

Ministère de l'Enseignement

REPUBLIQUE DU MALI

Supérieur et de la Recherche

Un Peuple

Un But

Une Foi

Scientifique

UNIVERSITE DES SCIENCES TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES



FACULTÉ DE MEDECINE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

Année Universitaire 2012/2013

Thèse N°...../2013

TITRE

**LA FREQUENCE DE *Mycobacterium africanum* DANS LA
TUBERCULOSE PULMONAIRE AU MALI**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le / / 2013 devant la Faculté de
Médecine et d'Odonto-Stomatologie du Point G au Mali.

Par *M. TOGO Antiémé Combo Georges*

Pour l'obtention de grade de Docteur en Médecine (Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Pr. Soukalo DAO

Membre : Dr TRAORE Aissata CISSE

Codirecteur : Dr Bassirou DIARRA

Directeur : Pr Souleymane DIALLO

Les données de ce travail proviennent des protocoles de recherche USTTB – SEREFO - NIAID

DEDICACES

Je rends grâce au DIEU créateur du ciel et de la terre, à sa créature et serviteur Jésus christ et à l'esprit saint pour m'avoir donné cette vie, le courage et la mentalité nécessaire à la réalisation de ce travail. Nous implorons ta miséricorde pour les fautes que nous avons commises et que nous aurons à commettre de manière volontaire ou involontaire. Nous te prions de nous guider sur le bon chemin que tu as comblés de ta grâce, et de nous gratifier de ton paradis et guide mes pas tout au long de cette vie sainte trinité Amen !

A mon père : Anyèssini Patrice TOGO

Nous t'appelons affectueusement Bouèssè

Dès notre plus jeune âge, tu nous as inculqué l'amour de la religion, le courage dans tout ce que nous entreprenons.

Que de sacrifices n'as tu pas consentis pour faire de tes enfants, des modèles.

Merci pour la confiance que tu me portes, je t'en serais toujours reconnaissant et je défendrais avec honneur les valeurs que tu nous as épousées.

Et trouves en cette occasion toute ma reconnaissance, mon dévouement et ma profonde affection.

Que dieu, le tout puissant te bénisse et te garde encore longtemps auprès de nous, et qu'Il te réserve Son paradis auprès de lui.

A ma mère : Kadidia TOLOFOUDIE

Si l'on avait le pouvoir de choisir une mère, je n'aurai pas hésité une seconde à te choisir. Tu es l'exemple de ma vie, la lumière qui a guidé mes pas et qui continuera à me guider toujours. Je n'aurai jamais assez de tes conseils et de ta tendresse. Que Dieu te prête une longue vie pour que tu te rendes compte à quel point tu es ma référence et pour que tu sois encore très fière de moi. Que la miséricorde DIEU te bénisse et te récompense Amen !

A mes frères et sœurs :

Erèssini Denis TOGO, Sèessin Abel Abdoulaye TOGO, Amadou TOGO, Oumarou TOGO, Rose TOGO, Assa TOGO,

Je n'exprimerai jamais assez tout l'amour que je ressens pour vous. Vous êtes et vous serez toujours mes premiers compagnons pour la vie, je vous souhaite beaucoup de courage et de chance dans la vie pour qu'ensemble nous puissions adoucir et remplir de bonheur a nos parents.

Merci ne suffira pas pour la reconnaissance que je vous dois.

Cette thèse est la votre, et je prie le TOUT PUISSANT de maintenir la fraternité qui nous lie, de réaliser nos rêves, et de nous gratifier de son paradis.

A tous mes cousins et cousine :

Voyez en ce travail toute ma sympathie.

A tous mes oncles et tantes paternels et maternels :

Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

A mes grands parents : Merci pour vos bénédictions

A ma tante chérie (Sarah TOGO)

Gentille et vertueuse, tu m'as entouré d'une attention et d'une affection jamais égalées trouve à travers ce modeste travail le témoignage de ma profonde gratitude. Que DIEU te donne longue vie.

REMERCIEMENTS

Paul SANGALA et famille,

Vous avez été une famille d'accueil pour moi où je n'ai manqué de rien. Vous m'avez adopté comme votre propre enfant. Je ne saurai vous remercier pour tous les bienfaits que vous m'avez procurés ; que Dieu vous le rende au centuple et qu'il vous gratifie de son paradis.

Antandou Moïse ARAMA et famille,

Retrouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance.

A mes camarades : Moussa ARAMA, Abdoulaye SANGALA et Justin DIARRA, Jonase DEMBELE

Merci pour les bons moments passés ensemble, que DIEU nous laisse unis à jamais.

Simon LOUGUE et Famille à Sévaré : *Vous avez été un Papa exemplaire soyez-en remercié.*

A mes camarade thésard : Mahamadou BALLO et Moussa DIAWARA

Soyez rassuré de ma reconnaissance.

Au Dr Bassirou DIARRA

Le plaisir et la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de nous aider, nous a profondément marqué.

Votre disponibilité, votre amour du travail bien fait, la rigueur de votre raisonnement scientifique ont été pour nous hautement profitables.

Au Dr Moumine SANOGO,

Vous avez été plus qu'un maître, vous avez été un ami ; votre amour pour le travail bien fait, votre humanisme, votre modestie et votre disponibilité nous ont profondément marqué. Courageux, infatigable, respectueux, nous avons admiré votre simplicité et votre attachement à notre formation. Votre courtoisie, votre simplicité et l'ambiance cordiale dans laquelle nous avons travaillé constituent sans doute une infime partie de vos nombreuses qualités. Merci pour tout.

Au Dr Anou Moïse SOMBORO

Merci de m'avoir encadré et pour tes bon conseils que tu n'as cessé de me prodiguer que le paradis soit notre future résidence

Mariam Hamidou DIALLO

Vous êtes l'exemple vivant de l'amour, de la tendresse, de la tolérance, de la bonté. Vous êtes ma référence et mon conseiller. Soyez rassuré de ma reconnaissance à toute ta famille.

Au Dr Sarro et son équipe

Pour l'esprits de sociabilité. Votre abord facile, votre très grand humanisme font de vous un exemple digne d'inspiration pour tous.

Je voudrais vous témoigner mes sincères reconnaissances et remerciements pour l'enseignement reçu et pour vos encouragements.

Au Dr Almoustapha et son équipe

Merci pour les efforts consentis pour la réalisation de ce travail. Que le seigneur vous paye au centuple.

Au Dr Baya et son équipe

Merci de m'avoir encadré durant mon séjour au SEREFO et pour tes bons conseils que tu n'as cessé de me prodiguer.

Que le miséricorde DIEU te maintient très longtemps en bonne santé.

Au Dr Aboubacar Alassane Oumar

Pour l'esprits de sociabilité, votre humanisme font de vous un exemple digne d'inspiration pour tous, soyez rassuré de ma reconnaissance.

Que le miséricorde vous donne longue vie.

Au Dr Dian DIALLO

Votre très grand humanisme fait de vous un exemple digne d'inspiration pour tous. Merci pour tes biens faits.

Au Dr Chamieĺ DEMBELE

Merci pour tout

A mon ami de tous les jours : Anyès dit Jules SANGALA

Retrouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance que DIEU nous laisse unis à jamais jusqu'à la fin des temps.

A ma chérie Jeanne Marie Alexandrine ARAMA

Mais je prie DIEU de nous accordé sa Grace dans notre Union, ainsi que dans notre progéniture qu'il nous fera don, et qu'il fasse que nous nous aimions, supportions dans les moments heureux comme difficiles.

Je suis pas facile a vivre, alors je te prie de m'excuser pour tous les efforts que tu consentiras pour me supporter.

A mes petit Papa et petite tante : Gaston, Benjamin, Anne Marie, Isabelle, Eveline.

Merci pour tout l'amour, l'attention, l'affection et le soutient que vous m'accordez.

Sans oublier Toumata je vous remercie pour tes biens faits.

Vous avez été d'un soutien dans la réalisation de ce travail, que votre récompense soit une vie pleine de bonheur.

A Mgr Georges FONGHORO : Merci pour tout

Au membre du groupe V : Merci pour votre soutient

A mes Maîtres du primaire : Ecole Primaire de sequé ; mes Professeurs du Lycée hamadoun dicko de sévaré, mes Maîtres de la Faculté de Médecine, et d'Odontostomatologie.

Merci pour le savoir que vous avez bien voulu me léguer. Je vous en serai gré durant toute mon existence, et que vous en soyez rétribués par la miséricorde DIEU.

A mes collègues et cadets académique « TOMON » : Elè Marcel Adjango, Moïse SANGALA, Jean-Paul SOMBORO, Salif SANAFI, Moïse ARAMA, Seydou ARAMA, Hamadi ARAMA, Blaise DJOUNDO, Benoît TOLOFOUDIE, Amadou SOMBORO, Dieudonné SOMBORO, Mamadou TOLOFOUDIE, Aboubacar André Pascal SOMBORO, Omar TESSOUGUE, Yaya TOGO, Irène ARAMA, TESSOUGUE, Clair SOMBORO

A la Jeunesse Ginna Dogon de la FMPOS,

A la communauté catholique du Point G,

A tous les membres de l'association des jeunes Tomon (YUGO WèLè),

A tous les membres de l'association des étudiants ressortissant de la région de Mopti et sympathisants (AERMOS),

A Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail. Merci pour le soutien, l'aide précieuse inestimable et désintéressée apportée tout le long de l'élaboration de ce travail. « Rien n'a plus de valeur sur terre qu'un cœur pur généreux.

Et c'est parmi les gens les plus simples que se cachent les plus grands trésors d'amour et de bonté ».

Aux patients,

*Sans votre consentement ce travail n'aurait pu être effectué.
Recevez toute ma gratitude.*

*Remerciements spécial: Au Directeur de SEREFO
professeur Ousmane KOITA*

Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez accordée en nous acceptant avec gentillesse dans votre service et guider nos premiers pas dans la recherche.

*Merci pour tout ; succès aux différentes études menées ;
courage et abnégation aux thésards.*

Veillez accepter, cher Maître, le témoignage de notre sincère et profonde gratitude et l'assurance de notre indéfectible attachement

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre maître et président de jury

PROFESSEUR SOUNKALO DAO

- **Professeur titulaire de maladies infectieuses et tropicales,**
- **Chef de DER de Médecine et Spécialités Médicales à la FMOS,**
- **Coordinateur du CES de maladies infectieuses et tropicales**
- **Chef du service des Maladies infectieuses et tropicales du C.H.U du Point G,**
- **Senior Investigateur clinique à SEREFO,**
- **Président de la Société Malienne de pathologies infectieuses et tropicales (SOMAPIT),**
- **Membre de la société Africaine de maladies infectieuses et tropicales, et de la Société de pathologies infectieuses de langue française.**

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en président ce jury. Votre humanité, votre écoute et votre gentillesse ont accompagné nos premiers pas à SEREFO.

Nous vous remercions de la confiance que vous nous avez accordée en jugeant ce travail. Vous avez su nous orienter durant notre formation. Votre rigueur scientifique fait de vous un encadreur admiré par les étudiants.

Grande est notre fierté de compter parmi vos élèves.

Puisse Allah le Tout Miséricordieux vous rendre vos bienfaits et nous permettre de suivre vos pas.

A notre maître et juge

DOCTEUR TRAORE AISSATA CISSE

- **Pharmacienne,**
- **Titulaire d'un Master 2 en Immunologie médicale à l'Université de Paris XI Kremlin-Bicêtre,**
- **Titulaire d'un Diplôme Universitaire de virologie médicale à l'Université de Paris VII René DIDEROT,**
- **Responsable de la culture des mycobactéries et du test de résistance aux antituberculeux au laboratoire national de référence de la TB (LNR), service de bactériologie à l'INRSP**

Cher Maître

Nous sommes très heureux de votre présence dans ce jury.

Vous avez accepté de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Votre abord facile et votre objectivité ont largement contribué à renforcer la qualité de ce travail. Ce qui nous permet d'apprécier la grandeur de votre personnalité.

Permettez nous cher maître de vous exprimer nos sincères remerciements et nos sentiments respectueux.

A notre maître et co-directeur de thèse

DOCTEUR BASSIROU DIARRA

- **Médecin,**
- **Titulaire d'un Master Sciences en Médecine Tropicale à l'Université de Nagasaki au Japon,**
- **Senior Chercheur et responsable du laboratoire P3 de Tuberculose à SEREFO**

Cher Maître

Vous nous faites un honneur en acceptant d'être co-directeur de cette thèse.

C'est le lieu pour nous de vous témoigner, toute notre reconnaissance et notre profond respect.

Nous avons été fascinés par votre capacité, et vos immenses qualités d'homme de science. Auprès de vous, nous avons appris la modestie, la patience, et l'amour de la recherche. Votre contact facile et votre sympathie nous ont beaucoup marqués.

Cher Maître, nous sommes fiers de faire partie de vos élèves.

A notre maître et directeur de thèse

PROFESSEUR SOULEYMANE DIALLO

- **Professeur Titulaire de Pneumologie à la FMPOS**
- **Président de la Société Malienne de Pneumologie (SOMAP)**
- **Président de l'Association pour la formation continue en Allergologie (ANAFORCAL).**
- **Colonel major de l'armée Malienne.**
- **Chef du service de Pneumologie du C.H.U du point-G**
- **Senior Investigateur clinique à SEREFO,**

Cher Maître

Plus qu'initiateur de ce travail vous avez été pour nous un guide permanent ; tant par vos encouragements, vos suggestions et votre disponibilité durant la réalisation de ce travail. Humble et Modeste, Homme de science et clinicien apprécié par ses pairs, vous êtes pour nous un modèle de rigueur, de sérieux et d'intégrité.

Votre écoute et votre gentillesse ont accompagné nos premiers pas à SEREFO. Recevez toute notre gratitude pour l'intérêt que vous avez su porter à ce travail. Soyez-en remercié.

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Prévalence de <i>M. africanum</i> dans les pays ouest-africains-----	10
<u>Figure 2</u> : Incidence de la tuberculose dans le monde en 2011-----	11
<u>Figure 3</u> : Aspect des BAAR de <i>M. tuberculosis</i> en corde au microscope après la coloration de Ziehl-Nelseen-----	20
<u>Figure 4</u> : Aspects des BAAR de <i>M. avium</i> après la coloration de Ziehl Nelseen-----	24
<u>Figure 5</u> : Aspects des BAAR de <i>M. kansasii</i> après coloration de Ziehl Nelseen-----	25
<u>Figure 6</u> : Colonies de <i>Mycobacterium gordonae</i> sur milieu de Lowenstein Jensen-----	26
<u>Figure 7</u> : Aspects des BAAR de <i>M.fortuitum</i> après coloration de Ziehl Neelsen et Colonies de <i>M.fortuitum</i> sur milieu-----	27
<u>Figure 8</u> : Illustration de la transmission de la tuberculose par les gouttelettes de Pflugge-----	28
<u>Figure 9</u> : Milieux de cultures utilisés au laboratoire de tuberculose de SEREFO-----	39
<u>Figure 10</u> : Répartition des patients en fonction de l'âge-----	68
<u>Figure 11</u> : Répartition des patients en fonction du sexe et statut VIH-----	69
<u>Figure 12</u> : Répartition des malades en fonction de type de patient tuberculeux-----	72
<u>Figure 13</u> : Répartition des patients en fonction des différentes souches de mycobactéries retrouvées-----	73
<u>Figure 14</u> : Répartition des patients en fonction des sous type de <i>M. africanum</i> -----	74

Figure 15 : Répartition des patients en fonction de la souche de mycobactérie et du statut VIH-----75

Figure 16 : Répartition des patients en fonction du sexe, de la souche de *Mycobacterium africanum* et du statut VIH-----76

Figure 17 : Répartition des patients en fonction des résultats des tests de sensibilité et de la souche de *M. africanum*-----77

Figure 18 : Répartition des patients en fonction des résultats des tests de sensibilité et de la souche de *Mycobactérium tuberculosis*-----78

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : Notion des résultats de l'examen direct d'expectoration -----	35
<u>Tableau II</u> : Résultats et interprétation de l'IDR-----	41
<u>Tableau III</u> : Listes des médicaments antituberculeux dits essentiels, leurs posologies et les fréquences de prise-----	46
<u>Tableau IV</u> : Effets indésirables mineurs des médicaments antituberculeux ----	47
<u>Tableau V</u> : Effets indésirables majeurs des médicaments antituberculeux et leurs prise en charge-----	48
<u>Tableau VI</u> : Les médicaments antituberculeux de seconde ligne utilisée au Mali depuis 2009-----	52
<u>Tableau VII</u> : Les catégories de traitement et les régimes de chimiothérapie correspondant-----	53
<u>Tableau VIII</u> : Le régime standardisé de seconde ligne-----	55
<u>Tableau IX</u> : Enregistrement des résultats normalisé du traitement des cas de tuberculose à frottis positive-----	57
<u>Tableau X</u> : Répartition des patients en fonction de la profession-----	70
<u>Tableau XI</u> : Répartition des patients en fonction de la provenance-----	71

SIGLES ET ABBREVIATIONS

BAAR :	Bacille Acido-Alcool-Résistant
BCG :	Bacille de Calmette et Guérin
BK :	Bacille de Koch
MTB :	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MAF :	<i>Mycobacterium africanum</i>
MAC :	<i>Mycobacterium avium</i> complexe
TB :	Tuberculose
TEP :	Tuberculose extrapulmonaire
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
UV :	Ultra violet
CO2 :	Gaz carbonique
IDR :	Intradermo réaction
S :	Streptomycine
H :	Isoniazide
R :	Rifampicine
E :	Ethambutol
Z :	Pyrazinamide
SIDA :	Syndrome de l'immunodéficience acquise
LCR :	Liquide céphalo rachidien
OMS :	Organisation mondiale de la santé
PNLT :	Programme National de lutte contre la tuberculose
Mg :	Milligramme

TCH :	Hydrazide de l'acide thiophène carboxylique
TB-MR :	Tuberculose multi résistant
PED :	Pays en voie de développement
Kg :	kilogramme
INNTI : inverse	Inhibiteur non nucléotidique de la transcriptase
AZT :	Zidovudine
3TC :	Lamivudine
FTC :	Entricitabine
EFV :	Efavirenz
ARV :	Antirétroviral
SEREF0 :	Centre de recherche et de formation
CS.Réf:	Centre de santé de référence
BSL-3:	Laboratoires biosécurité niveau 3
AST:	Test de sensibilité aux antituberculeux
SIRE:	Streptomycine, Isoniazide, Rifampicine, Ethambutol
MGIT:	<i>Mycobacterium</i> Groth Indicator Tube
PCR :	Polymérase chaine et réaction

SOMMAIRE

INTRODUCTION-----	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE-----	5
I-Généralités-----	6
1-Définition-----	6
2-Historique de la tuberculose, des mycobactéries et des médicaments antituberculeux-----	6
3-Epidémiologie-----	11
3-1.Epidémiologie Globale-----	11
3-2.Co-infection tuberculose / VIH-----	13
3-3.La tuberculose multirésistantes (TB-MR) -----	14
3-4.La tuberculose ultrarésistante (TB-UR) -----	14
4-Physiopathologie-----	15
5-Agents pathogènes-----	18
5-1.Mycobactérie du complexe tuberculosis-----	18
5-2.Les mycobactéries atypiques ou Non tuberculosis-----	23
6-Mode de transmission-----	27
7-Clinique-----	29
7-1.Primo-infection -----	29
7-2.La tuberculose pulmonaire commune-----	30
7-3.Tuberculose extra-pulmonaire-----	31
7-4.Tuberculose et immunodépression-----	32
8-Diagnostic-----	32
8-1.Diagnostic bactériologique-----	32
8-2.Diagnostic radiologique-----	40
8-3.Le test tuberculinique-----	41

8-4. Autre examens complémentaires-----	41
9-Traitement-----	42
9-1. Traitement préventif-----	42
9-2. Médicaments antituberculeux-----	45
9-2-1. Les régimes standardisés de chimiothérapie et leurs indications-----	49
9-2-2. Place des traitements adjuvants-----	55
9-2-3. Traitement antituberculeux chez les patients infectés par le VIH-----	58

CHAPITRE II : TRAVAIL EXPERIMENTAL-----	59
I-METHODOLOGIE-----	60
1-Type, Cadre et lieu d'étude-----	60
2-Echantillonnage-----	62
3-Matériels et Méthodes-----	63
3-1.Matériels-----	63
3-2.Méthodes de laboratoire-----	63
A-Dépistage du VIH-----	64
B-Diagnostic de la tuberculose-----	64
B-1.Culture et identification des mycobactéries-----	64
B-2.Test de sensibilité des médicaments antituberculeux de première ligne----	65
B-3.Spoligotypage-----	65
4-Traitement et Analyse des Données-----	66
5-Considération Ethique et Morale-----	66
II-RESULTATS-----	68
1-Résultats Globaux-----	68
1-1.Les caractéristiques socio-démographiques-----	68
1-1-1.Age-----	68
1-1-2.Rélation sexe et statut VIH-----	69
1-1-3.La profession-----	70
1-1-4.Résidence/ Provenance-----	71
2-Résultats de la culture, identification et tests de sensibilité des mycobactéries-- -----	72
2-1.Catégorie des malades-----	72
2-2.Prévalence globale des différentes souches de mycobactéries isolées----	73
2-3.Prévalence des sous types de <i>M.africanum</i> -----	74
3-Rélation <i>M.africanum</i> et l'infection par le VIH-----	75

4-Rélation <i>M.africanum</i> , sexe et l'infection par le VIH-----	76
5-Rélation <i>M.africanum</i> et la TB-MR-----	77
6-Rélation <i>M.tuberculosis</i> et TB-MR-----	78
III-COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS-----	79
1- Limite et Difficultés de l'étude -----	79
2-Individuellement-----	81
IV-CONCLUSION ET RECOMMANDATION-----	82
1-Conclusion -----	83
2- Recommandation-----	84
V-REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUEN-----	85

INTRODUCTION

Considérée comme une pathologie du passé, la tuberculose (TB) demeure un problème de santé publique à cause de la propagation du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et de l'apparition de souches de *Mycobacterium* du complexe tuberculosis (MTBc) résistantes au traitement.

C'est une maladie infectieuse et contagieuse causée par les mycobactéries du complexe tuberculosis posant un problème de prévention et de dépistage dans l'entourage des sujets atteints.

En 2011, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la prévalence et l'incidence de la tuberculose au Mali ont été respectivement de 90 et 63 pour 100 000 habitants [1].

Les mycobactéries du complexe tuberculosis sont composées de sept sous espèces qui sont :

Mycobacterium tuberculosis ; *Mycobacterium bovis* ; *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*; *Mycobacterium canettii* ; *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii* et la nouvelle souche découverte *Mycobacterium mungi* [2].

Toutes ces mycobactéries sont capables de causer la tuberculose maladie mais à des degrés et des régions diverses.

Le moyen de diagnostic le plus utilisé dans nos pays reste la microscopie par la présence de Bacilles Acido-Alcool Résistants (B.A.A.R.) [1].

Cette technique est peu sensible et ne permet pas de faire la distinction entre les éléments du complexe tuberculosis.

La culture et les techniques moléculaires comme le Spoligotypage ont permis d'identifier et de classer les sous espèces de mycobactéries.

Depuis sa découverte en 1968 par le Dr Castets et son équipe, *Mycobacterium africanum* (MAF) est reconnue comme une cause importante de tuberculose humaine en Afrique de l'Ouest [3].

Sa prévalence atteint jusqu'à 40% dans cette partie du monde [4].

Les études récentes ont montré que malgré une prévalence variable dans les pays de l'Afrique de l'Ouest, MAF est plus rencontré chez les personnes co-infectées par le VIH et donnerait peu de résistance ou d'échec thérapeutique aux antibiotiques [5,6].

C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier cette mycobactérie au Mali dans le but de déterminer les caractéristiques de l'infection à MAF chez les patients tuberculeux au Mali.

Pour faire cette étude, nous nous sommes fixés les objectifs suivants.

Objectif général

- Etudier la tuberculose à *Mycobacterium africanum* au Mali de Janvier 2006 à Décembre 2012

Objectifs spécifiques

- Estimer la prévalence de *Mycobacterium africanum* dans les infections tuberculeuses au Mali
- Décrire les caractéristiques socio-démographiques des patients infectés par *Mycobacterium africanum*
- Décrire les aspects clinico-biologiques des patients infectés par *Mycobacterium africanum*
- Déterminer la sensibilité aux médicaments antituberculeux des souches de *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium africanum*.

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.GENERALITES

1-Définition :

La tuberculose est une maladie contagieuse résultant des effets pathogènes sur l'organisme d'un bacille tuberculeux qui appartient au genre *Mycobacterium tuberculosis* (bacille de KOCH), beaucoup plus rarement que *Mycobacterium bovis* ou *Mycobacterium africanum*.

La variété la plus répandue est le bacille de type humain: *Mycobacterium tuberculosis*. Dans les régions d'élevage, les bovidés peuvent être infectés par une autre variété *Mycobacterium bovis* transmissible à l'homme.

En Afrique on a identifié chez l'homme un bacille de type intermédiaire *Mycobacterium africanum* dont la pathogénicité est la même que celle de *Mycobacterium tuberculosis* [7, 8,9].

2- Historique de la tuberculose, des mycobactéries et des médicaments antituberculeux

La tuberculose (humaine) est une maladie connue depuis la haute antiquité et certains ont même pensé retrouver sa trace jusque dans la littérature antique de l'Inde et de la Chine.

Les Grecs l'appelaient « phtisie » c'est à dire consommation, la comparant à un feu intérieur qui brûlait les viscères et ses lésions ont été diagnostiquées sur des momies égyptiennes.

L'infection tuberculeuse était pour les hébreux un des châtements divins. Hippocrate (5ème-4ème siècle) Galien (2ème siècle) tentaient déjà de donner une explication à cette maladie mais qui était le plus souvent confondue avec bien d'autres affections pulmonaires. Il faut attendre les 18ème et 19ème siècles pour une meilleure compréhension de cette maladie.

Jusqu'au 18ème siècle, toutes les maladies pulmonaires étaient plus ou moins confondues. Grâce à l'intervention de Laennec dans les années 1820, la phtisie sera identifiée comme une maladie spécifique.

Dès 1865 J A. VILLEMIN a soupçonné le caractère microbien de la TB.

En 1873, HANSEN découvre que la lèpre est causée par un fin bacille (Hansen, 1874), qui a beaucoup de ressemblances avec celui qui sera découvert 9 ans plus tard par R. KOCH.

Dès la fin des années 1880, Nocard et Roux montrent que l'addition de la glycérine stimule la croissance du bacille.

R. KOCH découvre le bacille de la tuberculose humaine en 1882 : *Mycobacterium tuberculosis* et réussit sa culture sur sérum de bœuf coagulé en 1884.

Il mit au point le test à la tuberculine. DORSET met au point un milieu de culture à l'œuf.

En 1885 ZIEHL et NEELSEN mirent au point une méthode de coloration spécifique aux mycobactéries basées sur l'acido-alcool résistance. Cette méthode de coloration est aujourd'hui utilisée dans les laboratoires d'analyse médicale pour le diagnostic bactériologique de la tuberculose.

Les travaux de Rivolta en 1889, puis de Maffucci en 1890 conduisent à différencier le bacille aviaire du bacille humain.

En 1895 de nombreuses mycobactéries furent découvertes.

En 1909 la tuberculine fut utilisée par C. MANTOUX (1879-1947). A.CALMETTE (1863-1933) médecin et C.GUERIN (1872-1961), vétérinaire n'avaient constaté que l'ensemencement d'une souche virulente de *Mycobactérium bovis* sur un milieu fait de pomme de terre, bile de bœuf et de glycérine n'altérait en dehors de son pouvoir pathogène aucun des caractères principaux du bacille, notamment pas celui d'induire une allergie.

Des ensemencements répétés 230 fois entre 1906 et 1921 ont rendu la souche inoffensive. Dès 1921 la vaccination par le BCG (Bacille de Calmette et Guérin) est utilisée chez l'homme

En 1944, S. A WAKSMAN avait découvert le premier antibiotique actif contre le bacille tuberculeux: la streptomycine.

La chimiothérapie antituberculeuse fut apparue à la fin de la deuxième guerre mondiale. En effet jusqu'aux années 1950, les traitements antituberculeux furent lourds et très souvent inefficaces.

D'autres médicaments ont été découverts dans les années qui ont suivies :

- ✓ En 1951 Ethambutol
- ✓ En 1952 Isoniazide et Pyrazinamide
- ✓ En 1956 Ethionamide
- ✓ En 1969 Rifampicine
- ✓ En 1953, d'autres mycobactéries acido-alcool-résistantes, les bacilles «para tuberculeux» ont été mis en évidence dans les milieux les plus divers (eau, terre, fumier, beurre).

Pollak et Buhler confirment le pouvoir pathogène occasionnel de certaines espèces de mycobactéries et isolent *Mycobacterium kansasii* sur des cadavres humains, ce qui relance les recherches sur les mycobactéries atypiques responsables de diverses mycobactérioses humaines et animales [10].

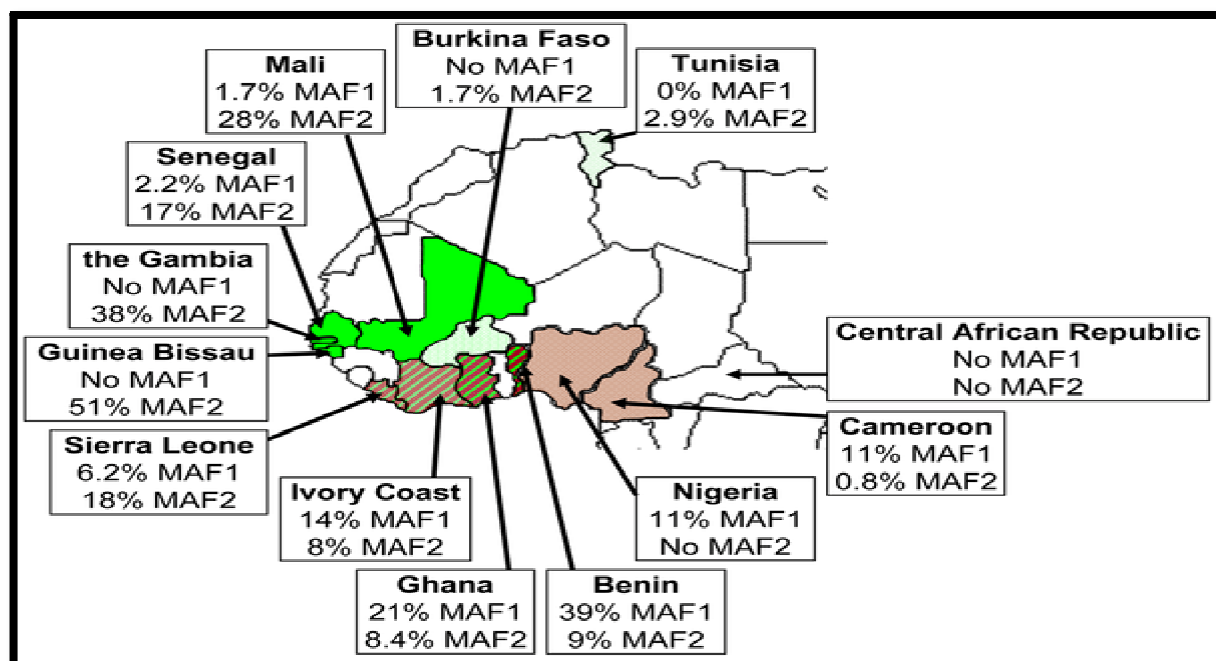
En 1968, Castets, Boisvert, Grumbach, Brunel et Rist décrivent une variété africaine du bacille tuberculeux, qui a été rapidement relevée au titre d'espèce et appelée «*Mycobacterium africanum*» (Castets et al, 1968).

En raison de leur origine géographique, ces souches ont été appelées *Mycobacterium africanum* par la suite deux sous types ont été identifiés.

Le sous-type I avec les caractéristiques culturales et biochimiques proches de *M. bovis*, est surtout isolé en Afrique de l'Ouest et précisément dans le Golfe de Guinée, où il serait responsable de la moitié de la tuberculose pulmonaire humaine [11-12]. Il a été d'abord décrit comme une sous espèce distinguée au sein du *M. tuberculosis* complexe en 1968 [13]. Les tests biochimiques ont mis en évidence l'aspect intermédiaire de MAF entre *M.tuberculosis* et *M.bovis*.

Elle donne des résultats variables sur les caractéristiques biochimiques, c'est ce qui complique la classification appropriée de la sous espèce. Cependant, la dite classification a été révisée depuis l'avènement des techniques moléculaires [14]. Le sous-type II semblable au *M. tuberculosis* est localisé en Afrique de l'Est. MAF représente 20 à 40% des souches tuberculeuses isolées au Sénégal [14]. Meissener a décrit des isolats similaires au Ghana en 1969 [15]. MAF pousse plus lentement que *M.tuberculosis* sur milieu de Lowenstein-Jensen (LJ), 6-10 semaines environ contre 3-4 semaines pour *M.tuberculosis* [16,17]. En utilisant la morphologie des colonies et des résultats biochimiques, une distinction a été faite entre la variété de Dakar et celle de Yaoundé [18,19]. Des études menées au Sénégal dans les années 1970 ont montré que la prévalence de MAF varie selon les régions et en moyenne 19,2% chez les patients à frottis positif de tuberculose pulmonaire. La figure 1 illustre la prévalence de MAF en Afrique.

Figure 1 : Prévalence de *M. africanum* dans les pays ouest-africains.



Source: de Jong BC, Antonio M, Gagneux S (2010) *Mycobacterium africanum*: Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. PLoS Negl Trop Dis 4(9).

M.tuberculosis et MAF sont des souches sensibles à la pyrazinamide [4]. L'ensemble des espèces constitutives de *Mycobacterium tuberculosis* complexe sont très proche génétiquement. Les techniques d'hybridations de l'ADN et le séquençage automatique des gènes ADNr 16s et hsp 65 ne permettent pas de les différencier. Une séquence d'insertion IS 6110 spécifique des bacilles tuberculeux a été découverte [20,21, 22].

Le nombre de copie varie selon les souches et l'espèce de mycobactérie. Ces copies sont intégrées de façon stable à l'intérieur du génome de chaque souche. L'utilisation de la technique RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) avec une sonde spécifique d'IS 6110 a permis l'obtention du profil épidémiologique des bacilles tuberculeux depuis de nombreuses années [23].

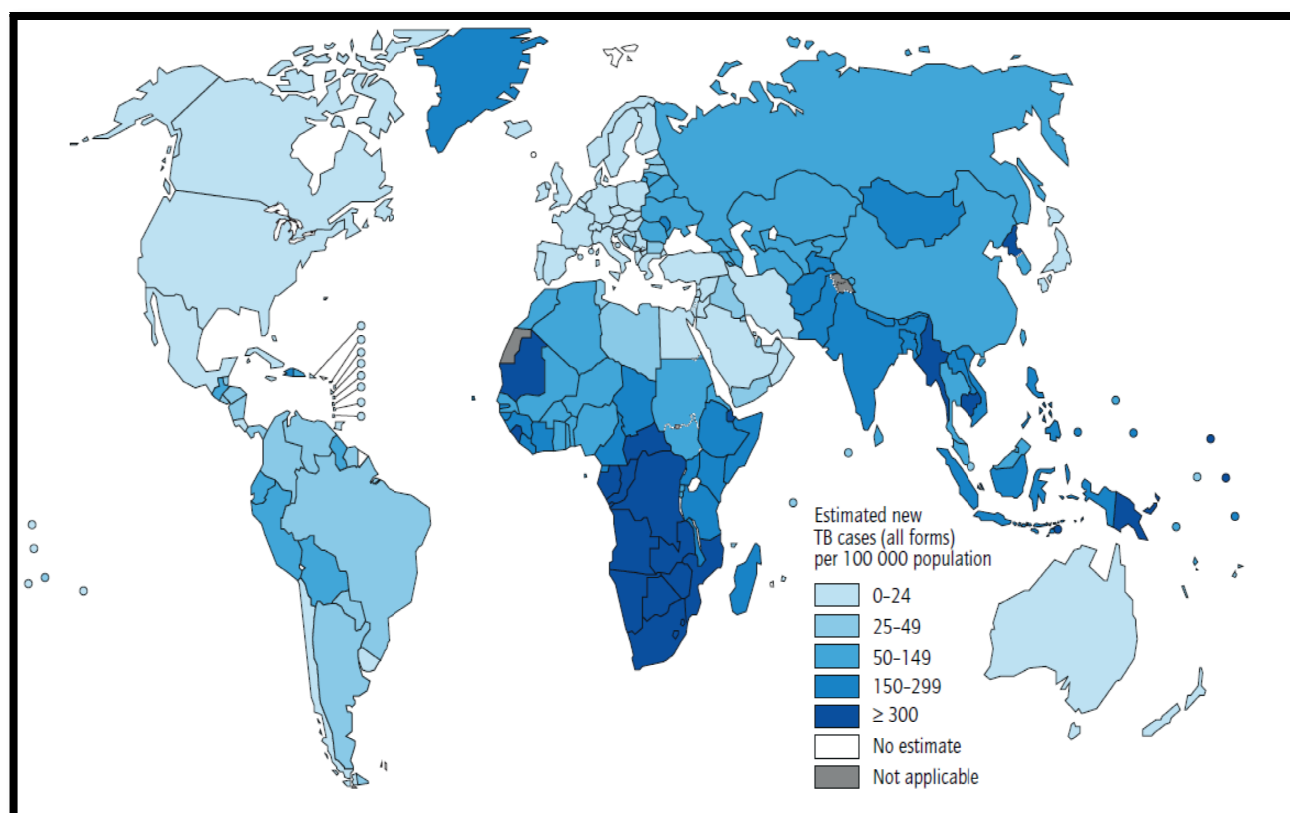
Des marqueurs génétiques ont été évalués pour caractériser certaines espèces dont l'étude de polymorphisme du gène gyrB. Le Spoligotyping a permis d'obtenir des profils épidémiologiques caractéristiques à l'intérieur de *M. tuberculosis* complexe de grouper des souches [24, 25].

La disponibilité d'un traitement efficace a eu cependant un impact très favorable sur l'évolution de la tuberculose, cette diminution régulière s'est ralentie vers 1986 à cause de la pandémie de l'infection à VIH. Pourtant, sa régression avait commencé avant la découverte des antibiotiques suite à l'amélioration des conditions de vie des populations dans les pays occidentaux. Ce fait illustre bien le caractère social de cette maladie dont l'apparition et l'évolution paraissent liées à la pauvreté [26]

3-Epidémiologie

3-1.Epidémiologie Globale

Figure 2 : Incidence de la tuberculose dans le monde en 2011



Source: Global Tuberculosis Report of WHO 2012

La tuberculose est un problème mondial de santé publique en constante progression. D'ailleurs, l'OMS considère la tuberculose comme l'épidémie mondiale la plus dangereuse, et comme une urgence sanitaire au niveau planétaire [27]. La tuberculose pulmonaire est presque toujours due à *Mycobacterium tuberculosis* (BK). La contamination est interhumaine par voie aérienne à partir de gouttelettes de sécrétions respiratoires aérosolées (gouttelette de pflugge).

En absence de traitement, une personne atteinte de tuberculose évolutive peut en infecter en moyenne 10 à 15 autres en espace d'une année. Il y a 22 pays qui comptent près de 80 % des cas de tuberculose du monde et dans lesquels la lutte contre la tuberculose a reçu une attention particulière depuis l'an 2000.

L'épidémie du SIDA et l'émergence de bacilles multi-résistants aux antibiotiques contribuent à aggraver l'impact de la tuberculose.

L'OMS estime qu'entre 2000 et 2020, près d'un milliard de personnes seront nouvellement infectées et que 200 millions d'entre elles développeront la maladie, dont 35 millions mourront de tuberculose si aucune amélioration n'est apportée dans le contrôle de cette infection [28]. A partir des années 1952, avec l'apparition d'une chimiothérapie efficace, le déclin de la tuberculose était envisageable. Dans les pays industrialisés, le risque d'infection déclinait de 10 à 15% et le seuil d'éradication de la maladie était fixé à 2015-2030.

Par contre dans les pays en voie de développement, le taux de déclin était estimé à 5 à 10% en Amérique latine, dans les Caraïbes et en Afrique du nord. Ce taux diminue et était au maximum de 3% en Afrique sub-saharienne et en Asie du sud-est, du même ordre que le taux de croissance démographique.

En 2012 le nombre de nouveau cas dans le monde était d'environ 9 millions dont moins de la moitié est officiellement déclarée avec plus de 3 millions de décès. Plus de 8 millions de nouveaux cas de tuberculose active se trouvent dans le monde, dont 80% en Afrique [26].

Le rapport 2012 de l'OMS sur la lutte contre la tuberculose dans le monde fournit les informations les plus récentes sur l'épidémie et les progrès réalisés dans les soins et la lutte contre cette maladie à partir des données rapportées par 204 pays et territoires qui comptabilisent plus de 99% des cas de tuberculoses dans le monde. Environ 60% des cas de tuberculose concernent les régions de l'Asie du sud-est et du Pacifique occidental. L'Inde et la Chine sont les deux pays les plus touchés avec presque 40% de l'ensemble des cas. Cependant, la Chine fait partie des 22 pays dans le monde qui enregistre un déclin notable des cas de tuberculose.

La région africaine abrite 24% des cas de tuberculose présents dans le monde, au Mali la proportion de nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à frottis positifs est de 3777(68%) contre 3562 cas (67%) en 2011 [29].

3-2.Co-infection Tuberculose /VIH

La recrudescence de la TB a commencé vers 1986 aux Etats-Unis d'Amérique avec l'augmentation du nombre de cas (3% en 1986, 6% en 1990) puis le rôle important de l'infection à VIH/SIDA est apparu dans cette résurgence.

En Afrique Noire et en Asie du Sud-Est, l'importance de l'endémie tuberculeuse et la prévalence élevée de l'infection à VIH/SIDA ont rendu cette situation plus fréquente qu'ailleurs. Dès les premières études menées en Afrique centrale et de l'Est, un taux de co-infection tuberculose-VIH \geq à 30% a été enregistré. En 2010, la prévalence de la co-infection TB/VIH variait entre 16 et 80% selon les pays d'Afrique subsaharienne, en moyenne de 36% (versus 3 à 6% dans les pays occidentaux).

L'infection à VIH a donc entraîné une résurgence de la tuberculose dans le monde, en particulier en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud-est, continent où l'endémie tuberculeuse était encore importante en 1981 [29].

Environ 23% des tuberculeux testés étaient positifs pour le VIH dans le monde, par contre cette proportion était plus élevée dans les pays d'Afrique (46%) et représentant près de 80% des cas de co-infection tuberculose-VIH dans le monde [29].

Dans le monde, 40% des malades tuberculeux ont bénéficié d'un dépistage du VIH en 2011.

Dans la région Afrique, 69% des malades tuberculeux ont subi un dépistage du VIH en 2011, contre 3% en 2004.

A l'échelle mondiale, 48% des patients co-infectés par le VIH/TB ont eu un traitement antirétroviral en 2011. Le nombre de personne traitée pour une infection à VIH/SIDA et ayant subi un dépistage de la tuberculose a augmenté de 39%, passant de 2,3 à 3,2 millions, entre 2010 et 2011. Près d'un demi-million de personnes exemptes de tuberculose évolutive ont reçu un traitement préventif par l'isoniazide, et ceci grâce aux progrès réalisés en Afrique du sud, plus de 2878 (76%) ont été traité avec succès au Mali [29].

3-3.La Tuberculose Multi-résistante (TB-MR)

La TB-MR se définit comme une tuberculose résistante à la fois à l'isoniazide [H] et à la rifampicine [R], les deux médicaments majeurs de la première ligne utilisés dans le traitement de la tuberculose pulmonaire. Récemment, un deuxième facteur de gravité s'est ajouté à l'infection à VIH :

- la résistance aux médicaments antituberculeux réalisant la tuberculose à germes multi résistants et,
- la tuberculose à germes ultra résistants.

3-4.La Tuberculose ultra-résistante (TB-UR)

Elle est définie par l'OMS comme une TB-MR avec une résistance supplémentaire aux fluoroquinolones (FQ) et à au moins l'un des trois médicaments antituberculeux injectables de deuxième ligne utilisés dans le traitement (capréomycine [CPM], kanamycine [KM] ou amikacine [AMK]).

4. Physiopathologie

Les bactéries responsables de la tuberculose humaine sont très variées, surtout celles du complexe tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* et *Mycobacterium africanum*.

Ce sont des bacilles acido-alcool-résistants (B.A.A.R), et les lésions qu'elles déterminent sont très polymorphes.

D'autant plus que les facteurs intervenants dans la détermination de ces lésions sont nombreux :

- ✓ La résistance de l'hôte et les phénomènes d'hypersensibilité au cours de l'infection.
- ✓ Le nombre de bacille infectant et leur vitesse de croissance au cours de l'infection.

Cependant, la localisation pulmonaire est de loin la plus fréquente et la plus contagieuse.

Elle est aussi la plus grave par son caractère invalidant et son impact sur la vie socio-économique. Elle évolue en plusieurs étapes aussitôt l'arrivée des bacilles tuberculeux dans les alvéoles pulmonaires par voie aérienne, deux éventualités peuvent se présenter :

- Si le sujet est immunologiquement compétent, les bacilles sont captés par les macrophages tissulaires et sanguins dans lesquels ils se multiplient. D'autres macrophages et monocytes sont attirés et participent au processus de défense contre l'infection, le foyer ainsi constitué est le foyer initial traduisant la primo-infection tuberculeuse. Cette primo-infection suite à l'inhalation de bacille guérit le plus souvent spontanément. Cependant; l'infection tuberculeuse persiste à l'état latent avec des bacilles vivants mais dormant pendant des années après la guérison apparente de la primo-infection tuberculeuse, elle se transforme en tuberculose active chez environ 10% des adultes immunocompétents.

Mais le risque est beaucoup plus élevé chez l'enfant, dépassant 40% chez le nourrisson.

- La réactivation de la maladie est favorisée par une baisse de l'immunité cellulaire: vieillissement, stress, malnutrition mais surtout immunodépression (corticothérapie, chimiothérapie, infection à VIH). Une dissémination par voie lymphatique ou par voie sanguine provoque une miliaire et des localisations extra-pulmonaires. Une localisation extra-pulmonaire apparaît dans 25% des cas (environ 70% au cours de l'infection à VIH).

En l'absence de traitement, la tuberculose pulmonaire active est mortelle dans 50% des cas. La moitié des survivants (25%) guérissent spontanément; l'autre moitié (25%) sont porteurs chroniques qui contribuent à propager la maladie. Sous traitement adapté et suivi, la tuberculose devrait toujours guérir.

La Tb-MR comporte jusqu'à 80% de mortalité chez l'immunodéprimé. On peut être asymptomatique ou symptomatique avec des manifestations cliniques discrètes : petite altération de l'état général, fébricule, asthénie et amaigrissement. Si le foyer initial persiste, la multiplication des bacilles peut évoluer vers une résorption. Si le sujet est soumis à des conditions défavorables; affaiblissement de l'organisme pour plusieurs raisons qui produit une décalcification de la gangue suivie de la libération des bacilles ; le sujet peut subir une réinfection et la maladie évolue vers le second stade on observe alors deux types de lésions.

➤ **Une lésion de type exsudatif :**

Caractérisé par une réaction inflammatoire aiguë avec infiltration liquidienne suivi d'œdème pulmonaire avec présence des macrophages, des polynucléaires et plus tard, des monocytes autour des bacilles tuberculeux, si la multiplication s'arrête là, il y a évolution vers la résorption.

➤ **Une lésion de type productif :**

Caractérisé par une lésion granulomateuse chronique, constituée par trois zones :

- Une zone centrale avec de nombreuses cellules géantes contenant des bacilles tuberculeux,
- Une zone médiane constituée par des cellules épithélioïdes et
- Une zone périphérique formée par des fibroblastes, des lymphocytes et des monocytes.

Quand la zone centrale se nécrose, il se produit une homogénéisation solide qui aboutit à la formation du caséum, processus fondamental de la tuberculose. Au début de la caséification, on observe un grand nombre de bacille dans la lésion par rapport à sa fin où le nombre diminue progressivement. Cette lésion caséuse solide peut évoluer vers une liquéfaction qui s'accompagne d'une véritable flambée bacillaire suivie d'une collection dans une cavité délimitée par une coque scléreuse qui la sépare du parenchyme pulmonaire.

Cette cavité peut s'ouvrir dans une bronchiole et s'accompagne d'une élimination des parties ramollies, c'est la caverne pulmonaire qui explique la chronicité de la tuberculose, sa marche envahissante et sa contagiosité surtout dans les familles où il ya la promiscuité.

En effet, cette caverne ne guérit pas spontanément et il se produit une multiplication bacillaire interne dans le revêtement nécrotique de sa coque et les bacilles se répandent par les branches. On assiste à une forme disséminée dans le tissu pulmonaire. Il peut y avoir des complications graves telles que ; **pulmonaire, hémorragique, capillaire, ou artérielle diffuse, atélectasie et cardiaque.**

Parallèlement, en un à deux mois se développe l'immunité de type cellulaire participant à la lésion granulomateuse folliculaire caractéristique de la tuberculose : nécrose caséuse centrale, cellules géantes et épithélioïdes intermédiaires, couronne de lymphocytes périphériques.

Cette immunité s'oppose à une réinfection et à la dissémination de l'infection en cours. En aucun cas elle n'est définitive ni absolue que dans 90% des cas.

Cette réaction amène la guérison définitive des lésions définissant la tuberculose infection ou tuberculose latente. Les 10% restant développent une tuberculose maladie, dans la moitié des cas de façon précoce en moins de cinq ans, dans l'autre moitié plus tardivement, parfois après plusieurs décades [30, 31,32].

5. Agents pathogènes

Les mycobactéries (famille des *Mycobacteriaceae*, ordre des actinomycétales) sont des bactéries immobiles, acido-alcool résistantes, non sporulées, aérobies intra et extra cellulaires [33].

5-1.Mycobactéries du complexe tuberculosis

➤ *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ou bacille de Koch

Le MTB est une bactérie pathogène spécifique de l'homme mais capable d'infecter certaines espèces animales vivant à ses cotés (chat, chien). Il est très sensible à certains agents physiques : la chaleur, la lumière solaire, les rayons X ou UV. Il résiste bien au froid et à la dessiccation et peut demeurer vivant plusieurs jours dans des produits contaminés tels que des produits d'expectorations.

Il est peu sensible à de nombreux agents chimiques tels que les acides et bases dilués, en revanche, il est tué rapidement par l'alcool dilué à 70%. Le MTB a la propriété d'être coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen qui met en évidence la richesse en lipides de sa paroi.

A la microscopie c'est un bacille fin légèrement incurvés de 1 à 10µm de long sur 0,2 à 0,6 µm de large ou groupé en amas sur milieux de culture solide, cordes et torsades sur milieux de culture liquide.

C'est une bactérie à croissance lente possédant de plus un branchement majeur en hélice mis en évidence par le séquençage de L'ADNr, qui ne se développe pas sur milieu usuel, le milieu d'isolement classique est celui de Lowenstein Jensen à l'œuf coagulé. Les colonies font leur apparition sur milieu de culture solide en 2 à 4 semaines, colonies épaisses et rugueuses, en choux fleur.

Le genre *Mycobacterium* se caractérise par la présence d'arabinogalactone et d'acide mycoliques spécifiques.

Les acides mycoliques sont des acides organiques gras alphas ramifiés et beta hydroxylés trouvés dans un certain nombre de genre. Les genres se différencient par leur nombre respectif d'atome de carbone. Les mycobactéries possèdent les acides mycoliques les plus longs avec 60-90 atomes de carbone. Leurs acides sont les seuls à porter des groupements méthoxylés, des fonctions cétones et carboxyliques, des ponts époxydes. Sur les espèces de mycobactéries, trois sont à l'origine de la tuberculose: la contamination interhumaine se fait majoritairement par voie pulmonaire ; les populations les plus touchées sont les enfants non vaccinés, les personnes âgées, les immigrés, les patients immunodéprimés [34,35].

Figure 3 : Aspects des BAAR de *M.tuberculosis* après culture sur milieu liquide en cordes au microscope après coloration de Ziehl-Neelsen.



BK (cordes ou moustaches)

Mireille Dosso [36].

➤ ***Mycobacterium bovis* :**

Agent de la tuberculose bovine. *M. bovis* est aussi pathogène pour l'homme comme l'est *M. tuberculosis*. La contamination se fait par voie aérienne au

contact des animaux malades ou par absorption de lait de vache contaminé. Agent rare dans les pays développés, il est plus fréquent dans les pays où la surveillance du bétail est insuffisante.

M. bovis se distingue aisément de *M. tuberculosis* par ses caractères cultureux (colonies minuscules, blanches, à surface lisse, qui apparaissent) et ses caractères biochimiques (micro-aérophile, niacine négative, nitrate négative).

La prévention se repose sur la pasteurisation du lait et l'abattage obligatoire des bovidés réagissant positivement à la tuberculine.

Actuellement on distingue deux sous espèces : *M. bovis subsp bovis* et *M. bovis subsp caprae*. Elles sont très proches phénotypiquement. La différence c'est la sensibilité à la pyrazinamide alors que *M. bovis subsp bovis* est résistante, *M. bovis subsp caprae* est sensible [37,38, 39].

➤ ***Mycobacterium africanum***

Elle sévit en grande partie en Afrique de l'ouest et en Afrique centrale, on trouve dans une proportion importante de cas (20 à 50%). C'est une variété du bacille tuberculeux dont les caractères cultureux et biochimiques sont intermédiaires entre ceux de *M. tuberculosis* et ceux de *M. bovis*, cette variété d'intérêt épidémiologique a été dénommée *M. africanum*.

Elle serait responsable d'un quart des cas de tuberculose dans les pays comme la Gambie. Il s'agit d'une infection de l'homme et se propage par voie aérienne à partir d'une personne malade.

Il dispose d'un degré similaire d'infectiologie dans l'organisme comme *M. tuberculosis*. Mais, il est moins susceptible d'évoluer vers une maladie clinique sauf chez les personnes vivant avec le VIH SIDA. Dans les pays endémiques elle représente une importante infection opportuniste au stade ultérieur de la maladie à VIH.

A l'examen microscopique, son aspect est identique à celui de *M. tuberculosis* (bacilles, cordes).

Les colonies sont dysgoniques, rugueuses, plates, de couleur mâte avec un bourgeon central et s'enchrassent dans la gélose, les bacilles sont micro aérophiiles et l'apparition sur milieu se fait 3-4 à 6 semaines après l'isolement sur milieu solide de Loweinsten Jensen (L-J).

Les caractères biochimiques : l'absence habituelle de nitrate réductase, et le test à la niacine est parfois positif mais souvent faiblement positif ou négatif. *M. africanum* à une sensibilité variable au TCH (hydrazide de l'acide thiophène carboxylique) et à 50µg/ml de pyrazinamide (Castets et coll., 1968) et il est traité avec un régime identique à la tuberculose causée par *M. tuberculosis*. Sa mise en évidence en Europe est rare mais possible à cause des migrations [40, 41].

➤ ***Mycobacterium canettii***

Il a été isolé et identifié par G.Canetti en 1969 chez un patient français présentant une tuberculose pulmonaire cavitaire. C'est un variant lisse de *M. tuberculosis* qui a été récemment décrit chez des patients originaires ou ayant séjournés en Afrique de l'Est [42].

➤ ***Mycobacterium microti***

M. microti a été découvert par Wells en 1937 sur la chauve souris sous le nom de < vole bacillus >.

Elle est classée comme membre du complexe *M.tuberculosis*. Ce genre est responsable d'infection chez des animaux comme les rongeurs (campagnols, cobayes ou lapins). Son impact chez l'homme est considéré comme nul et *Mycobacterium microti* n'est généralement pas considéré comme pathogène chez l'homme. Néanmoins le spoligotyping met en évidence des infections à *Mycobacterium microti* chez l'être humain [43, 44].

➤ ***Mycobacterium pinnipedii***

C'est une nouvelle espèce appartenant au complexe *M. tuberculosis* a été décrite chez des mammifères marins pinnipèdes (phoques morses, léopard de mer) [45, 46].

➤ ***Mycobacterium mungi***

C'est l'agent causal chez les mangoustes bandes qui vivent près de l'homme dans le district de Chobe au Botswana.

La dynamique de transmission reste inconnue. *M.mungi* est un pathogène provoquant des taux de mortalités élevés chez les mangoustes jeunes qui vivent en étroite association avec les humains [47].

5-2.Les mycobactéries atypiques ou Non tuberculeuses

Les mycobactéries atypiques ne sont cultivées que difficilement in vitro et peuvent être confondues avec les bacilles tuberculeux. Elles peuvent infecter l'homme ou d'autres mammifères.

Elles sont présentes dans l'environnement : la terre, l'eau, dans les aérosols, sur les plantes, et ne sont pas des pathogènes obligatoires. Parmi ces mycobactéries, le bacille de la lèpre ou bacille de Hansen est aussi inclus. Elles sont habituellement isolées en tant que contaminant des cultures mais, à des degrés divers, toutes sont susceptibles de se multiplier chez l'homme et de provoquer des maladies simulant la tuberculose que l'on appelle **mycobactérioses**. Celles-ci apparaissent essentiellement chez les sujets présentant un déficit immunitaire local (lésions cavitaires pulmonaires résiduelles) ou général de nature thérapeutique (greffés) ou pathologique (cancer, SIDA).

Le traitement des mycobactérioses est très difficile en raison de l'habituelle résistance naturelle des mycobactéries atypiques aux antituberculeux.

Les espèces les plus fréquentes sont :

➤ ***Mycobacterium avium-intracellulare* (MAC)**

Ce complexe est retrouvé dans l'environnement, l'eau, le sol mais aussi dans l'air (aérosols) ainsi que dans l'environnement hospitalier ou domestique. Il est composé de deux espèces distinctes, mais suffisamment proches pour être groupées dans *M.avium* complexe. *M avium* est responsable de la tuberculose

aviaire et des infections surtout ganglionnaires chez des mammifères domestiques (porcs).

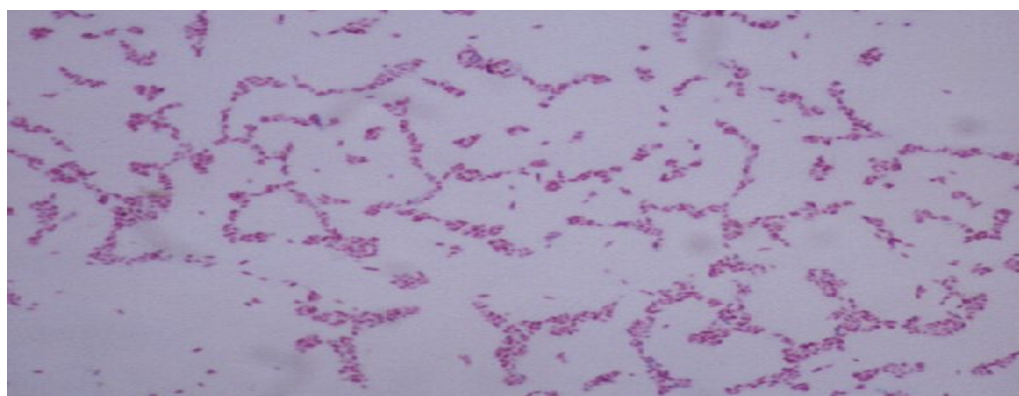
Les oiseaux sauvages ou domestiques sont contaminables aussi par *M.avium*. Avant l'apparition du sida, M.A.C était isolé au décours d'infection pulmonaire chez l'adulte ou d'adénite ganglionnaire chez l'enfant.

M.avium est la mycobactérie la plus fréquemment isolée chez les personnes vivantes avec le VIH à un stade avancé avec un taux de lymphocytes CD4 abaissé en dessous de 100 par μ l [48,49]. Le traitement est difficile en raison de la résistance des mycobactéries et de sa capacité à muter en présence des macrolides.

M.intracellulare est plutôt responsable d'infections pulmonaire ou d'adénites que d'infections chez les personnes vivants avec le VIH SIDA.

A l'espèce *M.avium*, s'est associée une espèce proche : *M.paratuberculosis* qui devient la sous espèce de *M.avium subsp paratuberculosis* et une autre sous espèce *M.avium subsp silvaticum* est retrouvée chez les animaux [50].

Figure 4: Aspects des BAAR de *M.avium* après la coloration de Ziehl Neelsen



M. avium (coccoïdes)

Mireille Dosso [36].

➤ ***Mycobacterium xenopi***

C'est une mycobactérie plus fréquemment rencontrée dans les infections pulmonaires en France, et causant des infections disséminées plus principalement chez les personnes vivant avec le VIH.

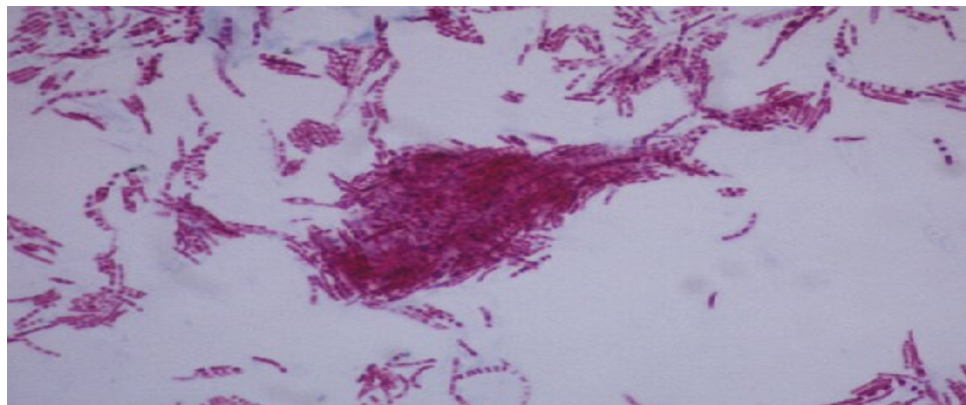
Elle est fréquente dans les atteintes osseuses ou articulaires, est aussi retrouvée dans l'eau potable et l'eau de réactif. Sa poussée est généralement lente sur des milieux récents. Sur milieux solides, cette espèce scotochromogène prend l'aspect de fines colonies, jaunes, et rondes. Il n'existe pas de traitement standard [51,52].

➤ ***Mycobacterium kansasii***

Cette espèce est retrouvée dans l'eau environnementale, domestique et hospitalière et en pathologie humaine. Les infections sont majoritairement pulmonaires, même si d'autres localisations ont été décrites. L'infection pulmonaire est observée chez les patients avec des facteurs favorisants : silicose, ancienne tuberculose, infection par le VIH.

Sur milieux solides, elle donne des colonies d'abord crèmes, rondes, lisses et brillantes qui deviennent jaune-orangées à la lumière. L'aspect microscopique montre des bacilles assez larges, longs, avec des granulations en échelles. C'est une des rares mycobactéries non tuberculeuses sur laquelle les antituberculeux de première ligne sont actifs [53,54].

Figure 5 : Aspects des BAAR de *M.kansasii* après coloration de Ziehl Neelsen.



M. Kansasii (épais et zèbré)

Mireille Dosso [36].

➤ *Mycobacterium gordonae*

Cette espèce, présente dans l'environnement est retrouvée dans des prélèvements pluri microbiens chez l'être humain. Il s'agit de colonisation sans incidence pathogène.

Elle est responsable de contamination de l'eau potable, elle donne aussi des colonies scotochromogènes, rondes, jaune-orangées, lisses, brillantes et des aspects larges au microscope [55].

Figure 6 : Colonies de *M.gordonae* sur milieu de Lowenstein Jensen.



M. gordonae

Mireille Dosso [36].

➤ *Mycobacterium fortuitum* complexe

Ces espèces sont présentes dans l'environnement. Elles sont fréquemment isolées dans les eaux domestiques et hospitalières et sont retrouvées à l'état commensal chez l'homme. Ce sont des mycobactéries à croissance rapide les plus fréquentes, incluant les espèces *M.fortuitum* ; *M.peregrinum*, *M.chelonae*, *M.abcessus* et *M.chelonae-like*.

Leur isolement d'un prélèvement pluri microbien n'est pas rare. Elles sont retrouvées dans des situations iatrogènes : pose de cathéters, prothèses cardiaques, après mésothérapie ou lors de dialyse péritonéale. Ces mycobactéries sont naturellement résistantes aux antituberculeux et à des nombreux antibiotiques.

Figure 7 : Aspects des BAAR de *M.fortuitum* après coloration de Ziehl Neelsen et Colonies de *M.fortuitum* sur milieu.



M. fortuitum



Espèce à croissance rapide

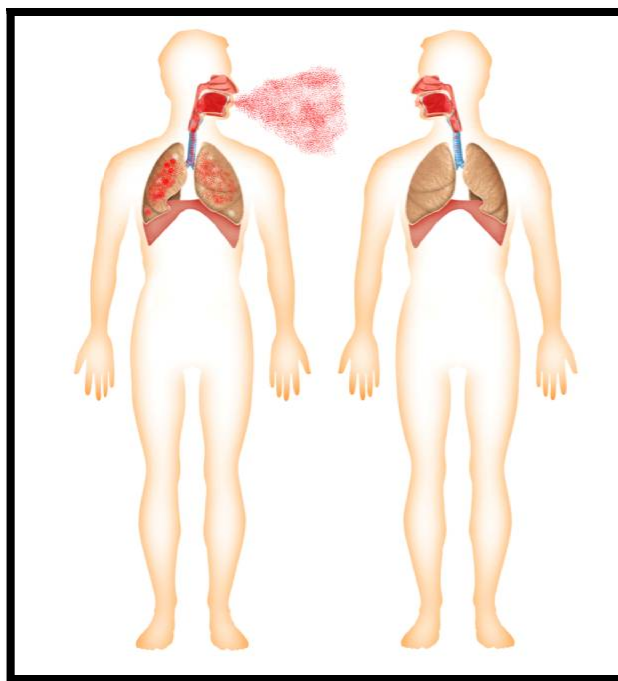
Mireille Dosso [36].

6. Mode de transmission

La tuberculose est une maladie contagieuse, endémo-épidémique, à transmission essentiellement interhumaine due au complexe tuberculosis (*M. tuberculosis*). L'atteinte pulmonaire est la plus fréquente des localisations et représente la source habituelle de transmission.

La transmission du bacille se fait par l'intermédiaire des aérosols de bacille tuberculeux ou gouttelettes de Pflügge émises, par les malades atteints de lésions ouvertes de tuberculose pulmonaire. Dont l'expectoration contient des bacilles mis en évidence par examen microscopique direct, dans l'air rejeté lorsqu'ils toussent, et éternuent.

Figure 8 : Illustration de la transmission de la tuberculose par les gouttelettes de Pflugge.



Sujet malade

Sujet « contact »

Source : www.cm-bligny.com

Les différents facteurs qui conditionnent après une inhalation de bacille tuberculeux la survenue d'une infection sont liés à : l'intensité, c'est à dire à la richesse bacillaire de l'aérosol infectant, la durée et la répétition des expositions, et aux moyens de défense de l'organisme dont l'immunité cellulaire.

Les mauvaises conditions de vie précaire, la promiscuité, l'immunodépression (VIH, diabète; cancer; hémopathie maligne; la corticothérapie de longue durée) et la toxicomanie sont entre autres des facteurs de risque pour la survenue de l'infection tuberculeuse. La transmission par la voie digestive est aussi documentée.

7. Clinique

7-1. Primo-infection

La primo-infection tuberculeuse (PIT) est la conséquence du premier contact du bacille tuberculeux avec un organisme indemne de tout contact antérieur. On distingue trois formes :

✓ La primo-infection est cliniquement silencieuse dans 95% des cas. Un virage tuberculinique témoigne d'une primo-infection récente.

Dans environ 5% des primo-infections, les manifestations cliniques permettent le diagnostic (Légère altération de l'état général, fébricule, asthénie, amaigrissement) ;

✓ La primo-infection latente caractérisée par :

- La typho-bacillose de LANDOUZY: faite de fièvre progressive en plateau, de sueurs abondantes, de splénomégalie, d'un sérodiagnostic de Félix et Widal négatif, et d'une Intradermo-réaction à la tuberculine (IDR) positive ;

- L' érythème noueux: les manifestations cutanées marquant le tableau clinique chez l'enfant fait de nodosité de 1 à 4 cm de diamètre enchâssées dans le derme et l'hypoderme saillant sous la peau douloureuse siégeant à la face antéro-interne des jambes, s'étendant aux cuisses et au bord cubital des bras.

- Les manifestations oculaires sont marquées par la kératoconjonctivite phlycténulaire.

Le diagnostic de la primo-infection repose sur l'IDR qui est le plus souvent positive. La radiographie pulmonaire demeure souvent normale au cours de la primo-infection mais quelque fois elle se traduit par cinq signes majeurs : la condensation parenchymateuse; l'atélectasie lobaire ou segmentaire qui est la manifestation la plus fréquente chez le nourrisson; les adénopathies hilaires (image en cheminée); l'épanchement pleural liquidien et l'aspect de miliaire. Le foyer initial se traduit par une opacité alvéolaire grossièrement arrondie de quelques millimètres de diamètre. Il est généralement associé à une opacité linéaire convergeant vers le hile et traduisant l'atteinte lymphatique.

L'évolution est généralement favorable, les signes cliniques disparaissent en quelques jours, l'amélioration radiologique est lente, souvent, l'on observe une persistance des calcifications du chancre et des adénopathies. Elle se complique de façon générale en formes extra pulmonaires dans les années qui suivent la primo-infection tuberculeuse.

Les plus rencontrées sont: pleurésie, péricardite, tuberculose péritonéale, méningite, ostéo-articulaire et la miliaire. La PIT peut se confondre avec la typhoïde, maladie de Hodgkin, la septicémie, la sarcoïdose et le cancer pulmonaire [56,57].

7-2.La tuberculose pulmonaire commune

C'est une forme de tuberculose pulmonaire post primaire, caractérisée par une combinaison de lésions exsudatives menant à la caséification et à la formation de cavernes et de lésions productives évoluant vers la fibrose. Elle est la plus fréquente et représente 80% des localisations tuberculeuses.

C'est pratiquement la seule localisation permettant la transmission de la tuberculose.

Elle est la résultante soit de manière rare d'une aggravation progressive du foyer initial de la primo- infection soit d'une infection exogène à partir d'un sujet contagieux, soit d'une réinfection endogène à partir de foyers tuberculeux latents ganglionnaires ou parenchymateux où le bacille tuberculeux peut persister toute la vie à l'état dormant.

Il peut s'agir d'une tuberculose pulmonaire insuffisamment ou non traitée, ayant laissé en place des bacilles. Le tableau clinique peut être évocateur devant une hémoptysie ou un épanchement pleural liquidien. Dans certains cas l'aspect peut être trompeur et simuler une maladie respiratoire aiguë. La découverte est souvent fortuite lors d'une radiographie pulmonaire car les signes fonctionnels sont en général discrets (asthénie physique, fébricule vespérale, sueurs nocturnes, douleurs thoraciques, toux sèche ou productive persistante résistant aux antibiotiques habituels, altération progressive de l'état général).

Les signes stéthoacoustiques sont aussi pauvres même en cas d'expression radiologique importante. Chez les sujets PV VIH, la symptomatologie peut être atypique. La fièvre au long cours et l'amaigrissement inexpliqué constitue des signes d'appel suffisants pour initier une exploration tuberculeuse [58].

7-3. Tuberculose extra pulmonaire

Elle peut être localisée dans plusieurs organes de l'organisme. On distingue : la tuberculose Hépatospléniques, la Méningite Tuberculeuse, la tuberculose Gastro-intestinale, la tuberculose ganglionnaire, la tuberculose ostéo-articulaire, la spondylodiscite tuberculeuse, la spondylite tuberculeuse, l'atteinte de l'arc postérieur, la péricardite tuberculeuse, la tuberculose pleurale [26].

7-4. Tuberculose et immunodépression

Un déficit de l'immunité cellulaire augmente le risque d'apparition de la tuberculose maladie et détermine la forme et la gravité de celle-ci. L'incapacité de cellules immunitaires normalement compétentes à empêcher la multiplication des bacilles au niveau de la primo-infection provoque l'apparition de la tuberculose maladie. Ce sont les patients recevant des traitements immunosuppresseurs (principalement les transplantés) ou des PV VIH qui sont les plus concernés.

Contrairement à d'autres pathologies, la tuberculose se déclare précocement, le diagnostic étant porté dans les 2/3 des cas lorsque le taux de lymphocyte CD4 atteint environ 250 par μl . L'aspect clinique n'est pas toujours évocateur, la forme pulmonaire unique n'étant retrouvée que dans 25% des cas. De même la localisation pulmonaire peut avoir des formes peu typiques : la présence de caverne est rarement observée par la radiographie. Des localisations extra-pulmonaires, ganglionnaires, hépatiques, spléniques, ou rénales accompagnent le plus souvent le foyer pulmonaire.

La tuberculose augmente la mortalité chez les PV VIH et même avec des taux de lymphocytes CD4 élevés. Le traitement de la tuberculose est prolongé à moins 9 mois dans ce cas.

Il est en général efficace, mais les antituberculeux peuvent être mal toléré, s'ajoutant aux effets des autres médicaments administrés notamment les ARV.

Le suivi des PV VIH peut donc être compliqué. L'interaction entre SIDA et tuberculose est devenue un problème de Santé Publique par l'apparition de souches résistantes ou multi résistantes [21].

8. Diagnostic

8-1. Diagnostic bactériologique

Le diagnostic de certitude de la tuberculose repose sur la mise en évidence du BK dans les produits pathologiques.

Dans la tuberculose pulmonaire, elle permet la recherche des sujets bacillifères qui sont à l'origine de la propagation de la maladie.

- **Examen direct d'expectoration**

- **Principe**

- Les mycobactéries, du fait de la structure de leur paroi, ne prennent pas les colorants usuels comme ceux utilisés pour la coloration de Gram.

- Elles sont capables en revanche d'être colorées par la fuchsine ou l'auramine et de conserver ces colorants malgré l'action conjointe de l'acide et de l'alcool. Elles sont dites bacilles acido-alcool résistants (BAAR). Il est impératif d'effectuer le prélèvement si possible avant tout traitement anti-mycobactérien.

- L'utilisation de récipients stériles, à usage unique et à fermeture hermétique est recommandée. Il faut éviter la contamination pouvant être à l'origine d'examen faussement positif. En cas de négativité des expectorations ou devant la difficulté pour un patient d'émettre des crachats de qualité, les produits d'aspiration trachéale ou trachéobronchique seront recueillis à l'aide d'une sonde d'aspiration. En hospitalisation, des tubages gastriques ou se les enfants (particularité de ne pas cracher) sont également réalisés chez les malades à jeun, alités depuis la veille et le plutôt possible au réveil.

- Coloration

La technique de référence (Ziehl-Neelsen) pour colorer les structures pariétales des mycobactéries permet la fixation en série de nombreux frottis. Les mycobactéries apparaissent comme de fins bacilles plus ou moins réguliers roses à l'Auramine Rhodamine, d'où une spécificité de 100% de cette méthode pour les mycobactéries, contre la méthode de Ziehl-Neelsen utilisant la fuchsine phéniquée à chaud, suivie d'une décoloration par une solution d'acide et d'alcool mélangée et d'une contre coloration au bleu de méthylène sur un fond bleu-vert irréversible de colorant tel que la fuchsine et l'Auramine.

L'observation des frottis se fait au grossissement (objectif 100) du fait du bacille, des BAAR, et une observation d'au moins 300 champs est nécessaire avant de rendre un résultat négatif (20 min / lame). Cela représente l'inconvénient majeur de cette technique pour l'observation.

- La méthode de la fluorescence

Plusieurs laboratoires ont remplacé la technique de Ziehl-Neelsen par celle de la coloration à l'auramine rhodamine qui présente les mêmes propriétés que la fuchsine phéniquée pour colorer les mycobactéries. L'observation est effectuée sur un microscope à fluorescence sous la lumière bleue ou rayonnement UV, les BAAR apparaissent comme des bâtonnets jaune vert brillants sur fond sombre. C'est pourquoi les frottis colorés par l'Auramine peuvent être examinés avec un objectif de faible grossissement à l'objectif 25 ce qui permet d'examiner la totalité du frottis en 5 minutes au moins. La surface de chaque champ microscopique observé étant 16 fois plus grande qu'avec un objectif à immersion de grossissement 100, l'examen microscopique est plus rapide, plus aisé et plus sensible [59,60,61].

- Notation des résultats

Le nombre de bacille observé dans un frottis reflète la gravité de la maladie et de la contagiosité du malade. Il est donc important de noter le nombre de bacille observé sur chaque frottis.

Le tableau ci-dessous montre la méthode de notation de résultat.

Tableau I: Notation des résultats de l'examen direct d'expectoration [62].

0 BAAR	Par 100 champs à l'immersion	Négatif
1 à 9 BAAR	Par 100 champs à l'immersion	faiblement positif ou « Rares BAAR »
10 à 99 BAAR	Par 100 champs à l'immersion	positif 1+
1 à 10 BAAR	Par champ	positif 2+
Plus de 10 BAAR	Par champ	positif 3+

Si le frottis est correctement préparé, il est vraisemblable que le nombre de bacille qu'il contient sera lié à la concentration des bacilles dans les crachats. La probabilité de ne pas trouver de BAAR dans les frottis diminue constamment lorsque la concentration des bacilles dans les expectorations augmente. Quand la concentration des bacilles dans les expectorations atteints 100 000 par ml, la probabilité d'un résultat négatif est presque nul [62].

- Sensibilité de l'examen microscopique

L'examen microscopique n'est pas très sensible puis qu'il faut entre 5000 et 10 000 bacilles par ml de crachat pour que l'on puisse voir au moins un BAAR sur un frottis avec une probabilité supérieure à 95 %. L'examen de plusieurs échantillons en général trois, améliore la sensibilité de la technique.

Malgré ses limites, l'examen microscopique reste une étape essentielle du diagnostic de la tuberculose puisqu'il permet de détecter rapidement, en pratique en moins d'une heure, les malades les plus contagieux pour leur entourage.

Près de 50 % des malades atteints de tuberculose pulmonaire à culture positive ont des bacilles visibles à l'examen microscopique.

En cas d'infection par le VIH, le taux de positivité des frottis dépend du degré de l'immunodéficience [63].

- Résultats faussement positifs

✓ **Particules acido résistantes** : Il arrive qu'un échantillon de crachats ou un frottis contienne des particules qui sont acido résistantes, c'est à dire que, traitée par la méthode de Ziehl-Neelsen, elles retiennent le colorant rouge (fuchsine phéniquée) et résistent à la décoloration par l'acide et l'alcool. Les particules rouges peuvent parfois ressembler à des bacilles tuberculeux.

Ce sont certaines particules alimentaires (par exemples des cires, des huiles), des précipités, d'autres micro-organismes, des matières inorganiques qui donne des artéfacts.

✓ **Contamination par transfert de bacilles d'un frottis à l'autre :**

Il peut arriver que des bacilles soient transférés accidentellement d'une lame positive à une lame négative, lorsque plusieurs lames sont traitées simultanément dans des cuves à coloration ou à décoloration. Des bacilles peuvent également être transférés accidentellement si la baguette de verre ou le compte-gouttes utilisé pour appliquer l'huile à immersion sur la lame touche la surface d'une lame positive et enlève un peu de frottis.

- Résultats faussement négatifs

Ils sont habituellement dus à des insuffisances dans la préparation, la coloration et la lecture du frottis. Le recueil correct de l'échantillon et la sélection soigneuse des particules de crachats sont des éléments essentiels de la préparation du frottis.

- **Diagnostic à partir de la culture**

La culture est beaucoup plus sensible que l'examen microscopique et permet l'identification de la mycobactérie isolée, ainsi que la mesure de sa sensibilité aux antibiotiques.

En raison des exigences nutritives et de la croissance lente de la majorité des espèces mycobactériennes (en moyenne 20 heures pour le temps de multiplication de *M. tuberculosis*), il est nécessaire d'employer des milieux de culture enrichis et de décontaminer les prélèvements avant de les ensemer. On enseme les crachats, les pus caséux et les prélèvements tissulaires.

L'identification se fait selon la vitesse de croissance, le caractère morphologique des colonies au Ziehl, les caractères biochimiques, et la croissance en présence d'inhibiteurs. Le milieu solide à l'œuf de Lowenstein Jensen est le milieu le plus couramment utilisé.

La température optimale de croissance est de 35 à 37°C. Le pH optimum est de 6,8 à 7 l'aspect des colonies est rugueux (*M tuberculosis*).

Lors de la primo culture, les colonies de *M. tuberculosis* poussent en 2 à 4 semaines sur milieu gélosé de Middlebrook®, en milieu liquide par système fluorescent grâce au *Mycobacterium Growth Indicator Tube* (MGIT) qui pousse en 10 à 20 jours.

Dès l'apparition de colonies constituées la fluorescence du MGIT est observée grâce à un lecteur automatique, semi-automatique ou manuel. Après vérification au microscope optique de la présence de BAAR, les cultures sont déclarées positives.

Les résultats sont exprimés quantitativement en nombre de colonie par tube.

L'antibiogramme permet de rechercher une résistance primaire aux antituberculeux de première ligne ou secondaire lors de l'échec du traitement ou rechute [61].

L'OMS a recommandé récemment pour les pays en développement l'utilisation du Xpert MTB/RIF® pour le test de sensibilité aux antituberculeux de première ligne. Cette technique peut être effectuée dans un laboratoire peu équipé et même dans un laboratoire mobile. Il permet une détection rapide de *M. tuberculosis* en quelques heures et permet de diagnostiquer la résistance à la rifampicine, antibiotique majeur de la première ligne. La résistance à la RIF étant rarement isolée, cet automate permet de détecter très rapidement les souches de TB-MR [26].

Figure 9 : Milieux de cultures utilisés au laboratoire de tuberculose de SEREFO



8-2.Diagnostic radiologique

• Radiographies Standards

Les radiographies standard du thorax peuvent être faites pour complément d'informations dans la tuberculose. Il existe des images évocatrices mais pas toujours pathognomoniques.

La topographie est généralement apicale (apex, lower). L'explication semble être la plus grande pression intra alvéolaire de l'oxygène favorable au BK. Ces lésions sont souvent bilatérales, associant divers types de lésions élémentaires :

Images nodulaires et Images cavitaires

• Radiographie du rachis

Elle peut être faite en cas de tuberculose vertébrale, c'est-à-dire qu'elle sera centrée sur la colonne vertébrale, dorsale, lombaire et le coccyx. Grâce à l'incidence de DESEZE (cliché dorso-lombo-pelvien ou cliché de profil centré sur L5-S1), on peut voir sur une radiographie en phase d'état :

- ✓ Anomalie ostéolytique des plateaux vertébraux : déminéralisations, flous, irrégularité puis érosion ;
- ✓ Anomalie ostéolytique des corps vertébraux adjacents : géodes typiques en miroir, ostéolyse, tassement vertébral traduisant un abcès des parties molles.

A un stade plus évolué non traité, on peut observer une :

- ✓ Ostéolyse des corps vertébraux avec tassement vertébral ;
- ✓ Déformation vertébrale (cyphose et scoliose) ;
- ✓ Image de reconstitution : condensation péri lésionnelle, ostéophytes latéraux [61].

8-3. Le test tuberculinique

Il consiste en l'injection intradermique de 0,10 ml de tuberculine purifié à la face antérieure de l'avant bras. La lecture se fait en 3 ou 4 jours et consiste en la mensuration ou à l'observation de la réaction cutanée causée par l'injection du produit.

Le tableau 2 nous présente les résultats attendus [61].

Tableau II : Résultats et Interprétation de l'IDR

Résultats		Interprétation
Anergie		Absence d'induration palpable
Chez l'immunodéprimé	Négatif	Diamètre transversal de l'induration inférieur à 5mm
	Positif	Diamètre transversal de l'induration inférieur à 5mm
Chez l'immunocompétent	Négatif	Diamètre transversal de l'induration supérieur à 10mm
	Positif	Diamètre transversal de l'induration supérieur à 10mm
Phlycténulaire		Diamètre transversal de l'induration supérieur à 10mm

8-4. Autres examens complémentaires

- La respirométrie, radiométrie ou Bactec (Technique de culture)

C'est une méthode de détection rapide de la mycobactérie en milieu liquide. Elle est basée sur la mesure du CO₂ marqué par le carbone 14 libéré par les mycobactéries au cours de leur croissance.

Des quantités minimales de CO₂ marqué pouvant être mesurées, la présence de mycobactérie est détectée dans les prélèvements positifs ou non à l'examen microscopique. C'est actuellement la méthode la plus rapide pour la réalisation de l'antibiogramme effectué en moyenne en 7 jours [60].

- L'anatomo-pathologie :

Elle peut contribuer au diagnostic. Le follicule tuberculoïde et la nécrose caséuse sont des arguments majeurs en faveur de la tuberculose [58].

- **Méthodes immunologiques :**

De nombreux essais ont été effectués pour mettre au point une sérologie spécifique de la tuberculose.

Jusqu'ici aucun n'a donné de résultat satisfaisant probablement des antigènes utilisés, aussi purifiés soit-ils contiennent des déterminants antigéniques présents dans l'ensemble des mycobactéries, entraînant des réactions croisées entre *M. tuberculosis* et les autres mycobactéries [61].

9. Traitement

9-1. Traitement préventif

• Prévention de la Tuberculose

La priorité de la prévention serait de diagnostiquer les malades dont l'expectoration est positive à la bacilloscopie et se rassurer que les patients suivent le traitement efficace jusqu'à la négativation des crachats et une amélioration notable sur le plan clinique. Stériliser les expectorations en les exposant au soleil tue les BK en cinq minutes (ceux-ci vivent pendant des années à l'ombre), en utilisant l'hypochlorite de soude 1% qui liquéfie l'expectoration et tue le BK, la chaleur à 60 degrés en 20 minutes ou à 70° C en 5 minutes tue les BK en brûlant les mouchoirs en papiers après usage. Insister sur l'hygiène de l'environnement : « le but étant de réduire le risque provenant de l'expectoration des malades contagieux non diagnostiqués ».

Lutter contre le tabac et l'alcool ; préconiser une bonne nutrition et Insister sur la prévention primaire qui est le vaccin [65].

- **Vaccination par le BCG**

La prévention de l'infection des sujets sains par ce vaccin ancien est incomplète. Le B.C.G est une suspension de Bacilles de Calmette et Guérin vivant mais atténué: c'est le seul vaccin bactérien vivant. Cette vaccination se fait à la naissance dans le cadre du Programme Elargi de Vaccination (PEV) par l'injection intradermique à la face postérieure du bras ou antérieure de l'avant bras de 0,05 ml de B.C.G lyophilisé thermostable à 0,5 ou 1mg/ml.

Après l'âge de 1 an, la dose est de 0,1ml. Une deuxième vaccination est souhaitable à l'âge d'entrer à l'école (6 ans).

- **Les complications de la vaccination**

En 3-6 semaines se forme une maculo-papule puis parfois un suintement et une croûte qui tombe en laissant une cicatrice un peu déprimée de 3 mm de diamètre. L'allergie s'installe de la 5ème à la 12ème semaine après la vaccination.

L'injection sous dermique entraîne un abcès et une absence d'immunisation.

La Bécégite est la généralisation de l'infection chez les sujets déficients en lymphocytes T, elle se traite par l'INH pendant 6 mois. L'adénopathie satellite du B.C.G est observée dans 1-2% des cas à partir de la 6ème semaine après la vaccination. Elle peut persister plusieurs mois, se fistulise dans 10% des cas et ne nécessite aucun traitement. L'ostéite post B.C.G est rare et bénigne.

La protection conférée par le B.C.G est extrêmement variable selon les études, allant d'une protection quasi nulle (Inde du sud : 200 000 personnes suivies durant 8 ans), à une protection de 80% (Grande-Bretagne). En moyenne la protection est de 50% et permet d'éviter les formes graves chez les enfants (surtout les formes miliaires et les méningites tuberculeuses).

Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer cette variabilité :

- ✓ variabilité des souches de B.C.G utilisées ;
- ✓ l'interaction avec l'immunité conférée par les mycobactéries de l'environnement ;

- ✓ le fait que les mécanismes immunitaires sont différents selon le stade de la maladie ;
- ✓ le B.C.G protège surtout contre la dissémination hématogène et contre les méningites tuberculeuses ;
- ✓ variation géographique de la virulence des souches de BK ;
- ✓ variation génétique de la réponse immunitaire aux mycobactéries ;
- ✓ malnutrition ;
- ✓ le manque de corrélation de la positivité de l'IDR après vaccination et la protection contre la maladie.

Pour toutes ces raisons, le rapport coût/ efficacité de la vaccination est difficile à évaluer.

En attendant les résultats des recherches sur les antigènes les plus immunisants de *M. tuberculosis* (clonage de la protéine majeure de *M. tuberculosis*) et sur les mécanismes humoraux et cellulaires précis de la protection contre la tuberculose, il est recommandé de continuer à vacciner par le B.C.G. dans les pays tropicaux d'autant plus que le B.C.G. protégerait en partie contre la lèpre.

Chez les « Sidéens », la vaccination par le B.C.G. est contre indiquée à cause du risque de Bécégite étendue. Mais l'O.M.S. recommande de continuer à vacciner les enfants séropositifs par le VIH.

9-2.Médicaments antituberculeux

Si le traitement antituberculeux ne pose plus que des problèmes d'observance, le développement de l'infection par le VIH, la recrudescence de la pauvreté et les bacilles multi résistants, suscitent un regain d'intérêt.

• Objectifs du traitement

- ✓ stériliser les lésions pour tarir ainsi la source de contamination
- ✓ éviter les rechutes
- ✓ rechercher les contacts et les traiter
- ✓ diminuer la morbidité et la mortalité
- ✓ éviter l'émergence des souches résistantes aux antibiotiques

- **Les médicaments essentiels disponibles**

En 1982 à Buenos-Aires (Argentine) la commission du traitement de l'Union Internationale Contre la Tuberculose (UIC) a retenu 6 médicaments comme essentiels dans le traitement de la tuberculose : la streptomycine (S), l'isoniazide (H), la rifampicine (R), la pyrazinamide (Z), L'éthambutol (E) et la thioacétazone (T).

Tableau III : Liste des médicaments antituberculeux dits essentiels, leurs posologies et les fréquences de prise [60].

Médicaments antituberculeux essentiels (Abréviation)	Effet Pharmacologique	Posologie recommandée (mg /kg) Quotidienne	3x /semaine	2x/semaine
Isoniazide(H)	Bactéricide	5(4-6)	10(8-12)	15(13-17)
Rifampicine(R)	Bactéricide	10(8-12)	10(8-12)	10(8-12)
Pyrazinamide(Z)	Bactéricide	25(20-30)	35(30-40)	50(40-60)
Streptomycine(S)	Bactéricide	15(12-18)	15(12-18)	15(12-18)
Ethambutol(E)	Bactériostatique	15(15-20)	30(25-3)	45(40-50)
Thiocétazone(T)	Bactériostatique	15(15-20)	Ne s'applique pas	Ne s'applique pas

Tableau IV : Effets indésirables mineurs des médicaments antituberculeux [60].

Effet secondaire	Le ou les médicaments probablement responsable(s)	Prise en charge
Anorexie, nausée, douleurs abdominales, urine rouge-oranges	Rifampicine	Faire prendre le traitement juste avant le coucher, rassurer le malade.
Douleurs articulaires	Pyrazinamide	Aspirine
Sensation de brûlures aux pieds	Isoniazide	Pyridoxine : 10mg par jour

Tableau V : Effets indésirables majeurs des médicaments antituberculeux et leurs prises en charge [61]

Effet secondaires	Le ou les médicaments responsable(s)	Prise en charge
Démangeaisons, éruption cutanées	Thiocétazone, Streptomycine	Arrêter le médicament, surtout la Streptomycine, et donner l’Ethambutol
Surdité (si pas de cérumen à l’autopsie)	Streptomycine	Arrêter la Streptomycine, et donner l’Ethambutol
Vertiges (et nystagmus)	Streptomycine	Arrêter la Streptomycine et donner l’Ethambutol
Ictère (à l’exclusion d’autres causes)	Isoniazide, Rifampicine et Pyrazinamide	Arrêter les médicaments et revoir les posologies
Vomissements, états confusionnels (suspicion d’insuffisance hépatique aigue d’origine médicamenteuse)	La plus part des médicaments antituberculeux	Arrêter les médicaments antituberculeux faire en urgence le test de la fonction hépatique et le temps de prothrombine
Troubles visuels (à l’exclusion d’autres causes)	Ethambutol	Arrêter l’Ethambutol
Choc, purpura, insuffisance rénale aigue	Rifampicine	Arrêter Rifampicine

9-2-1. Les régimes standardisés de chimiothérapie et leurs indications

Les régimes de chimiothérapie ont été standardisés dans le but :

- d'uniformiser le traitement de la tuberculose en fonction de la gravité et de la localisation de la maladie.
- d'éviter les traitements « anarchiques » générateurs de résistance bactérienne.
- de faciliter les prévisions de la consommation médicamenteuse par les personnels de santé concernés, et la gestion des stocks.

La standardisation des régimes thérapeutiques obéit aux règles impératives d'administration de la chimiothérapie antituberculeuse, qui sont les suivantes :

- Administration des médicaments en association,
- Doses optimales calculées en fonction du poids des malades,
- Ingestion des médicaments oraux à jeun, ou deux heures après un petit déjeuner léger,
- Régularité de la prise quotidienne des médicaments qui doit être directement supervisée au chargé de traitement TB, au moins durant la phase initiale du traitement (sinon pendant toute la durée du traitement lorsque la phase de continuation contient de la rifampicine)

❖ Les régimes standardisés de première ligne :

Ils s'appliquent à la grande majorité des malades, soit en première intention (primo-traitement), soit en seconde intention (retraitement).

✓ Le régime 2 RHZE/4 RH :

Le régime 2 RHZE/4RH est le régime de primo-traitement utilisé au Mali depuis le 1^{er} janvier 2009. Il comporte une phase initiale intensive de deux mois avec administration quotidienne de rifampicine (R), d'isoniazide (H), d'éthambutol (E), et de pyrazinamide (Z), suivie d'une phase de continuation de quatre mois avec administration quotidienne de (RH).

Ce régime de primo-traitement s'applique :

Aux malades de la **catégorie I** de traitement, qui sont :

Les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie positive et les cas graves de tuberculose pulmonaire à frottis négatifs qui sont :

- Les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie négative et culture positive,
- Les nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à microscopie négative après au moins 2 séries de 3 examens microscopiques négatifs mais avec extension des lésions radiologiques,
- Les primo infections symptomatiques avec adénopathies médiastinales et opacités pulmonaires,
- Les nouveaux cas de formes sévères de tuberculose extra pulmonaire : méningite, miliaire aiguë, tuberculose vertébrale, rénale et péricardique et les patients devant subir la chirurgie à cause des séquelles de la tuberculose thoracique.

✓ **Le régime standardisé de retraitement : catégorie II
2SHRZE/1HRZE/5HRE**

C'est un régime de 8 mois qui associe : rifampicine (R), isoniazide (H), pyrazinamide (Z) éthambutol (E) et streptomycine (S), administrés quotidiennement pendant les deux premiers mois, suivis de l'administration quotidienne de, R H, Z et E, durant le troisième mois, et de l'administration quotidienne de R H et E pendant les cinq derniers mois.

Ce régime ne s'applique qu'à moins de 10% des malades atteints de tuberculose pulmonaire à bactériologie positive. Ces malades sont classés dans la catégorie II de traitement, qui comporte 3 sous groupes :

- **Les rechutes de tuberculose pulmonaire déjà traitées** par le régime de première ligne :

Il s'agit des cas de tuberculose pulmonaire déjà traités par le régime de première ligne, déclarés guéris ou traitement terminé et qui présentent à nouveau une tuberculose pulmonaire évolutive prouvée par deux examens bactériologiques positifs (microscopie ou culture) ou par une détérioration radiologique avec un seul examen bactériologique positif.

- **Les échecs du traitement de première ligne :**

Ces échecs concernent :

- Les malades dont les frottis d'expectoration demeurent ou redeviennent positifs à l'examen microscopique direct cinq mois ou plus après le début du traitement,

- Les malades dont les frottis d'expectoration sont négatifs avant le traitement et qui sont devenus positifs au cours du traitement entre le deuxième et le cinquième mois en dépit d'une administration correcte des médicaments,

- Les reprises évolutives marquées par la réapparition des bacilles dans l'expectoration des malades qui ont prématurément interrompu leur traitement de première ligne pendant une durée de deux mois consécutifs ou plus après avoir reçu un mois de traitement ou plus.

Ce retraitement ne s'applique donc qu'aux malades qui ont reçu un traitement de première ligne (complet ou incomplet) et qui expectorent à nouveau des bacilles, décelés par l'examen microscopique ou par la culture.

✓ **Le régime de la catégorie III** de traitement :

Ce régime concerne :

- Les malades porteurs de lésions pauci-bacillaires,

- les cas de primo-infection avec adénopathie hilare ou médiastinale sans lésion pulmonaire visible,

- les cas de tuberculose pulmonaire à frottis négatif et extra-pulmonaire courants et simples : tuberculose pleurale, ganglionnaire périphérique, péritonéale à forme ascitique, osseuse et ostéo-articulaire des membres, hépatique, génitale ou cutanéomuqueuse.

Tableau VI : Les médicaments antituberculeux de seconde ligne utilisés au Mali depuis 2009 [66].

Médicaments de réserve	Abréviation	Posologie quotidienne mg/kg	Forme, dosages	Voie d'administration
Kanamycine	Km	15 (10-20)	Ampoule 1	injectable
Ofloxacin	Ofx	10 (8-12)	g	orale
Protionamide	Pto	15 (12-18)	Cp 250mg	orale
Ciclosérine	C	15 (10-15)	cp250mg	orale
Pyrazinamide	Z :	25(20-30)	cp 250mg Cp 400mg	orale

Tableau VII : Les catégories de traitement et les régimes de chimiothérapie correspondants [66].

Catégorie de traitement	Groupes de malade	Régimes de chimiothérapie	
		Phase initiale	Phase d'entretien
I	<ul style="list-style-type: none"> .Nouveaux cas de TP à frottis positif . Nouveaux cas de TP à culture positive seulement . Nouveaux cas de TP à frottis négatif mais à lésions parenchymateuses évolutives (non cavitaires) . Primo infection avec opacité pulmonaire . Formes sévères de TP et de TEP 	2 RHZE	4 RH
II	<ul style="list-style-type: none"> . Cas de TP déjà traités par un primo traitement . Rechute .Reprise évolutive après interruption prématurée . Echec 	2RHZES+ 1RHZE	5 RHE
III	<ul style="list-style-type: none"> . Primo infection symptomatique sans opacité pulmonaire, .Nouveaux cas de TP à frottis négatif mais à lésions parenchymateuses peu étendues .Formes communes de TEP (Adénopathies périphériques, Pleurésies, ascite, tuberculose osseuse) Chirurgie des séquelles de la tuberculose thoracique 	2RHZE	4 RH
IV	<ul style="list-style-type: none"> . Cas chroniques (après échec ou rechute du traitement de la catégorie II). . Cas de TP à bacilles multi résistants 	Régimes standardisés ou individualisés de 2 ^{ème} ligne	

✓ **Le régime de seconde ligne.**

Ce régime s'adresse principalement aux malades qui ont reçu un régime de retraitement standardisé, sous supervision stricte et qui, au cinquième mois de traitement ou plus tard, demeurent des « cracheurs chroniques persistants » de bacilles, c'est à dire qu'ils présentent trois examens microscopiques successifs positifs sur des échantillons d'expectoration recueillis à une semaine d'intervalle (Catégorie IV).

Ces malades, peu nombreux, représentent moins de 3% de l'ensemble des cas de tuberculose pulmonaire à bactériologie positive au Mali. Ils sont généralement porteurs de bacilles résistants et dans plus des deux tiers des cas, de bacilles multi résistants, à l'isoniazide et à la rifampicine au moins. Le régime de deuxième ligne s'adresse aussi à tout malade identifié comme porteur d'une souche bacillaire multi résistante, à l'isoniazide et à la rifampicine au moins. Le régime de deuxième ligne peut être standardisé ou individualisé.

❖ **Le traitement de seconde ligne standardisé comporte :**

- **Une phase initiale** durant au moins 3 mois (et toujours jusqu'à la négativation bactériologique obtenue pendant 2 mois consécutifs) comportant quatre médicaments de réserve : kanamycine, ofloxacine, éthionamide, cyclosérine, et le pyrazinamide, qui font partie des médicaments essentiels.

Ils sont utilisés dans ce régime en raison de la persistance habituelle de son activité et de son action synergique avec la kanamycine.

- **Une phase d'entretien** de 18 mois au moins comportant l'administration quotidienne des 3 médicaments les mieux tolérés habituellement : ofloxacine, éthionamide, et le pyrazimide

(Tableau V).

Tableau VIII : Le régime standardisé de seconde ligne [66].

Phase initiale		Phase d'entretien	
Médicaments	Durée moyenne	Médicaments	Durée optimale
- Ethionamide -Ofloxacin- -Kanamycine -Pyrazinamide - Cyclosérine	4-6 mois	- Ethionamide - Ofloxacin - Pyrazinamide	18 mois après la négativation bactériologique

Le traitement de seconde ligne peut être individualisé si l'on dispose des résultats du test de sensibilité aux antituberculeux, fait au début du retraitement ou du traitement de 2^{ème} ligne, c'est à dire vers les 3^{ème}- 4^{ème} mois d'un « retraitement » standardisé, on peut modifier le traitement standardisé. La décision de modifier le traitement standardisé est prise au cas par cas (en fonction des résultats du test de sensibilité) par le médecin spécialiste en charge du malade, qui fait partie du groupe spécial chargé d'évaluer les résultats du traitement des cas chroniques au niveau national, en liaison avec le laboratoire national de référence des mycobactéries.

9-2-2.Place des traitements adjuvants

Dans certaines localisations, on peut être amené à associer un traitement adjuvant, médical ou chirurgical.

- Traitement médical

Il s'agit le plus souvent d'une **corticothérapie** administrée par voie orale à la dose de 0.5 mg/kg/jour, que l'on associe à la chimiothérapie pendant 3 à 6 semaines, dans les localisations extra-pulmonaires, pauci-bacillaires mais très inflammatoires (méningites, pleurésies, ascites, péricardites, primo-infection avec opacité segmentaire ou lobaire, adénopathie périphérique volumineuse pseudo lymphomateuse, d'étiologie tuberculeuse prouvée).

Il peut s'agir aussi de ponction d'une adénite ou d'un abcès froid sous-cutané suivi d'injections de streptomycine in situ. Il peut s'agir enfin de ponctions pleurales évacuatrices répétées associées à une kinésithérapie respiratoire précoce ou des ponctions évacuatrices d'ascite tuberculeuse.

- Traitement chirurgical

Un traitement chirurgical complémentaire peut être associé à la chimiothérapie pour des raisons fonctionnelles ou esthétiques dans certaines localisations :

- Thoracique (pariétale, pulmonaire pleurale, médiastinale ou péricardique). En cas de nécessité, on peut être amené à poser l'indication d'une exérèse devant une tuberculose pulmonaire localisée, à bacilles résistants.
- Extra-thoracique (abcès froid, adénopathies, persistantes après traitement complet, tuberculoses ostéo-articulaires ou urogénitales) [66].

❖ Observance du traitement :

Modalités de surveillance: il faut

- ✓ S'assurer de la régularité du malade (bonne supervision ; éducation sanitaire)
- ✓ Adapter la posologie en fonction du poids ;
- ✓ Détecter d'éventuels effets secondaires ;
- ✓ Apprécier l'efficacité d'un traitement, essentiellement par des examens bactériologiques dont les échéances sont pour le régime de 6 mois :

Tableau IX : Enregistrement des résultats normalisés du traitement des cas de tuberculose à frottis positifs [60].

Guérison	Malade donnant des frottis négatifs à la fin ou à un mois de la fin du traitement, ainsi qu'une autre fois avant ce dernier
Traitement complet	Patient qui a terminé son traitement mais pour lequel on ne dispose pas des résultats des examens des frottis d'expectoration à au moins deux occasions avant la fin du traitement.
Echec	Malade donnant toujours ou de nouveau des frottis positifs après cinq mois ou plus du traitement
Traitement interrompu (abandon)	Malade ayant interrompu son traitement pendant deux mois ou plus
Transfert	Patient transféré vers une unité de soins relevant D'un autre district et pour lequel on ignore le Résultat du traitement
Décès	Patient mort en cours de traitement, quelle que Soit la raison du décès

Pour ces cas de patients (tuberculose extra pulmonaire et pulmonaire) à frottis négatifs, il est impossible d'évaluer si le traitement a réussi ou échoué ; car les indicateurs de résultats dépendent de l'examen des frottis d'expectoration. Pour ces patients, on notera toute fois dans le registre du district les indications suivantes : traitement complet ; décès ou transfert.

9-2-3. Traitement antituberculeux chez les patients infectés par le VIH

Les catégories de traitement obéissent aux mêmes critères quel que soit le statut du malade par rapport au VIH. En général, la chimiothérapie est identique sauf pour l'utilisation de la thioacetazone à laquelle on attribue un risque élevé de réaction cutanée grave, voire mortelle, chez le patient infecté par le VIH. Il arrive que le traitement disponible le plus efficace comporte de la thioacetazone. Lorsqu'on ne peut l'éviter, il est essentiel d'avertir les malades sur le risque de réactions cutanées graves. Il faut absolument leur conseiller d'arrêter la thioacetazone immédiatement et de venir consulter dans un service de santé si un prurit ou une réaction cutanée apparaissent [67].

Il existe des interactions médicamenteuses entre Inhibiteurs Non Nucléosidique de la Transcriptase Inverse (INNTI) ou les Inhibiteurs de la Protéase (IP) et la rifampicine. La névirapine (NVP) n'est pas recommandée en raison de son hépato-toxicité additive à celle des antituberculeux. L'efavirenz (EFZ) sera préféré parmi les Inhibiteurs Nucléosidique de la Transcriptase Inverse (INTI) : Zidovudine (AZT) + Lamivudine (3TC) ou Entricitabine (FTC) + Efavirenz (EFV).

Lorsque la tuberculose est révélatrice d'une infection à VIH il faut commencer d'abord par le traitement antituberculeux puis les ARV dès que possible dans 7 à 10 jours [67].

CHAPITRE II : TRAVAIL EXPERIMENTAL

I.METHODOLOGIE

1. Type, Cadre et lieu d'étude

Nous avons réalisé une étude rétrospective transversale entre Janvier 2006 et Décembre 2012 au centre de recherche et de formation sur le VIH et la Tuberculose (CEREFO/SEREFO). Les patients provenaient des centres de santé de référence (CS.Réf) des six communes du district de Bamako et du service de pneumo-phtisiologie du centre hospitalier universitaire (CHU) du point-G.

SEREFO est une initiative de recherche biomédicale entre les instituts nationaux de la santé aux Etats Unis d'Amérique (NIH-NIAID) et l'Université des Sciences, Techniques et Technologies de Bamako, Mali. SEREFO a été officiellement inauguré le 6 mars 2006.

La principale mission du programme SEREFO est de mener des activités de recherches pointues et durables afin d'améliorer la santé de la communauté Malienne et internationale en : conduisant la recherche durable en clinique et en biologie sur les maladies bactériennes et virales avec un accent particulier sur l'immunologie et la biologie moléculaire du VIH, et de *Mycobacterium tuberculosis*.

SEREFO collabore avec tous les CS.Réf des six communes du district de Bamako, ARCAD /SIDA-CESAC et le service de pneumo-phtisiologie du CHU du point G pour le recrutement des patients dans les différentes études.

SEREFO possède 3 principaux laboratoires :

- Le laboratoire d'immunologie : est un laboratoire de dernière génération qui soutient des études complexes visant à mieux comprendre le système immunitaire de l'homme et la pathogénie de la maladie.

- Le laboratoire de tuberculose de SEREFO est composé d'un laboratoire de biologie moléculaire et d'un laboratoire de Biosécurité Niveau 3 (BSL-3) qui nous permet de faire la culture et l'identification des agents bactériologiques fortement infectieux comme par exemple les mycobactéries.
- Le laboratoire de Virologie qui s'occupe essentiellement de la charge virale des patients infectés par le VIH/SIDA et aussi le séquençage pour les échecs de traitement.

Lieu de recrutements des patients :

Le service de pneumo- phtisiologie du CHU du point G qui est la référence dans la prise en charge de la tuberculose au Mali.

Il est situé au sud - est de l'entrée principale du CHU et comprend :

- cinq (05) bureaux de consultation pour les médecins.
- un (01) bureau pour le major
- une (01) salle pour les internes
- deux (02) bureaux pour les infirmiers dont un à l'étage
- une (01) salle de fibroscopie bronchique et de biopsie pleurale
- une (01) salle des archives
- deux (02) salles de soins
- deux (02) salles pour le centre de pour les cliniciens de SEREFO dont une pour les prélèvements et l'observation des malades co-infectés et l'autre pour la réception des malades
- une (01) salle pour les techniciens de surface
- deux (02) magasins de stockage de médicaments antituberculeux et de matériels médicaux.
- et une unité de prise en charge des malades atteints de TB-MR.

Il comporte 67 lits d'hospitalisation dont 20 au rez-de-chaussée pour les malades non tuberculeux, 32 à l'étage occupés par les tuberculeux bacillifères, et 15 lits pour les malades MDR.

Les activités du service de pneumo phthysiologie sont représentées par :

- Les soins curatifs :
 - Consultations externes et la prise en charge des patients hospitalisés
 - Examens spécialisés tels que la biopsie pleurale et la fibroscopie bronchique
 - Formation des internes: staff, réunion scientifique et bibliographie.
- La lutte antituberculeuse se caractérise par :
 - le dépistage des malades
 - la prise en charge des malades
 - le suivi des malades (clinique, biologique et radiologique)
 - le recensement et la recherche des perdus de vue
 - l'application de l'intradermo- réaction à la tuberculine
 - la prise en charge des TB-MR

2. Echantillonnage

Compte tenu du caractère rétrospectif de cette étude, nous avons enregistré tous les cas d'infection par le complexe *M.tuberculosis* qui ont bénéficié d'une culture des mycobactéries et le spoligotypage pendant la période d'étude.

L'échantillonnage était composé par l'ensemble des malades tuberculeux des différentes études de SEREFO entre Janvier 2006 et Décembre 2012.

- Critères d'inclusions :

Elle consistait à recenser tous les malades tuberculeux qui ont été enrôlés dans les différentes études de SEREFO et dont les résultats de la culture, du spoligotypage et ou des tests de sensibilité aux antituberculeux étaient disponibles et qui répondait aux critères d'inclusion de cette étude :

- Etre âgé de 18 ans au moins
- Avoir un taux d'hémoglobine supérieur ou égal à 8 g/dl
- Etre suspect de tuberculose ou patient sous traitement antituberculeux quelle que soit la durée,

- Donner son accord pour garder les échantillons et de les réutilisés pour des futures recherches,
- Donner son accord d'être prélevé pour le dépistage du VIH,
- Donner son accord volontaire du consentement écrit et éclairé avant d'être enrôlé dans l'étude.

- Critères de non inclusion :

N'ont pas été inclus dans cette étude tout autre patient qui ne répondait pas aux critères cités ci dessus.

- Plan de collecte des données :

La collecte des informations a été faite au service de pneumo-physiologie du CHU point-G à l'aide des dossiers des patients, avec un consentement éclairé et écrit des malades. Les malades étaient examinés d'abord et les échantillons prélevés étaient envoyés à SEREFO pour analyse.

Ils s'agissaient d'une série de deux crachats à un, deux ou trois jours d'intervalles et de 5ml de sang.

3. Matériels et Méthodes

3-1. Matériels

Les données cliniques et sociodémographiques des patients étaient recueillies sur des questionnaires individuels en papiers et transférées sur ordinateur sur fichiers Excel.

Chaque patient avait un dossier avec numéro.

Les échantillons de crachats étaient recueillis dans une boîte en plastique fermée et le sang était collecté dans les tubes de stockage de sérum 5ml (SST) (BD Vacutainer ® plus, Becton 17 K2EDTA, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

3-2. Méthodes de laboratoire

A SEREFO, tous les échantillons ont été examinés : le sang pour le dépistage du VIH et les crachats pour le diagnostic de la tuberculose.

A. Dépistage du VIH

Pour le dépistage du VIH, tous les patients ont été examinés selon l'algorithme suivant :

- D'abord le Détermine® ou test rapide (Détermine® HIV-1/2, Abbott Laboratoires, Matsudo-Shi, Chiba, Japan) et quelque soit le résultat on réalisait ensuite le test ELISA/Genscreen Ultra (Genscreen, HIV-1/2 version 2 Assay, Bio-Rad Laboratories, Marnes – La Coquette, France).

Après ces deux tests, tous les résultats positifs étaient confirmés par le Western Blot (New Lav Blot I and II, Bio-Rad Laboratories, Marnes – La Coquette, France).

B. Diagnostic de la tuberculose

B-1. Culture et identification des mycobactéries

La technique de culture utilisée a été la combinaison des deux types de milieux, le milieu solide et le milieu liquide. Dans le BSL-3, les échantillons de crachats étaient étiquetés, puis analysés pour la recherche des bacilles tuberculeux. Puis on procédait à la décontamination, digestion, centrifugation, concentration, microscopie et la mise en culture de tous les échantillons.

Les échantillons étaient traités suivant le mode opératoire standard de digestion, de décontamination avec l'hydroxyde de sodium et le N-acétyle L-cystéine pendant 15 minutes. Ensuite on effectue la neutralisation avec le phosphate buffer à pH neutre (6.8 ± 0.2) et enfin la centrifugation à haute vitesse (3000 g) pendant 15 minutes à 4 °C.

Après centrifugation, une partie du culot était utilisée pour faire des lames colorées à l'Auramine/Rhodamine (BBL™ Becton Dickinson, Sparks MD, USA) pour une lecture au microscope à fluorescence et le reste utilisé pour ensemercer les deux milieux de culture : le milieu solide Middlebrook® 7h11 Agar (Thermo Fisher Scientifique, Lenexa, KS, USA) et le milieu liquide MGIT® (MGIT® ; BBL™ MGIT™ Becton Dickinson, Sparks, MD, USA).

Les cultures étaient mises en incubation pour une période totale de 6 semaines ou 42 jours dans les incubateurs à 37 °C et 7% CO₂ et étaient examinées au moins une fois par semaine pour voir s'il n'y a pas de croissance des mycobactéries qui signifiait la positivité.

Les cultures positives étaient confirmées par les colorations de Kinyoun (Remel Inc, Lenexa, KS 66215, US) et d'Auramine Rhodamine qui montraient des bacilles fins rouges en forme de bâtonnet que sont les mycobactéries au microscope à fluorescence. Ensuite on procédait à l'identification des mycobactéries.

Cette identification a été faite par le GenProbe Accuprob® (Genprobe AccuProbe® GenProbe, San Diego, CA, USA) et permettait d'éliminer les mycobactéries non tuberculeuses.

B-2. Test de sensibilité des MTB aux médicaments (DST = Drug Susceptibility Testing) antituberculeux de première ligne :

Les tests de sensibilité ou antibiogrammes sont utilisés pour déterminer la sensibilité ou la résistance d'une souche bacillaire d'un malade aux différents antituberculeux. Ici la méthode indirecte d'AST/SIRE (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) contenant 0,8 µg/ml de Streptomycine, 0,1 µg/ml d'Isoniazide, 1,0 µg/ml de Rifampicine et 3,5 µg/ml d'Ethambutole a été utilisée.

B-3. Spoligotypage :

Le spoligotypage a été utilisé pour le typage des souches de mycobactéries isolées. C'est la méthode la plus souvent utilisée pour le typage moléculaire des souches du complexe *M.tuberculosis* (CMT).

Le spoligotypage « **spacer-oligo-nucleotide-typing** » repose sur la détection des séquences courtes répétées (spacers) de la région Direct Repeat (DR) du génome du CMT.

Le spoligotypage a été réalisé comme décrit par le fabricant [68]. Son principe consiste en l'extraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) puis à l'amplification de la région DR par la PCR suivi d'une hybridation sur une membrane.

La présence ou l'absence des 43 **spacers** était révélée après développement sur film radiologique. L'analyse et la détermination des sous-types du CMT ont été effectuées par comparaison avec la banque de données internationale SPOTCLUST.

4. Traitement et Analyse des Données

Les données ont été recueillies sur des questionnaires individuels et reportées sur fichier Excel et analysées sur Prism, Graph Pad v.2012.

Le test qualitatif de χ^2 a été utilisé pour déterminer s'il y avait une différence significative entre les différentes proportions.

Le risque alpha de 0,05 a été déterminé pour dire qu'il y'a une différence significative entre les proportions.

Les Variables mesurées étaient l'âge, le sexe, la profession, le statut VIH, le résultat bactériologique (culture et identification des mycobactéries), le résultat de l'antibiogramme des médicaments de la première ligne de la tuberculose, et le résultat du spoligotypage.

5. Considérations Ethiques et Morales

Tous les résultats issus de cette étude ont été obtenus grâce à des protocoles validés préalablement par deux comités d'éthiques, le comité d'éthique de la FMPOS, Bamako ; Mali et par l'IRB (International Review Board) du NIH-NIAID aux Etats Unis d'Amérique.

Les participants ont tous signé un consentement éclairé de façon autonome avant leur inclusion. Les participants avaient le choix de se retirer de l'étude s'ils le souhaitaient à n'importe quel moment sans que cela n'entraîne aucun inconvénient sur leur suivi et leur traitement par les médecins investigateurs.

En signant le consentement, ils acceptaient volontiers que leurs résultats et les échantillons soient utilisés pour d'autres recherches.

La confidentialité a été respectée par l'anonymat des échantillons et l'archivage des dossiers dans une armoire fermée à clé limitant l'accès aux personnels autorisés.

II. RESULTATS

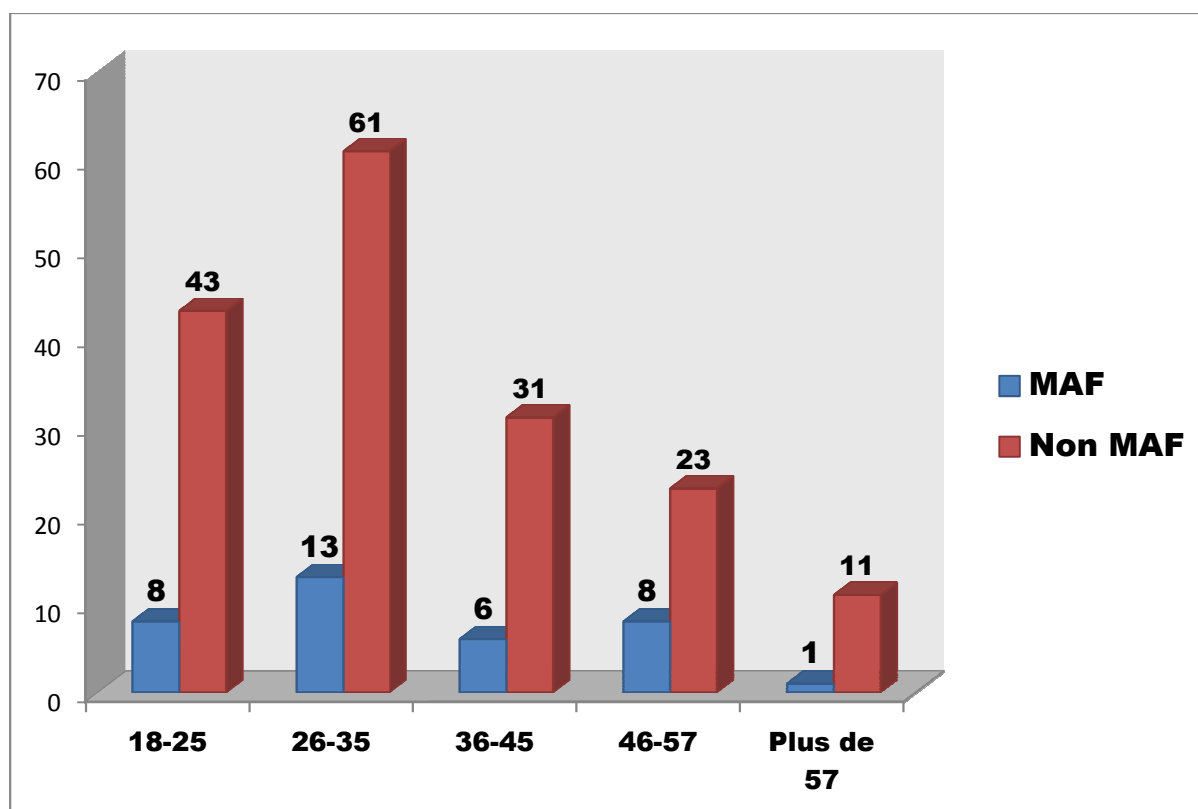
1. Résultats globaux

Nous avons recensé 205 cas de tuberculoses toutes formes confondues au cours de notre étude. L'infection à *Mycobacterium africanum* a été retrouvée chez 36 patients dans cette population soit une fréquence de **17,56%**.

1-1. Les caractéristiques socio démographiques :

1-1-1. Age

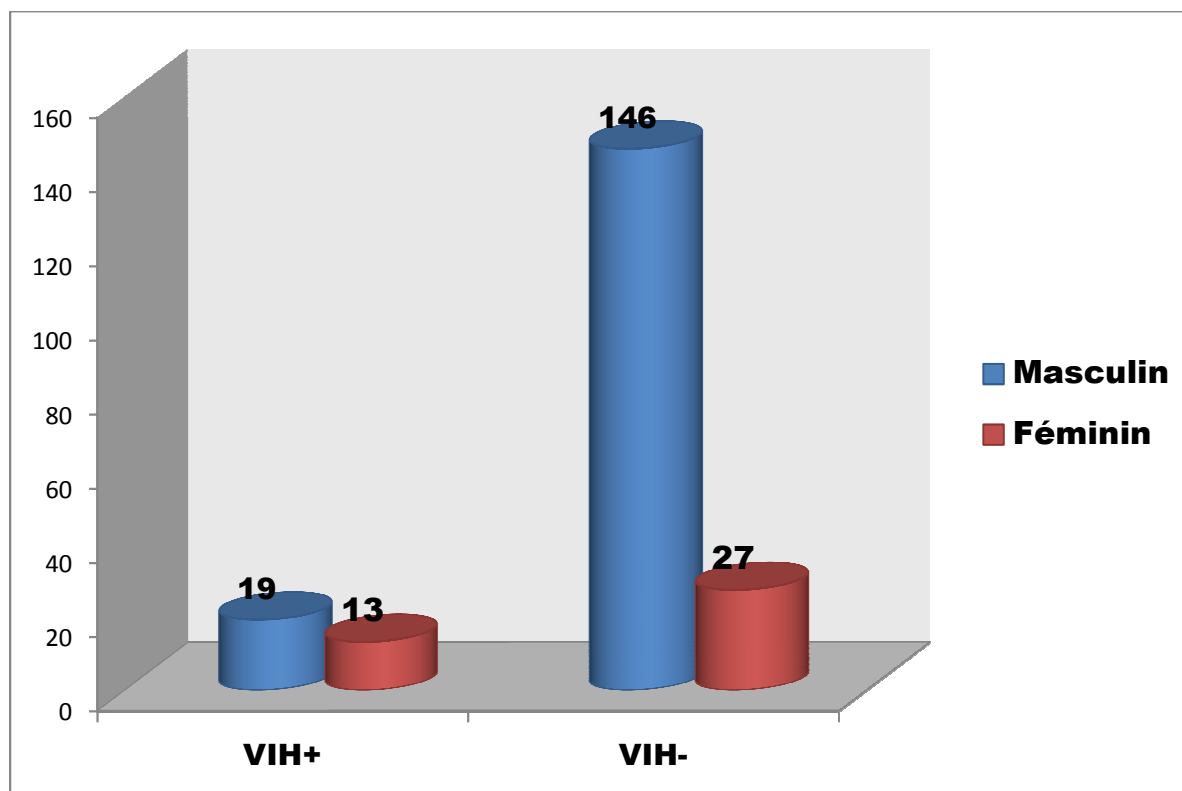
Figure 10 : Répartition des patients en fonction de l'âge.



La tranche d'âge de **26-35 ans** était la plus représentée aussi bien chez les patients infectés par MAF (36,11%) que ceux infectés par les autres mycobactéries du CMT (36,10%).

1-1-2.Relation Sexe et statut VIH :

Figure 11 : Répartition des patients en fonction du sexe et statut VIH.



Le sexe ratio (H/F) a été de 4,1 en faveur des hommes.

La co-infection VIH/TB a été retrouvée chez 32 de nos patients soit une fréquence de **15,61%** et nous avons observé qu'elle était plus représentée chez les femmes ($p < 0,0088$).

1-1-3.La profession

Tableau X : Répartition des patients en fonction de la profession

Profession	MAF	Non MAF
Fonctionnaire d'état	2(5,71%)	9(5,49%)
Profession libérale	10(28,57%)	53(32,32%)
Commerçants	8(22,86%)	46(28,05%)
Elève /Etudiants	4(11,43%)	25(15,24%)
Ménagères	2(5,71%)	11(6,71%)
Marchant ambulants	3(8,57%)	10(6,10%)
Cultivateur/Paysans	6(17,15%)	9(5,49%)
Sans Profession	0(0%)	1(0,60%)
Total	35(100%)	164(100%)

La majorité de nos patients étaient de profession libérale, parmi ceux-ci **28,57%** et **32,32%** avaient respectivement une infection MAF et CMT (Pas MAF). Chez 6 patients de notre étude, l'information sur la profession n'a pas été retrouvée.

1-1-4.Résidence/Provenance :

Tableau XI : Répartition des patients en fonction de la provenance

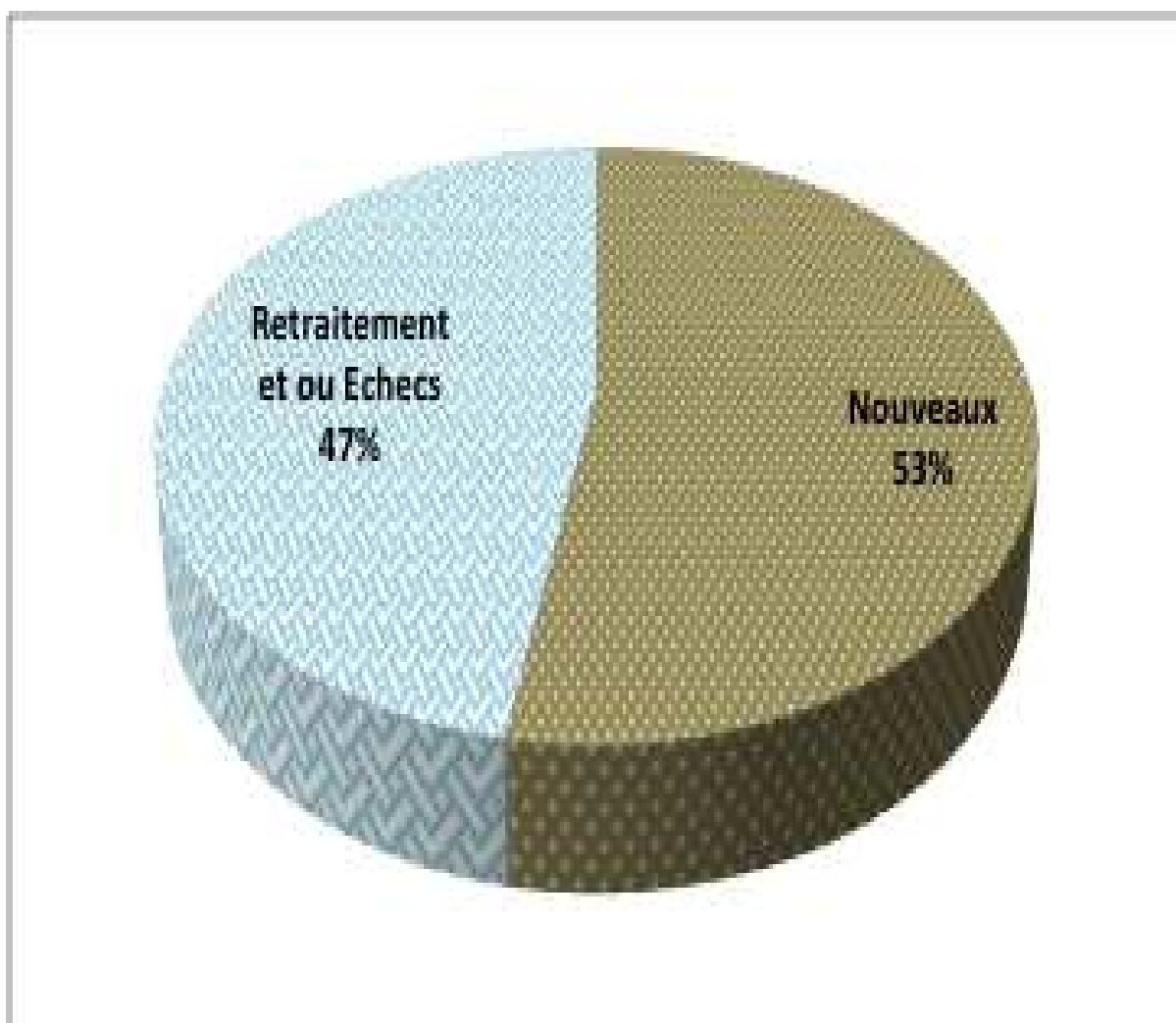
Provenance	MAF	Non MAF
Kayes	0(0%)	1(0,60)
Koulikoro	0(0%)	7(4,22%)
Sikasso	0(0%)	1(0,60)
Ségou	1(2,94%)	2(1,20%)
Mopti	1(2,94%)	3(1,81%)
Tombouctou	0(0%)	0(0%)
Gao	0(0%)	0(0%)
Kidal	0(0%)	0(0%)
Bamako	32(94,12%)	148(89,16%)
Hors Mali	0(0%)	4(2,41%)
Total	34(100%)	166(100%)

La majorité des patients résidait à Bamako-District (94,11%). La provenance chez 8 de nos patients n'a pas été retrouvée.

2. Résultats de la culture, identification et tests de sensibilité des Mycobactéries

2-1.Catégorie des malades

Figure 12 : Répartition des malades en fonction de type de patient tuberculeux.

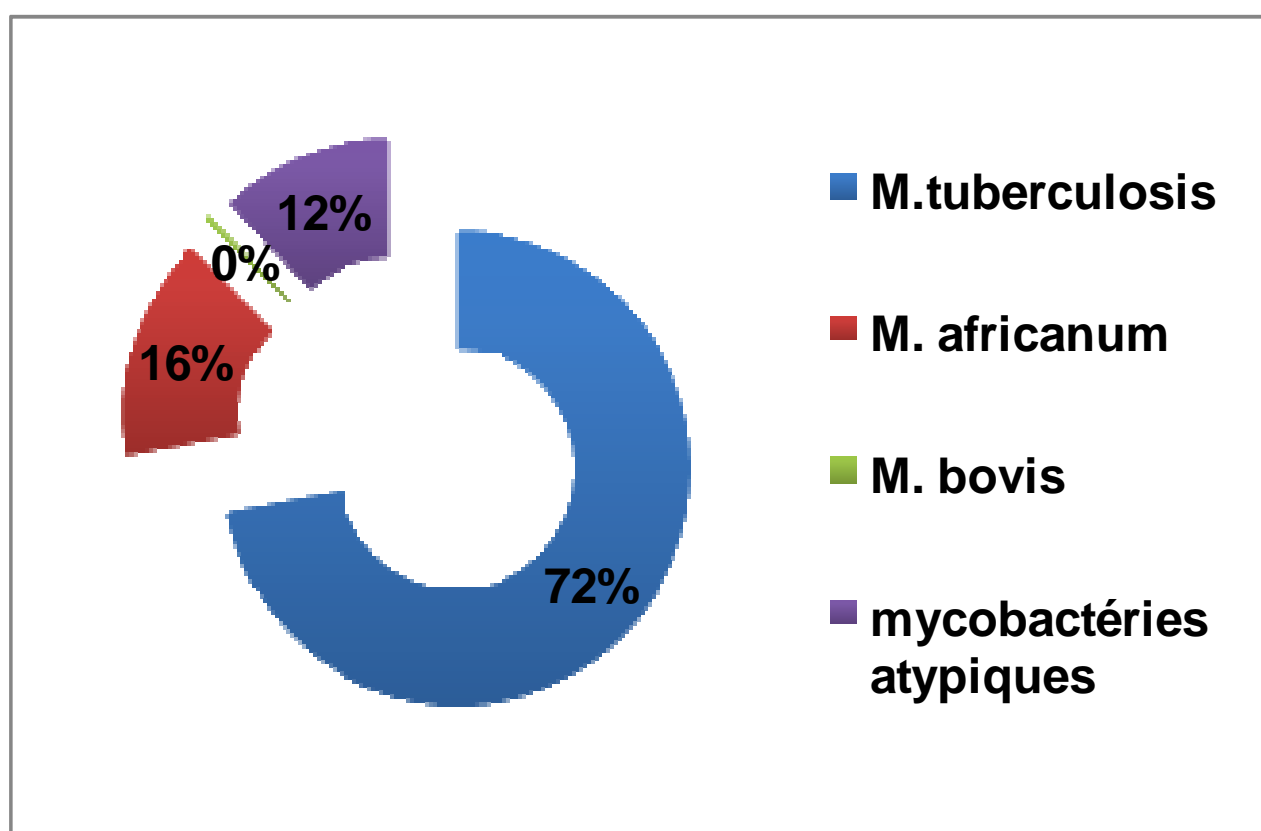


La distribution des patients entre nouveaux et retraitement et/ou échecs était presque égale **53% contre 47%**.

2-2.Prévalence globale des différentes souches de mycobactéries isolées

Nous avons recensé 205 cas du complexe tuberculosis et 28 cas de la forme atypique ceux qui fait au total 233 patients.

Figure 13 : Répartition des patients en fonction des différentes souches de mycobactéries retrouvées.

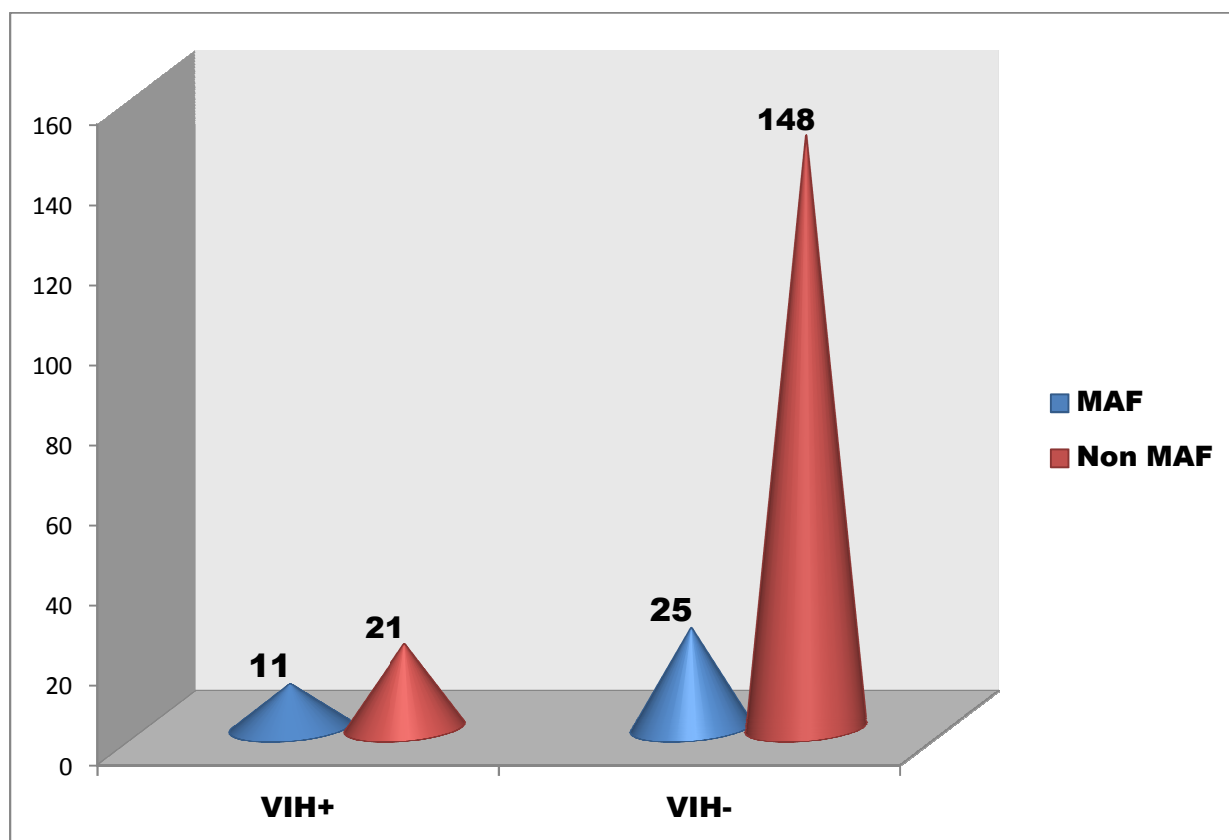


L'infection par *Mycobacterium tuberculosis* a été la plus retrouvée avec une fréquence de 72%.

L'infection à MAF venait en deuxième position avec 16%.

3. Relation *M.africanum* et l'infection par le VIH

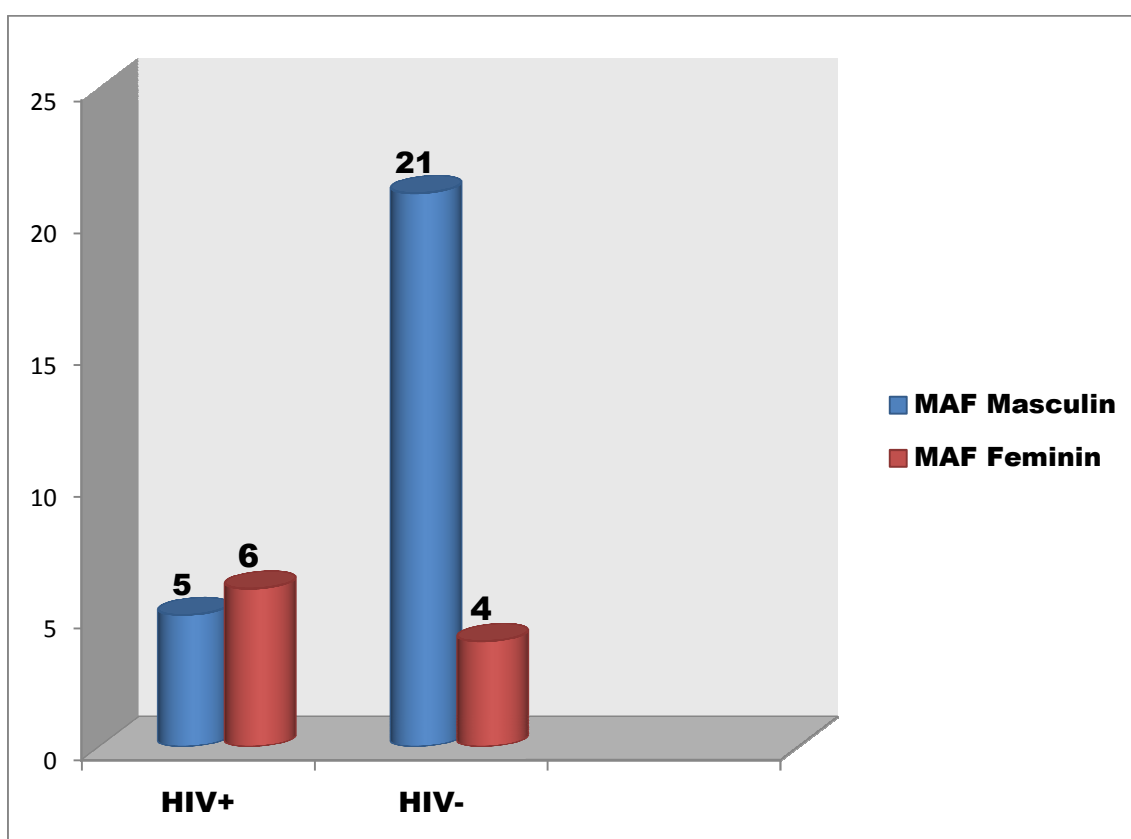
Figure 15 : Répartition des patients en fonction de la souche de mycobactérie et du statut VIH.



La co-infection tuberculose/VIH a été la plus retrouvée chez les patients infectés par *M.africanum* ($p < 0,009$).

4. Rélation *M.africanum*, Sexe et l'infection par le VIH

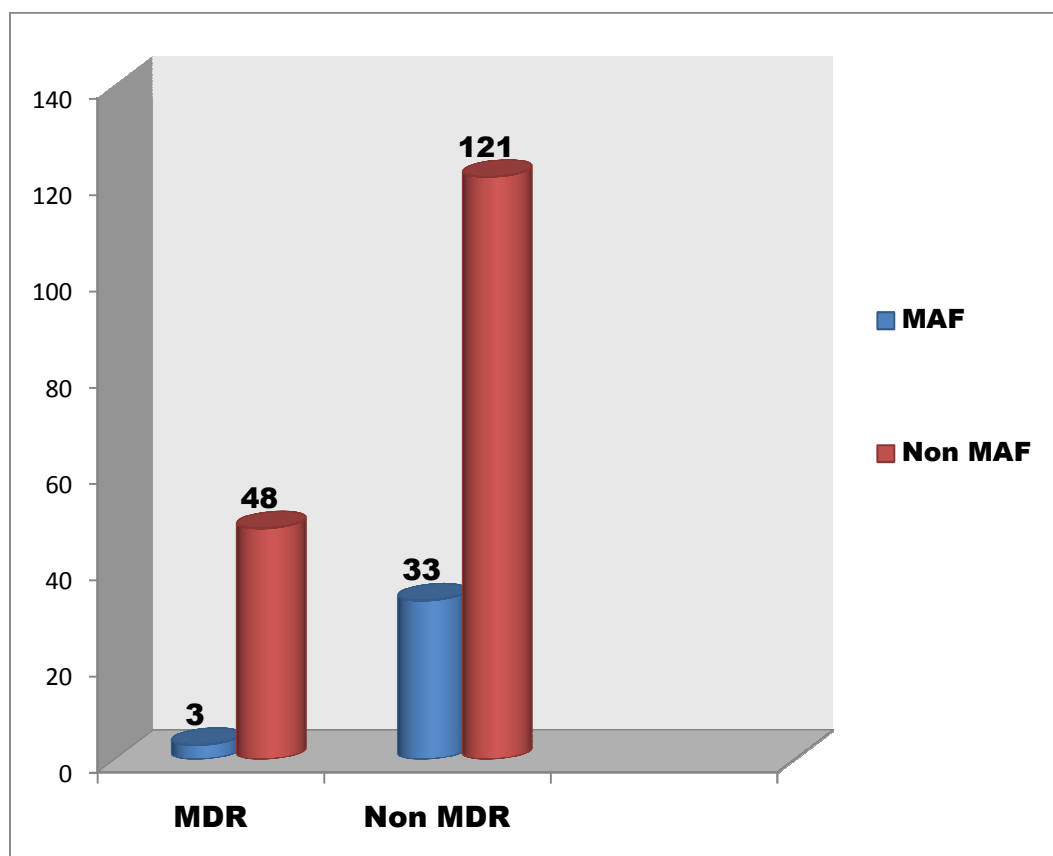
Figure 16 : Répartition des patients infectés par *M.africanum* en fonction du sexe, et du statut VIH.



Les patients de sexe féminin infectés par *M.africanum* étaient co-infectés au VIH par rapport aux autres patients.

5. Relation *M.africanum* et la TB-MR

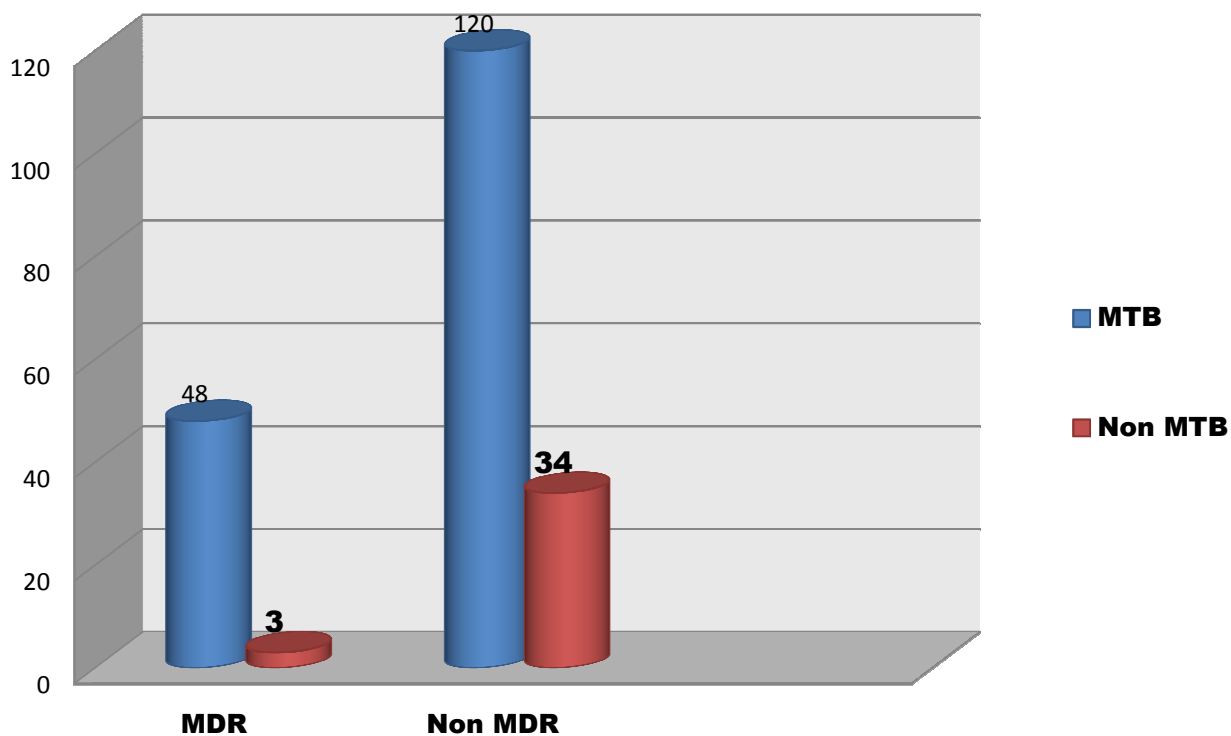
Figure 17 : Répartition des patients en fonction des résultats des tests de sensibilité aux antituberculeux.



La tuberculose Multi- résistance (TB- MR) a été observée chez 51 patients soit une prévalence de 24,87%, et nous avons observé qu'il y avait une faible prévalence de l'infection à *M.africanum* parmi ce groupe de patients (3/51) soit 5, 88% ($p < 0,01$). La prévalence de la TB-MR chez les nouveaux patients n'était que de 1,6% (2/123).

6.Rélation *M.tuberculosis* et TB-MR

Figure 18 : Répartition des patients en fonction des résultats des tests de sensibilité et de la souche de *Mycobactérium tuberculosis*.



Nous avons observé que parmi les cas de TB MR, **94,11%** des patients étaient infectés par *Mycobacterium tuberculosis* ($p < 0,01$).

III- DISCUSSIONS

1. Limite et Difficultés de l'étude

Malgré les résultats obtenus, notre étude présente des limites qui sont :

- La première limite se situe au niveau du test et la lecture du spoligotypage. Il est connu officiellement que c'est une technique qui présente 5% de faiblesse de diagnostic correct par rapport aux autres techniques moléculaires.
- Les autres difficultés ont été rencontrées au niveau du suivi du malade sous traitement et son évaluation à la fin du traitement.
- Un échantillon beaucoup plus large comprenant les malades des différentes régions du Mali pourrait mieux préciser la prévalence de l'infection à *M.africanum* au Mali.

Le spoligotypage est utilisé à travers le monde pour évaluer la distribution des mycobactéries dans les différentes régions.

La connaissance de la distribution des mycobactéries pourrait faciliter la mise en place des mesures de prévention et la lutte contre la maladie tuberculeuse.

Nous avons évalué la distribution de *M.africanum* entre Janvier 2006 et Décembre 2012 et avons démontré que cette mycobactérie était responsable de **17,56% (36/205)** des cas de tuberculose au Mali.

Cette fréquence est comparable aux récentes études effectués dans beaucoup de pays de l'Afrique de l'Ouest en particulier le Ghana (19,75%) [5], le Sénégal (19,2%), la Côte d'Ivoire, la Sierre Leone et le Nigeria respectivement avec, 22%, 18% et 11% [4].

Cette prévalence est très inférieure à celle de la Gambie (38%), du Bénin (48%) et de la Guinée Bissau (51%) [4]. Mais elle reste aussi très supérieure à celle du Burkina Faso (1,7%) [4].

Cette différence dans la distribution de *M.africanum* pourrait être expliquée en partie par le fait que sa distribution change d'une région à une autre et d'un pays à un autre. En plus, nous avons obtenu une plus grande prévalence du sous type II (94%).

Il a été observé en général que le sous type II est plus fréquemment rencontré dans la région occidentale de l'Afrique de l'Ouest et le type I dans sa région orientale.

L'infection à *M.africanum* a été observée de façon sporadique en dehors de l'Afrique de l'Ouest, particulièrement en Allemagne, Angleterre, France, Espagne et les Etats Unis chez les patients atteints de tuberculose pulmonaire et extra-pulmonaire [4].

Mais après des études épidémiologiques, il s'est avéré que ces patients venaient tous de l'Afrique de l'Ouest où bien qu'ils ont été en contact avec une population Ouest Africaine.

La raison pour laquelle, *M.africanum* type II est essentiellement rencontrée en Afrique de l'Ouest, et absente dans les autres parties du monde reste inconnue. Des études plus approfondie sur cette mycobactérie (écologie, structure biochimique) doivent permettre une meilleure compréhension de l'infection à MAF. Cela pourra ouvrir des perspectives vaccinales dans cette partie du monde.

Nous avons observé que la prévalence de l'infection à VIH était plus élevée chez les patients infectés par *M.africanum* que les autres mycobactéries ($p < 0,009$). Cette observation avait été aussi rencontrée en Gambie [69]. En plus les femmes étaient plus exposées à cette co-infection.

La plus grande fréquence de l'infection à *M.africanum* chez les sujets immunodéprimés pourrait s'expliquer par le fait que *M.africanum* est moins virulent en temps normal, mais qu'elle profite d'une immunodépression pour se réactiver. Un échantillon beaucoup plus large est nécessaire pour confirmer ou infirmer cette tendance féminine de la co-infection TB/VIH.

Les souches de *M.africanum* étaient plus sensibles aux médicaments antituberculeux que les autres mycobactéries ($p < 0,01$). Cette faible prévalence de *M.africanum* dans les cas de TB-MR a aussi été reportée presque dans toutes les études de la sous région [4, 5, 6].

Cette faible virulence de *M.africanum* par rapport à *M.tuberculosis* a une conséquence positive pour son hôte (Homme) et pourrait expliquer sa plus grande prévalence chez les sujets immunodéprimés.

Puisque l'hôte immunocompétent résisterait plus facilement à l'infection.

Nous avons observé une faible prévalence de la TB-MR chez les nouveaux patients (1,6%) ce qui démontre globalement la qualité de la prise en charge des patients tuberculeux au Mali.

2. Individuellement

Dans notre étude nous avons rencontré les malades tuberculeux de tous les âges, mais la tranche d'âge de 25 à 35 ans était la plus rencontrée avec 36,11%. Ce qui explique en partie le fardeau de la tuberculose puisque qu'elle touche la population jeune adulte, active et productive. La plus grande majorité des patients venaient de Bamako (94,12%), ceci pourrait s'expliquer par le fait que le seul centre spécialisé dans la prise en charge des cas de retraitements et échecs se trouve à Bamako et les patients doivent se déplacer pour y accéder.

CONCLUSION

RECOMMANDATIONS

1. CONCLUSION

Nous avons mené une étude rétrospective transversale dans le laboratoire de niveau III de sécurité du centre de recherche et de formation sur la tuberculose et le VIH (SEREFO) pour évaluer la fréquence de l'infection tuberculeuse à *M.africanum* au Mali entre 2006 et 2012.

Pendant cette période, 205 cas de tuberculose ont été diagnostiqués à SEREFO. Les patients étaient composés de 53% de nouveaux cas et 47% des cas de retraitement ou échecs. Le sexe ratio a été de 4,1 et la tranche d'âge 26-35 ans était la plus représentée avec 36,11%.

Le spoligotyping a permis de déterminer l'infection par *M.africanum* chez 36 patients soit une prévalence de 17,56%.

La prévalence globale de la TB-MR a été de 24,87%.

Il y avait une faible prévalence de la TB-MR chez les nouveaux patients 1,6% comparée à celle chez les cas de retraitements ou échecs, 44,5%.

Les patients infectés par *M.africanum* répondraient plus au traitement de première ligne que les autres espèces tuberculosis ($p < 0,01$).

La prévalence de la co-infection TB/VIH a été de 15,61% et elle était beaucoup plus observée en cas d'infection tuberculeuse à *M.africanum* ($p < 0,009$).

2. RECOMMANDATIONS

Au terme de notre étude nous formulons quelques recommandations

- Au Ministère de la santé/PNLT
 - Soutenir l'unité de prise en charge de la TB-MR pour une meilleure surveillance de ces patients
 - Eduquer et former les personnels sur la prise en charge de la tuberculose dans les centres de santé et référer les cas d'échec au service de pneumo-phtisiologie du CHU Point-G le plus tôt possible.
- A l'équipe de recherche **CEROFO/SEREF0 et ses Partenaires**
 - Etendre cette étude à un échantillon de plus grande taille comprenant toutes les régions du Mali pour mieux préciser la prévalence de *M.africanum*.
 - Continuer à supporter l'unité de prise en charge de la TB-MR pour le diagnostic et les tests de sensibilités des patients <<cas chroniques>>.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **WHORaport2012**, Global Tuberculosis Control-
http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf, consulté le 14-septembre-1012.
2. **Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, et al.** Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis.* 2010; **16**(8): 1296-9.
3. **Castets M, Boisvert H, Grumbach F, Brunel M, Rist N.** Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note. *Rev Tuberc Pneumol (Paris)* 1968;32:179–184.
4. **De Jong BC, Antonio M, Gagneux S.** *Mycobacterium africanum*-- review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 4(9): e744.
5. **Yeboah-Manu et al.**, 2011 (Ghana); 6(7): e21906.
6. **Traore B. ; Diarra B. ; Dembele B. P. P.**, Molecular strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Bamako, Mali. *Inter J Tuberc Lung Dis* 2012, vol. 16, n° 7, pp. 911-916.
7. **Chretien.J, Marsac.J,** Tuberculose: Abrégés de pneumologie 3ème édition Masson 1990 P : 389-459.
8. **Bouref. P** , Tuberculose : Abrégés de maladies tropicales édition MASSON 1987p :177-183
9. **Dicko. S**, Etude des effets secondaires des médicaments antituberculeux dans les services de médecine interne et de pneumo-physiologie de l'hôpital national du point G à bamako.
10. **Grellet i. Kruse C**, Histoires de la tuberculose : les fièvres de l'ame 1800-1940 Ed. Ramsay, Paris 1983, pp238.
11. **Kallenius G, Koivula T, Ghebremichael S, Hoffner SE, Norberg R, et al**, Evolution and clonal traits of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Guinea-Bissau. *J Clin Microbiol.* 1999;37:3872–3878.

12. **De Jong BC, Antonio M, Awine T, Ogungbemi K, de Jong YP, et al,** Use of spoligotyping and large-sequence polymorphisms to study the population structure of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in a cohort study of consecutive smear positive tuberculosis cases in the Gambia. *J Clin Microbiol* 2009;994-1001.
13. **Mostowy S, Onipede A, Gagneux S, Niemann S, Kremer K, et al,** Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3594–3599.
14. **Castets M,** *Mycobacterium africanum* (author's transl). *Med Trop (Mars)* 1979;39:145–8.
15. **Meissner G, Schroder K,** The so-called African mycobacteria strains from the tropical West Africa. *Zentralbl Bakteriol Orig.* 1969;211:69–81.
16. **Grosset J, Decroix G, Sors C,** Tuberculosis due to *Mycobacterium africanum* in African negroes in the Paris area. *Rev Tuberc Pneumol (Paris)* 1971;35:430–436.
17. **Pattyn SR, Keterew W, Hadgu AG, Van Den Breen L,** Identification and drug sensitivity of tubercle bacilli from Addis Ababa, Ethiopia. *Ann Soc Belg Med Trop.* 1978;58:59–62.
18. **Demers AM, Mostowy S, Coetzee D, Warren R, van Helden P, et al,** *Mycobacterium africanum* is not a major cause of human tuberculosis in Cape Town, South Africa. *Tuberculosis (Edinb)* 2010, 3594-3599.
19. **Diop S, de Medeiros D, de Medeiros G, Baylet R, Sankale M,** Incidence and geographic distribution of *Mycobacterium africanum* in Senegal. *Bull Soc Med Afr Noire Lang Fr.* 1976;21:50–56.
20. **Imada, T,**1985. Deoxyribonucleotic acid relatedness among species strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, and *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, and *Mycobacterium africanum*. *Int. J.Syst.Bacteriol.* 35:147-150.

21. **Rogall, T, T Flohr, and E.C Bottger**, 1990. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. J. Gen. Microbiol. 136:1915-1920.
22. **Hance, A.J. V. GRAND Champ, V.Levy-Frebault D.Lecossier, J. Ranzier, D.Bacart.And B.Gicquel**, 1989. Detection and identification of mycobacteria by amplification of Mycobacterial DNA. Mol. Microbiol.3:843-849.
23. **Van soolingen, D, P.E.W. de Haas, P.W.M.Hermans, D.R.Soli, and J.D.A.Van Ebden**, 1993.Comparison of various repetitive DNA elements as genetics markers for strain differentiation and épidemiologie of *Mycobacterium tuberculosis*.J.Clin.Microbiol. 31:1987-1991.
24. **Soni, H., X.Pan, L.Teeter,J.-M.Musser, and E.A.Graviss**, 2001.Transmission of Dynamics and molecular characherisation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS 6110. J.Clin. Microbiol 39:217-221.
25. **Institut,Pasteur**, Latuberculose Document électronique : www.pasteur.fr/actu/presse/documentation/tuberculose.html, consulté le 8-février-2013.
26. **EPilly Trop Maladies Infectieuses, Tuberculose**, p427 à 438
27. **Epidemiologie Document électronique :** www.fr.wikipedia.org/wiki/tuberculose, consulté le 19-Mars-2013.
28. **Aubry .P**, Latuberculose à l'heure du SIDA Médecine tropicale : <http://medecinetropicale.free.fr/cours/tuberculose et SIDA.htm>, consulté le 24-Mars-2013.
29. **OMS**, organization Mondiale de la santé. Rapport 2012 sur la lutte contre la tuberculose dans le monde/www.who.int/tb/publications/global_2012 consulté le 24-Mars-2013.

30. **Mokhtar.T**, Les méthodes simplifiées du diagnostic bacteriologiques de la tuberculose. Rev-Alger des sciences médicales 1983 ; 7 :1-135.
31. **Mne .Infoedeci**, Tuberculose pulmonaire et primo-infection tuberculose. Document électronique : www.med.info.com/principales/fichier/pm-pne-tub-pulmo 2005. consulté le 28-Mars-2013.
32. **M.Moussa.Sanogo**, Analyse de la relation entre les signes de présomption et le diagnostic bacteriologique chez les suspects de tuberculose pulmonaire au centre de santé de référence de la commune V de District de Bamako. Thèse de medecine, Bamako 2008.
33. **Toko Tchindzie L.C** ? Echec du traitement antituberculeux au mali de 2000 a 2003 These de medecine, Bamako ; 2004 :6-15.
34. **Gille Panteix ET JF, FR, RL**, PR1264 Précis de bactériologie clinique: Mycobactéries tuberculeuses Édition : ESKA 2007, 2è édition P : -1252.
35. **Miscoud, M., P. Leclercq, et J.-P. Brion**, 1988. La tuberculose du sujet agé Méd.Mal. Infect. S : 338-343.
36. **Les mycobactéries** www.pasteur-yaoundé.org/buruli, consulté le 11-Juin-2013.
37. **Serrano JE, A Garrido Contreras, LL Vizcaino**, 1986. Considerations sur la tuberculose chez les animaux de compagnie.Méd. Mal.Infect. 10:556-557.
38. **Aranaz A.D. Coussins, A.Mateos and C.Dominguez**, 2003. Elevation of *Mycobacterium bovis* subsp caprae Aranaz et al 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb Nov sp Nov. Int J Syst Evol.Microbiol. 53:1785-1789.
39. **Kubica T, S.R, sch-Gerdes, and S.Niemann**, 2003.*Mycobacterium bovis* subsp caprae caused one –third of human *M. bovis* –associated tuberculosis cases reported in Germany between 1999 and 2001. J. Clin.Microbiol. 41:3070-3077.

40. **Frothingham, R., p.L.Stri chlaud G, Betzel,S.Ramaswany, J.-M.Musser, and D.L.willians**, 1999. Phenotypic and genotypic characterization of *Mycobacterium africanum* isolates from west Africa. *J.clin.Microbiol* 37:1921-1926.
41. **Grosset, J., H.Boisvert, P.H.Lagrange, and G.Barantou**, 1982. Les mycobactéries –p 657-703 In : L.le Minor et M.veron (eds) *Bacteriologie Médicale*. Flammarion, Paris.
42. **Van soolingen, D; T.Hoogenboezem, P.E. de Haas, P.W.Hernans, M.A, Koe, K.S. Teppema, P.5. Brennan, G.S.Besra, F.Portaels, J.Top, L.M.Schon, and J.D.Van Embden**, 1997. A novel pathogenic tasion of *Mycobacterium tuberculosis* complexe, canetii: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J syst Bacteriol*, 47:1236-1245.
43. **Wayne, L.G.,and Kubica G.P. Mycobacteriaceae Chester**, 1987, 63 a 1, p 1436-1457 In:NR Krieg and JG Holt eds *Bergeys manual of systemic bacteriology*, vol 2, The Willams and Wikilkins Co, Baltimore 1986.
44. **Kremer.K, D.Van Soolingen, J.Van Emden, S.Hughes, J.Inwald, and G.Hewinson**, 1998. *Mycobacterium microti*: more widespread than previously thought. *J.Clin. Microbiol* 36:2793-2794.
45. **Bigi F.MC Garcia-Pelayo, J.Nunez-ordciz, A.Peralta, KC caini, P.Golby, J.Hinds, A. cataldi.SV Gordon, MI Roumano**, 2005. Identification of genetic markers for *Mycobacterium pinnipedii* though genome analysis. *FEMS Microbio let* 248:147-152.
46. **Coussins, R.Bastida, A. cataldi, V.Quse, S.Dow, P.Duignan, A.Murray ,C.Dupont, N.Ahmed,DM collins,WR Buther,D.Dawson, D.Rodriguez, J.Louneino,MI Romano, A.Alito,M.Zumanaga A.Bemardetti**, 2003 Tuberculosis in seals caused by à novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complexe: *Mycobacterium pinnipedii* sp, *Nov.Int.J.Syst.Evol.Microbiol* 53:1305-1314.

47. **Alexander K, Pleydell E, Williams M, Lane E, Nyange J, Michel A.** *Mycobacterium tuberculosis*: an emerging disease of free-ranging wildlife. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:598–601.
48. **Monteclavo, M.A., G. Forester, A.Y. Tsang, G. du Moulin, and G.P. Wormser,** 1994. Colonisation of potable water with *Mycobacterium avium* complexe in homes of VIH-infected patients. *Lancet* 343:1137.
49. **Kock, N.D, R.A Kock, J.Wambua, G.J.Kamau, and K.Mohan,** 1999. *Mycobacterium avium*-related epizootic in free-ranging lesser flamingos in Kenya. *J. Wild Dis.* 35:297-300.
50. **Interlied, C.B, C.A. Kemper, and L.E Bermudez,** 1993. The *Mycobacterium avium* complexe, *Clin. Microbiol. Rev.* 6:266-310.
51. **Juffermans, N.P., A. Verbon, S.A. Danner, E.J. Kuijper, and P. Speelman,** 1998. *Mycobacterium xenopi* in HIV-infected patient: an Emerging pathogen. *AIDS* 12:1661-1666.
52. **Slosarek, M, M.Kubin, and J.Pokorny,** 1994. Water as possible factor of transmission in mycobacterial infections. *Cent. Eur. J. Public Health* 2:103-105.
53. **Powell, B.L. Jr, and J.E Steadham,** 1981. Improved technique for isolation of *Mycobacterium Kansasii* from water. *J. Clin. Microbiol.* 13:969-975.
54. **Corbett, E.L., Hay, G.J. Churchyard, P.Herselman, T. Clayton, B. G. Williams, R. Hayes, D. Mulder, K.M. De Cock,** 1999. *Mycobacterium Kansasii* and *M.scrofulaceum* isolates from HIV-negative South African gold miners: incidence, clinical significance and radiology. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3:501-507.
55. **And Lalande.F. Barbut, A.Varnerot, M.Febvre, D.Nesa, S. Wasel, V.Vincent J-C.Petit,** 2001. Pseudo-oubreack of *Mycobacterium gordonae* associated with water from refrigerated fountains. *J.Hosp.Infect.* 48:76-79.
56. **Desmeules M ; Laforge J ; Cormer Y ; Solal-Celignyp ; Pecher J.C,** *Tuberculose pulmonaire.* Maloine, Paris 2è éd, p : 149-944.

57. **Fatturisso V. /Ritter O**, Vade-necum clinique du diagnostic au traitement. 16è ed, MASSON, 2001 :943-944.
58. **Diarra B**, Etude des connaissances et attitudes des pratiques comportementales de la population générale de Bamako face à la tuberculose. Thèse de médecine, 2005 :83.
59. **Pouabé R**, Résultats comparés de la radiographie thoracique et de la bacilloscopie dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire. Thèse Med, Bamako, 2000.
60. **Ait-Khaled N, Ewnarson D**, Tuberculose : manuel pour les étudiants en médecine ; WHO/CDS/TB/99.272 ;149p
61. **Adonisie K**, Etude bibliographique de la tuberculose au Mali de 1981 à 2003. Thèse Med, Bamako, 2004.
62. **Chretien J. Rouillon A**, Le tier monde face à la tuberculose peurs et terreurs à la contagion. Cholera, tuberculose, syphilis, XIXe S. Fayard France 1988.
63. **Pichard E, Minta D**. Tuberculose : maladies infectieuses 2002, FMPOS-Bamako.
64. **Mycobactéries** biotechnologie pellier.fr
65. **Le Beau**, Pneumologie francophone, Ellipse, paris 1994 ; 4 : 58-9.
66. **Pnit-Mali**, Régime et classification des médicaments antituberculeux au Mali 2009.
67. **Ministère** de la santé politique et protocoles de prise en charge antirétrovirale du VIH SIDA juin 2010.
68. **OMS**, Le traitement de la tuberculose : principes à l'intention des programmes nationaux. 2 ème édition 1997. WHO/TB/97.220.
69. **Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al**, Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997; **35**(4): 907-14.

LES ANNEXES

PROCÉDURE DE DIGESTION ; DÉCONTAMINATION ; CENTRIFUGATION ; CONCENTRATION DES ÉCHANTILLONS DE CRACHATS ET PRÉPARATION DE LAME.

A. Le principe :

La majorité des échantillons respiratoires soumis pour la culture et l'isolement des mycobactéries sont contaminés avec beaucoup d'autres agents de la flore bactérienne, qui ont une croissance plus rapide que les mycobactéries.

L'isolement des mycobactéries devient beaucoup plus facile si on utilise des méthodes pour faire la lyse des autres organismes (digestion), et réduire leur nombre (décontamination). N-acétyl L-cystéine (NALC) est utilisée comme agent mucolytic pour la digestion des crachats et faciliter l'isolement des mycobactéries. L'hydroxyde de sodium (NAOH 4 %) est utilisée comme agent décontaminant. On mélange les échantillons respiratoires a volume égal avec la solution de NAOL-NAOH, puis on les vortex pour les laissés a la température pendant 20 minute. Après on neutralise cette réaction par l'addition du phosphate. Les échantillons sont ensuite soumis a une centrifugation a haute vitesse (4500 rpm) pour concentré les mycobactéries. Le surnageant est versé et le culot est conservé pour préparer les lames et au besoin peut être dilué avec le phosphate pour inoculer les différents milieux de cultures. L'atmosphère nécessaire pour une croissance optimale des mycobactéries est comprise entre 8-10% de CO₂, associée à l'air.

B-Materiel :

Le gant, du respirateur, et de sous blouse est obligatoire, un papier absorbant, vesphene; un biquer, entonnoir ; un plastique rouge pour les déchets.

C-Mode opératoire :

Toutes les étapes de cette procédure doivent se passer à l'intérieur du laboratoire de tuberculose sous la hotte.

Transférer les crachats d'échantillons dans les flacons étiquetés de 50 ml, avec les pipettes de transfert stériles. Si les crachats sont très épais, il faut utiliser une solution saline stérile de 2 ml pour les dilués avant de les transférer dans les flacons de 50 ml, et aussi si, le volume du crachat est supérieur à 10 ml, il faut les séparer en 5 ml et les transférer dans un flacons de 50 ml, et considérer comme un cas pour la digestion, décontamination et la concentration et enfin de les combinés après la concentration dans un seul flacon de 50 ml. Pour chaque échantillon il faut utiliser une pipette pummactic de 10 ml pour ajouter le même volume de la solution de NaCl-NAOH au crachant. Refermé le flacon de 50 ml et mettre la montre à 20 minutes ;

Vortexer chaque flacon pendant une période de 10-20 secondes jusqu'à liquéfier les échantillons.

Si cette liquéfaction devient difficile, il faut ajouter du NALC jusqu'à la liquéfaction complète.

Si les échantillons sont difficiles à digérer il faut associer un milieu sélectif pour faciliter l'isolement des crachats.

A la fin des 20 minutes il faut remplir les flacons au niveau de 45 ml avec du phosphate buffer pour neutralisée la réaction.

Refermer le flacon et inverser pour bien mélanger le contenu.

Placer les flacons dans la centrifugeuse et les équilibrer pour éviter un chevaussement,

Centrifuger pendant 15 minutes à 4500 rpm 5°C. Après la centrifugation le concentré est utilisé pour faire les lames, laissé sécher sur une plaque chauffante de 65-75°C.

Après cette période de 10 minutes de contact avec le phénol les lames ne sont plus infectieuses.

Transporter les lames pour la coloration a l'auramine rhodamine.

Utiliser une pipette pummactic stérile et ajouter 1 ml de phosphate buffer au fond du culot sédimentaire,

Utiliser la même pipette aspirer approximativement 1 ml pour inoculer le MGIT avec 0,5 ml ; 0,2 ml sur milieu solide et 0,2 sur milieu de LOWESTEIN JENSEN avec 0,2 ml.

Mettre la pipette pimactic dans la boîte contenant du vesphene.

En utilisant une loupe striée pour une bonne isolation des mycobactéries et lui mettre dans un plastique.

Mettre tout les milieux dans un incubateur.

Autoclave toutes les boîtes et les déchets, nettoyer tous les endroits et tous les instruments utilisées.

C-LIMITATION

La solution de NALC –NAOH est toxique non seulement pour les mycobactéries, mai aussi pour les autres bactéries de croissance rapide.

Les points a surveiller pendant toute la procédure sont : le temps de contact avec NALC-NAOH, la température pendant la centrifugation et la capacité de la centrifugeuse de conserver le culot au fond du tube.

LE TEST D'ACCUPROBE-GENPROBE

A. Principe

Le test d'Accuprobe-Genprobe est un test d'identification rapide basé sur l'hybridation de l'acide nucléique et une abilité de la complémentarité de l'ARN ribosomal de la mycobactérie par une sonde moléculaire (probe) spécifique aux différents complexes.

NB: Tout le travail doit être fait dans le laboratoire de TB à l'intérieur de la hotte.

Les blousses, respirateurs et gans sont recommandés.

B. Préparation de l'inoculum

1. MGIT: Concentration

a- Labeller les tubes de lyse.

b- Vortexer le tube MGIT pour 30 secondes.

c- Transférer 1,2 ml du tube MGIT au microtube.

d- Mettre le microtube dans la microcentrifugeuse à 10 500 rpm pendant 10 minutes.

e- Utiliser la pipette de Transfer pour évacuer le surnageant.

f- Ajouter 220 µl du réactif d'identification de Culture 1 (réactif de lyse).

g- Ajouter 220 µl du réactif d'identification de Culture 2 (réactif d'hybridation).

h- Vortexer bien pour 30 sec.

i- Transférer 200 µl de la suspension dans les tubes de lyse labellés.

j- Vortexer bien pour 30 sec.

k- Procéder à la sonication.

2. Extraction de colonies

NB: Le choix de la sonde moléculaire est basé sur les caractéristiques morphologiques (macro, microscopique) de l'organisme à tester, ainsi que les informations cliniques.

a- Labeller les tubes de lyse.

b- Ajouter 100 µl du réactif d'identification de Culture 1 (réactif de lyse).

c- Ajouter 100 µl du réactif d'identification de Culture 2 (réactif de d'hybridation).

d- Avec l'anse de 1 µl récupérer les colonies de la culture solide pour les tubes de lyse contenant les réactifs d'identification.

e- Vortexer bien pour 30 sec.

f- Procéder à la sonication

C. Sonication, Lyse, et Préparation des probes tubes

- Placer les tubes de lyse dans le portoir flottant avant de procéder pour 15 minutes de sonication.

- labeller les probes tubes et garder dans le réfrigérateur à l'abri de la lumière.
- Placer les tubes de lyse dans la plaque chauffante de 95°C pour 10 minutes.

D. Hybridation

- Mettre 100 µl de la suspension dans les tubes de sonde.
- Ne pas prendre le culot du fond du tube.
- Vortexer brièvement.
- Mettre les tubes dans le bain Marie à 60°C pour 15 minutes sans dépasser 20mn.

E. Selection

- Mettre 300 µl du réactif d'identification de Culture 3 (réactif de selection) dans chaque tube de sonde.
- A lire au maximum avant 1H de temps.
- Vortexer pour 15 seconde, cette etape est essentielle pour la performance du test.
- Incuber les tubes de sonde dans le bain Marie à 60°C pour:
la sonde de *M. tuberculosis Complex* – **10 minutes**, ne pas dépasser 11 minutes.
les sondes de *M. avium Complex* et *M. gordonae* – **5 minutes**, ne pas dépasser 6 minutes.
la sonde de *M. kansasii* – **8 minutes**, ne pas dépasser 9 minutes.
- Retirer les tubes du bain Marie et attendre au moins **5 minutes** pour que les tubes se refroidissent.

F. Detection

- Faire le control de qualité avant de lire les tubes de sonde par la machine Genprobe (Leader 50i Luminometer).
- Faire 3 series de lavage de la machine.
- Faire toujours passer d'abord les échantillons de controle avant les isolats à tester et cela avant la fin des 60mn après le reatif de detection.

G. Interprétation des résultats

-les échantillons de contrôle doivent être interprétés et acceptables avant d'interpréter les autres à tester.

Reprendre le test si le contrôle n'est pas acceptable.

Reaction positive = RLU (Relative Light Unit) Valeur > 60 000

Reaction negative = RLU Valeur < 10 000

Une valeur de RLU entre 10 000 and 60000 **doit être reprise**

Les caractéristiques morphologiques doivent être conformes au résultat de l'Accuprobe pour être aussi acceptable.

H. Limitations

La réussite du test dépend d'un bon ajustement de la température et aussi d'un bon vortexage pour homogénéiser les mélanges.

TEST DE SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES : METHODE MGIT AST SIRE

I. Matériel

Vortex Mixer

Incubateur CO₂, 35°C

Lampe de Wood (la lumière ultraviolette)

Turbidimètre

Congélateur de -80°C

Cabinet de Biosécurité (hotte)

II. Procédure

A. Préparation de MGIT AST SIRE tubes et vérifier la pureté des isolats

Pour le contrôle de qualité et les isolats de chaque patient, les tubes suivants doivent être préparés

REMARQUE: Ajouter aseptiquement 0,5 ml d'OADC à chaque tube MGIT.

A. Pour chaque tube MGIT marqués **AST contrôle de croissance** ne pas ajouter d'antibiotique.

B. Pour chaque tube MGIT marqués **STR -Ajouter 100 µl STR Stock Solution (40 µg / ml)**

C. Pour le tube MGIT marqués **INH -Ajouter 100 µl de solution stock INH (5 µg / ml)**

D. Pour le tube MGIT marqués **RIF -Ajouter 100 µl de solution stock RIF (50**

µg/ml)

E. Pour le tube MGIT marqués **EMB -Ajouter 100 µl de solution stock EMB (175 µg / ml)**

5. Pour le contrôle de la qualité et chaque patient, préparer

- La gélose au sang de mouton.
- Le milieu de Middle brook 7H11.

Préparation de la suspension

1. Sans exception, le contrôle de qualité *M.tuberculosis* ATCC 27294, et tous les isolats des patients soumis à l'essai ne doit pas être supérieure à 14 jours.

2. Sans exception, le contrôle de qualité *M.tuberculosis* ATCC 27294, et tous les isolats des patients soumis à l'essai doit être pure.

3. Une fois la pureté et l'âge des isolats ont été confirmés, pour le contrôle de qualité et chaque patient à tester préparer les tubes suivants:

A. Tube 1 - tube stérile de verre avec 6 à 8 billes de verre.

B. Tube 2 - tube stérile de verre sans billes

C. Tube 3 - tube stérile de verre sans billes

D. Tube 4 - tube stérile de verre sans billes

4. Etiqueter avec le nom ou n ° d'étude

5. Ajouter 4ml de bouillon Middle brook 7H9 au **tube 1**

6. Ajouter 4ml de solution saline stérile au **tube 4**.

7. Pour le contrôle de qualité et chaque patient, au moyen d'un coton-tige stérile, retirer les colonies de la plaque Middle brook 7H11 et suspendre dans le tube 1.

8. Préparer une suspension lourde, plus de 1,0 McFarland

9. Vortexer chaque suspension de 2 à 3 minutes.

10. Laisser chaque suspension pendant 20 minutes sans déranger.

11. Après 20 minutes, transférer le surnageant au tube 2 et laisser chaque suspension pendant 15 minutes.

12. Après 15 minutes, transférer le surnageant au tube 3.

13. Utiliser le Middle brook 7H9, réglez le volume dans le tube 3, au moins a 3ml.

Un volume de 3ml est nécessaire afin d'obtenir une lecture précise en utilisant le turbidimètre

Utilisation du turbidimètre

Mesure du seuil "Zéro check"

1. Chaque jour, avant de l'utiliser, réaliser et enregistrer les résultats du seuil
2. Mettre le turbidimètre dans la hotte le brancher à la prise électrique.
3. à l'aide d'un essuie-glace, nettoyer l'extérieur de (2) tubes en verre contenant 4ml d'eau pure. S'assurer que des rayures ne sont pas sur les tubes.
4. Insérer un tube dans le "blank" "Blanc" ou "1".
5. Insérez le deuxième tube dans le "échantillon" "Sample" ou "2".
6. Observez la lecture sur l'afficheur numérique.
7. Ecrire le résultat obtenu.
8. La limite acceptable est 0,00 +- 0,01.

Si la valeur sur l'écran est en dehors de cette fourchette, voir les lignes directrices pour des détails spécifiques (Annexe A).

Mesurer 0,5 McFarland

1. Préparer un tube de verre contenant 4ml de bouillon Middle brook 7H9. Ce tube est la "Vierge".
2. Préparer une suspension de *M. tuberculosis* c'est le "Test".
3. Mettez la "Vierge" tube dans la "Blank" ou "1".
4. Mettez le «Test» dans la suspension "échantillon" ou "2".
5. Observer et enregistrer la lecture sur l'afficheur numérique. Cette lecture est la différence de l'absorbance entre la "Vierge" et le tube "échantillon"
6. La fourchette acceptable pour la turbidité de 0,5 McFarland Standard est 0.05-0.12.
7. Si la lecture de l'affichage numérique est inférieure à 0,05, la suspension est faible et plus d'organisme doit être ajouté.
8. Si la lecture de l'affichage numérique est supérieure à 0,12, la suspension est trop lourde, et doit être dilué en utilisant le bouillon Middle brook 7H9.

9. Utiliser le turbidimètre, ajuster la suspension à 0,5 McFarland Utilisez Middle brook 7H9 pour diluer si nécessaire.

10. Une fois que chaque suspension a été ajusté de 0,5 Macfarlane, étiqueter chaque tube "0,5 MCF".

11. Transférer 1,0 ml de la solution 0,5 Macfarlane dans le tube 4 (1:5 dilution).

Label chaque tube "1:5 DIL".

12. Cette suspension diluée est maintenant prêt à être utilisés pour les essais.

D. Inoculation des MGIT pour le test de sensibilité

1. En utilisant une pipette pumpmatic 1 ml, ajouté aseptiquement, 0,5 ml de chaque suspension préparée aux tubes MGIT.

2. Fermer hermétiquement.

Inverser à plusieurs reprises pour mélanger.

3. En utilisant une pipette pumpmatic 1 ml, de manière aseptique, ajouter 0,1 ml de chaque suspension préparée à la plaque de sang de mouton(SBA).

Étaler pour l'isolement des colonies.

Mettre dans un sac en plastique et incubé à 35 - 37 °.

4. En utilisant une pipette pumpmatic 1 ml, de manière aseptique, ajouter 0,2 ml de chaque suspension préparée à la plaque 7H11.

Étaler pour l'isolement des colonies et mettre dans un sac en plastique et incubé à 35 - 37 °

5. Essuyez soigneusement l'extérieur de chaque tube MGIT avec du vespène.

Incuber les tubes à 35-37 ° C.

6. Préparer une fiche de travail pour le QC et chaque patient.

E. lecture des tubes MGIT AST

1. Examiner chaque gélose à 72 heures pour la contamination bactérienne.

A. Si la gélose ne montre pas de croissance, continuer la procédure pour la lecture et l'interprétation des résultats.

B. Si la gélose au sang de mouton indique la croissance, jeter les tubes MGIT

AST et refaire le test.

2. À partir du 3^{ème} jour après mise en place, retirez les tubes MGIT AST de l'incubateur et lire à l'aide d'une lampe Wood (UV).

Mettre les résultats sur la fiche de travail.

III. Interprétation des résultats

1. L'isolat est considéré **sensible**: quand il n'ya pas de fluorescence dans le tube contenant l'antibiotique (2) jours au-delà de l'apparition de la fluorescence dans le tube **AST contrôle de croissance**.

2. L'isolat est **résistant**: quand il y a la fluorescence dans le tube contenant l'antibiotique dans les (2) jours avant ou après apparition de la fluorescence dans le tube **AST contrôle de croissance**.

3. S'il n'ya pas de fluorescence dans le tube **AST contrôle de croissance** le 12^e jour après mise en culture, le test est invalide et doit être répété.

IV. Limites

1. Les suspensions doivent rester libres pour le temps indiqué, avant la normalisation.

2. Un turbidimètre doit être utilisé pour effectuer la mesure de la suspension. Ne pas utiliser le standard McFarland.

3. Le test est invalide si le tube **AST contrôle de croissance** n'est pas positif 12 jours après la mise en culture. L'essai doit être répété.

4. Utiliser uniquement des cultures pures de *M.tuberculosis*.

Les cultures qui sont contaminées ou qui contiennent de multiples espèces de mycobactéries peuvent donner des résultats erronés.

LE TEST DE SPOLIGOTYPAGE

I. PRINCIPE

Spoligotypage est une méthode basée sur la PCR pour la détection simultanée et le typage des souches de tous les membres du complexe *M. tuberculosis*. La région répétée directe est présent à tous les membres du complexe *M. tuberculosis*. La région se compose de plusieurs copies d'une séquence d'ADN de 36 paires de base, bien conservée, séparées par des séquences non répétitives "espaceur", chacune 34 à 41 paires de bases de long. L'ordre des «espaceurs» est le même pour toutes les souches du complexe *M. tuberculosis*. Mais, la présence ou l'absence de ces «espaceurs» peuvent varier d'une souche à l'autre. Après l'hybridation, la membrane est incubée avec un conjugué de peroxydase de streptavidine qui se lie à la biotine sur l'étiquette du produit de PCR. Après une série de lavages, la membrane est incubée avec enhanced chimiluminescence (ECL) Réactifs de détection. La peroxydase présente sur la streptavidine conjuguée catalyse une réaction avec les réactifs ECL, résultant en l'émission de lumière. Cette émission de lumière est détectée par l'exposition d'un film sensible à la lumière de la membrane, suivie par le développement du film.

II. DIRECTIVES DE TYPE EXEMPLES

Types d'échantillons appropriés pour cette procédure sont les suivants:

1. ADN extrait de croissance Colonial
2. ADN extrait de Tween Dubos Broth albumine Suspension
3. L'ADN extrait des fondus, concentré expectorations Pellet

III. ÉQUIPEMENT

1. thermocycler
2. Chambre PCR
3. Mini-microcentrifuge
4. Vortex Mixer
4. Heat-bloc (99-100 ° C)
5. Rotation bain d'eau et thermomètre - 40 ° C (- 80 ° C)
6. Hybridation Four et thermomètre - (42 ° C)

7. Moyens d'aspiration (pompe à vide, autre)
8. Air Incubateur et Thermomètre (60-70 ° C)
9. Film Developer et Dark Room
10. Balance (balance

IX. PROCÉDURE

A. Préparation du Master Mix

Remarque: À partir de l'étape 4, tout travail doit être fait dans le Master Mix. Chambre, à l'intérieur d'une chambre PCR. Blouse et des gants jetables.

Extraction de l'ADN, la quantification SOP-ADN (Méthode photométrique), procéder à l'extraction et la quantification de l'ADN. Ajuster la concentration de l'ADN à isoler 2ng/μl. Utilisation de la spoligotypage Master Mix Feuille de préparation (Annexe A), calculer la quantité de chaque composant de mélange maître nécessaire pour le nombre d'échantillons d'ADN+1. Dans la salle de mélange maître, assembler et préparer des réactifs et du matériel à l'emploi. Obtenir de la glace dans un seau à glace. Etiqueter un tube à bouchon à vis 1.5ml avec les lettres "MM". Placer le tube sur la glace.

6. Fermer les bouchons et étiquettes le nombre approprié de tubes de bande et mettre de côté dans un rack. Sur spoligotypage Master Mix feuille, notez ce qui sera distribué dans chaque tube de la bande. Utilisation de la spoligotypage Master Mix Prep.

Feuille de travail comme guide, préparer la quantité appropriée de mélange maître. Soyez sûr de garder le mélange maître et composants du mélange maître sur la glace. Une fois que tous les composants du mélange maître ont été combinés, rapidement vortexetdespin. Retour à la glace.

Placer la grille contenant les tubes de bandes étiquetées, sur la glace. Passer soigneusement 40 pl du mélange maître dans chacun des tubes bandes PCR. Dans chaque tube de contrôle positif, dispenser 8μl de l'ultra pur H₂O. Dans le tube de contrôle négatif, passer 10 pi de H₂O ultra pur. Garde tubes de bande

dans la baie, sur la glace, et mettre de côté. Retour des réactifs à leurs emplacements appropriés.

En utilisant une solution d'eau de Javel à 10%, suivie par EtOH à 70%, le nettoyage des pipettes et la zone de travail. Des tubes de transport de la bande vers la chambre de PCR pour l'addition de l'ADN.

B-Ajout d'ADN de Master Mix et chargement / Running Thermocycler

Remarque: Tous les travaux doivent être effectués dans le "Amplicon Free Zone". Une blouse jetable et des gants sont obligatoires. Les étapes 1, 2 et 3 doivent être effectuées à l'intérieur d'une PCR. Intérieur de la chambre PCR, avec des tubes de la bande sur la glace, verser 10 ul chacun des ADN de l'échantillon dans le tube de bande appropriée. Remarque: le montant final de l'ADN ajouté à chaque tube de la bande doit être 20ng. Pour chaque contrôle positif, distribuer 2ul d'ADN dans le tube de bande appropriée. Quand tout l'ADN a été ajouté, tourner rapidement les tubes de la bande et charger sur le thermocycleur

C-Hybridation et détection

Remarque: Tous les travaux doivent être effectués dans la «zone sale» parce qu'on travaille maintenant avec des «zillions» de amplicons qui peuvent causer la contamination de dosage.

- Prendre les dispositions nécessaires pour l'utilisation du promoteur de film.
 - .-Retirer les tubes de la bande contenant le produit PCR, du réfrigérateur, ou -20 ° C congélateur.
 - Allumez le bloc thermique régler à 99 ° C
 - Allumez le tournant bain d'eau. Réglez la température à 60 ° C.
 - Mettre des bouteilles à la fois SDS 2XSSPE/0.1 d'% et 2XSSPE/0.5% SDS à tourner bain d'eau. Laisser revenir à la température.
 - Utilisation de la mini-buvard Canal Map Worksheet (Annexe B), d'organiser des échantillons par voie pas., L'échantillon n., Et le nom de l'échantillon.
 - Etiqueter le nombre approprié de tubes à bouchon à vis stériles de 1,5 ml avec le cas échéant mini-buvard numéro de canal.
- Pour chaque tube étiqueté, ajouter 150ul de 2XSSPE/0.1% SDS.
- Suivant ajouter 20 ul de produit PCR dans le tube approprié. Set tubes de côté.
 - Lavez membrane spoligotypage dans 250ml de 2XSSPE/0.1% SDS, à 60 ° C pendant 5 minutes.

- Égoutter tampon 2XSSPE/0.1% de SDS.
- En utilisant des pinces et des gants, lieu membrane sur le mini-buvarde de sorte que l'avant de la membrane est confronté à des canaux mini-buvarde.
- Placer le bord entaillé de la membrane, sous l'étiquette sur le mini-buvarde sorte que les canaux soient perpendiculaires au motif de ligne des oligonucléotides appliqués sur la membrane.
- Placer un coussin de mousse sur le dessus de la membrane.
- Placer la plaque de fond de la mini-buvarde sur la plaque supérieure inversé si les broches d'alignement tomber en place.
- Serrer les vis. A hermétiques mini-buvarde rendements propres modèles de spoligotype.
- Aspirer liquide résiduel provenant de chaque canal mini-buvarde. Mettez de côté.
- Dénaturation - Placer les tubes contenant le produit dilué PCR dans le bloc thermique à 99 ° C pendant 10 minutes.
- Après l'incubation de 10 minutes, refroidir immédiatement, sur la glace.
- Utilisation de la carte sous la Manche Mini-buvarde comme guide, remplir chaque canal avec environ 130µl du produit PCR dilué. Éviter les bulles d'air.
- Note: Remplissez les première et dernière canaux avec 2XSSPE/0.1% SDS.
- Hybridation - Lieu mini-buvarde dans un incubateur à air à 60 ° C pendant 60 minutes. Ne secouez pas.
- Au cours de l'hybridation, préchauffer le SDS 2XSSPE/0.5 d'% à 60 ° C dans le bain d'eau en rotation.
- Après hybridation est terminée, aspirer les échantillons de tous les canaux de la mini-buvarde.
- Versez 250 ml de préchauffé 2XSSPE/0.5% SDS dans un récipient en plastique.
- Retirer la membrane de la mini-buvarde aide d'une pince.
- Lieu membrane en conteneur plastique de solution préchauffée 2XSSPE/0.5% SDS
- Couvrir récipient et fermer, et mis dans le 60 ° C au bain d'eau rotatif.
- Mettre du poids sur le dessus du conteneur pour garder membrane submergée. Incuber pendant 10 minutes.
- Après 10 minutes, jeter la solution.
- Allumez le four à hybridation et régler la température à 42 ° C.

- Répétez la procédure (étapes 23-28) à laver.
- Préparer streptavidine-POD conjugué comme suit:
Dans un tube 15ml conique (Falcon) ajouter 10 ml de 2XSSPE/0.5% SDS.
- Ajouter 2.5µl de conjugué streptavidine-peroxydase
- Rouler délicatement la membrane à l'intérieur d'une feuille de maille du four de taille appropriée.
- Placez délicatement la membrane dans une bouteille de roulement.
- Ajouter la solution de conjugué streptavidine-POD préparé à la bouteille de roulement. Fermez hermétiquement.
- Rouler bouteille manuellement pour disperser solution.
- Mettez bouteille rouler dans un four à hybridation et incubé pendant 45 à 60 minutes à 42 °C.
- Pendant l'incubation, d'ajuster la température du bain d'eau en rotation à 42 ° C et de préchauffer la bouteille de 2XSSPE/0.5% de SDS.
- Pendant l'incubation, laver et rincer mini-buvard et laisser sécher à l'air.
- Retirez délicatement la membrane de la bouteille de roulement et laver deux fois dans 250ml de 2XSSPE/0.5% SDS pendant 10 minutes à 42 ° C.
- Ensuite, lavez membrane deux fois dans 250ml de 2XSSPE pendant 5 minutes à température ambiante.
- Dans un tube de 50 ml conique (Falcon), mélanger 10 ml de réactif ECL-1 et 10 ml de réactif ECL-2.
- Régler la minuterie numérique pendant une minute.
- Éponger brièvement membrane sur du papier absorbant. Mettez membrane dans un conteneur dédié et ajouter 20 ml de la solution de réactifs de détection ECL préparé. Lancement d'une temporisation.
- Laisser incubé pendant seulement 1 minute.
- Au cours de l'incubation d'une minute, secouez doucement le récipient pour assurer le réactif ECL couvre membrane entière.
- Après une incubation de 1 minute, transférer la membrane à une page

protecteur ouvert.

Soigneusement page dépliant protecteur sur la membrane, et doucement lisser nos bulles.

-Placer la membrane dans une cassette de film.

-Dès que possible, à l'intérieur d'une pièce sombre, exposer un film sensible à la lumière à la membrane pendant 10 à 20 minutes.

52. Ajuster la température du bain d'eau en rotation à 80 ° C et de préchauffer la bouteille de SDS à 1% Solution.

-Passez à la développeuse de films.

-Après l'exposition, dans une pièce sombre, retirez le film de la cassette du film et de charger dans le développement du film.

-Après le développement du film, évaluer motif spoligotype.

-Si le motif de spoligotype est trop sombre, d'exposer une autre feuille de film à la membrane à l'intérieur de la cassette de film, pendant une période de temps plus courte.

D. Membrane Régénération

1. Retirer la membrane de cassette de film protecteur et page et laver deux fois dans 250 ml de préchauffé SDS à 1% Solution à 80 ° C pendant 30 minutes.

2. Lavez membrane dans 250ml d'EDTA 20 mM, pH 8, pendant 15 minutes, à la température ambiante.

3. Membrane de magasin dans 200 à 250 ml de 20 mM d'EDTA, pH 8, dans un récipient en matière plastique, à 4 ° C. Éviter la déshydratation.

E. Clean ULaissez le laboratoire que vous souhaitez trouver.

1. Essuyez toutes les surfaces avec l'eau de Javel à 10%.

2. Rincez et essuyez les contenants et graduées avec H₂O distillée.

3. Pipettes propres et boîtes de pointes de pipette avec la solution d'eau de Javel à 10% puis de 70% Et OH.

4. Laver et rincer les bouteilles de roulement et laisser sécher.

5. Retour tous les réactifs à leur emplacement exact.

6. Jeter tous les déchets.

7. Éteignez tous les appareils.

X. Interprétation des résultats

1. Confirmez les modèles de spoligotype à la fois positif et le contrôle négatif, afin d'assurer toutes les entretoises sont présents et d'exclure toute contamination.

2. Examinez isoler des tendances pour les similitudes et les différences.

Convertir le modèle de spoligotype premier à code binaire enfin un code octal.

3. Comparer les résultats à ceux de connaître isole (base de données, autre).

XI. limitations

1. Bruit de fond élevé (rayures) sur le modèle de spoligotype indique un besoin de nettoyer le mini-buvard. Nettoyer avec une brosse dédiée et tremper dans une solution Alconox nuit.

2. Bruit de fond élevé (points) sur le modèle de spoligotype indique un problème avec la membrane. Régénérer à nouveau la membrane et tests avec des produits de PCR de la souche témoin. Si le problème persiste, ne pas utiliser la membrane.

4. Tampons FDS devrait être pas plus de 1 semaine.

Travailler avec les vieux SDS solution peut conduire à des problèmes avec des motifs de spoligotype.

5. Des problèmes avec le test de spoligotypage - Contacter Isogen sciences de la vie, le support technique:

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom: TOGO

Prénom: Antiémé Combo Georges

Téléphone: 75314307

E-mail : georgeseka12@yahoo.fr

Titre de la thèse: Le poids de *Mycobacterium africanum* dans la tuberculose pulmonaire au Mali

Année: Universitaire 2012-2013

Pays: Mali

Ville de soutenance: Bamako

Lieu de dépôt: Bibliothèque de la faculté de médecine et D'odontostomatologie (FMPOS) de Bamako.

Secteur d'intérêt: Pneumologie, Bactériologie, infectiologie.

RÉSUMÉ:

Notre étude avait pour but d'évaluer la fréquence de *Mycobacterium africanum* dans la tuberculose pulmonaire au Mali. Pour atteindre nos objectifs, nous avons effectué une étude rétrospective transversale entre Janvier 2006 et Decembre 2012 au Centre de recherche et de la formation sur le VIH et la Tuberculose (SEREFO).

L'étude a porté sur 205 cas de tuberculeux qui ont bénéficié des techniques suivantes : L'examen direct des crachats, le test d'identification moléculaire par la méthode de Genprobe® Accuprobe®, le test de sensibilité aux antibiotiques et le spoligotyping®.

Le spoligotyping a permis de déterminer l'infection par *M.africanum* chez 36 patients soit une prévalence de 17,56%.

La prévalence de la co-infection TB/VIH a été de 15,61% et elle était beaucoup plus observée en cas d'infection tuberculeuse à *M.africanum*

Dans le cadre de ce travail nous n'avons pas observé un signe pathognomonique à l'infection *M.africanum* par rapport aux signes due au *M. tuberculosis* au SEREFO.

Mots clés: *Mycobacterium africanum*, Tuberculoses, VIH, MDR, Bamako, Mali.

SHEET:

First Name: TOGO

Name: Antièmé Combo Georges

Phone: 75314307

E-mail: georgeseka12@yahoo.fr

Thesis title:

Year: 2012-2013

Country: Mali

Town of defense: Bamako

Discharge point: Pneumology, Bacteriology, infectious diseases.

SUMMARY:

Our study aimed to evaluate the prevalence of *Mycobacterium africanum* in tuberculosis in Mali. To achieve this goal, we conducted a retrospective cross-sectional study between January 2006 and December 2012 at the center of research and training on VIH and TB.

The study included 205 cases of TB who received the following techniques: direct sputum, testing molecular identification method Genprobe® Accuprobe®, test sensitivity to antibiotic and spoligotyping®.

The spoligotyping allowed to determine infection in 36 patients MAF is a prevalence of 17,56%. The prevalence of co-infection TB/ VIH was 15,61% and it was more observed in cases of tuberculous infection MAF.

As part of this work we have not seen a path gnomonic infection MAF compared to the signs related to *M. tuberculosis* in SEREFO.

Kys words: MAF, Tuberculosis, VIH, MDR, Bamako, Mali

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette faculté, et de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de race, de parti ou de classe viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage des mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes condisciples si j'y manque.

Je le Jure!