

REPUBLIQUE DU MALI
Un Peuple - Un But - Une Foi

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI

Année 1989

N° 1

**MESURE DE LA SENSIBILITE DE MYCOBACTERIUM LEPRAE
APRES TRAITEMENT A BASE DE RIFAMPICINE**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le----- Novembre 1989
devant l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie du Mali

Par
MONSIEUR SEKOU DIOGO KEITA
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'Etat)

EXAMINATEURS

Président : Professeur Yaya FOFANA

Juges : Professeur Boubacar CISSE
Docteur Issa TRAORE
Docteur Pierre JAMET

ECOLE NATIONALE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DU MALI
ANNEE UNIVERSITAIRE 1988-1989

Professeur Sambou SOUMARE	Directeur Général
Professeur Bocar SALL	Directeur Général Adjoint
Docteur Hubert BALIQUE	Conseiller Technique
Hama B. TRAORE	Economiste

D.E.R. DE CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeur Mamadou Lamine TRAORE	Chef de D.E.R. Chirurgie
Professeur Aliou BA	Général-Médecine Légale, Ophtalmologie
Professeur Bocar SALL	Orthopédie-Traumatologie, Secourisme
Professeur Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Professeur Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Professeur Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Professeur Abdoul Alassane TOURE	Orthopédie-Traumatologie

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Bénitiéni FOFANA	Gynécologie-Obstétrique
Docteur Mme SY Aida SOW	Gynécologie-Obstétrique
Docteur Kalidou QUATTARA	Urologie
Docteur Amadou Ingré DOLO	Gynécologie-Obstétrique
Docteur Mamadou Lamine DIOMBANA	Odonto-Stomatologie
Docteur Djibril SANGARE	Chirurgie Générale, Soins infirmiers
Docteur Salif DIAKITE	Gynécologie-Obstétrique
Docteur Massaoulé SAMAKE	Gynécologie-Obstétrique
Docteur Mme TRAORE Jeannette THOMAS	Ophtalmologie
Docteur Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
Docteur Alhousséini Ag MOHAMED	O.R.L.
Docteur Cheick Mohamed Chérif CISSE	Urologie
Docteur Gérard TRUSCHELL	Chirurgie

3. ASSISTANTS ET C.E.S.

Docteur Abdou Kader TRAORE dit DJOP	Chirurgie Générale
Docteur Daba SOGODOGO	Chirurgie Générale
Docteur Lassana KOLTA	Chirurgie Générale
Docteur Sékou SIDIBE	Orthopédie-Traumatologie
Docteur Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale
Docteur Sidi Mohamed COULIBALY	Ophthalmologie
Docteur Mamadou A. CISSE	Urologie
Mme COUMARE Fanta COULIBALY	T.P. Soins infirmiers

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeur Souleymane SANGARE	Chef de DER Pneumo-Phtisiologie
Professeur Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Professeur Aly GUINDO	Gastro-Entérologie
Professeur Mamadou Kouréïssi TOURE	Cardiologie
Professeur Mahamane MAIGA	Néphrologie
Professeur Ali Nouhoum DIALLO	Médecine Interne
Professeur Baba KOUMARE	Psychiatrie
Professeur Moussa TRAORE	Neurologie
Professeur Issa TRAORE	Radiologie
Professeur Mamadou Marouf KEITA	Pédiatrie

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Balla COULIBALY	Pédiatrie
Docteur Sidi Yehia TOURE	Réanimation
Docteur Toumani SIDIBE	Pédiatrie
Docteur Eric RICHARD	Médecine Interne
Docteur Sanoussi NANAKASSE	Dermatologie-Léprologie
Docteur Boubacar DIALLO	Cardiologie
Docteur Dapa Ali DIALLO	Hématologie-Médecine Interne

3. ASSISTANTS ET C.E.S.

Docteur Moussa MAIGA	Gastro-Entérologie
Docteur Bah KEITA	Pneumo-phtisiologie
Docteur Hamar Alassane TRAORE	Médecine Interne
Docteur Somita M. KEITA	Dermatologie-Léprologie
Docteur Mme KONARE Habibatu DIAWARA	Dermatologie-Léprologie
Docteur Kader TRAORE	Médecine Interne

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeur Bréhima KOUMARE	Chef de D.E.R. Microbiologie
Professeur Siné BAYO	Anatomie Pathologie Histologie-Embryologie
Professeur Abdel Karim KOUMARE	Anatomie
Professeur Gacoussou KANOUTE	Chimie Analytique

2. DOCTEURS D'ETAT

Professeur Yéya Thiakolo TOURE	Biologie
Professeur Amadou DIALLO	Biologie-Génétique

3. DOCTEURS 3ème CYCLE

Professeur Bouba DIARRA	Microbiologie
Professeur Moussa HARAMA	Chimie Organique minérale
Professeur Massa SANOGO	Chimie Analytique
Professeur Niamanto DIARRA	Mathématiques
Professeur N'Golo DIARRA	Botanique
Professeur Souleymane TRAORE	Physiologie Générale
Professeur Moussa Issa DIARRA	Biophysique
Professeur Salikou SANOGO	Physique
Professeur Mme THIAM Aïssata SOW	Biophysique
Professeur Daouda DIALLO	Chimie Minérale
Professeur Abdoulaye KOUMARE	Chimie Générale
Professeur Yénimégué Albert DEMBELE	Chimie Organique
Professeur Bakary M. Cisse	Biochimie
Professeur Godefroy COULIBALY	T.P. Parasitologie
Professeur Mamadou KONE	Anatomie-Physiologie humaine
Professeur Jacqueline Cisse	Biologie Animale
Professeur Bakary SACKO	Biochimie

4. ASISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Ogobara DCUMBO	Parasitologie
Docteur Yéya MAIGA	Immunologie
Docteur Abderhamane Sidéye MAIGA	Parasitologie

5. MAITRE ASSISTANT

Docteur Hama Cisse	Chimie Générale
--------------------	-----------------

6. ASSISTANTS

Docteur Flabou BOUGOUDOGO	T.P. Microbiologie
Docteur Amadou TOURE	Histo-Embryologie
Docteur Abdoul K. TRAORE dit DIOP	T.P. Anatomie

7. CHARGE DE COURS

Monsieur Modibo DIARRA

Diététique-Nutrition

D.E.R. DE SICNECES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeur Boubacar CISSE

Chef de D.E.R. Toxicologie

2. MAITRES ASSISTANTS

Docteur Boukassoum HAIDARA

Législation et Gestion Pharmaceutique

Docteur Boubacar KANTE

Pharmacie Galénique

Docteur ELimane MARIKO

Pharmacodynamie

Docteur Alou KEITA

Pharmacie Galénique

Docteur Arouna KETTA

Matière Médicale

Docteur Souleymane GUINDO

Gestion

3. DOCTEUR 3ème CYCLE

Docteur Mme CISSE Aminata GAKOU

Pharmacie Galénique

4. ASSISTANT

Docteur Drissa DIALLO

Matière Médicale

D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

1. PROFESSEURS AGREGES

Professeur Sidi Yaya SIMAGA

Chef de D.E.R. Santé Publique

Docteur Hubert BALIQUE

Maître de conférence en Santé Publique

2. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Docteur Sory Ibrahima KABA

Epidémiologie

Docteur Sanoussi KONATE

Santé Publique

Docteur Moussa MAIGA

Santé Publique

Docteurs SOULA

Santé Publique

CHARGES DE COURS

Monsieur Cheick Tidiani TANDIA

Hygiène du Milieu

(Ingénieur Sanitaire)

Mme MAIGA Fatoumata SOKONA

Hygiène du Milieu

(Ingénieur Sanitaire)

PROFESSEURS MISSIONNAIRES

Professeur Oumar SYLLA	Pharmacie Chimique
Professeur Humbert GIONO-BARBER	Pharmacodynamie
Docteur Guy BECHIS	Biochimie
Professeur François MIRANDA	Biochimie
Professeur Alain GERAULT	Biochimie
Docteur Marie Hélène ROCHAT	Pharmacie Galénique
Docteur Alain LAZURENS	Chimie
Docteur François ROUX	Biophysique
Monsieur El Hadj Makhtar WADE	Bibliographie
Professeur Pierre Jean REYNIER	Pharmacie Galénique
Professeur GENLAUX	C.E.S. Dermatologie
Professeur LAGOUTTE	C.E.S. Ophtalmologie
Professeur Philippe VERIN	C.E.S. Ophtalmologie
Professeur Mme Paulette GIONO-BARBER	Anatomie-Physiologie Humaine

Je dédie ce travail

A la mémoire de mes grands-parents.

A mon Père et à ma Mère

En témoignage de mon plus profond respect et en hommage à l'amour familiale dont j'ai toujours été l'objet.

A mes frères et Soeurs.

A tous mes amis (es).

A mes collègues de promotion.

A nos malades de la lèpre : prompt rétablissement.

A tous ceux qui ont contribué à l'élaboration de ce travail :

Mme KEITA Nanténé KEITA : Technicienne de Labo

Mr Hamadoun OUOLOGUEM : Infirmier Spécialiste lèpre.

Pour leur franche collaboration.

A Mr Issa WASSA : Aide-soignant

Mr Bamba KIABOU : Aide-soignant

Aly MINTA : Aide-soignant

Pour l'entretien des souris.

En témoignage de ma respectueuse gratitude et de ma profonde admiration.

A tout le personnel de l'Institut MARCHOUX.

A tous nos maîtres de l'Ecole de Médecine et de Pharmacie.

Au Professeur Souleymane SANGARE

Pour tous les efforts que vous m'avez prodigués. Retrouvez ici le témoignage de ma profonde gratitude.

A Mme DOUMBIA Oumou DIOUF qui a accepté de dactylographier ce travail.

Toute ma sympathie.

A NOS JUGES

A notre Maître et Président de Thèse

Professeur Yaya FOFANA

Professeur d'Hématologie à l'E.N.M.P. du Mali, Ancien chef de l'Unité
Biologie de l'Institut MARCHOUX.

Nous le remercions de nous avoir accueilli dans son laboratoire dès le début de nos études et d'avoir pris une part si active et si efficace dans l'élaboration de ce travail. Il n'a jamais hésité à nous accorder l'entretien qui apporte conseils, encouragements, appui et solutions.

Nous n'oublierons jamais la confiance qu'il a bien voulu nous accorder. Puissent notre travail et nos efforts lui apporter le témoignage de notre immense gratitude et de notre respectueux attachement.

A notre Maître Professeur Boubacar CISSE

Professeur de Toxicologie à l'E.N.M.P. du Mali

Chef D.E.R. de Pharmacie

Après nous avoir prodigué au cours de nos études un enseignement de qualité, nous fit l'honneur de sa présence parmi notre Jury. Qu'il retrouve ici l'expression de toute notre gratitude.

Au Docteur Issa TRAORE

Directeur de Thèse

Chef de l'Unité Animalerie Expérimentale de l'Institut MARCHOUX

Vous avez bien voulu me conseiller pour la rédaction de cette thèse, et vous avez beaucoup aidé à sa réalisation grâce à votre apport précieux en matériels et en documents. Vous avez également accepté de participer au Jury de cette thèse, je vous en remercie très profondément et je vous prie de croire à mon parfait dévouement.

Au Docteur P. JAMET

Chef de l'Unité Recherche Appliquée de l'Institut MARCHOUX

Vous qui avez accepté de participer au Jury de cette thèse, je vous prie de retrouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Je remercie sincèrement

Messieurs le Docteur Pierre BOBIN, Directeur de l'Institut MARCHOUX ainsi que le Professeur J. GROSSET : qui m'ont patiemment guidé dans le choix du sujet, des méthodes et dont les conseils m'ont aidés à réaliser ce travail.

S O M M A I R E

	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : <u>MALADIE DE HANSEN</u>	3
1. Description de la maladie	3
2. Classification	4
2.1 La forme indéterminée	4
2.2 La forme tuberculoïde polaire (TT)	4
2.3 La forme lépromateuse (LL)	4
2.4 Les formes borderlines (BB, BL, BT)	4
CHAPITRE II : <u>MYCOBACTERIUM LEPRAE</u>	5
1. Historique	5
2. Classification	5
3. Morphologie	5
3.1 Microscopique optique	6
3.2 Microscopique électronique.	6
4. Essais de culture	10
5. Recherche de M. leprae	10
5.1 Coloration du frottis	11
5.2 Evaluation du nombre et de l'aspect morphologique des bacilles.	12
6. Inoculation de M. leprae à la souris	12
6.1 Multiplication de M. leprae chez la souris	13
6.2 Classification de l'activité anti-bactérienne des antibiotiques	13
6.3 Persistance de M. leprae après chimiothérapie.	15
CHAPITRE III : <u>MEDICAMENTS ANTILEPREUX</u>	16
1. <u>Dapsone</u>	16
1.1 Historique	16
1.2 Constitution chimique	17
1.3 Présentation	18
1.4 Posologie	19
1.5 Mode d'action	19
1.6 Toxicité	19

2.	<u>Rifampicine</u>	20
2.1	Constitution chimique	20
2.2	Mécanisme d'action	20
2.3	Posologie	20
2.4	Métabolisme	21
2.5	Toxicité	21
3.	<u>Clofazimine</u>	23
3.1	Actions thérapeutiques	23
3.2	Tolérance	23
4.	Ethionamide - Prothionamide	25
5.	Polychimiothérapie	26
CHAPITRE IV : <u>RESISTANCE MEDICAMENTEUSE DE M. LEPRAE</u>		27
1.	Définition de la résistance médicamenteuse	27
2.	Résistance primaire et secondaire	27
3.	Preuve de l'existence d'une résistance médicamenteuse	28
3.1	Essai clinique	28
3.2	Test de sensibilité médicamenteuse dans le coussinet plantaire de la souris	28
4.	Etiologie de la résistance médicamenteuse	29
5.	Prévention de la résistance médicamenteuse	30
CHAPITRE V : <u>MATERIEL ET METHODES</u>		31
1.	Les malades	31
2.	Méthodes	32
2.1	Préparation des échantillons de biopsies cutanées pour l'inoculation à la souris	32
2.1.1	Lames pour la préparation des frottis standards	32
2.1.2	Nettoyage des lames	32
2.1.3	Délivrance du volume standard de suspension bacillaire	32
2.1.4	Fixation et coloration de frottis standards	32
2.1.5	Microscopie	33
2.1.6	Numération des BAAR	33
2.1.7	Calcul de la concentration de BAAR/ml de suspension	33

2.2	Préparation de biopsies pour l'inoculation à des souris	34
2.3	Inoculation de <i>M. leprae</i> à la souris	35
2.3.1	Etude de la viabilité de <i>M. leprae</i>	35
2.3.1	Etude de la sensibilité aux médicaments	35
2.3.1.1	Mesure de la sensibilité de <i>M. leprae</i> à la Dapsone	35
2.3.1.2	Mesure de la sensibilité de <i>M. leprae</i> à la Rifampicine	36
2.4	Collecte de <i>M. leprae</i> à la patte de souris	36
2.5	Préparation des colorants	38
2.6	Préparation de la solution de RMP à 1 g/l	39
2.7	Souris d'expérimentation	
CHAPITRE VI : <u>RESULTATS</u>		43
CHAPITRE VII : <u>DISCUSSION</u>		50
CONCLUSION		52
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.		54

A B R E V I A T I O N S

M. leprae	Mycobacterium leprae
D.D.S.	Dapsone
RMP	Rifampicine
CLO	Clofazimine
ETH	Ethionamide
PTH	Prothionamide
E.N.M.P.	Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie
IB	Indice bacillaire
IM	Indice morphologique
BAAR	Bacille acido alcoolique résistant
M. tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis

INTRODUCTION

Maladie de répartition mondiale, la lèpre affecte environ 12 millions d'individus (39) dont les deux tiers vivent en région tropicale.

L'expression pathologique de la lèpre est directement liée aux réponses immunologiques développées par l'hôte vis à vis de *Mycobactérium leprae*.

Les formes lépromateuses sont caractérisées par une non réponse cellulaire associée à une dissémination bactérienne massive. Ce sont ces formes qui posent le plus de problèmes thérapeutiques.

Cette endémie lépreuse a été exclusivement traitée par les sulfones en monothérapie pendant une vingtaine d'années.

Or, à la lumière des observations faites dans les maladies infectieuses et dans la tuberculose en particulier (5), la monothérapie expose au risque d'apparition rapide de souches bacillaires résistantes. Il était donc logique de voir apparaître des résistances aux sulfones qui s'exprimaient par une rechute sous traitement.

Mais bien que les sulfones aient été utilisées pour la première fois en 1941 par FAGET et al., la première suspicion de sulfono-résistance secondaire ne fut rapportée qu'en 1953 par WOLCOTT et ROSS (47) et la première preuve clinique et expérimentale par PETTIT et REES (29, 30).

La prévalence de cette résistance acquise à la Dapsone varie suivant les pays : Mali 5 % avec une incidence annuelle de 3 % (1, 2) ; Ethiopie 100 % avec une incidence annuelle de 3 % (27, 28) ; Burkina Faso 7 % (24).

L'activité bactéricide puissante de la Rifampicine a été illustrée par de nombreuses études tant chez la souris que chez l'homme (23, 36, 37, 44), son utilisation dans le traitement de la lèpre a réduit considérablement la durée du traitement.

Si la résistance à la Dapsone est maintenant bien décrite, seuls quelques cas de résistance à la Rifampicine ont été rapportés (6, 13, 14, 16, 17). En effet, à partir de 1977, un certain nombre d'essais de chimiothérapie comportant l'administration de Rifampicine ont été réalisés à l'Institut MARCHOUX. Les résultats cliniques et bactériologiques avaient été jugés très favorables à la fin du traitement chez tous les malades inclus. Après quelques années d'inactivité clinique, certains de ces malades ont présenté des

signes de rechute. Le but de cette étude est :

- 1) Confirmer expérimentalement ces rechutes cliniques par étude de la viabilité de *Mycobacterium leprae* dans le coussinet plantaire de la souris (seule méthode disponible actuellement).
- 2) Mesurer la sensibilité de M. leprae à la Rifampicine et à la Dapsone.

Cette étude a été réalisée grâce à l'Animalerie Expérimentale de l'Institut MARCHOUX, qui est la première en Afrique Francophone de l'Ouest.

L'Animalerie Expérimentale collabore très étroitement avec le laboratoire de bactériologie concernant les prélèvements de B.H. pour l'établissement de l'indice bactériologique (IB) et morphologique (IM) dans les diverses formes de lèpre.

Elle a rapidement contribué au projet de Kolokani et est fortement encouragée et financée en partie par l'O.M.S. et l'A.F.R.F. :(Association Française Raoul FOLLEREAU).

Nous adopterons le plan suivant : au préalable une revue des principales données concernant la bactériologie et la thérapeutique de la maladie de HANSEN sera d'abord présentée.

Dans un deuxième temps, nous décrirons nos méthodes et les résultats seront discutés et confrontés aux données de la littérature.

CHAPITRE I

MALADIE DE HANSEN

1. DESCRIPTION

La maladie de HANSEN est une maladie à trophisme nerveux, les atteintes par le bacille seront donc, à plus ou moins long terme, des atteintes nerveuses, la prédilection de M. leprae pour les tissus nerveux n'a pas encore été pleinement élucidée.

LUASDEN en 1964 (21) rapporte que les acides aminés nécessaires à la croissance de M. leprae se rencontrent au niveau de la fibre nerveuse.

2. CLASSIFICATION

La maladie de HANSEN présente plusieurs aspects différents tant du point de vue clinique, bactériologique, histologique et immunologique.

La classification actuelle est celle de Ridley JOPLING adoptée par l'OMS.

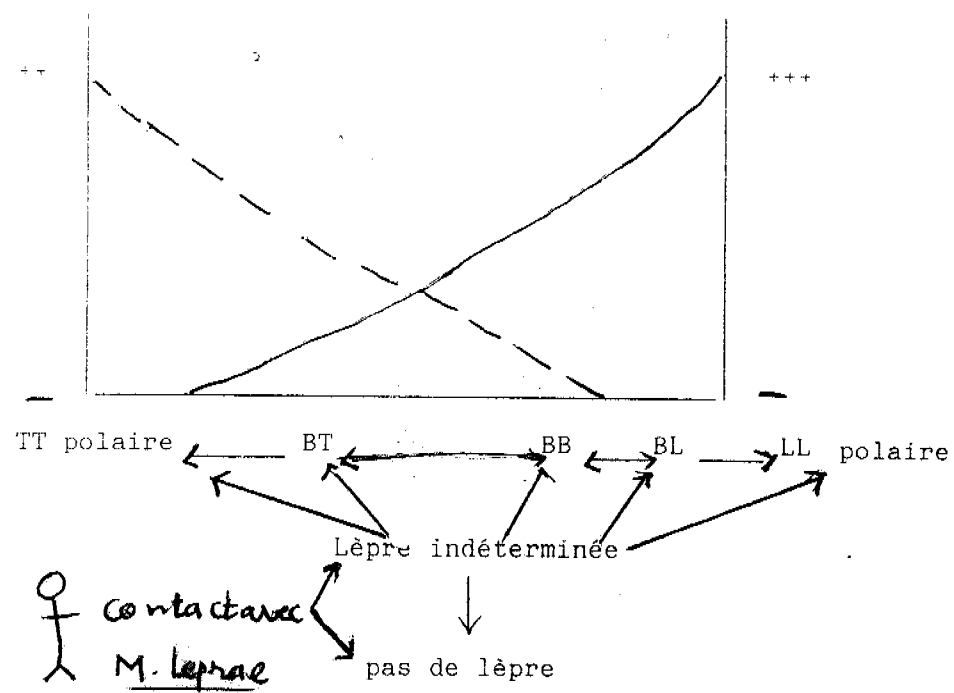


Fig n°1 Schéma de Ridley JOPLING (33)

- Taux des anticorps
- - - - Réponse de l'immunité à médiation cellulaire
- TT Lèpre tuberculoïde polaire
- BT Lèpre Borderline tuberculoïde
- LL Lèpre Lépromateuse polaire
- BB Lèpre Borderline
- BL Lèpre Borderline Lépromateuse

2.1 La forme indéterminée

Forme obligatoire de départ de la maladie de HANSEN qui évoluera vers l'une des formes de la maladie ou se guérira pleinement.

2.2 La forme tuberculoïde polaire (TT)

Encore appelée forme allergique, c'est la forme non contagieuse de la maladie où prédominent les lésions nerveuses.

C'est une forme stable, les rares bacilles, trouvés lors des prélèvements histologiques, sont localisés au niveau de la fibre nerveuse avec une prédilection pour la gaine de schwaan. Les malades atteints présentent cependant une réaction d'hypersensibilité retardée (H.R.) que l'on peut mettre en évidence in "vivo" ou in "vitro".

2.3 La forme lépromateuse (LL)

Forme multibacillaire et contagieuse de la maladie, avec présence de nombreux bacilles disséminés dans l'organisme.

Les malades présentent une H.R. nulle mais une réaction à médiation humorale très importante mais inefficace. Cette forme lépromateuse polaire est également une forme stable parfois appelée forme anergique.

2.4 Formes Borderlines (BB, BL, BT)

Formes à immunités variables non stables pouvant évoluer vers les formes allergiques (Reversal Reaction) ou anergiques (Down grading reaction). On y trouve toutes les nuances intermédiaires entre TT polaire et LL polaire.

CHAPITRE II

MYCOBACTERIUM LEPRAE

1. HISTORIQUE

L'agent pathogène de la lèpre fut découvert par Armauer HANSEN en 1873, il réussit à décèler sur des préparations fraîches et non colorées de tissus lépreux de petits bâtonnets rectilignes résistant à l'action de la potasse. Il s'agissait du bacille de HANSEN (BH) mais son interprétation fut constaté par WIRCHOW, et ce n'est qu'après l'application par NEISSER en 1879 des techniques employés par KOCH pour colorer le bacille de la tuberculose, que la nature microbienne des bâtonnets décrits par HANSEN fut définitivement admise.

2. CLASSIFICATION

Le bacille de HANSEN est un schisomycète qui se place dans :

- la classe des Actinomycetales
- l'ordre des Mycobacteriales
- la famille des Mycobactéries
- le genre Mycobacterium.

L'espèce est Mycobacterium leprae (HANSEN)

3. MORPHOLOGIE

3.1 Au microscope optique : on distingue 3 formes :

- le bacille normal est un bâtonnet immobile, rectiligne ou légèrement incurvé, aux extrémités arrondies dont la longueur varie de 3 à 8 microns et la largeur de 0,3 à 0,5 microns.
Les bacilles les plus longs se retrouvent dans la lèpre active. Ils se colorent uniformément en rouge vif par la méthode ZIELH NIELSON, basée sur la propriété que présentent certains bacilles de résister à l'action de l'acide et de l'alcool après avoir été colorés par la fuchsine : ce sont des bacilles acido alcool résistants.
- Le bacille en involution assez volumineux, incurvé, terminé par un renflement en massure moins uniformément coloré, correspondant à une forme de souffrance.
- Le bacille en dégénérescence qui se rencontre chez les malades en traitement et qui doivent être considérés comme des stades de destruction du bacille.

.../...

Des lacunes décolorées dans l'épaisseur du corps bacillaire donnent divers aspects : bipolaire, en chaînette ; enfin la désintégration du bacille disperse les grains qui se transforment en poussière puis disparaissent.

Une des particularités du bacille de HANSEN est de se rassembler parallèlement les uns aux autres en paquet de cigares. Dans les lésions lépromateuses, les bacilles se regroupent en amas arrondis de 50 à 100 microns de diamètre que l'on appelle "globi" et qui résulte de l'agglutination des bacilles par une substance amorphe, non acido résistante : la gelée.

Le globi est intracellulaire, les bacilles pénètrent dans un macrophage, s'y multiplient, envahissent la cellule, repoussant noyau et cytoplasme, provoquant à la périphérie sa dégénérescence.

3.2 Au microscope électronique

A l'aide de cet appareil, des études très détaillées de M. leprae ont été faites, soit sur des bacilles isolés, soit sur des coupes ultra fines de lésions lépreuses.

La surface bactérienne est recouverte d'une membrane cellulaire constituée par deux couches épaisses de 10 millimicrons, l'interne de densité modérée, l'externe de faible densité.

La membrane cytoplasmique est constituée de deux couches denses de 3 millimicrons d'épaisseur, séparées par un espace de faible densité électronique, la couche la plus externe étant accolée à la membrane cellulaire. En un certain point de sa surface, cette membrane s'invagine dans la profondeur du cytoplasme en un manchon torsadé : le mésosome.

Le cytoplasme bactérien forme un gel apparemment amorphe contenant les ribosomes qui sont souvent groupés en amas : les polysomes, le noyau est une formation ovale ayant 30 à 60 Å de diamètre.

4. LES ESSAIS DE CULTURE

Malgré les essais de plusieurs chercheurs, on n'est pas encore arrivé à cultiver M. leprae.

.../...

Les milieux les plus divers ont été employés, ceux utilisés dans la culture du BK (Bacille de KOCH) et des mycoses, les milieux synthétiques et ceux contenant les facteurs de croissance, les milieux en aérobiose et en anaérobiose. Tous ces essais ont abouti à des résultats toujours contestés.

D'autres tentatives ont été faites d'inoculer les cellules de culture par des bacilles acido résistants, vivants, irritants, provenant de lépromes confirmés histologiquement.

Le problème majeur de ces essais d'inoculation de cellule en culture provient de ce que le temps de dégénération du bacille de HANSEN est nettement plus long que pour la cellule hôte. On obtient une majorité de cellules non parasitées au point qu'on a l'impression que les bacilles ont disparu dans le milieu (19).

Pour KATO, l'échec des cultures de BH peut s'expliquer par le fait que : *Mycobacterium* aurait des caractères comparables à ceux de certains microorganismes du sol, il présenterait le même mécanisme d'accumulation du carbone et l'absence des mêmes enzymes : ce serait un bacille autotrophe, raison pour laquelle il ne détruit pas l'histiocyte dans lequel il vit.

Le sol très riche en matières organiques pourrait jouer un rôle de vecteur dans la transmission de la maladie.

Si la culture de *M. leprae* reste encore impossible, par contre des bacilles non acido résistants ont été isolés fréquemment par de nombreux chercheurs à partir de lésions cutanées, de sang, moëlle osseuse de lépreux.

DELEVILLE (8) a isolé des germes décrits comme diphtéroïdes à cause de leur ressemblance avec *Coryn diptheria*. Ce sont des bâtonnets gram positif irréguliers, parfois ramifiés avec renflement terminal ou en altéré, avec tendance à la formation d'éléments coccoïdes en chapelets.

Le traitement à l'acide périodique entraîne une acido résistance mais elle serait due à des substances polysaccharidiques constituant en partie leur paroi cellulaire.

DELEVILLE qui a réussi des isolements à partir des prélèvements provenant de diverses régions du globe, désigne cette bactérie par les lettres L.D.C. (Leprosy derived coryn bacterie Braksdale).

Toutes les souches obtenues présenteraient les mêmes caractères morphologiques et tinctoriaux : l'étude immunologique aurait démontré à DELEVILLE la présence de divers antigènes communs entre M. leprae et sept de leurs souches. Les diptéroïdes ((L.D.C.) vivant à faible dose stimulent la multiplication de M. leprae avec un raccourcissement du temps de génération. Cet effet n'est pas obtenu avec d'autres germes et permet donc de le considérer comme spécifique.

La relation antigénique des L.D.C. avec M. leprae suggère la possibilité de leur emploi pour des tests cutanés chez les lépreux au même titre que la lépromine.

COUDERT et al (7) ont obtenu deux souches de mycobactéries sur milieu lowenstein-jensen, souches isolées de culture de lépromes humains en provenance de Rhodésie (Rho) et de Vietnam (Vi). L'ultra-structure, le comportement intracellulaire, le rôle pathogène pour les rongeurs ont été étudiés, mais ce sont les méthodes d'immuno-fluorescence et d'immuno-électrophorèse vis à vis des serums de malades qui ont fait ressortir une parenté structural et antigénique étroite avec M. leprae et M. leprae murium.

MUROHASHI aurait cultivé une suspension mycobactérienne obtenue à partir d'un nodule lépromateux dans un milieu de gélose molle, dépourvu d'éléments cellulaires, dans lequel il avait ajouté du pyruvinate et augmenté la teneur en phosphate et sulfate de magnésium. Après cinquante semaines à 37 ° C l'examen de frottis réalisé à partir de ces cultures a montré la présence de microcolonies de bacilles acido-résistants. Des suspensions de ces bacilles injectées par voie intradermique à des lépreux aurait réagit comme le lépromine.

Face à l'isolement de plus en plus fréquent des souches cultivables in vitro qu'on dénomme "bacille de HANSEN", en raison de l'origine ayant servi à l'isolement, le groupe de travail sur la microbiologie au congrès international de la lèpre en 1978 a fixé les critères à appliquer au prétendu succès de culture in vitro du bacille de HANSEN (22).

- La technique doit réussir dans plusieurs essais différents à partir du matériel riche en bacilles, à partir de prélèvement soit de malades, soit d'animaux inoculés.

- Le degré de multiplication doit être significatif, en tenant compte des erreurs expérimentales et d'artefacts.
- Idéalement les cultures devraient pouvoir être subcultivées indéfiniment.
- Les critères d'identification suivants devraient être appliqués :
 - a) Toutes les souches cultivées devraient être identiques dans tous leurs caractères, y compris leurs sensibilités aux substances antimicrobiennes, quoique des différences mineures soient possibles, on ne peut en effet exclure l'existence de biotypes.
 - b) Les souches doivent posséder des déterminants antigéniques spécifiques de M. leprae.
 - c) Les souches doivent être différentes des espèces actuellement connues de mycobactéries.
 - d) Elles doivent se comporter chez les animaux d'expérience comme les souches de M. leprae isolées de l'homme.
 - e) Des suspensions standardisées doivent fournir des réactions de Mitsuda négatives chez le lépromateux et positives chez les sujets non lépromateux.
 - f) La paroi cellulaire doit avoir la même composition que celle de M. leprae préparée à partir de tissus d'animaux inoculés expérimentalement.
 - g) L'hybridation de l'ADN de souches cultivées doit montrer un degré d'homologie élevé avec celui de M. leprae obtenu à partir de tissus infectés (humain ou animal).

La situation actuelle est qu'aucune souche cultivée prétendue M. leprae ne remplit les critères mentionnés. A l'heure actuelle la culture in vitro de M. leprae n'est donc pas réalisée.

.../...

5. RECHERCHE SUR M. LEPRAE

La mise en évidence du Mycobacterium leprae :

- de poser avec certitude le diagnostic de lèpre, mais rappelons que cette recherche est presque toujours négative dans les formes allergiques,
- de classer le malade et d'apprécier son degré de contagiosité,
- d'évaluer les résultats thérapeutiques.

Dans la pratique courante, on recherche le bacille dans :

- la muqueuse nasale
 - le suc dermique au niveau d'une lésion cutanée
 - le suc dermique du lobe de l'oreille.
- L'examen de la muqueuse nasale se fait en curetant légèrement le septum nasal ou le cornet inférieur. Un écouvillonnage énergique du nez peut suffir. L'examen doit porter sur la muqueuse pituitaire et non sur le mucus nasal qui peut contenir des bactéries acido-résistantes saprophytes.
- Le prélèvement du suc dermique se fait en pratiquant une incision à l'aide d'un vaccinostyle, gratter le derme et étendre le suc dermique sur une lame. Il ne faut pas scarifier trop profondément pour ne pas avoir trop de sang : cette méthode est plus pratique car elle permet de faire des frottis de plusieurs lésions et d'étaler ces divers prélèvements sur une seule lame.
- Le suc dermique du lobule de l'oreille est précocement positif chez le lépromateux. Le prélèvement se fait par une scarification légère au vaccinostyle. On effectue généralement deux prélèvements, un à droite et un à gauche.

5.1 Coloration du frottis

Les lames (pas plus de 4 à la fois) sont recouvertes de carbo-fuchsine récemment filtrée, puis on les laisse reposer 20 minutes. On les lave ensuite avec précaution à l'eau du robinet (dans un becher, de façon que le frottis ne reçoive pas directement l'eau).

On les laisse ensuite mouillées jusqu'à ce qu'on les décolore, lame par lame, en faisant couler doucement une solution d'acide chlorhydrique à 1 % dans l'éthanol à 70 % sur la lame jusqu'à ce que le liquide

s'écoulant doucement soit incolore. Dès que la décoloration est obtenue, on lave la lame à l'eau de robinet et on la laisse mouillée jusqu'à recoloration différentielle par contact avec du bleu de méthylène pendant une minute.

5.2 Evaluation du nombre et de l'aspect morphologique des bacilles

Indices

Il est classique de calculer deux indices :

- l'indice bacillaire de RIDLEY
 - l'index morphologique de REES.
 - L'indice bacillaire de RIDLEY recense les bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) par champ microscopique selon l'échelle logarithmique de RIDLEY & JOPLING
- Par définition, l'indice bacillaire est la moyenne arithmétique des indices déterminés sur les frottis de muqueuse nasale et du suc dermique prélevés sur un sujet en différents endroits du corps du malade.

Indice bacillaire	BAAR par champ microscopique
6+	plus de 1 000 par champ
5+	100 à 1 000 par champ
4+	10 à 100 par champ
3+	1 à 10 par champ
2+	1 à 10 pour 10 champs
1+	1-10 pour 100 champs
0+	0 par champ

- L'index morphologique de REES détermine le pourcentage des germes uniformément colorés à l'immersion au microscope.
- SHEPARD (34) a établi une corrélation entre l'aspect morphologique des bacilles et leur pouvoir infectieux, confirmant l'hypothèse de HANSEN selon laquelle les formes fragmentaires ou granuleuses ne sont que des degrés divers dans la dégénérescence du bacille, seuls les bacilles totalement colorés sont viables et contagieux.

En Afrique sa valeur est généralement à 50 % chez les lépromateux non traités ; elle diminue rapidement avec traitement et avoisine 0 % après un mois de traitement par la Rifampicine à six mois par les sulfones et la Clofazimine (19).

6. INOCULATION DE M. LEPRAE A LA SOURIS

En absence de culture sur milieu artificiel, l'inoculation de M. leprae dans le coussinet plantaire de la souris et l'étude de sa multiplication chez cet animal sont les seuls moyens dont on dispose actuellement pour prouver la viabilité des bacilles visibles à l'examen microscopique, apprécier l'activité des antibiotiques disponibles et tester la sensibilité des bacilles aux antibiotiques. Dans ce domaine aucun changement fondamental n'a été effectué depuis la mise au point de la méthode par SHEPARD (34, 38).

6.1 Multiplication de M. leprae chez la souris (10)

En se basant sur les travaux de FENNER, SHEPARD (34) démontre que la multiplication de M. leprae est limitée dans le coussinet plantaire des souris intacts immunologiquement.

L'inoculation de 5×10^3 M. leprae dans le coussinet plantaire de la souris est suivie d'une phase de latence qui dure habituellement 3 à 4 mois. Pendant cette phase l'examen microscopique quantitatif ne permet pas de mettre en évidence les bacilles. Ceux-ci n'apparaissent qu'au 4^e mois. Leur nombre augmente progressivement, pour atteindre, autour du 6^e mois, un maximum de 10^6 .

Lorsque la population bacillaire atteint 10^6 , la multiplication des bacilles s'arrête en raison de l'acquisition par la souris d'une immunité spécifique. Le nombre des bacilles viables diminue ensuite spontanément, en moyenne 50 % tous les 25 jours (44).

Par contre chez les souris thymectomisées et irradiées, et chez les souris nues, la multiplication ne s'arrête pas lorsque la population bacillaire atteint 10^6 , elle continue, la population bacillaire peut atteindre 10^7 - 10^8 chez les souris thymectomisées et irradiées (31) et même 10^9 voire plus chez les souris nues.

Le temps de division reste de l'ordre de 14 jours chez les souris immunodéficientes que chez les souris conventionnelles.

L'intérêt des souris immunodéficientes n'est donc pas de donner des résultats plus rapidement que les souris conventionnelles mais plutôt de permettre des inoculations plus riches et donc de faciliter la mise en évidence de rares bactéries persistantes.

6.2 Classification de l'activité antibactérienne des antibiotiques

La courbe de croissance de M. leprae chez la souris peut être affectée par l'administration simultanée d'un antibiotique. Comme l'effet produit par un antibiotique dépend considérablement de la méthode employée pour l'étudier.

Deux méthodes sont principalement employées : la méthode cinétique de SHEPARD (35), et la méthode du nombre le plus probable de COLSTON (4).

Dans la méthode cinétique, l'antibiotique est administré à la souris pendant les 2 mois qui suivent l'incubation de M. leprae. La courbe de croissance des bacilles est ensuite comparée à la courbe témoin obtenue avec les mêmes bacilles inoculés simultanément à des souris témoins qui ne reçoivent pas d'antibiotique.

Plusieurs éventualités peuvent se produire : (figure n°2)

- a) la courbe des bacilles est superposable à la courbe témoin : l'antibiotique est inactif
- b) la courbe des bacilles est parallèle à la courbe témoin mais décalée dans le temps de 2 mois, c'est-à-dire de la durée d'administration de l'antibiotique. Ce dernier a seulement empêché la multiplication des bacilles tant qu'il était administré mais la multiplication des bacilles a repris dès qu'il a été arrêté. L'antibiotique est dit bactériostatique.
- c) La courbe des bacilles est décalée dans le temps de plus de 2 mois. Tout se passe comme si, au moment où la multiplication reprend à l'arrêt de l'administration de l'antibiotique, le nombre de bacilles viables était plus faible qu'il ne l'était au début du traitement. L'antibiotique est dit bactéricide parce qu'il ne s'est pas contenté d'arrêter la multiplication bacillaire mais a tué une proportion plus ou moins importante des bacilles. Bien entendu, l'antibiotique est d'autant plus bactéricide que la courbe de croissance des bacilles est plus décalée dans le temps par rapport à la courbe témoin.
- d) A l'extrême, avec un antibiotique très fortement bactéricide, les bacilles inoculés seront tous tués et il n'y aura plus du tout de croissance.

L'absence d'activité bactéricide est efficacement démontrée par cette approche ; toutefois, la plupart des médicaments bactéricides exercent un effet bactériopansal, c'est-à-dire une bactériostase prolongée après arrêt de traitement suite à la guérison de cellules atteintes de manière rémédiabile.

Alors que des médicaments tels que la Clofazimine, persistent dans les tissus du sujet après la fin du traitement.

Une approche modifiée conçue pour surmonter ces difficultés et appeler le nombre le plus probable, c'est une méthode encore plus précise pour apprécier l'activité d'un antibiotique. Après avoir soumis une population bacillaire à l'action d'un antibiotique étudié, des dilutions successives de cette population bacillaire sont inoculées à des souris. La plus forte dilution ne donnant pas bien à une croissance permet de calculer le nombre le plus probable de survivant à l'action de l'antibiotique.

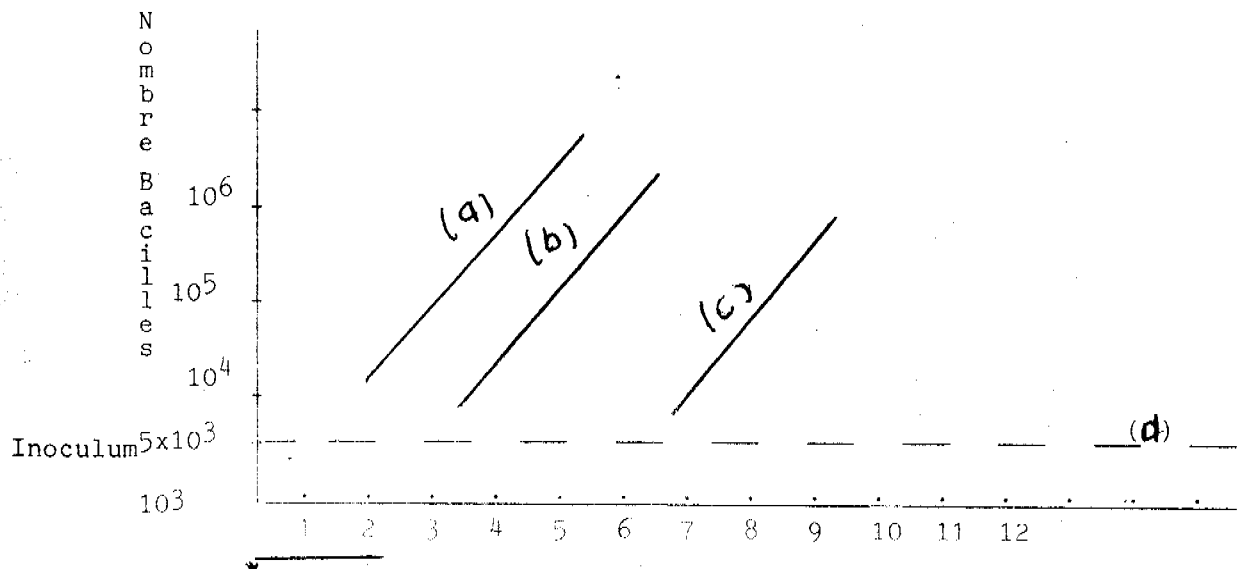


Fig n°2 Appréciation de l'activité d'un antibiotique sur M. leprae chez la souris selon la méthode cinétique.

		(a) Pas d'activité	(b) bactériostase	(c) bactéricidie
		(d) bactéricidie totale.		

Début Fin
de traitement

6.3 Persistance de *M. leprae* après chimiothérapie

Malgré l'administration prolongée d'antibiotique, un certain nombre de *M. leprae* sensibles aux antibiotiques administrés survient au sein des lésions. Ces bacilles, appelés bacilles persistants ("persisters"), sont responsables des rechutes qui surviennent après arrêt du traitement. De tels microbes persistants ont été mis en évidence dans d'autres maladies que la lèpre, par exemple les staphylococcies, les streptococcies, fièvre typhoïde, brucellose et bien entendu la tuberculose.

Le phénomène de persistance microbienne n'est donc pas spécifique à la lèpre. Il pourrait toutefois être plus fréquent dans la lèpre que dans les autres maladies infectieuses, peut-être que les populations bacillaires sont plus abondantes que dans les autres maladies infectieuses ou parce que les moyens de défense de l'organisme sont plus perturbés. Il n'était pas étonnant que la persistance microbienne soit fréquente chez les malades traités par la Dapsone. Car cet antibiotique a une faible activité bactéricide.

Pour COLSTON (4), en effet après deux mois de traitement quotidien de la souris par la Dapsone, à une posologie équivalente à 100 mg/j chez l'homme, 22 % des bacilles inoculés sont encore vivants. Alors que pour la Rifampicine, après deux mois de traitement quotidien par la Rifampicine, 0,01% seulement des bacilles inoculés sont encore vivants.

Toutefois des persistants ont pu être mis en évidence après 5 ans de traitement par la Rifampicine (43).

L'inoculation à la souris est actuellement le seul moyen biologique de révéler la persistance de *M. leprae* après chimiothérapie.

Mais on ne peut inoculer que 5×10^3 ou 10^4 *M. leprae* dans le coussinet plantaire des souris normales, du point de vue immunologique. Il est donc difficile d'étudier la persistance microbienne.

Mais par contre l'emploi des souris immuno déprimées, auxquelles on peut inoculer plus de bacilles, permet d'apprécier avec plus de précision le phénomène de persistance.

L'étude récente de Chingleput-Bamako rapporte des taux constants d'environ 10 % de persistance à 3, 12, 24 mois, quel que soit le protocole thérapeutique utilisé dans cette étude (40, 41, 45).

CHAPITRE III

MEDICAMENTS ANTILEPREUX

Jusqu'en 1941, il n'existait pas de médicaments antiléprieux réellement efficace, puisque l'huile d'hydrocarpus (chaulmoogra) à laquelle on recourait depuis des siècles en Chine et en Inde s'était révélée de valeur médiocre.

En 1941 Guy FAGET utilisait pour la première fois un dérivé disubstitué de la Dapsone (Promin*) par voie intraveineuse pour soigner la lèpre aux U.S.A. Actuellement, la Dapsone, la Clofazimine et la Rifampicine sont les principaux antiléprieux.

1. LA DAPSONE

1.1 Historique

La sulfone mère a été synthétisée en 1908 par FROMM et WITMANN. Trente ans plus tard J. FOURNEAU et al de l'Institut Pasteur montraient son activité vis à vis de la streptococcie expérimentale de la souris. En 1939, RIST, Mile BLOCH et HAMON rapportaient l'activité de la sulfone mère in vitro sur le BK et in vivo sur la tuberculose de cobaye du lapin et des oiseaux.

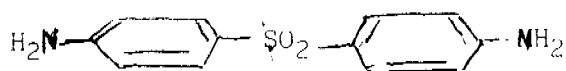
Mais ce médicament montrait une importante toxicité liée à la forte posologie.

Les dérivés moins toxiques furent alors préparés et utilisés d'abord dans la tuberculose, puis dans le traitement de la lèpre. En 1941, FAGET et al utilisaient la Promin* (dérivé disubstitué à la léproserie de Carville en Louisiane). Ces résultats furent remarquables qu'ils marquaient une nouvelle étape dans le traitement de la lèpre.

Ces dérivés sulfonés étaient chers, ce qui limitait leur emploi, de plus l'expérimentation a révélé qu'ils n'agissent que par la sulfone mère libérée dans l'organisme, après leur dégradation celle-ci fut alors employée seule.

1.2 Constitution chimique

c'est une sulfone symétrique à deux noyaux.



C'est la 4-4' diaminodiphenyl sulfone (DDS) et sa formule brute est : $C_{12}H_{12}N_2O_2S$: 248,3 (poids moléculaire).

Elle est spécialisée sous les noms déposés suivants :

Disulone*, Dapsone*, Avlosulfone.

Sa toxicité à forte dose (1-28/j) dans le traitement des infections streptococciques a amené les chimistes à synthétiser des dérivés par introduction dans la molécule de substituants qui devaient soit diminuer la toxicité, soit accroître l'activité.

- Les sulfones M monosubstitués : expérimentés en un laps de temps
- L'hydroxyéthylsulfone : métabolisée dans l'organisme en un dérivé glycine qui a été synthétisé sous le nom de phénylglycine sulfone ou (ciloprome).
- L'exosulfonyl ou succinylsulfone
- Les sulfones M'M disubstitués : largement expérimentés
- La Promin* ou diamino 4-4' diphenylsulfone diglucose de sodium qui a été utilisée par FAGET par voie intraveineuse à la dose quotidienne de 2.5g, 32 % DDS.
- Cimedone ou paradiphenyl M'.propyl aminophenyl sulfone tétra sulfonate de sodium ou sulphetrone 27 % DDS fut expérimenté par LAVIRON et LAURET à l'Institut MARCHOUX avec d'excellents résultats (19).
- Chaulfone ou bis dihydrochaulmoogryl 4-4' DDS : 32 % DDS, elle fut utilisée à la dose de 200 mg/j.
- L'Avlosulfone ou diéthyl 4-4' DDS disulfonate de sodium 50 % DDS ; utilisé à la dose de 800 mg en IV trois fois par semaine avec des résultats équivalents à ceux de la DDS.

1.3 Présentation

Il existe actuellement deux présentations.

- Sous forme de comprimés dosés à 100 mg de diamino diphenyl sulfone. Ils sont présentés en spécialités sous le nom de Dapsone* ou Disulone* utilisé dans le traitement de masse. Le Disulone fer contient en plus du DDS, 20 mg de protoxalate de fer pour lutter contre l'anémie qui peut compliquer le traitement.
- Il existe également une Disulone 40 mg + 80 mg de protoxalate de fer.

.../...

- Sous forme de suspension retard : la difficulté du traitement de masse en Afrique noire provient du fait qu'il est nécessaire d'aller distribuer le médicament à de nombreux malades dispersés sur de vastes régions. Ce qui a nécessité l'emploi des suspensions retard permettant des injections hebdomadaires ou bimensuelles. La DDS parentérale est une suspension à 25 % de DDS dans du chaulmoograte d'éthyle (1 ml = 250 mg DDS) administrée tous les 15 jours. Cette forme a été utilisée à l'Institut MARCHOUX par SCHNEIDER et RAYROUX.

Actuellement il existe une forme long. retard : la 4-4' diacetyl DDS ou DA DDS ou Hansolar, injectée par voie intramusculaire à la dose de 225 mg tous les 15 jours, elle libère 2-3 mg de DDS par jour et, selon les expérimentateurs, elle présenterait une activité comparable à celle de la DDS.

Par contre, le D.A. DDS ne doit être utilisé que lorsque le malade est bactériologiquement inactivé, dans un traitement d'entretien (19).

1.4 Posologie

La prise quotidienne représente la méthode la plus souhaitable, la posologie est de 50-100 mg (1-2 mg/kg de poids corporel).

Une dose quotidienne inférieure à 100 mg ne devrait pas être administrée à des adultes pesant plus de 20 kgp. Cette posologie fait apparaître dans le serum, après 4 heures environ, des pics de concentration maximale inhibitrice (CMI) de Dapsone sur M. leprae.

Ces hautes concentrations du médicament vont inhiber la multiplication des mutants de M. leprae qui présentent une résistance légère à la Dapsone, voire de degré modéré, mais ces valeurs de pointe diminuent rapidement après quelques heures.

Il est dès lors fort important de donner la Dapsone à pleine posologie dès le début et de ne pas réduire la dose pendant les réactions lépreuses (39).

La prise hebdomadaire a été utilisée en Afrique avec 100 mg/kg de poids corporel chaque semaine, avec un maximum de 600 mg pour un adulte

Enfin le traitement bimensuel utilisait D.A. DDS qui est une sulfamide long-retard et est administré par voie intramusculaire à des doses

de 225 mg toutes les 10 semaines.

Cette forme ne doit pas être préférée par rapport à la Dapsone orale, parce que les concentrations sériques sont beaucoup plus basées qu'avec le traitement standard par voie buccale et pourrait favoriser l'émergence de bacilles de HANSEN sulfono-résistants.

1.5 Mode d'action

Après administration par voie orale, la DDS est totalement absorbée au niveau de l'intestin grêle dans la proportion de 95 %, elle est retrouvée dans la peau, le foie, les reins et est à un taux deux fois plus élevé dans le tissu lépreux que dans le tissu sain (19).

Son action est essentiellement bactériostatique.

Elle agit en interférant dans la synthèse de l'acide folique par compétition avec l'acide para aminobenzoïque, M. leprae se fragmente et prend un aspect granuleux.

La DDS s'élimine par les urines.

L'action bactériostatique de la DDS est lente, la négativation bactériologique demande 3-6 ans (39) chez les lépromateux IM tombe à zéro, 5-6 mois de traitement par DDS.

1.6 Toxicité

Aux posologies quotidiennes, actuellement recommandées, la Dapsone est bien tolérée. Les effets secondaires chez les lépreux sont rares : malaises, sensation de faiblesse, fièvre.

A côté de ces symptômes mineurs et transitoires, il peut survenir :

- une hémolyse importante chez les sujets très âgés ou très jeunes ou chez ceux qui souffrent d'un déficit en G6PD (Glucose 6 phosphate Déshydrogenase) (39),
- dermatite exfoliatrice, néphrite et hépatite (39).

De fabrication peu coûteuse, rapidement absorbée par l'organisme, la Dapsone a transformé le pronostic de la lèpre. Malheureusement elle provoque des états réactionnels graves par leurs conséquences, au niveau du nerf en particulier. Enfin, l'apparition d'une sulfono-résistance nécessite l'association d'autres médicaments spécifiques à la DDS dans le traitement d'attaque et de consolidation.

2. RIFAMPICINE (RMP)

La Rifampicine est un antibiotique dérivé des produits du métabolisme d'un champignon du Var, découvert en 1957 : le streptomyces mediterranei.

De nombreux produits isolés à partir de ce microorganisme, l'un des premiers à avoir été obtenu fut la Rifampicine B.

SENSI et coll. synthétise un nouveau dérivé de la Rifampicine : Rifamycine AMP.

2.1 Constitution chimique

C'est une poudre cristalline, de couleur rouge brique, stable sur milieu acide, oxydé en quinone sur milieu alcalin.

Sa formule chimique est : méthyl 4- piperazinyl I imino methyl 3 - rifamycine S V.

Ce produit est commercialisé sous la forme de gélule contenant 300 mg de produit pur, sous les noms de Rimactan* et de Rifadine*.

2.2 Mécanisme d'action La Rifampicine a une action originale, différente des autres antibiotiques, et bénéficie de trois privilèges :

- C'est un bactéricide puissant puisqu'il paralyse dans les bactéries l'ARN polymérase, indispensable à la synthèse de l'ARN messager, donc à la synthèse des protéines.
- Il conserve son pouvoir bactéricide sur des germes résistants aux antibiotiques usuels.
- Son activité thérapeutique est sans danger, en effet, son action véritable qui est l'inhibition spécifique de l'information biologique n'intéresse que les bactéries, la Rifampicine ne pouvant agir sur l'ARN polymérase des cellules animales.

2.3 Posologie

Les premiers résultats du traitement de la lèpre ont été publiés en 1970 (20, 32).

La posologie habituellement recommandée s'établit entre 450 et 600 mg par jour.

La dose unique de 600 mg tue 99,9 % des bacilles lépreux en quelques jours et rend non infectieux un lépreux multibacillaire (39).

Bien que les bacilles soient rapidement tués, la vitesse de régression de l'indice bactériologique, la rapidité de l'amélioration et l'incidence des réactions à l'E.N.L. (érythème nouveau lépreux) chez les lépromateux sont identiques à celle qu'entraîne la Dapsone.

2.4 Métabolisme

Administrée par voie orale, la Rifampicine est rapidement absorbée par le tube digestif, concentrée dans le foie, diffusée dans le sang et les tissus à des concentrations actives.

Le temps de demie vie de la Rifampicine est de 2-3 heures chez l'homme (12).

L'élimination principale de la Rifampicine s'effectue par la bile et les selles (80 %), l'excrétion rénale (20 %) n'est cependant que complémentaire, l'urine pouvant avoir une teinte rose orangée.

La concentration plasmatique maximale de la Rifampicine est atteinte deux heures après son absorption, baissant à partir de la troisième heure, pour s'infléchir au zéro à la 24^e heure.

La diffusion de la Rifampicine est excellente dans les tissus et les cellules à l'exception des organes riches en lipides.

La diffusion dans la peau semble égale à celle du sang, la concentration est élevée dans les poumons, le foie, la rate et les muscles, faible dans le système nerveux riche en lipides.

2.5 Toxicité

La Rifampicine est bien tolérée par les patients mais il faut cependant signaler :

- Des réactions cutanées caractérisées par un oedème accompagné d'un érythème au niveau du visage, avec congestion des conjonctives.
- Des réactions gastro-intestinales : nausées, vomissements, anorexies, douleurs abdominales.

.../...

- Des réactions hépatiques qui se caractérisent par une élévation du taux de transaminases, soit par un ictère de type retentionnel.
- Purpura thrombocytopénique.
- Une anémie hémolytique aigüe qui peut se compliquer et provoquer une atteinte rénale.
- Un syndrome grippal.
- Une chute tensionnelle.

La Rifampicine est le médicament le plus bactéricide à l'égard de M. leprae. Généralement bien supportée, elle entraîne une amélioration clinique spectaculaire en quelques semaines et une chute de l'indice morphologique qui avoisine 0 % en moins d'un mois.

La Rifampicine doit être administrée sous surveillance médicale.

3. CLOFAZIMINE (LAMPRENE) ou B663

Le principe actif du Lamprène est une iminophenazine substituée, colorant rouge vif synthétisé en 1954 par Vincent BARRY et coll à Dublin en collaboration avec GEIGY.

En 1962 BROWNE et HOGERZELL publièrent le premier rapport sur l'emploi du Lamprène au Nigéria (3).

La Clofazimine est fortement lipophile et se dépose dans les tissus adipeux et les cellules du système réticulo-endothélial et elle est captée par les macrophages dans l'ensemble de l'organisme.

La demie vie d'élimination plasmatique après une dose unique ou en administration itérative de capsule de Lamprène à 50 ou 100 mg est de 10 jours (39). Il est donc impossible de déterminer la concentration minimale inhibitrice dans le plasma car la substance n'est pas distribuée avec homogénéité dans les tissus en raison de son accumulation tissulaire marquée (9).

3.1 Actions thérapeutiques

La Clofazimine doit occuper une place de choix dans la thérapeutique de la lèpre lépromateuse à cause de sa triple activité :

- son activité spécifique à l'égard de M. leprae
- son action anti-inflammatoire : ce qui rend possible la poursuite du traitement chez les réactionnels (E.N.L. et réactions reverses)
- pour prévenir et traiter une résistance à la sulfone mère.

3.2 Tolérance

La Clofazimine est généralement bien tolérée et non toxique aux doses thérapeutiques normales (100-200 mg/jour).

Au niveau de la peau, elle provoque une coloration rougeâtre. Cette coloration est due à l'accumulation du produit au niveau des lésions lépromateuses.

.../...

Cette hyperpigmentation disparaît après le traitement en 2 à 6 mois..
Au niveau du tube digestif : des effets secondaires gastro-intestinaux ont été signalés (nausées, vomissements, douleurs épigastriques).

La Clofazimine est dépourvue d'effet embryotoxique tétratogène ou mutagène (39).

La Clofazimine représente donc le traitement de choix du lépromateux, en particulier du lépromateux africain souvent difficile à revoir aux centres de distribution de médicaments lorsqu'il présente un E.N.L. Bien que le médicament soit sur le marché depuis 1969, un seul cas de lèpre résistant à la Clofazimine a été signalé jusqu'ici, il le fut en 1982 (42).

La Clofazimine ne présente pas de résistance croisée avec les autres médicaments anti-hanséniens.

4. ETHIONAMIDE - PROTHIONAMIDE

L'Ethionamide (Trecator), le Prothionamide (Trevintix) diffusent rapidement dans l'organisme après leur absorption orale et s'éliminent par les urines. Si ces deux médicaments sont bactéricides à l'égard de M. leprae chez la souris, ils le sont modérément chez l'homme. Leur activité est plus rapide que celle de la Dapsone mais plus lente que celle de la Rifampicine.

On ^{les} utilise essentiellement chez les malades sulfono-résistants ou pour remplacer la Clofazimine souvent refusée à cause de la coloration qu'elle provoque.

La résistance apparaît rapidement quand ils sont utilisés en monothérapie.

La dose quotidienne ne doit pas dépasser 375 mg, car ce sont des médicaments toxiques qui provoquent une augmentation des transaminases, des polyneuropathies, des syndromes dépressifs, des hépatites avec ictères.

Des nouveaux médicaments : les fluoro quinolones se sont révélés très actifs contre M. leprae dans l'infection du coussinet plantaire chez la souris (15, 26).

5. POLYCHIMIOThERAPIE

La polychimiothérapie des malades multibacillaires a deux objectifs (11) :

- de prévenir la sélection de mutants résistants
- tuer la plus grande quantité de bacilles de façon à obtenir un taux maximal de rechute ($\leq 5\%$) après arrêt du traitement.

Les schémas recommandés par l'OMS (46)

- Lèpre multibacillaire

- . Rifampicine 600 mg une fois par mois sous surveillance
- . Dapsone 100 mg par jour en auto-administration
- . Clofazimine 300 mg une fois par mois sous surveillance et 50 mg par jour auto-administrée.

Le schéma peut être complété par l'administration mensuelle de 500 mg d'Ethionamide ou de Prothionamide.

Lorsque l'emploi de la Clofazimine est absolument hors de question en raison de la coloration que ce médicament donne aux lésions cutanées, il faut envisager de la remplacer par 250-375 mg d'Ethionamide ou de Prothionamide auto-administré quotidiennement.

Il convient de poursuivre le traitement associé au moins deux ans et si possible plus longtemps, jusqu'à la négativation des examens bactériologiques.

- Lèpre paucibacillaire

dans la lèpre paucibacillaire, la population bactérienne est au maximum d'environ 10^6 microorganismes.

Le schéma est :

- . Rifampicine 600 mg une fois par mois pendant 6 mois
- . Dapsone 100 mg par jour pendant 6 mois.

CHAPITRE IV

RESISTANCE MEDICAMENTAUSE DE M. LEPRAE (18, 25)

De très nombreuses souches bactériennes ne sont pas en pratique aussi sensibles aux antibiotiques que le spectre d'activité de chacun de ces produits pourrait le laisser croire. En effet, depuis l'introduction successive en thérapeutique des différents antibiotiques, la sensibilité des bactéries a beaucoup évolué de sorte que la proportion de souches résistantes dans de nombreuses espèces est actuellement importante.

Plusieurs facteurs sont responsables de cette évolution :

- des facteurs propres aux bactéries, facteurs génétiques, expliquant l'apparition des bactéries résistantes à un ou plusieurs antibiotiques (mais il s'agit de phénomène rare),
- des facteurs favorisant la diffusion des souches bactériennes résistantes. Ils tiennent essentiellement à nos habitudes thérapeutiques et à un mauvais usage de l'antibiothérapie.

1) Définition de la résistance médicamenteuse

Il y a résistance médicamenteuse lorsque la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un produit vis à vis d'une souche bactérienne diffère significativement de celle qui a valu pour une série de souches sauvages, c'est-à-dire provenant de malades jamais traités par le médicament et sélectionnés avant l'application sur une grande échelle du médicament en question.

2) Résistance secondaire et primaire

Historiquement la résistance ^{acquise} est toujours la première à faire son apparition, elle résulte en effet de la sélection de populations résistantes chez les malades porteurs à l'origine de germes sensibles lorsque le malade, avec une résistance secondaire, infecte des personnes de leur entourage, ceux-ci développent une maladie résistante d'emblée : on la désigne sous le terme "résistance primaire".

A noter que la résistance secondaire n'apparaît que chez les malades multibacillaires alors que la résistance primaire peut exister tant dans des formes paucibacillaires que multibacillaires.

.../...

Comme il n'est pas possible de s'assurer avec certitude si un malade n'a pas été traité antérieurement, on remplace actuellement le terme résistance primaire par celui de résistance initiale.

La résistance n'est donc pas le résultat d'une adoption progressive de formes sensibles aux médicaments auxquels ils sont exposés, et on n'a jamais vu jusqu'à présent une souche résistante redevenir sensible (25).

Seuls les malades multibacillaires (LL, BL, BB) de la classification RIDLEY J. courent le risque de voir apparaître une résistance médicamenteuse qui résultera de la sélection de mutants résistants par le traitement étant donné leur importante charge bactérienne, jusqu'à 10^{11} germes dont 10 % peut être vivants.

Il s'ensuit que :

- si le traitement est régulier et à dose élevée, entière, seuls des mutants à résistance élevée peuvent survivre et apparaître,
- si le traitement a été à faible dose, ou irrégulier, des mutants à résistance faible peuvent être sélectionnés.

3) Preuve de l'existence d'une résistance médicamenteuse

Une résistance médicamenteuse doit être suspectée lorsqu'un malade rechute sous traitement, ou ne répond pas comme prévu au traitement ou provient de l'entourage d'un malade réputé résistant.

3.1 Essai clinique

Après évaluation minutieuse du malade (clinique, bactériologique et histologique) un traitement entièrement supervisé est administré. Au bout de 6-9 mois, une nouvelle évaluation décide si le malade a regres- sé ou non.

3.2 Test de sensibilité médicamenteuse dans le coussinet plantaire de la souris

Une biopsie cutanée d'un endroit avec un IB de 3 ou plus est prélevée lors de l'essai clinique et des souris normales inoculées dans une ou deux pattes arrières avec 5×10^3 bacilles ou 10^4 bacilles. Les souris sont divisées en différents lots, un lot ne recevant pas de médi-

cament servant de contrôle, d'autres recevant le (s) médicament (s) à tester aux doses appropriées. Six à douze mois après l'inoculation, les souris sont examinées.

En général la résistance secondaire (acquise) s'acquiert de deux manières :

- résistance par mutation chromosomique
- résistance extra chromosomique.

La première forme survient lors de mutations au niveau du chromosome bactérien. Ces mutations sont des phénomènes généralement spontanées, rares, stables,, héréditaires et dues au hasard, donc indépendant de l'emploi de l'antibactérien. Celui-ci ne fait que révéler l'existence des souches résistantes en détruisant les souches sensibles. La résistance par mutation chromosomique ne se produit qu'à l'encontre d'un seul type de médicament.

Le second type de résistance acquise est lié soit à l'existence de plasmide (gènes) en liberté dans le cytoplasme de la bactérie, soit à l'apport du facteur de résistance par un bactériophage d'une bactérie à l'autre. Le transfert des caractères de résistance s'opère sous l'influence d'un facteur de transfert : RTF (résistance transfert factor).

4) Etiologie de la résistance médicamenteuse

Des germes apparaissent comme mutants dans toute population bactérienne, également en absence de tout produit antibactérien.

Pour M.tuberculosis la fréquence de mutation est de 10^{-6} - 10^{-7} dans les résistances faibles et à 10^{-8} à 10^{-9} pour les fortes résistances.

Pour 10^9 M.tuberculosis, on pourrait s'attendre à trouver 100-1 000 bacilles mutants faiblement résistants, 10-100 modérément résistants et 1-10 hautement résistants.

En absence de produit antibactérien, ces mutants sont désavantagés par rapport au reste de la population. Le facteur sélectif que constitue le produit antibactérien renverse totalement cette situation : les formes sensibles meurent, les résistants survivent et se multiplient, remplaçant progressivement les organismes sensibles dans la population bactérienne.

5) Prévention de la résistance médicamenteuse

Par analogie avec le traitement de la tuberculose et autres affections multibacillaires, tout malade multibacillaire doit être traité par une combinaison médicamenteuse dès le début du traitement.

En effet, si la proportion de germes mutants résistants vis à vis de 2 ou 3 médicaments est respectivement de 10^{-x} , 10^{-y} , et 10^{-z} , la proportion de germes à résistance double ou triple est de $10^{-(x+y)}$ et de $10^{-(x+y+z)}$. En terme réel 10^{11} M. leprae, comporte 10^{10} germes sensibles à deux produits, environ 10^4 germes résistants au premier 10^4 germes résistants au second ; mais 10^{-12} seulement aux deux produits à la fois c'est-à-dire non existant.

Le traitement combiné signifie l'administration de deux ou plus de produits en même temps et d'emblée, et non pas l'un après l'autre. Ce procédé, en effet, mènerait inévitablement à une sélection de germes résistants aux deux produits l'un après l'autre.

La proportion estimée de mutants résistants est : 10^{-7} pour la Rifampicine et 10^{-6} pour la Dapsone, la Clofazimine et les Thionamides.

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE V

MATERIEL ET METHODES

1. LES MALADES

Depuis 1986, 25 malades multibacillaires ont été biopsiés, présentant tous des signes en faveur d'une rechute clinique caractérisée par :

- Apparition de nouvelles lésions
- IB \geq 2+
- Nombre de BAAR/g tissu supérieur ou égal à 10^7
- IM \geq 5 %.

Ces malades ont été traités, soit par la Rifampicine seule ou en association avec d'autres médicaments anti-tuberculeux.

La confirmation expérimentale de ces rechutes cliniques a été réalisée à l'Animalerie Expérimentale de l'Institut MARCHOUX.

Les renseignements thérapeutiques nous ont été fournis par le Service Recherche Appliquée.

.../...

2. METHODES

2.1 Préparation des échantillons de biopsies cutanées pour l'inoculation à la souris

2.1.1 Lames pour la préparation des frottis standards

On emploie les lames standards pour examen microscopique 76 x 25 mm, sur lesquelles 4 cercles de 8 mm de diamètre ont été marqués par dépolissage.

2.1.2 Nettoyage des lames

- . Dégraisser, faire tremper dans de l'acide citrique à 50 % pendant 24 heures
- . Faire bouillir dans du "Decon 90" à 2 %
- . Laver à l'eau de robinet
- . Faire bouillir dans de l'acide nitrique à 50 %
- . Laver à l'eau de robinet
- . Rincer plusieurs fois à l'eau distillée
- . Conserver les lames dans un mélange 50/50 acétone et alcool.

2.1.3 Délivrance du volume standard de suspension bacillaire

Le volume standard de suspension bacillaire est déposé sur le cercle de 8 mm de diamètre au moyen d'une anse de platine de 2 mm. L'anse standard est réalisée de la même façon qu'une anse bactériologique mais courbée à 45° et l'anneau de fil est légèrement ouvert de façon que le contenu soit complètement libéré dès le contact avec la lame de verre.

On prélève la suspension en y plongeant l'anse, puis en la retirant verticalement. On dépose l'échantillon standard sur la lame en plaçant l'anse horizontalement au centre du cercle, puis on étale toute la suspension en passant deux fois sur la circonférence interne du cercle. On passe l'anse après chaque prélèvement et on fait quatre frottis par dilution.

2.1.4 Fixation et coloration des frottis standards

On laisse les frottis sécher à l'air, puis on les fixe à la chaleur pendant 5 minutes sur une plaque chauffante, et on expose

aux vapeurs de formol à 40 % pendant 5 minutes, puis fixés à nouveau par la chaleur pendant 5 minutes.

Les frottis fixés sont colorés par la fuchsine à froid.

2.1.5 Microscopie

L'utilisation d'un microscope de bonne qualité, avec un système d'éclairage adéquat est indispensable. Il faut pour cela un microscope binoculaire muni d'un objectif x 100 et d'oculaire x 6 ou 10.

Il est nécessaire de connaître l'aire du champ ouvert par ce système optique pour chaque microscope utilisé pour la numération des BAAR. L'aire est déterminée à partir du diamètre du champs mesuré avec un micromètre optique à chambre claire.

2.1.6 Numération des BAAR

La lame est placée sous microscope avec une goutte d'huile à immersion et ajustée sur la platine de façon que le premier champ microscopique complet du frottis se trouve sur un même diamètre que celui-ci. On compte les BAAR dans le premier champ au total dans huit champs.

Les quatre frottis correspondant à la dilution étudiée sont comptés de la même façon et on fait la moyenne des BAAR comptés dans les quatre frottis. Quand le nombre de BAAR est élevé, on dilue la suspension pour obtenir une numération de 20-100 BAAR par champs le long du diamètre du frottis coloré.

Lorsque les BAAR sont en petit nombre, on les compte non pas par champ, mais directement le long d'un diamètre et on fait la moyenne des quatre frottis.

2.1.7 Calcul de la concentration de BAAR/ml de suspension

Les suspensions de M. leprae pour numération des BAAR sont diluées dans de l'albumine bovine 0,1 % dans l'eau distillée stérile. L'albumine est employée pour faciliter l'adhérence des BAAR à la lame.

Après avoir déterminé le volume de liquide délivré par l'anse et l'aire couverte par huit champs microscopiques, on peut calculer le facteur de conversion en fonction de l'anse et du microscope utilisé comme suit :

$$F = \frac{\text{aire du cercle de 8 mm}}{\text{aire du champ microscopique} \times 8} \times \frac{1 \text{ ml}}{V/\text{volume délivré par l'anse}}$$

$$\text{soit } F = \frac{\pi \times 4^2}{(\pi \times r^2) \times 8} \times \frac{1}{V}$$

r = rayon du champ microscopique en mm

V = volume délivré par l'anse en ml

Le nombre de BAAR/ml de suspension est égal au facteur de conversion (F) multiplié par la numération moyenne des huit champs multiplié par la dilution de la suspension.

Pour notre microscope, marque Leitz, le facteur de l'anse est : 5.344×10^4 ml.

2.2 Préparation de biopsie pour l'inoculation aux souris

La méthode consiste à donner le meilleur homogenat total possible de la biopsie. Elle emploie des matériaux stériles. On pèse le tissu biopsié de façon à déterminer le volume minimal de liquide de suspension (albumine bovine à 0,1 % dans l'eau distillée stérile).

Les proportions utilisées sont les suivantes :

pooids de la biopsie	Volume de liquide de suspension (ml)
(8)	
jusqu'à 0,020	0,5
0,050	1,0
0,080	1,5
0,150	2,0
0,250	2,5
0,350	3,0

.../...

La biopsie est déposée dans une boîte de pétrie tarée, on enlève la plus grande partie de la graisse et on pèse de nouveau. Puis on émince le tissu à fond avec des petits ciseaux courbés, et on transvase le tout en s'aidant des ciseaux dans le broyeur homogénéiseur contenant le liquide de suspension nécessaire.

Les tissus émincés sont homogénéisés à fond, et on prépare des frottis standards pour le dénombrement des BAAR.

On calcule le nombre de BAAR/ml d'échantillon, BAAR/échantillon et BAAR/g tissu.

2.3 Inoculation de M. leprae à la souris

Le volume d'inoculum étant de 0,03 ml par coussinet plantaire de la souris, nous inoculons 10^4 BAAR comme nombre maximale de bacilles inoculés par patte de souris de sorte qu'il est fréquemment nécessaire de diluer la suspension avant l'inoculation.

2.3.1 Etude de la viabilité de M. leprae

Pour chaque cas de suspicion de rechute clinique, nous inoculons 10^4 BAAR aux deux coussinets plantaires des pattes postérieures à un groupe de 10 souris femelles. On recueille ensuite les coussinets plantaires et on y compte les BAAR, six à douze mois après l'inoculation des bacilles.

2.3.2 Etude de la sensibilité aux médicaments

2.3.2.1 Mesure de la sensibilité de M. leprae à la DAPSONE

Trois lots de dix souris sont inoculés en même temps que le lot témoin (lot servant pour étude de la viabilité) repartis comme suit :

- un lot de dix souris avec la Dapsone incorporée dans la nourriture à la concentration de 0,01 %
- un lot de dix souris avec la Dapsone incorporée dans la nourriture à 0,001 %
- un lot de dix souris avec la Dapsone incorporée dans la nourriture à la concentration de 0,0001 %.

2.3.2.2 Mesure de la sensibilité de M. leprae à la Rifampicine

Un lot de dix souris est conjointement inoculé avec le lot des souris témoins pour mesure de la sensibilité de M. leprae.

La solution de Rifampicine est à 1g/l.

La Rifampicine est donnée par gavage oesophagien une fois par semaine à raison de 10 mg/kg (0,2 ml pour une souris de 20g et 0,3 ml pour une souris de 30g.

2.4 Collecte de M. leprae dans les pattes de souris

Au moment voulu, les souris sont sacrifiées et épinglées sur une planche à dissection, les pattes arrières disposées de façon que les coussinets plantaires soient tournés vers le haut. On recueille chaque coussinet plantaire avec une série d'instruments stériles.

Lorsqu'ils sont homogénéisés dans 2,0 ml d'albumine bovine à 0,1 % dans l'eau distillée, on étale une goutte de chaque suspension dans une boîte de pétrie en plastique.

Chaque coussinet plantaire est prélevé entier du talon à la base des doigts avec de petits ciseaux à becs courbés et déposé dans la goutte de suspension, qui se trouve dans la boîte de pétrie. Puis, avec une lame de scapel pointue, tout le tissu restant du coussinet et le tissu situé entre les os sous-jacents sont curetés et ajoutés au tissu déjà recueilli.

Avec les mêmes ciseaux, l'ensemble du tissu recueilli est finement émincé et déposé dans un broyeur pour être homogénéisé à fond après addition de la totalité du liquide de suspension (2 ml/patte et 3 ml pour deux pattes).

On prépare des frottis standards pour dénombrer les BAAR dans ces homogénéités plantaires.

On obtient le nombre total de BAAR/coussinet plantaire qui est égal au nombre de BAAR/ml x 2 (coussinet plantaire recueilli dans 2 ml de liquide de suspension) ou égal au nombre de BAAR/ml x $\frac{3}{2}$ (coussinet plantaire recueilli dans 3 ml de liquide de suspension).

- Les résultats seront donnés 6-12 mois après l'inoculation des bacilles.

Les récoltes positives sont celles qui donneront une multiplication de M. leprae supérieure ou égale à 1.0×10^5 BAAR/patte de souris.

- Les rechutes sont confirmées expérimentalement par la multiplication de M. leprae dans le coussinet plantaire chez au moins une souris

- La sensibilité de M. leprae à un médicament est traduite par l'absence de multiplication chez les souris traitées par ce médicament.

2.5 Préparation des colorants Thélep

Solution de carbo fuschine

C'est un mélange de deux solutions :

Solution 1 (solution 10 % de fuschine basique dans l'alcool à 95 %)

Peser Fuschine basique en poudre..... 1g 2g

Mesurer Alcool absolu ou à 95 %.....10 ml ou..... 20 ml

mélanger ces quantités.

Solution 2 (solution aqueuse de phénol à 5 %)

Mesurer Phénol liquide..... 5 ml ou..... 10 ml

mesurer eau distillée..... 95 ml ou..... 190 ml

mélanger ces quantités

On ajoute :

- à 20 ml de la solution (1)..... Carbo fuschine à 10 %
180 ml de la solution (2)..... Solution de phénol à 5 %

Solution alcoolo-acide chlorhydrique concentrée à 1 %

Préparer alcool à 70 %

mélanger : alcool absolu..... 70 ml

eau distillée..... 30 ml

faire couler lentement dans un récipient contenant

- 1 ml d'acide chlorhydrique concentré
- 99 ml d'alcool à 70 %.

Solution de bleu de méthylène

Mélanger après avoir pesé ou mesuré les ingrédients :

- dissoudre 0,6 g de poudre de bleu de Méthylène
- dans 60 ml d'alcool à 95 % puis
- ajouter 140 ml d'eau distillée.

Les solutions de carbo-fuschine et de bleu de Méthylène

- 1) doivent être toujours filtrées au moment de la coloration
- 2) peuvent être gardées dans des flacons bouchés 3 mois à la température du laboratoire.

2.6 Préparation de la solution de Rifampicine à 1g/litre

La solution de Rifampicine se prépare en eau gélosée à 0,05 g/l.

Préparation de l'eau gélosée à 0,05 g/litre

Peser 0,05 g de Bacto Agar. Faire fondre doucement dans un litre d'eau distillée jusqu'à limpidité du liquide. Répartir en flacons de 100 ml bouchés à vis avec capsule intérieure. Autoclaver à 120° pendant 20 minutes. Garder à l'abri de la poussière.

Préparation de 100 ml de solution de Rifampicine à 1g/litre en eau gélosée

Peser 100 mg de poudre de Rifampicine : placer la poudre dans un mortier en porcelaine stérile et broyer finement. Ajouter petit à petit la plus grande partie du contenu d'un flacon de 100 ml d'eau gélosée tout en continuant à broyer et à homogénéiser. Verser la suspension obtenue dans un flacon de 100 ml stérile bouché à vis. Rincer le mortier avec les quelques millilitres d'eau gélosée restants et ajouter l'eau du rinçage à la suspension déjà faite.

Conservation de la solution de Rifampicine

La suspension de Rifampicine se garde au réfrigérateur à 4°C pendant un mois. Pas totalement limpide quand elle vient d'être préparée, elle le devient après une nuit au réfrigérateur.

Emploi de la solution de Rifampicine

Sortir la solution du réfrigérateur. Agiter doucement pour être sûr que la Rifampicine est bien dissoute. Traiter les souris par gavage, une fois par semaine. Le traitement débute le jour ou le lendemain de l'inoculation et continue toutes les semaines jusqu'au sacrifice des souris (en général entre 8 et 10 mois).

Volume de solution à administrer

Les souris âgées de 4 à 8 semaines pèsent environ 20 g. Elles reçoivent 0,2 ml de solution de Rifampicine à 1 g/litre, soit 0,2 mg de Rifampicine pour un poids de 20 g = 1 mg pour 100 g ou 10 mg/kg.