératoire	42
IV- Résultats :	45
V- Discussion :	47
CONCLUSION.....	48
REFERENCES	49
ANNEXES.....	57