



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I
2005

FACULTE DE PHARMACIE

Double

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

le 28 Juin 2005

par Carole DESCHASEAUX épouse LEBEL
née le 8 Mars 1976 à Laxou (54)

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 04 octobre 1988 tient lieu de



DB 320 15

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA TUBERCULOSE :
ETUDE DES SOUCHES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
PAR LA TECHNIQUE IS6110-RFLP

Président :

Mme J. SCHWARTZBROD

Professeur

Juges :

M. A. LOZNIOWSKI
Melle M. DAILLOUX
Mme N. MONHOVEN
Mme M. ALBERT

Professeur
Maître de conférences
Docteur es Sciences
Maître de conférences

BU PHARMA-ODONTOL

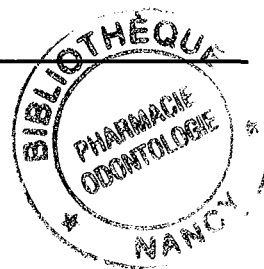


104 070462 5



UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I
2005

FACULTE DE PHARMACIE



MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

le 28 Juin 2005

par Carole DESCHASEAUX épouse LEBEL
née le 8 Mars 1976 à Laxou (54)

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 04 octobre 1988 tient lieu de

DB 32015

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA TUBERCULOSE :
ETUDE DES SOUCHES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
PAR LA TECHNIQUE IS6110-RFLP

Président :

Mme J. SCHWARTZBROD

Professeur

Juges :

M. A. LOZNIOWSKI
Melle M. DAILLOUX
Mme N. MONHOVEN
Mme M. ALBERT

Professeur
Maître de conférences
Docteur es Sciences
Maître de conférences

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY 1

Membres du personnel enseignant 2004/2005

Doyen : Chantal FINANCE

Vice Doyen : Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie
Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche
Jean-claude BLOCK

Directeur des Etudes
Gérald CATAU

Responsable de la Filière officine
Gérald CATAU

Responsables de la Filière industrie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Isabelle LARTAUD

Responsable de la Filière hôpital
Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne
Mlle GIRAND Thérèse
M. JACQUE Michel
M. LECTARD Pierre
M. LOPPINET Vincent

M. MARTIN Jean-Armand
M. MORTIER François
M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Mme FUZELLIER Marie-Claude
Mlle IMBS Marie-Andrée
Mme POCHON Marie-France

PROFESSEURS

M. ASTIER Alain
M. ATKINSON Jeffrey
M. AULAGNER Gilles
M. BAGREL Alain
Mlle BATT Anne-Marie
M. BLOCK Jean-claude
Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine
Mme FINANCE Chantal
Mme FRIANT-MICHEL Pascale
Mlle GALTEAU Marie-Madeleine
M. HENRY Max
M. JOUZEAU Jean-Yves
M. LABRUDE Pierre
Mme LAURAIN-MATTAR Dominique
M. LALLOZ Lucien
M. LEROY Pierre
M. MAINCENT Philippe
M. MARSURA Alain
M. MERLIN Jean-Louis
M. NICOLAS Alain
M. REGNOUF de VAINS Jean-Bernard
M. RIHN Bernard (Professeur associé)
Mme SCHWARTZBROD Janine
M. SIEST Gérard
M. SIMON Jean-Michel
M. VIGNERON Claude

Pharmacie clinique
Pharmacologie cardiovasculaire
Pharmacie clinique
Biochimie
Toxicologie
Santé publique
Pharmacologie cardiovasculaire
Virologie, immunologie
Mathématiques, physique, audioprothèse
Biochimie clinique
Botanique, mycologie
Bioanalyse du médicament
Physiologie, orthopédie, maintien à domicile
Pharmacognosie
Chimie organique
Chimie physique générale
Pharmacie galénique
Chimie thérapeutique
Biologie cellulaire oncologique
Chimie analytique
Chimie Thérapeutique
Biochimie
Bactériologie, parasitologie
Biochimie
Droit officinal, législation pharmaceutique
Hématologie, physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Communication et santé
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François:	Chimie thérapeutique
M.	CATAU Gérard	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M.	CHILLON Jean-Marc	Pharmacologie
M.	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, conseils vétérinaires
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Mycologie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
M.	DUVAL Raphaël	Microbiologie clinique
Mme	FAIVRE Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
Mlle	FONS Françoise	Biologie végétale, mycologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mlle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mlle	LAMBERT Alexandrine	Biophysique, biomathématiques
M.	LAMPRECHT Alf	Pharmacie galénique
Mme	LARTAUD Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mlle	MARCHAND Stéphanie	Chimie physique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MERLIN Christophe	Microbiologie environnementale et moléculaire
M.	MONAL Jean-Louis	Chimie thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PERRIN-SARRADO Caroline	Pharmacologie
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
Mlle	THILLY Nathalie	Santé publique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
M.	ZAIOU Mohamed	Biochimie et biologie moléculaire appliquées aux médicaments
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratique officinale
-----	------------------	---------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
Mme	PAVIS Annie	Bactériologie

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

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

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI
IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR
AUTEUR »

A Notre Maître et président de thèse,

***Madame le Professeur J. SCHWARZBROD, Professeur des Universités
(Faculté de Pharmacie de Nancy)***

Vous nous faites l'honneur de présider cette thèse.

Au cours de nos études à la Faculté, vous nous avez dispensé un enseignement de très grande qualité et vous nous avez transmis votre passion pour la microbiologie.

Nous vous en remercions et souhaitons que vous trouviez ici le témoignage de notre grande reconnaissance et de notre profond respect.

A Notre Maître et Juge,

Monsieur A. LOZNIEWSKI, Professeur des Universités (Faculté de Médecine de Nancy)

Lors de notre passage dans votre service, vous nous avez de précieux conseils et vous nous avez fait partager vos connaissances.

Pour l'honneur que vous nous faites en jugeant cette thèse, nous souhaitons que ce travail soit le témoignage de notre gratitude et de notre profond respect.

A Notre Maître et juge,

***Mademoiselle M. DAILLOUX, Maître de Conférences des Universités -
Praticien Hospitalier (Laboratoire de Bactériologie – CHU de Nancy)***

Vous êtes à l'origine de cette thèse que vous avez acceptée de diriger.

L'accueil que vous nous avez réservé, votre compétence et vos conseils, vos grandes qualités humaines, votre disponibilité, votre goût de la rigueur et de la perfection ainsi que votre persévérance nous ont permis de mener à bien ce travail.

Que cette thèse soit le témoignage de toute notre gratitude

A Notre Maître et Juge,

***Madame N. MONHOVEN, Docteur es Sciences (Laboratoire de Biologie
Moléculaire – CHU de Nancy)***

Vous nous faites l'honneur de participer cette thèse.

Vos conseils nous ont permis de mener à bien notre étude.

Puissiez-vous trouver dans ce travail le témoignage de notre respect pour
votre compétence et nos remerciements pour votre disponibilité.

A Notre Maître et juge,

Madame M. ALBERT, Maître de Conférences des Universités (Faculté de Pharmacie de Nancy)

Pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail, pour votre aide précieuse et vos conseils.

Pour le chemin parcouru depuis les bancs de la Faculté.

Puisse cette thèse être la marque de notre reconnaissance et de notre estime.

Remerciements :

A Madame Catherine Laurain

Pour l'intérêt que tu as porté à ce travail, tes conseils avisés, ta disponibilité et ta gentillesse, nous souhaitons que cette thèse soit la marque de notre reconnaissance.

A Madame Suzanne Pichon

Pour ton dynamisme, ton envie de mener les choses à bien, ton aide précieuse et ta disponibilité. Merci d'avoir pris le relais.

Au laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital de Brabois

A toutes les personnes du laboratoire qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Au laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital Central

Pour votre accueil et votre disponibilité.

A Madame Jeannette Texier-Maugein

Pour l'accueil chaleureux que j'ai reçu dans votre laboratoire, pour vos compétences, vos conseils et votre gentillesse. Sans vous ce travail n'aurait pas été possible. Nous vous présentons nos plus sincères remerciements.

A Anthony, pour sa présence à mes côtés tout au long de ces années

A Baptiste, mon rayon de soleil

A mes parents, pour leur présence constante, leur soutien indéfectible et l'intérêt constant qu'ils ont porté à mes études ainsi qu'à ce travail

A Guillaume, Christophe et Anne-Marie, pour leur soutien et leur esprit de famille

A Solange et Henri pour leur disponibilité et leur gentillesse

A Yannick, Christelle et Maëlys

A toute ma famille

A Florence, Benoît et Antoine, pour leur amitié de longue date

A Aurélie, Michel et Maxime, à Ludovic, à Laure et Fabrice, à Estelle et Sébastien, et à tous mes amis

A Corine, pour son accueil chaleureux, son humanité, son amitié et le bonheur de travailler ensemble pendant un long moment encore.

SOMMAIRE



INTRODUCTION	
1^{ère} Partie : LA TUBERCULOSE ET L'AGENT RESPONSABLE	8
I. L'agent responsable : <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	9
A. Le genre <i>Mycobacterium</i>.....	9
1. Nomenclature	9
2. Définition	9
3. Classification.....	10
4. Habitat.....	11
B. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
1. Historique.....	12
2. Caractères bactériologiques	12
2.1. <i>Morphologie</i>	12
2.2. <i>Caractères physiologiques</i>	13
2.3. <i>Sensibilité aux agents physiques et chimiques</i>	13
II. La tuberculose	13
A. Physiopathologie.....	13
1. Contamination par le bacille tuberculeux	13
2. Lésions induites par le bacille.....	14
3. Contamination et transmission de l'infection tuberculeuse.....	15
B. Situation actuelle	15
1. Situation dans le monde	15
2. Situation en Europe	18
3. Situation en France	18
3.1. <i>Incidence</i>	18
3.2. <i>Facteurs de risque</i>	20
3.2.1. <i>L'âge</i>	20
3.2.2. <i>Le pays d'origine</i>	20
3.2.3. <i>La promiscuité</i>	21
3.2.4. <i>La forme clinique</i>	21
3.2.5. <i>Autres facteurs de risque</i>	21
3.3. <i>Mortalité</i>	22
C. Diagnostic.....	22
1. Diagnostic clinique et radiologique	22

1.1.	<i>Formes pulmonaires</i>	22
1.1.1.	<i>Primo-infection tuberculeuse</i>	23
1.1.2.	<i>Tuberculose maladie</i>	23
1.1.3.	<i>Miliaire tuberculeuse</i>	25
1.2.	<i>Formes extra pulmonaires de la tuberculose</i>	25
1.3.	<i>Tuberculose et VIH</i>	26
2.	Diagnostic bactériologique	27
2.1.	<i>Prélèvements</i>	27
2.1.1.	<i>Les prélèvements d'origine pulmonaire</i>	28
2.1.2.	<i>Les prélèvements extra pulmonaires</i>	28
2.2.	<i>Traitement des échantillons : décontamination et fluidification</i>	29
2.3.	<i>Examen microscopique</i>	30
2.4.	<i>Techniques d'amplification génomique à partir des échantillons biologiques</i>	32
2.4.1.	<i>Amplicor Roche Diagnostics- PCR</i>	32
2.4.2.	<i>Technique TMA de Gen-Probe Bio Mérieux</i>	32
2.4.3.	<i>Technique NASBA</i>	33
2.4.4.	<i>Stratégie</i>	33
2.5.	<i>Culture</i>	34
2.6.	<i>Identification des espèces mycobactériennes</i>	35
2.6.1.	<i>Caractères biochimiques</i>	35
2.6.2.	<i>Techniques de biologie moléculaire</i>	37
2.7.	<i>Démarche globale</i>	39
2.8.	<i>Sensibilité aux antibiotiques</i>	40
D.	Traitement	41
1.	<i>Qui traiter ?</i>	41
2.	<i>Principes</i>	42
3.	<i>Médicaments antituberculeux</i>	42
3.1.	<i>Isoniazide</i>	42
3.2.	<i>Rifampicine</i>	43
3.3.	<i>Ethambutol</i>	43
3.4.	<i>Pyrazinamide</i>	43
3.5.	<i>Streptomycine</i>	43
4.	<i>Bilan pré thérapeutique</i>	44
5.	<i>Choix du traitement</i>	44
6.	<i>Surveillance du traitement</i>	45
E.	Prévention	45
1.	<i>Vaccination par le BCG</i>	45
2.	<i>Investigations autour d'un cas de tuberculose</i>	48
3.	<i>Prévention et surveillance de la tuberculose parmi les personnels exposés</i>	50

4. Prévention de la transmission de la tuberculose dans les établissements de santé	51
---	----

F. Législation de la tuberculose.....	52
--	-----------

2^{ème} partie : EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE A LA TUBERCULOSE	54
--	-----------

I. Rappels.....	55
------------------------	-----------

A. Le génome de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	55
--	-----------

B. Les techniques actuelles de typage moléculaire et leurs applications	57
--	-----------

1. La technique IS6110-RFLP	58
1.1. La séquence d'insertion IS6110	58
1.2. Principe de la RFLP	60
1.3. IS6110-RFLP	60
2. Spoligotyping : Spacer Oligotyping	61
3. MIRU-VNTR	61
4. Autres méthodes.....	63
5. Applications du typage moléculaire	64
6. Choix de la technique.....	65

II. Travail expérimental : Application de l'IS6110- RFLP au laboratoire.....	67
---	-----------

A. Matériels et Méthodes.....	67
--------------------------------------	-----------

1. Souches bactériennes étudiées	67
2. Matériels.....	69
3. Réactifs.....	70
4. Mode opératoire	73
4.1. Extraction et quantification de l'ADN.....	73
4.1.1. Principe	73
4.1.2. Protocole	75
4.1.3. Remarques.....	77
4.2. Digestion de l'ADN.....	78
4.2.1. Principe	78
4.2.2. Protocole	80
4.2.3. Remarques.....	81
4.3. Séparation des fragments d'ADN.....	81
4.3.1. Principe	81
4.3.2. Protocole	81

4.4. Transfert par Southern Blot.....	82
4.4.1. Principe	82
4.4.2. Protocole	83
4.4.3. Remarques.....	84
4.5. Préparation de la sonde.....	84
4.5.1. Principe	84
4.5.2. Protocole	85
4.6. Hybridation de la membrane et révélation de la réaction	88
4.6.1. Principe	88
4.6.2. Protocole	88
4.7. Comparaison des profils.....	90

B. Résultats..... 91

1. Résultats observés..... 91
2. Interprétation..... 94

C. Discussion. Analyse des résultats..... 96

1. Lien familial..... 99
2. Lien professionnel..... 100
3. Chez un même patient..... 101

CONCLUSION 103

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 105

INTRODUCTION



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

Le risque de contracter la tuberculose est encore présent, en raison des caractères propres au bacille tuberculeux, mais aussi du mode de transmission et de la physiopathologie bien particulière de cette maladie.

Le traitement de la tuberculose et les mesures de prévention sont actuellement bien connus mais posent certains problèmes liés notamment à la durée de ce traitement et au risque de non observance.

La connaissance de l'épidémiologie de la tuberculose contribue à prévenir sa transmission.

Deux grands axes y contribuent :

- d'une part les enquêtes épidémiologiques classiques qui conservent tout leur intérêt : les enquêtes réalisées autour d'un cas ont pour objectif de dépister le plus rapidement possible des cas secondaires, afin de limiter la transmission de la tuberculose
- d'autre part la découverte du génome de *Mycobacterium tuberculosis* a ouvert de nouvelles perspectives, en permettant la mise au point de techniques de biologie moléculaire à des fins diagnostiques et de typage épidémiologique.

Tous ces éléments permettent d'étudier plus précisément la transmission de cette maladie et d'établir des liens entre les différents cas de tuberculose, notamment dans les situations de micro épidémies.

1^{ère} Partie : LA TUBERCULOSE ET L'AGENT RESPONSABLE

I. L'agent responsable : Mycobacterium tuberculosis

A. Le genre Mycobacterium

1. Nomenclature

Sur le plan taxonomique, les mycobactéries appartiennent à l'ordre des Actinomycétales et en particulier à la famille des *Mycobacteriaceae* qui ne comprend qu'un seul genre : le genre *Mycobacterium*. Celui-ci regroupe plus de 70 espèces parmi lesquelles *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose, auquel nous nous intéressons plus particulièrement dans cette étude. Le genre *Mycobacterium* présente une propriété tinctoriale essentielle : l'acido-alcoolo-résistance. Toutefois, cette propriété peut concerner également d'autres bactéries comme certaines Corynebactéries et quelques Actinomycètes, parmi lesquels les *Nocardia*.

2. Définition

Le genre *Mycobacterium* est défini par 3 critères (40) :

- L'acido-alcoolo-résistance

Cette propriété est liée à la richesse de la paroi bactérienne en lipides et entraîne une imperméabilité aux colorants usuels ainsi qu'une résistance à la décoloration par un traitement acide/alcool. En revanche, la paroi fixe de façon intense les colorants alcalins tels que la fuchsine basique. La coloration de Ziehl-Neelsen, basée sur cette propriété, est utilisée pour la réalisation de l'examen microscopique.

- La composition en acides mycoliques

Ces acides gras insaturés à longue chaîne carbonée (C60 à C90) sont le support de l'acido-alcoolo-résistance et constituent un critère taxonomique de choix car leur structure varie selon les espèces bactériennes.

- Le contenu de l'ADN en Guanine et Cytosine

Le GC% des mycobactéries est compris entre 61 et 71%, à l'exception de *Mycobacterium leprae* dont le GC% est compris entre 54 et 57%. Ce pourcentage élevé explique que les 2

brins d'ADN soient fortement liés et impose des conditions techniques particulières lorsqu'il faut rompre les 3 liaisons Hydrogènes.

3. Classification

Le genre *Mycobacterium* rassemble plus de 80 espèces qui sont réparties en 3 groupes classés en fonction de leur pouvoir pathogène:

- Le complexe *tuberculosis* regroupe les espèces *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* et le BCG, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti* et *Mycobacterium microti*.
 - *Mycobacterium tuberculosis* est responsable de la tuberculose humaine et son pouvoir pathogène sera détaillé plus tard.
 - *Mycobacterium bovis* provoque chez les bovins des lésions tuberculeuses pulmonaires, des lésions des glandes mammaires. Il peut être pathogène pour tous les mammifères et également pour l'homme qui se contamine à partir du réservoir animal par inhalation de particules infectées, notamment dans les étables.
 - *Mycobacterium africanum* est responsable de tuberculoses humaines en Afrique, il est plus rare en Europe.
 - *Mycobacterium microti* est une espèce très peu pathogène pour l'homme qui infecte les rongeurs et les bovins (41).
 - *Mycobacterium canetti* est rarement responsable de tuberculose, ces cas ont été décrits en Afrique.
- Les mycobactéries atypiques. Cultivables in vitro, elles n'ont pas de pouvoir pathogène par injection sous-cutanée chez le cobaye. La plupart sont des espèces saprophytes. Certaines, considérées comme des bactéries opportunistes, peuvent occasionnellement être à l'origine d'infections humaines appelées mycobactérioses. Elles ne manifestent un pouvoir pathogène qu'à la faveur d'une défaillance des défenses de l'hôte (immunodépression, VIH). C'est notamment le cas de *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii* ou *Mycobacterium xenopi*.

Certaines mycobactéries atypiques sont des espèces pathogènes : *Mycobacterium ulcerans* est la seule mycobactérie à posséder une toxine et *Mycobacterium marinum* présente un pouvoir pathogène cutané.

Les mycobactéries atypiques ont été classées en 4 groupes par Runyon en 1959 en fonction de leur délai de croissance et de l'aspect des colonies en culture.

- Les mycobactéries responsables de la lèpre de l'homme et du rat, *Mycobacterium leprae* et *Mycobacterium lepraemurium* sont des espèces non cultivables.

4. Habitat

Les mycobactéries du groupe tuberculeux se rencontrent chez des hôtes animaux tandis que le réservoir de *Mycobacterium leprae* est uniquement humain. Le réservoir de *Mycobacterium tuberculosis* est représenté par l'homme atteint de tuberculose qui peut contaminer son entourage par les crachats, l'émission de gouttelettes de Pflügge. Les mycobactéries atypiques quant à elles se trouvent dans l'environnement hydro-tellurique et contaminent l'homme de façon indirecte.

B. Mycobacterium tuberculosis

1. Historique

L'ancienneté de la tuberculose est attestée par l'existence de lésions osseuses caractéristiques, découvertes sur des squelettes très anciens dont certains dataient du Néolithique ou chez des momies de l'Égypte ancienne. Cependant, certaines formes de la maladie n'ont été individualisées que tardivement : ainsi la description de la méningite tuberculeuse ne remonte qu'au milieu du XVIII^{ème} siècle.

La transmissibilité de la tuberculose a été démontrée en 1866 par Villemin qui, par méthode expérimentale, a prouvé l'inoculabilité de produits tuberculeux à l'animal et donc la contagion de la tuberculose.

La découverte de l'agent bactérien de la tuberculose par Robert Koch date de 1882, d'où le nom de bacille de Koch ou BK donné au bacille tuberculeux.

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

En 1944, Waksman découvre la Streptomycine qui s'avère efficace contre les bacilles tuberculeux. D'autres antibiotiques apparaissent ensuite comme l'Isoniazide en 1952, le Pyrazinamide en 1954, l'Ethambutol en 1962 et surtout la Rifampicine en 1968. Enfin, le séquençage complet du génome de *Mycobacterium tuberculosis* fut réalisé en 1998.

2. Caractères bactériologiques

2.1. Morphologie

Mycobacterium tuberculosis est un fin bacille de 2 à 5 µm de long, légèrement incurvé, aux extrémités arrondies, non capsulé, non sporulé, immobile (69).

C'est une bactérie gram positif mais difficilement colorable par cette méthode. La méthode de Ziehl-Neelsen révèle son acido-alcool-résistance et les bacilles tuberculeux apparaissent alors rouges sur fond bleu.

2.2. *Caractères physiologiques*

Mycobacterium tuberculosis est une bactérie exigeante qui nécessite de nombreux facteurs de croissance pour son développement. Le temps moyen de division est d'environ 20 heures ce qui explique l'évolution lente de la maladie, la nécessité de prescrire des traitements longs et les délais de réponse des cultures.

Mycobacterium tuberculosis est une bactérie aérobie qui se localisera préférentiellement dans les tissus bien oxygénés ce qui explique la prépondérance des tuberculoses pulmonaires.

2.3. *Sensibilité aux agents physiques et chimiques*

Mycobacterium tuberculosis peut survivre au froid et à la dessiccation, ce qui explique que l'on puisse l'isoler de façon transitoire dans l'environnement.

Mycobacterium tuberculosis est sensible aux agents physiques tels que les rayonnements ionisants, les rayons X, les UV dans certaines conditions, la lumière et la chaleur.

Sa sensibilité aux agents chimiques est variable : détruit par l'alcool à 70°, il résiste à de nombreux antiseptiques, aux bases et aux acides dilués.

II. La tuberculose

A. Physiopathologie

Elle permet de mieux comprendre quels sont les facteurs de risque et pourquoi certaines populations sont plus exposées au risque de tuberculose

1. Contamination par le bacille tuberculeux

Mycobacterium tuberculosis est un agent pathogène strictement humain ; la forme pulmonaire est la plus fréquente et assure principalement la transmission interhumaine du bacille. La transmission de *Mycobacterium tuberculosis* se fait par voie aérienne, la contamination se

produit par inhalation d'un aérosol pulmonaire provenant d'un patient bacillifère lors de toux, de paroles, d'émission de gouttelettes de Pflügge...

2. Lésions induites par le bacille

Chez un sujet non immunisé, le bacille tuberculeux pénètre au niveau de l'alvéole pulmonaire où il provoque l'apparition d'un chancre d'inoculation. Cette première phase locale aboutit à une lésion aspécifique : le chancre se présente sous forme d'un foyer exsudatif, les bacilles tuberculeux sont phagocytés par les macrophages, ils se multiplient activement dans ces cellules. Les bacilles atteignent également le ou les ganglions qui drainent le territoire atteint, ce qui entraîne une adénopathie satellite. On observe une multiplication active des bacilles et à ce stade, les bacilles peuvent éventuellement disséminer par voie lymphatique ou sanguine à partir du ganglion médiastinal pour atteindre divers organes : poumon, ganglion périphérique, séreuses, appareil urogénital, os.

Six semaines plus tard environ, les moyens de défense de l'organisme entrent en jeu et la réaction immunitaire spécifique se met en place, les lymphocytes affluent à proximité des macrophages activés. Cette phase conduit à une limitation stricte des lésions au point d'inoculation et parallèlement au développement d'une hypersensibilité retardée qui se manifeste par une lésion spécifique. Celle-ci se présente sous forme d'un granulome tuberculeux avec le plus souvent une nécrose caséuse centrale solide.

Dans 90% des cas, la lésion se stabilise, le caséum involue sur plusieurs mois et finit par se résorber ou se calcifier. Cependant, des bacilles tuberculeux peuvent rester quiescents au sein du granulome, pendant toute une vie, et constituent un réservoir potentiel de bacilles. Ils peuvent être à l'origine de rechutes. Une réaction d'hypersensibilité retardée positive révèle cette primo infection.

Dans 10% des cas, le caséum se ramollit, la lésion s'ouvre, les bacilles tuberculeux se multiplient dans un milieu oxygéné et peuvent diffuser par voie lymphatique ou hémotogène. On observe une extension de la lésion. Le sujet entre alors dans la tuberculose maladie active. A ce stade de la maladie, la réaction tuberculinique révélant l'état d'hypersensibilité est fortement positive.

3. Contamination et transmission de l'infection tuberculeuse

Si on observe 100 malades « cracheurs » c'est-à-dire éliminant des BK dans leurs expectorations et pour lesquels l'examen microscopique est positif, après une période de 2 ans, en l'absence de traitement, la moitié de ces patients sont décédés, un quart est guéri et le quart restant est tuberculeux chronique. Ces 100 malades au départ auront durant cette période contaminé 1000 personnes; on estime en effet qu'un patient pour qui l'examen microscopique est positif contamine 10 sujets. Parmi ces 1000 personnes, 100 développeront une tuberculose maladie. Enfin, parmi ces 100 nouveaux malades, 55 environ élimineront des bacilles dans les expectorations, disséminant ainsi le bacille. Ce schéma général peut être plus ou moins modifié en fonction de facteurs d'environnement, d'hygiène, de confinement, de sensibilité des individus (19).

Par ailleurs, il faut savoir qu'il existe des facteurs génétiques de susceptibilité à la maladie tuberculeuse : en effet, il existe un lien épidémiologique entre tuberculose et déficit en vitamine D, ainsi qu'entre tuberculose et polymorphisme du gène de l'interleukine 1 β .

B. Situation actuelle

1. Situation dans le monde

La tuberculose est la principale maladie infectieuse affectant l'espèce humaine, plus fréquente que le paludisme et le SIDA réunis. En effet, on compte dans le monde une nouvelle infection par le bacille tuberculeux chaque seconde ; plus d'un tiers de la population mondiale a été en contact avec le bacille et la prévalence de l'infection tuberculeuse est estimée en 2003 à plus de 2,1 milliards d'individus. Il faut noter cependant que seul un petit nombre d'entre eux développera une tuberculose maladie. L'incidence de la tuberculose dans le monde est estimée à 8,8 millions de nouveaux cas par an selon les données de 2003 et la mortalité s'élève à 1,75 millions par an (127).

Le tableau A donne une estimation de l'incidence de la tuberculose, des cas à frottis positifs ainsi que de la mortalité selon les régions du monde.

Région de l'OMS	Nombre de cas (en milliers)		Cas pour 100 000 habitants		Décès par tuberculose (y compris chez les VIH-positifs)	
	Toutes formes (%)	Frottis positif	Toutes formes	Frottis positif	Nombre (en milliers)	Pour 100 000 habitants
Afrique	2372 (27)	1013	345	147	538	78
Amériques	370 (4)	165	43	19	54	6
Asie du Sud-Est	3062 (35)	1370	190	85	617	38
Europe	439 (5)	196	50	22	67	8
Méditerranée orientale	634 (7)	285	122	55	144	28
Pacifique occidental	1933 (22)	868	112	50	327	19
Ensemble du monde	8810 (100)	3897	140	62	1747	28

Tableau A : Estimations de l'incidence de la tuberculose et de la mortalité par tuberculose lors de l'année 2003 (127).

On observe d'énormes disparités selon les pays :

- Dans les pays en voie de développement, la prévalence de l'infection tuberculeuse est beaucoup plus élevée qu'ailleurs et l'épidémie de SIDA ne fait qu'aggraver la situation. 95% des cas de tuberculose sont situés dans ces pays. L'Afrique (incidence 345/100 000 hab), l'Asie du Sud-Est (190/100 000 hab) et l'Amérique latine (28,1/100 000 hab) sont particulièrement touchées.

C'est en Asie du Sud-Est que les cas sont les plus nombreux, ils représentent un tiers de l'incidence mondiale. Toutefois, l'incidence par habitant est presque 2 fois plus élevée en Afrique qu'en Asie du Sud-Est, avec près de 350 cas par an pour 100 000 habitants.

Dans ces pays en voie de développement, les cas de tuberculose ainsi que les décès concernent principalement la tranche d'âge la plus active, c'est-à-dire les 15-49 ans (59) ; 80% des tuberculeux ont moins de 50 ans.

- Dans les pays développés, la tuberculose était un problème majeur de santé publique au début du XXème siècle avec un taux de mortalité de 300 cas pour 100 000 habitants. Son incidence a ensuite diminué régulièrement de façon spectaculaire. Cette diminution de l'incidence est attribuée à une meilleure politique de dépistage et de traitement précoce et à la réduction du risque infectieux dans un environnement socio-économique plus favorable. Cependant, au début des années 1990, une recrudescence de la tuberculose a été observée, elle était liée principalement à l'infection à VIH. Dans les pays industrialisés, la tuberculose touche plutôt des sujets de plus de 50 ans appartenant à des populations à risque (personnes immigrées, immunodéprimées, vivant dans des conditions précaires...). Aux USA, le nombre de cas de tuberculose a augmenté durant cette période, lié au VIH, avec notamment un taux important de bacilles tuberculeux résistants aux antituberculeux dans les grandes villes, ce qui a été à l'origine de micro épidémies.

2. Situation en Europe

L'incidence globale en Europe est de 50 cas pour 100 000 mais on observe des disparités en fonction des pays (58).

En Europe de l'ouest, l'incidence a progressivement diminué pour atteindre 12,9 cas pour 100 000 habitants, avec une répartition bimodale selon l'âge : dans la population immigrée, il s'agit plutôt de sujets jeunes et les femmes sont plus nombreuses que les hommes. Dans la population autochtone, les sujets infectés sont plutôt des hommes âgés de plus de 65 ans. On observe une répartition avec une concentration des cas dans la capitale dans de nombreux pays européens (France, Belgique, Angleterre, Pays-Bas), comme cela a été observé aux USA.

Dans les pays d'Europe centrale, l'incidence est de 40,4 cas pour 100 000 habitants.

Dans les pays d'Europe de l'Est, l'incidence est plus élevée, 90 cas pour 100 000 habitants, et la situation est particulièrement inquiétante ; de nombreuses épidémies sont survenues dans les prisons et le pourcentage de bacilles résistants aux traitements antituberculeux est important.

Notons qu'en France métropolitaine, l'incidence de la tuberculose est plutôt élevée par rapport aux autres pays européens de l'ouest (36).

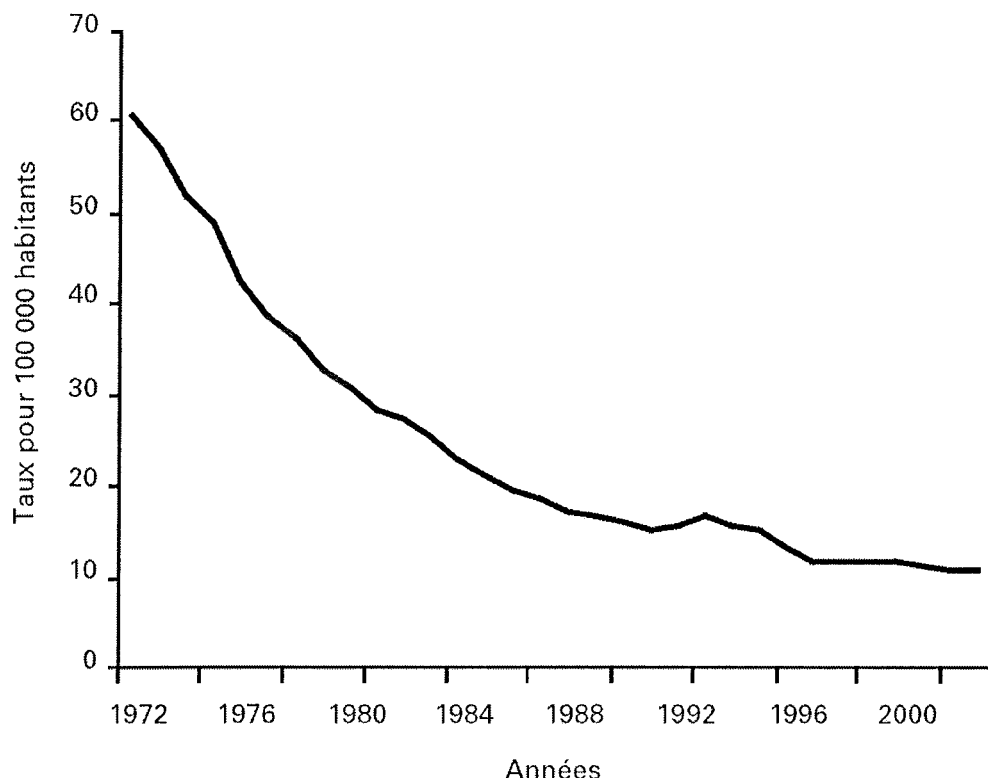
3. Situation en France

3.1. Incidence

A partir des relevés de déclaration obligatoire, le Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire a publié en mars 2003 un bilan de la situation concernant la tuberculose. (14)

Entre 1972 et 1998, l'incidence de la tuberculose est passée de 60 cas à environ 10 cas pour 100 000 habitants, comme le montre la figure 1. Depuis 1997, celle-ci reste stable autour de 11 cas pour 100 000 habitants avec cependant de fortes disparités régionales et sociodémographiques (29,67). En 2001, 6465 cas ont été déclarés mais il faut tenir compte d'une sous déclaration de cas (18).

Figure 1 : Evolution de l'incidence de la tuberculose (cas déclarés)



En France, on observe d'énormes disparités selon les régions, selon l'âge, selon le pays d'origine des sujets. Il faut également tenir compte de tous les facteurs de risque de tuberculose qui peuvent s'ajouter et compliquer la situation.

En France métropolitaine, le taux d'incidence relevé en Ile- de France est quatre fois supérieur à la moyenne nationale (27,2 cas pour 100 000 habitants contre 7 pour 100 000 habitants) et 46% des cas déclarés se situent dans cette région (24). Hormis la région Provence-Alpes-Côte-d'Azur où l'incidence reste élevée, les régions dans lesquelles l'incidence est la plus élevée se situent dans le Nord de la France.

En Lorraine, l'incidence des cas de tuberculose déclarés était de 6,5 cas pour 100 000 habitants en 1992, 8,1 en 1995 et 5,6 en 2001. Parmi les cas déclarés, l'incidence des cas de tuberculose pendant la période 1993-95 était dans cette région de 7,1 cas pour 100 000 habitants chez les personnes françaises et 22,2 cas pour 100 000 habitants chez les personnes étrangères (68). Durant cette même période, les formes pulmonaires isolées représentaient

74% des cas, les formes extra pulmonaires 20,6% et les formes mixtes 5,4%. Le pourcentage de personnes atteintes par le VIH parmi les cas de tuberculose déclarés en 1995 était de 5,3%. Par ailleurs, l'étude de la couverture vaccinale par le BCG, basée sur les certificats de santé du 24ème mois révélait en 1994 un taux de 95%, le plus élevé avec l'Ile-de-France, la moyenne française étant de 82%.

3.2. Facteurs de risque

3.2.1. L'âge

L'âge est un paramètre important à considérer : le taux d'incidence augmente avec l'âge et atteint 22,1 pour 100 000 habitants chez les personnes de plus de 75 ans. L'âge médian est de 44 ans et près de 60% des cas sont de sexe masculin. Parallèlement, l'âge des sujets pour lesquels les cas sont déclarés recule. Par ailleurs, parmi les cas déclarés, 278 cas de tuberculose concernent des enfants de moins de 15 ans, parmi lesquels 77% vaccinés par le BCG.

3.2.2. Le pays d'origine

D'énormes disparités sont observées selon le pays d'origine : alors que les personnes de nationalité étrangère représentent moins de 7% de la population en France, elles constituent 35 % des cas de tuberculose déclarés (5). De plus, parmi les personnes de nationalité étrangère, la tranche d'âge 25-39 ans était la plus touchée (87 cas pour 100 000), contrairement aux personnes de nationalité française. Les personnes étrangères proviennent souvent de pays où l'incidence de la tuberculose est beaucoup plus élevée qu'en France, et elles ont souvent des conditions de vie et de logement plus défavorables, ce qui accroît le risque de transmission de tuberculose. Et tandis que l'incidence diminuait de 6% chez les personnes de nationalité française entre 1997 et 2001, elle augmentait de 7% durant cette même période chez les personnes de nationalité étrangère. En France, dans les populations étrangères issues de pays à forte endémie, l'incidence, environ 10 fois supérieure à celle des populations autochtones, est en augmentation (de près de 20% par an pour la population des 15-24 ans). En Ile-de-France, la proportion d'étrangers est de 13%, la proportion de cas diagnostiqués chez les étrangers est de 45%. Par ailleurs, dans cette région, la population

exposée est plus variée et plus jeune, la tranche d'âge 25-39 ans est la plus touchée et on y trouve un tiers des cas de tuberculose à bacilles multi résistants.

3.2.3. La promiscuité

La résidence en collectivité s'accompagne d'un risque accru de tuberculose, qu'il s'agisse d'une résidence pour personnes âgées, d'un foyer de travailleurs (5), d'un centre social ou dans une moindre mesure d'une prison (21,57). Elle concerne 14,7% des cas renseignés.

3.2.4. La forme clinique

Concernant la présentation clinique de la maladie, les formes pulmonaires isolées ou associées qui constituent la forme la plus contagieuse représentent pratiquement $\frac{3}{4}$ des cas tandis que les méningites tuberculeuses constituent 1,5% des cas (100 cas en 2001).

Parmi les cas déclarés et renseignés, l'examen microscopique était positif dans 62% des cas, la culture dans 71,5% des cas.

3.2.5. Autres facteurs de risque

Certaines situations sont considérées comme des facteurs de risque de développer une tuberculose. C'est le cas de la malnutrition, d'un traitement immunosuppresseur (corticothérapie, chimiothérapie), d'une transplantation récente ou encore d'une maladie concomitante (diabète, éthylisme, toxicomanie, syndromes lymphoprolifératifs, cancers, insuffisance rénale chronique, gastrectomie, silicose ou VIH). Par ailleurs, des cas de contamination de tuberculose liés à l'utilisation d'endoscopes ou de matériel de dialyse ont été décrits (22).

Les sujets immigrés provenant de pays où la prévalence de la tuberculose est élevée, les personnes en situation précaire, vivant dans des conditions socio-économiques défavorables, au contact de tuberculeux (risque multiplié par 5), les sujets non vaccinés par le BCG (risque multiplié par 5) ou encore ceux chez lesquels une primo-infection récente n'a pas été traitée

(risque multiplié par 50) sont des sujets présentant un risque accru de développer une tuberculose.

Parmi les facteurs de risque, un antécédent de tuberculose traitée était retrouvé dans 9% des cas, constituant un risque de résistance au traitement. Concernant la co-infection VIH/tuberculose, elle représente 5,6% de l'ensemble des cas de tuberculose.

Enfin, le taux de souches multi résistantes, c'est-à-dire résistantes à l'isoniazide et à la rifampicine est de 0,7% et reste stable depuis plusieurs années (101).

3.3. *Mortalité*

En ce qui concerne la mortalité par tuberculose, le nombre annuel moyen de décès est passé de 1000 en 1988-1990 (soit 1,9 pour 100 000 habitants) à 695 en 1999 (1,2 pour 100 000 habitants), soit une baisse de 30% environ. Ces taux de décès varient selon l'âge : proche de zéro chez les sujets les plus jeunes et même nul chez les 0-14 ans, il augmente de façon sensible avec l'âge et atteint 7,8 cas pour 100 000 habitants chez les sujets de plus de 65 ans.

C. Diagnostic

1. Diagnostic clinique et radiologique

La tuberculose est une maladie connue depuis l'époque préhistorique et tire son nom de l'aspect des lésions qui évoque de petits tubercules. Elle est due principalement à *Mycobacterium tuberculosis*.

1.1. *Formes pulmonaires*

La localisation pulmonaire est de loin la plus fréquente et représente environ 80% des formes de tuberculose maladie (13).

Compte tenu de la physiopathologie de la tuberculose, il convient dans un premier temps de distinguer la primo-infection tuberculeuse de la tuberculose maladie (6,90).

1.1.1. Primo-infection tuberculeuse

La primo-infection tuberculeuse se définit comme le premier contact infectant avec le bacille tuberculeux. Son diagnostic repose essentiellement sur le virage récent des tests tuberculiniques car les symptômes sont généralement nuls et la radiographie pulmonaire n'est souvent pas faite. Ces tests tuberculiniques mettent en évidence la réponse de l'immunité cellulaire à un mélange protéique standardisé de fragments de mycobactéries : la « tuberculine ». Dans les pays où la vaccination par le BCG est obligatoire, ce test perd à la fois sa valeur pour la mesure épidémiologique du risque annuel d'infection et sa valeur diagnostique. Désormais, la revaccination est supprimée en France, ce qui facilitera l'interprétation de l'Intra-Dermo-Réaction (IDR) : une réaction positive chez un adulte qui n'a pas été revacciné peut avoir une valeur significative plus grande.

L'IDR à la tuberculine se pratique par injection de tuberculine (Tubertest®) par voie intradermique sur la face antérieure de l'avant-bras (70). La lecture se fait après 72 heures par la mesure du diamètre d'induration. L'interprétation doit tenir compte de l'état antérieur des réactions et des informations concernant une éventuelle vaccination par le BCG. Une réaction positive marquée par l'apparition d'un phlyctène, d'une induration, traduit le plus souvent une infection tuberculeuse récente. Le Monotest® qui était très utilisé par les médecins, notamment chez le nourrisson car facile d'utilisation, a été supprimé en novembre 2004, seul le Tubertest® reste utilisé.

La radiographie thoracique peut montrer une image typique de nodule pulmonaire correspondant au chancre d'inoculation, associé à une adénopathie satellite. Parmi les examens complémentaires, l'absence de bacilles dans l'expectoration et de signes de tuberculose maladie doit être vérifiée.

1.1.2. Tuberculose maladie

Parfois la primo-infection tuberculeuse peut être symptomatique et aboutir à une tuberculose maladie ; elle peut se manifester par des signes respiratoires sous forme d'une atteinte

gangliopulmonaire à la radiographie avec toux et syndrome fébrile, éventuellement une altération de l'état général. Les symptômes observés sont beaucoup plus rarement digestifs (diarrhée fébrile), cutanés (érythème noueux) ou oculaires (kératoconjonctivite)...

Le diagnostic de présomption de tuberculose maladie se base sur la clinique et la radiologie. La tuberculose maladie ou tuberculose pulmonaire commune se manifeste le plus souvent par des signes généraux, pulmonaires ou extra pulmonaires, elle est plus rarement découverte de façon fortuite.

A l'examen clinique, on observe classiquement des signes généraux : altération de l'état général avec asthénie, anorexie, perte de poids, fièvre élevée ou fébricule, sueurs nocturnes. On observe également des symptômes respiratoires notamment une toux persistante, avec ou sans expectoration ; celle-ci conduit généralement à pratiquer une radiographie thoracique. Les hémoptysies sont moins fréquentes mais considérées comme plus graves et de ce fait elles sont plus rarement négligées. Une dyspnée peut être observée dans les formes très étendues.

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

La radiographie du thorax est presque toujours anormale : le cliché typique se présente sous forme d'images nodulaires associées à des images cavitaires, au niveau des lobes supérieurs ou dans le segment apical du lobe inférieur. Des images excavées à parois épaisses traduisent en général une tuberculose active et contagieuse.

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

Une conjonction d'arguments épidémiologiques (terrain, contag), mais surtout des examens bactériologiques et plus rarement histopathologiques viennent confirmer le diagnostic de présomption.

Ainsi, la mise en évidence de bacilles tuberculeux à l'examen microscopique, par la culture ou par amplification génique est utilisée dans le cadre d'une suspicion de tuberculose. Un traitement est souvent débuté de façon concomitante, même en l'absence de certitude bactériologique.

Sur le plan histologique, la découverte d'un granulome tuberculoïde, surtout en présence de nécrose caséeuse et dans un contexte évocateur, peut suffire au diagnostic.

1.1.3. Miliaire tuberculeuse

La miliaire tuberculeuse est une forme rare mais sévère, caractérisée par une dissémination hématogène rapide du bacille.

Le diagnostic s'appuie essentiellement sur la clinique et les clichés thoraciques.

Dans un premier temps, on observe une fièvre isolée puis les signes respiratoires tels que toux sèche et dyspnée apparaissent.

A la radiographie et au scanner, une distribution « hématogène » des micronodules est hautement évocatrice de miliaire tuberculeuse.

Par ailleurs, la réalisation de biopsies bronchiques peut révéler la présence de granulomes tuberculoïdes.

La recherche de bacilles tuberculeux dans les expectorations est souvent négative à l'examen microscopique et même en culture.

Un bilan d'extension est impératif, à la recherche de localisations extra pulmonaires consécutives à la dissémination hématogène des bacilles.

1.2. Formes extra pulmonaires de la tuberculose

Les localisations extra pulmonaires de la tuberculose représentent une minorité de cas ; par ordre de fréquence, on peut distinguer :

les localisations séreuses : l'atteinte de la plèvre est la plus fréquente et représente 10 à 15% des tuberculoses. Les signes pleuraux sont au premier plan et la radiographie montre une opacité pleurale. La ponction pleurale ramène un liquide sérofibrineux renfermant une faible quantité de bacilles. La biopsie pleurale, examen clé du diagnostic, révèle la présence de lésions granulomateuses.

La tuberculose ganglionnaire se caractérise par des adénopathies chroniques associées ou non à une altération de l'état général. Les réactions cutanées à la tuberculine sont très positives.

Les formes osseuses et ostéoarticulaires ne sont pas exceptionnelles.

De nombreux organes peuvent être touchés et des formes rénales, urogénitales, méningées, hépatiques, ainsi qu'une péricardite tuberculeuse ou un pyothorax sont possibles.

Chez les sujets immunodéprimés, les manifestations extra pulmonaires sont plus fréquentes que chez les autres malades

1.3. Tuberculose et VIH

Lorsque le nombre de lymphocytes T CD4 n'est que modérément diminué, la radiographie typique montre des images infiltratives et parfois cavitaires au niveau du lobe supérieur, les localisations extra pulmonaires sont rares et l'IDR à la tuberculine est positive dans 2/3 des cas.

En revanche, lorsque le nombre de CD4 a fortement chuté, l'IDR n'est positive que dans 30% des cas et les images pulmonaires sont volontiers atypiques. Les localisations extra pulmonaires, en particulier ganglionnaires, sont plus fréquentes.

La durée du traitement est allongée à 9 mois afin d'éviter les rechutes.

L'INSERM et le Groupe d'Epidémiologie Clinique des CISH ont publié dans un tableau les taux de lymphocytes CD4 observés lors de l'apparition d'une tuberculose, pulmonaire ou extra pulmonaire.

		Tuberculose	
		Pulmonaire	Extra pulmonaire
Nombre de cas (1992-1998)		1213	890
CD4 (par mm3) Valeurs Normales : 500- 1400	< 50	39,3%	36,7%
	50-99	15%	18,4%
	100-199	18,6%	21,9%
	200-349	14,4%	14,6%
	> 350	12,6%	8,3%

Tableau B : Statistiques des cas de tuberculose selon le taux de lymphocytes CD4

2. Diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique de tuberculose repose sur la mise en évidence des bacilles de la tuberculose, c'est-à-dire *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* ou *M. africanum*. Le diagnostic bactériologique permet de dépister 80% des tuberculoses pulmonaires suspectées cliniquement et radiologiquement (39).

L'examen microscopique est un outil de première ligne, simple et rapide, mais sa sensibilité est faible, le prélèvement doit contenir au moins 10 000 bacilles /ml. Il est toujours complété par une mise en culture. Les techniques d'amplification génomique rapides contribuent également au diagnostic.

Le diagnostic bactériologique comporte 3 étapes : l'isolement, l'identification et la détermination de la sensibilité aux antituberculeux de la souche

Dans certains cas, il est très utile de soumettre cette souche à des comparaisons épidémiologiques.

Pendant de nombreuses années, l'inoculation au cobaye fut l'élément clé du diagnostic ; elle n'est désormais plus utilisée.

Dans le cadre de la recherche et de l'enseignement, selon l'arrêté du 18 Juillet 1994, *Mycobacterium tuberculosis* appartient aux microorganismes de classe 3 ; les manipulations à haut risque doivent donc être effectuées dans un laboratoire sécurisé P3, afin d'éviter la dissémination d'agents infectieux dans l'environnement, en particulier les bacilles multi résistants.

2.1. Prélèvements

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

2.1.1. Les prélèvements d'origine pulmonaire

La symptomatologie de la tuberculose étant dominée par les formes pulmonaires, il est logique que la majorité des prélèvements parvenant au laboratoire soient d'origine pulmonaire.

Les crachats

On recueille les crachats émis spontanément dans des flacons stériles, de préférence le matin au réveil, 3 jours de suite. Il est important d'obtenir des crachats d'origine bronchique et non salivaire. On peut au besoin avoir recours à l'expectoration provoquée par un aérosol de solutés salins ou après une séance de kinésithérapie.

Les tubages gastriques

Réalisés en particulier chez les enfants ou les sujets âgés, ils sont réalisés au réveil, chez des sujets alités depuis la veille. Ils permettent de recueillir les sécrétions bronchiques dégluties pendant le sommeil et seront traités comme des crachats.

Les prélèvements sous fibroscopie bronchique

Ils sont réalisés lorsque les crachats ou tubages gastriques ne permettent pas le diagnostic. Ce sont des aspirations bronchiques, des brossages bronchiques ou encore des liquides de lavage broncho alvéolaire.

2.1.2. Les prélèvements extra pulmonaires

Les urines

Les premières urines du matin sont recueillies 3 jours consécutifs, en général dans un contexte de leucocyturie sans bactériurie apparente, mais également lors d'un bilan d'extension à la recherche des différentes localisations tuberculeuses.

Les liquides d'épanchement

Les liquides pleuraux, liquides céphalo rachidiens, liquides d'ascite et liquides articulaires peuvent être prélevés pour être analysés. Si ces prélèvements sont hémorragiques, ils peuvent être additionnés d'un anticoagulant comme l'héparine.

Les biopsies

Ces prélèvements peuvent être réalisés au niveau de la plèvre, du péritoine, des bronches, des os, des séreuses, du foie, des ganglions, et même du cerveau, des reins en post-mortem chez les sujets HIV positifs...

Le sang et la moelle osseuse

Des hémocultures sont réalisées en cas de suspicion de forme disséminée, le plus souvent chez l'immunodéprimé. Le sang est recueilli dans un tube de type Isolator TM 10 contenant de la saponine afin de libérer les mycobactéries des leucocytes sanguins.

2.2. Traitement des échantillons : décontamination et fluidification

Il faut distinguer deux catégories de prélèvements :

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

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

Différentes méthodes sont utilisées :

- La méthode à la soude 4% est la technique la plus ancienne, simple mais pratiquement plus utilisée car elle est agressive pour les mycobactéries.

- La méthode à la soude a donc été complétée par l'utilisation d'antiseptiques fluidifiants:

La méthode la plus utilisée est celle au laurylsulfate de sodium. Elle est utilisée pour l'ensemencement des milieux à l'œuf. Cependant elle ne convient pas pour la culture en milieu liquide ni pour la biologie moléculaire car le laurylsulfate de sodium est un inhibiteur de la réaction d'amplification d'ADN et que l'on ne parvient pas à neutraliser complètement son action.

La méthode utilisant la N acétylcystéine sodique, agent fluidifiant et décontaminant, est compatible avec tous les milieux de culture, elle est recommandée pour les milieux liquides et les techniques de biologie moléculaire. Elle est de ce fait de plus en plus utilisée.

L'acide oxalique peut être utilisé conjointement à de la N acétylcystéine sodique pour des prélèvements très contaminés tels que ceux des patients atteints de mucoviscidose.

- Les acides peuvent être utilisés pour le traitement des prélèvements très contaminés : acide sulfurique à 4%, acide oxalique.
- Le chlorure de benzalkonium est parfois utilisé.
- La méthode au Chlorure de Cétyle Pyridinium (CPC) est utile lorsque le délai de transport est long.

2.3. *Examen microscopique*

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

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

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

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

Les résultats sont exprimés quantitativement :

- 10 bacilles pour 100 champs : rares BAAR
- 10 bacilles pour 10 champs : quelques BAAR
- > 10 bacilles par champ : nombreux BAAR

Très utile, l'examen microscopique permet un diagnostic d'orientation, il est généralement bien corrélé aux résultats de la culture mais manque de sensibilité (40-50%). Il faut au moins 10^4 bacilles par millilitre de prélèvement pour que l'examen microscopique soit positif. Il est donc complété par d'autres examens, techniques de biologie moléculaire et mise en culture (101).

2.4. Techniques d'amplification génomique à partir des échantillons biologiques

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

2.4.1. Amplicor Roche Diagnostics- PCR

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

2.4.2. Technique TMA de Gen-Probe Bio Mérieux

La TMA (Transcription Mediated Amplification) est une amplification de l'ARN ribosomal. Elle se pratique à partir des culots de décontamination des échantillons pulmonaires. Après amplification, les amplicons d'ARN ribosomal sont hybridés avec une sonde ADN chimiluminescente. Cette méthode commercialisée en kit est standardisée, ne

nécessite pas de travailler dans des zones différentes ni de transfert des amplicons. Mais elle présente l'inconvénient de ne pas détecter les inhibiteurs.

2.4.3. Technique NASBA

Le test GenoType Mycobacteria Direct utilise cette technique. Après extraction des acides nucléiques, l'ARN est fixé sur des billes magnétiques puis amplifié. La détection se fait sur une bandelette à l'aide de sondes spécifiques de *Mycobacterium avium intracellulare*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense* et du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

Ce test est validé pour des échantillons respiratoires décontaminés, il est utilisé pour des patients suspectés de tuberculose jamais traités ou n'ayant pas été traités par des antituberculeux plus de 7 jours dans les 12 derniers mois. Cette technique n'est pas validée chez les enfants ni chez les sujets séropositifs HIV.

Cette technique rapide présente l'avantage de détecter les mycobactéries tuberculeuses et certaines mycobactéries atypiques. Ses principaux inconvénients sont son coût élevé, l'utilisation d'ARN plus labile et la nécessité d'un matériel spécifique.

2.4.4. Stratégie

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

2.5. Culture

Différents milieux de culture peuvent être utilisés :

➤ Milieux solides

○ Milieu à l'œuf de Löwenstein-Jensen (LJ) et Coletsos

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

Quatre tubes de milieux de culture sontensemencés, 2 Löwenstein-Jensen et 2 Coletsos, incubés inclinés et légèrement ouverts dans une atmosphère humide, à 37 °C et également à 40°C pour les patients immunodéprimés à la recherche de mycobactéries atypiques. Les prélèvements d'origine cutanée sontensemencés et incubés à 37°C et 30°C.

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

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

○ Milieux semi synthétiques de Middlebrook

Ces milieux gélosés transparents ne sont pas utilisés en routine en France en raison de leur moindre conservation et de leur coût plus élevé que celui des autres milieux.

➤ Milieux liquides

Le recours aux milieux liquides permet une détection plus rapide de la croissance des mycobactéries, et donc un diagnostic plus rapide. Selon les systèmes, la détection de la croissance des mycobactéries repose soit sur la consommation d'oxygène, soit sur le dégagement de CO₂. Le délai de détection des mycobactéries est alors de 8 à 30 jours, en général entre 2 et 3 semaines. La lecture se fait grâce à des techniques de fluorescence (Tubes

MGIT, système Bactec) ou de colorimétrie (système MB Redox, Bact/Alert). Lorsque la culture apparaît positive, il convient de vérifier qu'il s'agit de mycobactéries par l'examen d'un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen. Par ailleurs, selon la législation, une culture sur milieu solide effectuée en parallèle est obligatoire.

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

2.6. Identification des espèces mycobactériennes

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

2.6.1. Caractères biochimiques

Ces différents caractères sont traditionnellement utilisés pour l'identification d'une espèce mycobactérienne à partir d'une culture positive, ils permettent de différencier les mycobactéries du complexe tuberculeux des mycobactéries atypiques et d'identifier les espèces du groupe tuberculeux.

Catalase

L'activité catalasique des mycobactéries est mise en évidence à 22 et à 68°C. La catalase est positive pour toutes les mycobactéries à 22°C. A 68°C, elle est positive pour *Mycobacterium kansasii*. *Mycobacterium tuberculosis*, *africanum* et *bovis* ont une catalase thermosensible.

Test à la niacine = acide nicotinique

L'acide nicotinique est excrété dans le milieu de culture par quelques mycobactéries, elle est recherchée sur une culture abondante. *Mycobacterium tuberculosis* est, avec *Mycobacterium microti*, la seule souche qui produit de l'acide nicotinique.

Réduction des nitrates en nitrites

Une colonie, mise en suspension dans de l'eau distillée, est incubée en présence de nitrate de sodium pendant 2 heures à 37°C. Après addition d'acide chlorhydrique, de sulfanilamide et d'éthylène diamine, une coloration rose ou rouge apparaît en cas de réaction positive, c'est-à-dire en présence de nitrites.

Sensibilité au TCH

On observe la croissance bactérienne en présence d'hydroxyde de l'acide thiophène-2-carboxylique sur un milieu de Loewenstein-Jensen, à une concentration de 2 µg/ml. La souche est considérée comme résistante si la croissance sur milieu TCH est supérieure à 1% par rapport à une culture témoin sans TCH. Il est à noter que la résistance à l'isoniazide entraîne celle au TCH.

Les résultats de ces tests et l'aspect des cultures permettent de différencier les espèces du complexe tuberculeux des mycobactéries atypiques.

L'ensemble des caractères cultureux et biochimiques destinés à l'identification des mycobactéries tuberculeuses est résumé dans le tableau C.

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

Tableau C : Caractères cultureux et biochimiques des mycobactéries du groupe tuberculeux

L’identification des mycobactéries atypiques ne sera pas envisagée dans ce travail.

2.6.2. Techniques de biologie moléculaire

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

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

- Le test Accuprobe® de GenProbe permet à partir d'une colonie l'identification des mycobactéries du complexe tuberculosis : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti* et du BCG. Il permet également d'identifier *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium gordonae* et *Mycobacterium kansasii*. Les mycobactéries renferment de l'ARN ribosomal qui est détecté par hybridation avec des sondes spécifiques d'ADN monocaténaire, ces sondes étant pourvues d'un marqueur chimiluminescent. Cette technique rapide, réalisable en 2 heures, constitue un bon test de screening pour différencier les mycobactéries tuberculeuses des mycobactéries atypiques. Elle présente l'inconvénient de devoir choisir la sonde appropriée en fonction de la morphologie des BAAR ; par ailleurs, elle ne permet pas d'identifier toutes les mycobactéries atypiques.
- Le test GenoType® MTBC, est un test génétique de différenciation du complexe tuberculosis à partir de la culture, il permet en 4 heures l'identification de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis ssp bovis*, *Mycobacterium bovis ssp caprae* et du BCG (89). Cette méthode comprend une extraction de l'ADN suivie d'une amplification par PCR et d'une hybridation avec des sondes spécifiques. Sa sensibilité est un peu supérieure à celle du test Accuprobe® (90).
- Selon le même principe, le test GenoType® *Mycobacterium* est un test génétique qui permet en 3 heures l'identification des 13 principales espèces de mycobactéries atypiques à partir d'une culture.
- Le test INNO-LiPA MYCOBACTERIA® est un test d'hybridation moléculaire sur bandelette pour la détection et l'identification simultanée de 16 espèces du genre *Mycobacterium*, à partir de cultures sur milieux solides ou liquides. Ce test, basé sur les différences nucléotidiques dans l'inter-espace 16S-23S de l'ARN ribosomal, permet d'identifier :le complexe *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium simiae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans*, *Mycobacterium celatum*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*,

Mycobacterium scrofulaceum, *Mycobacterium malmoense*, *Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum* et *Mycobacterium smegmatis*.

Non seulement les kits de biologie moléculaire permettent d'identifier les espèces mycobactériennes, mais il existe des kits de détection de la résistance à certains antituberculeux :

- Le test Genotype[®] MTBDR de Biocentric permet la détection des résistances de *Mycobacterium tuberculosis* à la rifampicine et à l'isoniazide, sur la base des principales mutations rencontrées au niveau des gènes rpoB (84) et katG. Le test est basé sur une amplification de type PCR suivie d'une hybridation inverse sur une bandelette de nitrocellulose supportant les sondes adéquates. Cette technique disponible depuis janvier 2005 est réalisée en 4 heures à partir de cultures sur milieux solides ou liquides. Le gène rpoB code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase, cible de la rifampicine, tandis que le gène katG code pour la peroxydase- catalase, cible de l'isoniazide.
- Le test INNO-LIPA Rif TB[®] permet l'identification du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et la détection simultanée d'une résistance à la rifampicine. Il consiste à extraire l'ADN mycobactérien à partir de cultures solides ou liquides puis à amplifier la région rpoB décrite précédemment. L'ADN ainsi généré est alors hybridé sur une bandelette contenant 10 sondes, parmi lesquelles une sonde spécifique du complexe tuberculosis et 4 sondes de détection des mutations les plus fréquemment observées.

2.7.Démarche globale

Le traitement appliqué aux prélèvements qui parviennent au laboratoire est résumé ci-dessous (19).

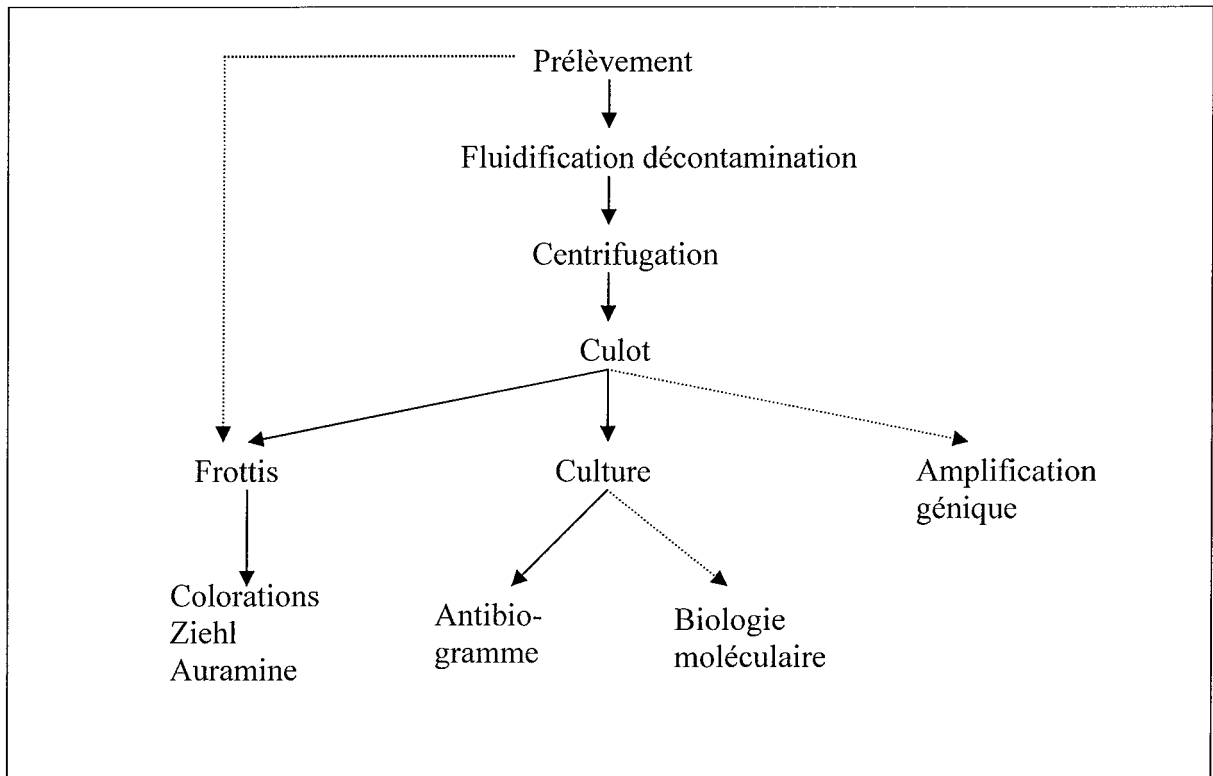


Figure 2 : Traitement d'un prélèvement pour la recherche des mycobactéries.

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

2.8. Sensibilité aux antibiotiques

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

Quand il existe des résistances aux antituberculeux, elles sont dues à des mutations chromosomiques, la résistance à la Rifampicine étant la plus fréquente et souvent associée à une résistance à l'Isoniazide.

L'antibiogramme s'effectue selon la méthode des proportions et consiste à détecter le pourcentage de mutants résistants dans la population de bacilles isolés chez le patient par comparaison à une culture témoin sans antibiotique. Si on observe plus de 1% de mutants résistants, on considère qu'il existe un risque d'échec du traitement. Cette méthode est classiquement pratiquée en milieu solide, sur des milieux de Loewenstein-Jensen, mais elle a également été adaptée aux milieux liquides.

D. Traitement

La tuberculose étant une maladie transmise directement d'homme à homme, le traitement des malades conditionne à la fois leur devenir à titre individuel (guérison, rechute), mais également celui de leur entourage (personnes contaminées à partir d'un cas). Un traitement bien suivi permet d'éviter l'apparition de souches multirésistantes ainsi que des conséquences fâcheuses telles que rechute, prolongation du traitement, allongement de la période de contagiosité, risque de décès multiplié par 4.

1. Qui traiter ?

Tous les cas de tuberculose maladie doivent bénéficier d'un traitement adapté (15).

La primo-infection tuberculeuse peut évoluer vers une tuberculose maladie dans 1 cas sur 10.

Chez l'enfant et l'adolescent, une primo-infection tuberculeuse latente est traitée pendant 6 mois par isoniazide afin de diminuer le risque de tuberculose maladie. Chez les sujets immunodéprimés, la primo-infection se traite comme une tuberculose maladie. Chez l'adulte immunocompétent enfin, le traitement n'est pas obligatoire.

En revanche, toute primo-infection tuberculeuse symptomatique ou s'accompagnant d'anomalies radiologiques doit être traitée comme une tuberculose maladie.

Après un traitement adapté, l'évolution des miliaires tuberculeuses est le plus souvent favorable.

2. Principes

Les cavernes tuberculeuses renferment plusieurs populations bacillaires. Le traitement antituberculeux doit être bactéricide sur toutes ces populations bacillaires, qu'elles soient extracellulaires ou intra- cavitaires, intra-macrophagiques ou que les bacilles soient quiescents intra-caséux, ce qui nécessite l'association de plusieurs antibiotiques, certains agissant sur les bacilles intracellulaires, d'autres sur les bacilles extracellulaires.

Par ailleurs, une part des bacilles tuberculeux est spontanément résistante aux antituberculeux; cette résistance primaire est faible. Mais il existe également une résistance secondaire correspondant à des mutants résistants, le traitement doit donc réduire rapidement la population de bacilles afin de diminuer le risque d'apparition de ces mutants résistants.

La résistance acquise de *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux est un mécanisme chromosomique, donc non transmissible par des plasmides ; aussi la multirésistance de *Mycobacterium tuberculosis* reste un problème marginal en France, à condition de respecter les modalités du traitement, ce dernier doit être suffisamment long pour permettre de détruire tous les bacilles tuberculeux et éviter les rechutes.

3. Médicaments antituberculeux

Les principaux médicaments antituberculeux sont décrits ci- dessous (77) :

3.1. Isoniazide

Cet hydrazide de l'acide nicotinique est un antituberculeux de première intention, il inhibe la synthèse des acides mycoliques, entraînant une déformation de la cellule bactérienne chez *Mycobacterium tuberculosis*. Par ailleurs, il se manifeste par des altérations du métabolisme des protéines, des acides nucléiques, des glucides et des lipides. Il favorise également la formation de radicaux libres oxygénés.

3.2. *Rifampicine*

Cet antibiotique bactéricide, dérivé semi synthétique de la rifamycine B, a pour cible l'ARN Polymérase ADN dépendante. Les résistances observées sont dues à des mutations à l'origine d'altérations de la cible.

3.3. *Ethambutol*

Il inhibe d'une part le transfert des acides mycoliques dans la paroi et entraîne d'autre part l'accumulation de mono et di-mycolates de tréhalose, provoquant des changements du métabolisme lipidique. Il a une activité principalement bactériostatique et agit sur les bacilles intra et extracellulaires en phase de multiplication.

3.4. *Pyrazinamide*

Son mécanisme d'action n'est pas connu. Il agit en milieu acide et donc sur les bacilles intracellulaires.

3.5. *Streptomycine*

C'est le premier antibiotique antituberculeux utilisé, il a permis de lutter efficacement contre les méningites tuberculeuses. Cet antibiotique de la famille des aminoglycosides a une action bactériostatique et bactéricide par fixation sur les unités 30S des ribosomes bactériens, provoquant des erreurs de lecture du code génétique et l'élaboration de protéines non fonctionnelles. Il n'est plus très utilisé en première intention à cause de sa toxicité et du taux élevé de résistances primaires et secondaires ; il reste cependant très utile en tant qu'antibiotique relais.

Il existe d'autres antituberculeux de seconde intention comme par exemple les fluoroquinolones (Moxifloxacin), leur utilisation reste limitée notamment aux cas de tuberculose résistants aux principaux antituberculeux.

4. Bilan pré thérapeutique

Un bilan pré thérapeutique est réalisé avant de débiter un traitement antituberculeux ; il convient de vérifier différents éléments :

- effectuer un bilan d'extension à la recherche d'autres localisations tuberculeuses sans pour autant retarder la mise en route du traitement
- d'éventuels antécédents de tuberculose qui augmentent les risques de résistance aux antituberculeux
- une notion de traitement spécifique antérieur ou de résistance aux antituberculeux
- la provenance éventuelle de pays où l'incidence de tuberculose est élevée et où les bacilles multirésistants sont plus fréquents
- d'éventuels facteurs prédisposants : immunodépression, diabète, insuffisance rénale, éthyliste, gastrectomie, VIH
- rechercher les contre-indications et précautions d'emploi avant traitement, grâce à un bilan hépatique, rénal et ophtalmologique.

5. Choix du traitement

La durée du traitement ne doit jamais être inférieure à 6 mois, celui-ci doit comporter au moins 3 antibiotiques en traitement d'attaque, en disposant si possible des données de l'antibiogramme (99).

Le schéma de traitement habituel est le suivant :

- Quadrithérapie pendant 2 mois
 - Rifampicine
 - Isoniazide
 - Pyrazinamide
 - Ethambutol (dans les cas graves)
- puis
- Bithérapie pendant 4 mois
 - Rifampicine
 - Isoniazide

6. Surveillance du traitement

Une surveillance à la fois clinique et biologique est réalisée et comprend notamment :

- un examen clinique régulier
- des radiographies du thorax
- un bilan hépatique mensuel
- un bilan de la fonction rénale
- un examen ophtalmologique pendant la durée du traitement par éthambutol
- un examen bactériologique

L'observance, critère essentiel de succès du traitement, peut être surveillée grâce à la coloration orangée des urines par la rifampicine.

La bonne tolérance au traitement sera jugée sur l'interrogatoire du patient et le suivi biologique et clinique régulier.

Quant à l'efficacité du traitement, elle sera mesurée par la décroissance de la fièvre, la régression de la toux, l'amélioration de l'état général et la négativation des cultures des prélèvements bactériologiques (101).

E. Prévention

1. Vaccination par le BCG

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

Le BCG est une souche de *Mycobacterium bovis* rendue avirulente par un grand nombre de repiquages sur milieu bilié et glyciné. En France, la vaccination par le BCG est obligatoire pour les enfants avant leur entrée en collectivité (23).

Le BCG confère une immunité cellulaire relative. De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer l'efficacité de cette vaccination (15) :

- Le BCG protège surtout les enfants contre les méningites tuberculeuses. Deux méta-analyses ont repris l'essentiel des résultats publiés concernant les nourrissons et les enfants : il ressort que la protection apportée par le BCG est légèrement supérieure chez le nourrisson que chez

l'enfant, de l'ordre de 80% pour les formes graves (miliaires et méningites) et de 55% pour les formes pulmonaires. Par ailleurs, le vaccin semble également efficace contre les mycobactéries environnementales puisque des observations faites en Europe du Nord montrent qu'il y a eu, depuis l'arrêt de la vaccination par le BCG, davantage de mycobactérioses, notamment ganglionnaires chez l'enfant.

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

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

Par ailleurs, ces études montrent que le BCG est un vaccin qui ne confère pas une immunité totale mais qui présente une spécificité certaine puisqu'un arrêt de la vaccination se traduit par une augmentation des cas de tuberculose (23).

La place de la vaccination dans la maîtrise de la maladie est en cours de réévaluation à l'échelle mondiale et l'attitude adoptée par chaque pays varie en fonction des données épidémiologiques, des différents facteurs de risque et donc du rapport bénéfice/risque que présente la vaccination.

L'analyse des avantages et inconvénients de la vaccination par le BCG demande au préalable de disposer d'estimations fiables concernant l'incidence de la maladie tuberculeuse et des mycobactérioses non tuberculeuses, l'efficacité du vaccin, la durée de protection conférée par la vaccination, la fréquence et la gravité des effets indésirables du vaccin, le coût du vaccin ou encore le coût du traitement d'un cas de tuberculose. Par ailleurs, la vaccination des populations dites à risque suppose une identification correcte de ces populations : s'il est impossible d'identifier correctement des populations dont l'incidence est 30 à 50 fois plus élevée que celle du reste de la population, une stratégie de vaccination sélective risque d'être inefficace.

Le changement de politique vaccinale n'est donc pas une décision facile.

Pour l' UICTMR (Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires), l'arrêt de la vaccination systématique par le BCG est justifiée lorsque :

- Le taux annuel des cas de tuberculoses pulmonaires à expectorations positives à l'examen microscopique est inférieur à 5 pour 100 000

ou

- Le taux des méningites tuberculeuses chez les enfants de moins de 5 ans est inférieur à 1 pour 10 millions

ou

- Le risque annuel d'infection tuberculeuse est inférieur à 0,1%.

L' OMS a également défini ces 3 critères comme critères de décision de vaccination ou non.

Dans les pays industrialisés, les politiques vaccinales diffèrent énormément d'un pays à l'autre. Aux Etats-Unis (incidence $6/10^5$), la vaccination par le BCG n'a jamais été recommandée, la stratégie de lutte contre la tuberculose reposant sur la détection précoce et le traitement des cas contagieux, ainsi que sur la thérapie préventive des personnes infectées. Au Japon (incidence $26/10^5$), les tests tuberculiniques après BCG et la revaccination BCG ont été récemment abandonnés ; la poursuite de la vaccination généralisée des enfants est en discussion. En Nouvelle-Zélande (incidence $9/10^5$), la politique de vaccination généralisée des adolescents a été remplacée ces dernières années par une approche sélective, c'est-à-dire une vaccination des nouveaux-nés dans les régions à haut risque.

En Europe occidentale, les politiques vaccinales restent très variables. Dans certain pays comme l'Allemagne et l'Autriche la vaccination n'est pas recommandée. Une dizaine de pays (Belgique, Danemark, Espagne, Italie, Suède...) recommandent une vaccination pour les groupes à risque. Quelques pays dont la France pratiquent encore une vaccination généralisée. Depuis les années 1970, on assiste, en Europe occidentale, à un abandon progressif de la vaccination généralisée des jeunes enfants décidé par les tendances épidémiologiques de la maladie tuberculeuse, les effets secondaires du BCG, la faible efficacité de la vaccination et des considérations de coût-bénéfice mais les études montrent que l'arrêt de la vaccination généralisée entraîne une augmentation de l'incidence de la tuberculose et des mycobactérioses pédiatriques.

La France est l'un des rares pays européens à maintenir la vaccination BCG généralisée avant l'âge de 6 ans (70). Un décret du 30 juin 2004 supprime les revaccinations des sujets, même ceux pour lesquels le résultat de l>IDR est négatif, et l'arrêté du 13 juillet 2004 a mis fin à la pratique des tests tuberculiniques de contrôle après la vaccination. A 6 ans, 95% des enfants ont reçu le BCG.

On peut estimer le nombre de cas de tuberculose évités en France grâce à la vaccination : il varie selon les études entre 318 et 802 cas annuels.

2. Investigations autour d'un cas de tuberculose

Les personnes de l'entourage proche des malades contagieux sont les plus exposées au risque de tuberculose et, lorsqu'elles ont été infectées, c'est dans la période qui suit immédiatement l'infection qu'elles ont le plus grand risque de développer une tuberculose maladie. Il est donc impératif de dépister rapidement les cas de tuberculose. En France où l'incidence de la tuberculose est devenue relativement basse, un dépistage « ciblé » est très important. Le dépistage doit se dérouler au sein de la famille bien sûr mais également au sein de collectivités, en particulier d'enfants, de personnes âgées ou de sujets immunodéprimés.

Les investigations autour d'un cas sont menées selon la technique des cercles concentriques : d'abord la famille, puis l'environnement proche et de plus en plus éloigné, les résidences en collectivité, les études dans les établissements de santé et auprès du personnel soignant (107).

Les investigations menées ont deux objectifs :

- D'une part identifier puis traiter les personnes malades pouvant elles-mêmes contaminer leur entourage et donc arrêter le cycle de transmission de la tuberculose.
- D'autre part dépister les cas de primo infection tuberculeuse et au besoin les traiter, et ainsi empêcher l'évolution vers une tuberculose maladie.

Pour connaître le risque de transmission, il faut évaluer :

- Le cas index et ses caractéristiques

Il est important de connaître le degré de contagiosité de ce cas en étudiant ses caractéristiques bactériologiques (un examen microscopique positif est un signe de plus grande contagiosité), radiologiques (la présence de cavernes est associée à un risque accru de transmission), cliniques (le risque de transmission est accru dans les formes pulmonaires, les laryngites tuberculeuses, selon l'intensité et la durée de la toux...) ainsi que la sensibilité de la souche tuberculeuse au traitement car la multirésistance, c'est-à-dire la résistance à l'isoniazide et à la rifampicine, allonge la période de contagiosité et donc de transmission potentielle.

En général, la contagiosité diminue rapidement jusqu'à devenir négligeable en 1 à 3 semaines, lorsque le patient, sous traitement, ne tousse plus et n'a plus de fièvre.

- Le type de contact avec l'entourage

La durée d'exposition influence le risque de transmission car la moitié des gouttelettes infectantes reste dans l'air 30 minutes après une toux.

On distingue 3 catégories de contacts :

- Le contact étroit concerne les personnes habitant sous le même toit ou partageant la même pièce pendant de nombreuses heures par jour, en particulier la famille.
- Le contact régulier concerne les personnes partageant régulièrement le même lieu fermé (école, entreprise, prison).
- Le contact occasionnel concerne des personnes partageant occasionnellement le même lieu fermé.

- Les conditions environnementales du lieu de transmission

La transmission du bacille tuberculeux s'effectuant par voie aérienne, par des aérosols renfermant des bacilles, les conditions susceptibles d'accroître le risque de transmission sont importantes à considérer : le volume du lieu, la circulation de l'air, les systèmes de ventilation...

Dans un second temps, il convient d'évaluer les facteurs influençant l'évolution vers une tuberculose maladie des personnes infectées : l'âge, les pathologies ou les traitements

induisant une immunodépression, les pathologies associées ainsi que la susceptibilité individuelle des sujets contacts. A l'inverse, une vaccination par le BCG (qui confère une protection estimée à 50%, diminuant au fil du temps) et une infection tuberculeuse antérieure (développement d'une immunité partielle) constituent des facteurs susceptibles de diminuer la réceptivité des personnes exposées.

Devant tout cas de tuberculose nouvellement diagnostiqué, il faut entreprendre une recherche des cas de tuberculose (maladie ou infection) dans l'entourage afin de dépister les cas secondaires et de mettre en place un traitement adapté. Ce dépistage se pratique grâce à l'IDR, à la radiographie thoracique, aux consultations médicales

Un cas particulier d'investigation concerne les sujets ayant voyagé avec une personne atteinte de tuberculose ; dans ce cas, les mesures sont prises en fonction du caractère effectivement contagieux ou non de la personne, de la durée du trajet, de l'intervalle de temps écoulé entre le voyage et la déclaration du cas et selon la proximité des personnes exposées avec le malade...

3. Prévention et surveillance de la tuberculose parmi les personnels exposés

La tuberculose est reconnue comme maladie professionnelle pour les personnels de soins et de laboratoires (maladie n°40 inscrite au tableau des maladies professionnelles). Entre 30 et 50 cas sont déclarés chaque année par les services de médecine du travail, dont 90% de formes pleuro pulmonaires. Si la nature de l'activité professionnelle expose les personnes au risque de tuberculose, une surveillance particulière est mise en place. Tout d'abord à l'embauche, la médecine du travail prévoit une radiographie pulmonaire, en complément de la visite médicale, puis un examen clinique annuel. Dans le secteur privé, la radiographie pulmonaire n'est plus obligatoire, seule la primo vaccination par le BCG l'est. Par contre, les mesures de prévention primaire demeurent essentielles : limiter l'exposition du personnel et appliquer rigoureusement les mesures d'isolement respiratoire des patients (107).

En cas de tuberculose professionnelle, une enquête est réalisée par le médecin du travail, en collaboration avec le Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales (CLIN) et le Comité d'Hygiène, de Sécurité et des Conditions de Travail (CHSCT), afin de repérer et corriger

d'éventuels dysfonctionnements, de dépister d'autres contaminations et de réaliser une enquête autour de ce cas.

4. Prévention de la transmission de la tuberculose dans les établissements de santé

Le regroupement dans les mêmes services hospitaliers de patients immunodéprimés et de patients tuberculeux crée les conditions favorables à la survenue d'infections nosocomiales, et le risque est accru lorsque le bacille est multi résistant car la période de contagiosité est alors plus longue (107). Il est donc préférable, dans la mesure du possible, d'éloigner ces patients. Les analyses par typage moléculaire peuvent démontrer les cas de transmission nosocomiale.

Il convient, dans un premier temps, de prendre des mesures de protection respiratoire ou d'isolement respiratoire ; en effet, les sujets contagieux sont ceux qui ont une tuberculose pulmonaire ou laryngée. Cet isolement doit être maintenu durant toute la période de contagiosité, c'est-à-dire au moins jusqu'à ce que l'examen microscopique des expectorations soit négatif, ce qui peut dans certains cas prendre plusieurs mois. Le patient est placé dans une chambre seule, la chambre d'isolement doit être en pression négative, aérée régulièrement, exposée à la lumière du jour et aux UV ; la porte reste fermée et l'isolement est signalé sur la porte ; le patient porte un masque de soin pour les déplacements hors de sa chambre qui doivent être limités et les examens comportant un risque élevé d'exposition tels que les examens endoscopiques doivent être évités. De plus, les surfaces doivent être nettoyées et désinfectées avec un produit efficace sur le bacille tuberculeux (sols, parois, mobilier, objets...). Le matériel de soins, les instruments, les fibroscopes doivent être stérilisés.

L'isolement est instauré en cas de suspicion de tuberculose pulmonaire contagieuse, en cas de tuberculose active contagieuse, c'est-à-dire lorsque l'examen microscopique des crachats est positif ou lors de procédures à risque susceptibles de déclencher la toux et la production d'aérosols.

Les UV sont utilisés pour leur pouvoir germicide en complément de la ventilation des locaux mais leur effet est limité.

Les personnes au contact du patient doivent porter un masque de protection respiratoire pour minimiser les risques de contamination ; les gouttelettes formant l'aérosol vecteur de *Mycobacterium tuberculosis* ont une taille de 1 à 5 µm et le masque doit permettre de protéger

celui qui le porte. Des études ont montré qu'il n'y a pas de réaérosolisation possible des bactéries piégées dans le filtre du masque.

F. Législation de la tuberculose

La tuberculose est une maladie à déclaration obligatoire depuis 1964. Le critère de la DO est basé sur la présence d'une tuberculose maladie ayant conduit à la mise en route d'un traitement antituberculeux (au moins trois antituberculeux). En revanche, un cas de tuberculose infection, c'est-à-dire une primo-infection sans localisation patente ou un simple virage des tests tuberculiniques, ainsi que les infections à mycobactéries atypiques ne sont pas déclarés.

La découverte d'un cas de tuberculose est signalée à la DDASS qui transmet les informations au Conseil Général. Celui-ci est chargé des investigations autour d'un cas pour dépister d'éventuels cas secondaires et procède à la mise en place des mesures pour contrôler la transmission de la maladie.

Une fiche de notification est remplie à des fins épidémiologiques, l'objectif étant de suivre les tendances de la maladie et l'évolution des groupes dits « à risque ». Un fichier anonymisé est transmis de la DDASS à l'Institut National de Veille Sanitaire (InVS).

Depuis 2003, certaines données ont été ajoutées sur la fiche de déclaration telles que : sans domicile fixe, refus de traitement, diagnostic post-mortem, antibiogramme, cicatrice vaccinale pour les enfants ou encore profession à caractère sanitaire, afin de mieux connaître les caractéristiques des cas déclarés.

Médecin ou biologiste déclarant (tampon)	Si notification par un biologiste
Nom :	Nom du clinicien :
Hôpital/service	Hôpital/service
Adresse	Adresse
Téléphone	Téléphone
Télécopie	Télécopie
Signature	

Tuberculose

cerfa

12210*01

Important : cette maladie justifie une intervention urgente locale, nationale ou internationale. Vous devez la signaler par tout moyen approprié (téléphone, télécopie,...) au médecin inspecteur de la DDASS avant même confirmation par le CNR ou envoi de cette fiche.

Initiale du nom :	Prénom :	Sexe :	M	F	Date de naissance (jj/mm/aaaa) :	
					Date de la notification :	

Code postal du domicile du patient :	Nationalité :	
Pays de naissance :	si né(e) à l'étranger, année d'arrivée en France :	
Profession de caractère sanitaire ou social :	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Ne sait pas	si oui, précisez :
Résidence en collectivité :	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Ne sait pas	
Si oui, laquelle :	<input type="checkbox"/> Etablissement d'hébergement pour personnes âgées <input type="checkbox"/> Etablissement pénitentiaire	
	<input type="checkbox"/> Centre d'hébergement collectif (foyer social, de travailleur...) <input type="checkbox"/> Autre, précisez	
Sans domicile fixe :	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Ne sait pas	

Date de mise en route du traitement :	
si diagnostic post-mortem, date du décès :	
si refus de traitement, date du diagnostic :	

Antécédents			
Vaccination BCG chez les enfants < 15 ans :	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Ne sait pas		
Présence d'une cicatrice vaccinale :	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
Antécédents de tuberculose traitée par antibiotiques :	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Ne sait pas		
Si oui, année du dernier traitement :			

Tuberculose

Critères de notification : cochez une des cases

Tuberculose maladie

Cas confirmé : maladie due à une mycobactérie du complexe tuberculosus prouvée par la culture

Cas probable : 1) signes cliniques et/ou radiologiques compatibles avec une tuberculose, et 2) décision de traiter le patient avec un traitement antituberculeux standard.

Infection tuberculeuse (primo-infection) chez un enfant de moins de 15 ans : IDR à 10U positive sans signes cliniques ni para cliniques (induration > 15mm si BCG ou augmentation de 10mm par rapport à une IDR datant de moins de 2 ans) ou IDR phlyctériulaire.

Localisation(s) de la tuberculose (si plusieurs localisations, cocher toutes les cases correspondantes)			
<input type="checkbox"/> Pulmonaire	<input type="checkbox"/> Méningée	<input type="checkbox"/> Ganglionnaire hilare	<input type="checkbox"/> Ganglionnaire autre
<input type="checkbox"/> Pleurale	<input type="checkbox"/> Ostéo-articulaire	<input type="checkbox"/> Génito-urinaire	<input type="checkbox"/> Autre, précisez :

Traitement immunosuppresseur thérapeutique :	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	si oui, lequel (corticoïdes, anti-TNF,...) :
--	---	--

Bactériologie			
Prélèvements respiratoires :		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	préciser le type de prélèvement :
Examen microscopique (BAAR) :	<input type="checkbox"/> Positif <input type="checkbox"/> Négatif	<input type="checkbox"/> Inconnu	<input type="checkbox"/> crachat, <input type="checkbox"/> tubage, <input type="checkbox"/> aspiration bronchique
Culture :	<input type="checkbox"/> Positive <input type="checkbox"/> Négative	<input type="checkbox"/> En cours	<input type="checkbox"/> Non fait
Autre technique :	<input type="checkbox"/> Positive <input type="checkbox"/> Négative	<input type="checkbox"/> En cours	préciser :
Prélèvements d'autres origines :		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	préciser le type de prélèvement :
Examen microscopique (BAAR) :	<input type="checkbox"/> Positif <input type="checkbox"/> Négatif	<input type="checkbox"/> Inconnu	<input type="checkbox"/> Non fait
Culture :	<input type="checkbox"/> Positive <input type="checkbox"/> Négative	<input type="checkbox"/> En cours	<input type="checkbox"/> Non faite
Autre technique :	<input type="checkbox"/> Positive <input type="checkbox"/> Négative	<input type="checkbox"/> En cours	préciser :
Antibiogramme en début de traitement :			
Résistance à l'isoniazide :	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Inconnu	à la Rifampicine :	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Inconnu

Histologie			
Histologie évocatrice :	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> En cours <input type="checkbox"/> Non faite		

Dépistage dans l'entourage	
Dépistage réalisé :	<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
Demande d'intervention du Service de Lutte Anti-Tuberculeuse du Conseil Général :	
<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
Si oui : veuillez contacter ce service au numéro suivant :	

**2^{ème} partie : EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE
APPLIQUEE A LA TUBERCULOSE**

I. Rappels

A. Le génome de *Mycobacterium tuberculosis*

Le séquençage du génome de *Mycobacterium tuberculosis*, l'étude des différents gènes de la bactérie et notamment de la souche de référence H37Rv a débuté en 1992 dans le but d'améliorer la compréhension de la biologie de la bactérie et de favoriser la mise au point de nouveaux traitements et vaccins contre la tuberculose (25). En effet, malgré les médicaments existants et la vaccination par le BCG, la tuberculose demeure un problème majeur de santé publique.

Avec 4 411 529 paires de bases et 4 000 gènes, le génome de *Mycobacterium tuberculosis* est le deuxième génome bactérien par la taille séquencé après celui d'*Escherichia coli* (4 639 221 paires de bases). L'analyse du génome a mis en évidence des particularités de *Mycobacterium tuberculosis*: le génome a un contenu très important (65%) en régions riches en 2 bases seulement : Guanine G et Cytosine C. A la différence des autres bactéries, une très grande partie de ses capacités codantes est destinée à la production d'enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation de toutes sortes de lipides. En effet, le bacille tuberculeux pourrait certainement utiliser les lipides composant les membranes des cellules hôtes comme source d'énergie et de carbone. De plus, le bacille tuberculeux peut synthétiser tous les acides aminés essentiels, vitamines, cofacteurs d'enzymes... Il peut également grâce aux enzymes qu'il synthétise métaboliser des hydrates de carbone, des alcools, des cétones et des acides carboxyliques.

Le séquençage des gènes conservés comme celui de l'ARN 16S ou le gène hsp65, codant pour une protéine de choc thermique, révèle des régions très conservées pour l'ensemble du genre *Mycobacterium* et des régions de polymorphisme élevé.

Par ailleurs, cinquante gènes codant pour de l'ARN fonctionnel ont été découverts et le génome comporte 3924 cadres de lecture ouverts représentant environ 91% des capacités de codage.

Parmi les séquences d'insertion, seize copies d'IS6110 et six copies d'IS1081 ont été dénombrées pour la souche de référence H37Rv. La distribution de ces séquences n'est pas

aléatoire ; la plupart de ces séquences d'insertion sont situées au niveau de régions inter gènes ou de régions non codantes, souvent à proximité des gènes codant pour les ARNt.

De plus, au moins deux prophages ont été détectés lors du séquençage du génome et leur présence pourrait expliquer que *Mycobacterium tuberculosis* puisse survivre en culture et se multiplier.

Un résultat inattendu de l'étude des gènes a été la découverte de deux nouvelles familles de protéines (PE et PPE), sources potentielles de variations antigéniques, au sein d'une bactérie qui par ailleurs est génétiquement extrêmement homogène. Ces protéines semblent capables d'interférer avec la réponse immunitaire. Si une variabilité antigénique étendue ou une perturbation de la présentation de l'antigène sont confirmées par des études ultérieures, ces données seront essentielles pour la conception de vaccins, pour la compréhension des mécanismes immunitaires protecteurs et peut-être pour expliquer les réponses variées observées dans différents programmes de vaccination par le BCG.

Mycobacterium tuberculosis est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques, en grande partie parce que son enveloppe cellulaire agit comme une barrière. Mais le séquençage a clairement montré que le génome bactérien contient plusieurs déterminants potentiels de résistance (bêta-lactamases, acétyltransférases, pompes à efflux...) La connaissance de ces mécanismes supposés de résistance devrait permettre d'améliorer l'utilisation des médicaments existants et de faciliter la conception de nouveaux traitements.

La connaissance du génome peut permettre de mieux comprendre les caractéristiques biologiques particulières de *Mycobacterium tuberculosis*:

- la croissance lente de la bactérie contribue à la chronicité de la maladie et impose un traitement de longue durée

- la capacité de latence et de réactivation du bacille des dizaines d'années après l'infection est vraisemblablement programmée génétiquement.

Peu d'informations sont disponibles sur les bases moléculaires de la virulence mycobactérienne, malgré de nombreuses recherches. Avant que soit connu le génome, seuls trois facteurs de virulence avaient été décrits :

- le système catalase-peroxydase qui protège le bacille des radicaux oxygénés produits par les phagocytes.

- les gènes mce qui codent pour un facteur de colonisation des macrophages.

- le gène sigma factor sigA dont les mutations peuvent conduire à une résistance aux antituberculeux.

Depuis, toute une série de gènes codant pour des protéines ont été identifiés, notamment l'homologue d'un gène impliqué dans la survie intracellulaire de *Salmonella typhimurium*. Toutes ces données devraient accélérer l'étude de la pathogenèse de *Mycobacterium tuberculosis*.

En 2002, une équipe a séquencé et comparé le génome d'une autre souche de *Mycobacterium tuberculosis*, la souche CDC1551, par rapport à la souche H37Rv (38). Il s'agit d'une souche rencontrée en clinique et récemment impliquée dans des cas de tuberculose. Elle est connue pour être transmissible et virulente chez l'homme, tandis que la souche de référence est une souche de laboratoire. Les génomes des deux souches ont été comparés en terme de polymorphisme sur de larges séquences, supérieures à 10 paires de bases (LSP pour Large Sequence Polymorphism) et également de polymorphisme limité à un nucléotide (SNP pour Single Nucleotide Polymorphism). Cette étude a révélé de grandes variations d'un génome à l'autre : 74 LSP et plus de 1000 SNP. Ces différences constituent des marqueurs potentiels susceptibles d'être utilisés dans l'étude de la phylogénétique des bacilles tuberculeux. Par ailleurs, 4 copies de la séquence d'insertion IS6110, principal marqueur épidémiologique, ont été identifiées pour la souche CDC1551. Enfin, il est probable qu'une partie de ces séquences polymorphes code des gènes impliqués dans la pathogénicité et les interactions avec l'hôte.

B. Les techniques actuelles de typage moléculaire et leurs applications

L'analyse épidémiologique des cas de tuberculose a longtemps été basée sur leur description, l'appréciation de leur contagiosité et le dépistage de nouvelles infections dans l'entourage de cas déclarés, en particulier par des tests tuberculiniques.

Des méthodes d'étude complémentaires se sont développées : différents marqueurs phénotypiques ont été utilisés tels que les profils de résistance aux antituberculeux ou la lysotypie c'est-à-dire la sensibilité des souches à différents phages mais cette dernière méthode est laborieuse, peu discriminante et mal standardisée. Les inconvénients de ces techniques phénotypiques ont motivé la mise au point de plusieurs techniques génotypiques qui ont donné de meilleurs résultats (116,17).

L'analyse du génome de *Mycobacterium tuberculosis* a permis la mise au point de différentes techniques de typage moléculaire, celles-ci permettent de comparer les souches de *Mycobacterium tuberculosis*, elles sont plus ou moins rapides, simples d'exécution, et discriminantes. D'un point de vue de santé publique, l'objectif des analyses moléculaires est d'étudier les relations entre les différents cas de tuberculose, afin de mieux connaître la transmission de la maladie et d'identifier des facteurs de risque de transmission active non détectés par les méthodes épidémiologiques conventionnelles (51,16,33). Ces méthodes sont utilisées en complément des enquêtes épidémiologiques classiques qui conservent tout leur intérêt (32,34).

1. La technique IS6110-RFLP

La technique de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (de l'anglais Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) est basée la présence de séquences d'insertions IS6110.

1.1. La séquence d'insertion IS6110

Les séquences d'insertion IS sont des éléments transposables simples, très répandus chez les bactéries Gram négatif (Entérobactéries). Plusieurs copies de ces séquences sont intégrées dans le génome, chromosome ou plasmide. Leur taille varie entre 700 et 5700 paires de bases. Elles sont flanquées de 2 séquences inversées répétées plus ou moins parfaites (IR), indispensables pour la transposition, elles mêmes situées à côté de séquences Direct Repeat (DR) (71).

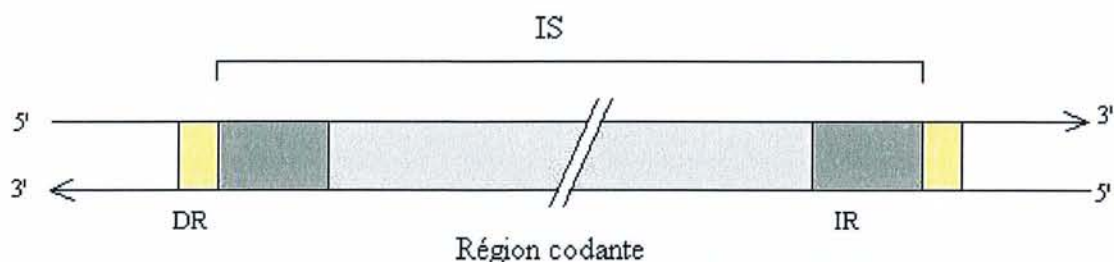


Figure 3: Séquence d'insertion

L'IS6110 est une séquence d'insertion spécifique des bacilles du complexe *Mycobacterium tuberculosis* et qui n'est pas retrouvée chez les autres mycobactéries (45). Il s'agit d'un élément de 1361 paires de bases, appartenant à la famille IS3, qui possède des extrémités inversées et deux phases ouvertes de lecture qui pourraient coder des transposases (110). L'intérêt de IS6110 comme outil de typage réside dans son polymorphisme de position et le nombre variable de copies d'une souche à l'autre. En effet, la distribution des séquences d'insertion n'est pas uniforme sur l'ensemble du génome et se concentre dans certains endroits appelés « points chauds » (72,55,43). Selon une hypothèse, l'ancêtre des bacilles de la tuberculose actuels ne possédait qu'une seule copie de IS6110 localisée dans la région DR et aurait évolué par transposition de proche en proche. Ainsi, les copies d'IS6110 sont en nombre et en localisations variables selon les souches. Il est important de noter que *Mycobacterium bovis* ne possède qu'une seule copie d'IS6110 en position connue, ce qui permet de différencier *Mycobacterium tuberculosis* de *Mycobacterium bovis* (117).

Bien que IS6110 soit un élément transposable, la fréquence de transposition est suffisamment faible pour permettre la stabilité des profils génomiques, critère indispensable pour l'utilisation de cette séquence à des fins épidémiologiques. En effet, des expériences ont été réalisées in vitro pour évaluer la stabilité des profils de restriction suite à des repiquages ou à des passages sur macrophages et elles se sont révélées concluantes. Chez des patients, des profils de souches isolées lors de rechutes ou dans des chaînes de transmission étaient généralement identiques ou ne présentaient que des variations d'une ou deux bandes, liées à des transpositions (121).

1.2. Principe de la RFLP

La technique de RFLP permet de révéler des marqueurs génétiques le long du génome. Cette technique appliquée aux bacilles tuberculeux permet pour chaque souche de mettre en évidence les séquences IS6110. Elle s'effectue en plusieurs étapes : après extraction de l'ADN bactérien, celui-ci est digéré par une enzyme de restriction qui a pour but de couper l'ADN en un site particulier. Chaque enzyme reconnaît spécifiquement une séquence d'ADN. C'est l'extrême spécificité de ces enzymes qui permet la mise en évidence du polymorphisme. La digestion d'ADN différents, par une même enzyme, produit des fragments de longueurs différentes et en nombres différents. Les fragments de restriction sont séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose. Ces fragments d'ADN sont ensuite transférés sous forme dénaturée sur une membrane de nitrocellulose, la position relative des fragments d'ADN est préservée durant le transfert. Les séquences correspondantes à l'IS6110 sont révélées par hybridation avec une sonde spécifique. Des profils électrophorétiques différents seront ainsi observés chaque fois que des sites de restriction différeront dans la zone reconnue par la sonde.

1.3. IS6110-RFLP

L'IS6110-RFLP consiste à déterminer le nombre et la taille donc la position des fragments de restriction obtenus à partir de l'ADN chromosomique des souches de *Mycobacterium tuberculosis* (60). Elle utilise une enzyme de restriction qui clive le génome au niveau des séquences IS6110 et permet donc d'étudier la distribution de cette séquence au sein du génome (83,97).

De nombreuses et larges études épidémiologiques menées dans le monde avec cette technique permettent d'en évaluer les performances. La stabilité des profils génomiques, critère indispensables pour un bon outil épidémiologique, a ainsi été démontrée. Cependant, la limite au polymorphisme de position de l'IS6110 a été confirmée par la mise en évidence de patients sans lien épidémiologique porteurs de souches à profils identiques et par la description de souches à faible nombre de copies (127,109,124,125).

La RFLP basée sur l'IS6110 est la technique la plus discriminante et elle est actuellement la méthode de référence, standardisée par Van Embden (114). Cependant, la lourdeur de cette technique peut constituer un obstacle à sa mise en place ; il s'agit d'une technique longue, sans amplification et nécessitant de nombreuses étapes, ce qui a conduit au développement

d'autres méthodes plus rapides (53,76) basées sur la PCR (82,128,100), utilisées surtout pour un dépistage, comme tests de screening (99). Il existe également d'autres techniques de RFLP dont les cibles sont des éléments répétitifs de l'ADN différents de l' IS6110 (92,63,108,88).

2. Spoligotyping : Spacer Oligotyping

Cette méthode de typage rapide repose sur la détection du polymorphisme des séquences situées entre les éléments répétés identiques de la région DR (Direct Repeat). Cette région DR est une région unique qui contient des répétitions directes de 36 paires de bases séparées par des séquences variables de 35 à 41 paires de bases (49). Elle n'est présente que chez les mycobactéries tuberculeuses (46). Ces séquences inter-DR varient d'une souche à l'autre par leur longueur, leur séquence et leur nombre. La technique consiste à amplifier la région DR puis à l'hybrider à une membrane sur laquelle sont fixées de façon covalente les 43 séquences inter-DR les plus fréquents. Le spoligotyping est une technique facile, rapide et comprend une amplification, cette technique ne nécessite donc pas une culture abondante, contrairement à la RFLP (35,48). De plus, elle est reproductible et la membrane peut être réutilisée. En revanche, certaines séquences peuvent manquer et perturber la phase de révélation. Par ailleurs, le résultat obtenu n'est pas toujours de très bonne qualité et dépend des conditions techniques (lavages, témoin à vérifier, région mal amplifiée, phase de révélation tributaire du fabricant...). Le spoligotyping a un pouvoir discriminant plus élevé que la RFLP IS6110 pour les souches à faible nombre de copies de IS6110 (87), mais la méthode de référence RFLP IS6110 est plus performante pour les souches à plus de 5 copies, ce qui représente la majorité des cas (128).

Le pouvoir discriminant trop faible du spoligotyping qui regroupe des cas non liés entre eux en fait plutôt une technique de screening, complétée ensuite par une RFLP dès lors que les spoligotypes sont identiques (46) ou éventuellement par une autre technique (101).

3. MIRU-VNTR

Les MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat) constituent un puissant outil épidémiologique. Ces séquences hypervariables de 10 à 100 paires de bases sont souvent trouvées en répllication en tandem et dispersées dans des régions intergéniques du génome de *Mycobacterium tuberculosis* (61). L'étude du génome de

la souche de référence H37Rv a mis en évidence 41 loci MIRU et 12 ont été retenus pour la réalisation de la technique mais parmi ces 12 loci, tous n'ont pas le même pouvoir discriminant. Le polymorphisme porte à la fois sur le nombre de copies et sur les séquences. Les séquences MIRU sont parfaitement stables dans les conditions de culture habituelles (94).

Cette méthode génotypique est basée sur l'amplification par PCR des éléments flanquants des MIRU. La technique consiste en une amplification par PCR multiplex des loci suivie d'une analyse des amplicons par séquençage (105,106).

Cette technique, grâce à la PCR, ne nécessite pas une grande quantité de colonies mais utilise un thermocycleur. Elle est par ailleurs rapide, reproductible et permet d'identifier rapidement des contaminations de laboratoire (42). Il s'agit d'un système discriminant, adéquat pour l'analyse des liens épidémiologiques sur une période d'au moins 5 ans. Par ailleurs, c'est une méthode simple, peu coûteuse ; elle permet de comparer des profils de différents pays grâce à la création d'une banque de données internationales sur le web. Elle possède un pouvoir discriminant proche de celui de la RFLP *IS6110* (52,103,62), d'autant plus que le nombre de copies d'*IS6110* est faible (7), mais toutes les publications préconisent l'emploi simultané de plusieurs méthodes pour obtenir une spécificité maximale (26,65). Une étude portant sur le groupe Beijing a été réalisée par la technique MIRU-VNTR : ce groupe serait responsable de 25% des cas de tuberculose et il est fréquemment associé à des résistances aux antituberculeux, d'où l'intérêt de son étude (112). De nombreuses méthodes ne permettent pas de typer cette souche. La technique MIRU le permet mais certains loci ont un pouvoir discriminant médiocre et un certain nombre de souches ayant le même profil MIRU ont des profils différents par *IS6110*-RFLP (62) ; cette dernière technique est la plus performante pour comprendre l'épidémiologie des sous-types (74).

Par contre, la stratégie MIRU a porté sur 6 puis 12 loci et des liens épidémiologiques récents établis ont ensuite été infirmés (94). La confirmation par RFLP montre que si le lien épidémiologique est également trouvé en RFLP le pouvoir discriminant de la technique est de 99,9 % ; si les profils RFLP sont différents, il s'agit de liens anciens (7).

4. Autres méthodes

- Les séquences PGRS (Polymorphic GC Rich Repetitive Sequence) sont de longueur et de séquence variables, représentées en 30 copies, qui présentent une homologie de 70% entre elles. Il s'agit d'un outil épidémiologique intéressant mais dont le pouvoir discriminant est inférieur à celui de la RFLP, cette technique peut être utilisée comme complément d'une autre méthode de typage (110)
- La DRE PCR (Double Repetitive Element PCR) est une technique qui utilise une amorce correspondant à IS6110 et une correspondant à PGRS (75). Cette technique n'est pas suffisamment discriminante à elle seule, elle peut-être utilisée en complément d'une autre technique rapide telle que le spoligotyping. (100), permettant d'obtenir de bons résultats, de façon plus précoce que la RFLP. Cependant certaines souches ne parviennent pas à être typées et doivent être étudiées par la méthode de référence.
- La méthode de LM PCR (ligation-mediated PCR) consiste à amplifier les séquences comprises entre IS6110 et un site de restriction (85). Elle est comparable au spoligotyping en termes de faisabilité et de production d'images pour une base de données. La LM PCR groupe un peu moins de souches que le spoligotyping et possède donc un pouvoir discriminant supérieur (12). Elle peut être utilisée comme test de screening et est notamment utile pour typer les souches qui possèdent peu de copies d'IS6110. Mais dans tous les cas, la RFLP qui est plus discriminante sera effectuée après.
- L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE pour Pulsed Field Gel Electrophoresis) est une technique discriminante, utilisée pour l'étude des mycobactéries atypiques (56), notamment *Mycobacterium avium* (30), *Mycobacterium abscessus* (130), *Mycobacterium mageritense* (44). Elle est également utile à l'étude de souches de *Mycobacterium bovis* (37) En revanche, peu d'études concernent l'électrophorèse en champ pulsé et *Mycobacterium tuberculosis* (129); les protocoles qui existaient étaient complexes, difficiles à reproduire, le manque d'une technique standardisée a limité son utilisation. En 1999, Singh *et al* (97) ont publié une technique reproductible consistant à utiliser 4 enzymes et ils l'ont comparée à l'IS6110-RFLP. La PFGE est

une discriminante, permettant d'étudier une grande partie des souches, elle est plus performante que la RFLP pour les souches possédant moins de 5 copies d'IS6110 ; au-delà de 5 copies, la RFLP donne de meilleurs résultats et la PFGE a tendance à regrouper des cas non apparentés.

- La FAFLP (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism) correspond au polymorphisme de longueur des fragments amplifiés sous sa forme fluorescente. Cette réaction basée sur une PCR comprend une digestion de l'ADN par une combinaison d'enzymes de restriction suivie d'une amplification sélective. Les fragments sont visualisés sur un gel à l'aide de marqueurs fluorescents (91,2). Cette technique est précise, reproductible, plus performante que l'IS6110-RFLP pour les souches qui n'en possèdent qu'une copie mais moins discriminante si le nombre de copies d'IS6110 augmente (47).

5. Applications du typage moléculaire (122,121,120)

Elles sont nombreuses et permettent notamment d'établir le tracé d'épidémies (102,11) et d'étudier la transmission de la tuberculose (113) dans des communautés fermées, la famille, l'environnement proche ou dans la population générale, de distinguer réinfection et rechute lorsque des souches de bacilles tuberculeux sont successivement isolées chez un même malade faisant plusieurs épisodes de tuberculose (31), de déterminer la nature nosocomiale d'une épidémie (54) liée notamment à l'utilisation de matériel tel qu'un endoscope, d'identifier des contaminations de laboratoire (8,95), d'étudier les liens phylogéniques entre les souches (92)... Ces techniques de typage moléculaire contribuent à améliorer la compréhension de la tuberculose et de sa transmission (79). Elles permettent également de suivre l'évolution des cas de tuberculoses résistantes aux antibiotiques (86).

Ces méthodes d'épidémiologie moléculaire sont devenues les compléments indispensables des enquêtes épidémiologiques classiques (50) et occupent une place essentielle dans la lutte contre la tuberculose (73).

Toutes ces techniques permettent de disposer de bases de données et ainsi de comparer des souches isolées dans le monde entier.

6. Choix de la technique

En 1993, Van Soolingen *et al.* ont comparé différents marqueurs génomiques permettant l'étude des souches de *Mycobacterium tuberculosis* (119) : IS6110, IS1081, PGRS et DR. L'IS1081 possède un pouvoir discriminant plus faible que DR et PGRS, IS6110 est le marqueur le plus performant.

En 1999, Kremer *et al.* ont comparé différentes techniques de typage moléculaire, ils ont évalué leur reproductibilité, leur pouvoir discriminant et leur spécificité (63). Huit techniques de RFLP avec différentes cibles ainsi que 7 techniques basées sur une PCR ont été testées. Toutes les techniques utilisant la RFLP se sont avérées hautement reproductibles. Parmi les techniques PCR, la plus reproductible est la LM PCR, suivie des MIRU-VNTR et du spoligotyping. En revanche, la DRE PCR, l'IS6110-inverse PCR, l'IS6110-Amplprinting et l'APPCR (Arbitrarily Primed PCR) sont peu reproductibles. Un classement a été établi selon les performances de la technique et place l'IS-6110 RFLP en première position, suivie de la LM PCR, de l'APPCR, de la RFLP-PGRS, de la DRE-PCR du spoligotyping et des VNTR. Les méthodes de choix sont l'IS6110-RFLP et la LM PCR.

Bifani *et al.* ont testé différentes techniques destinées à permettre de reconnaître les variants de la souche de référence de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra, afin d'identifier cette souche et de mettre en évidence des cas de contaminations de laboratoire (10). L' IS6110-RFLP est alors la méthode la plus discriminante.

Ces techniques fournissent de nombreux renseignements mais ne révèlent pas de profils caractéristiques pour les souches résistantes aux antibiotiques (1) ; des études concernant de nouveaux marqueurs sont en cours. Par ailleurs, concernant la résistance aux antituberculeux, une étude menée par Alito *et al.* consistait à étudier des souches MDR (Multi Drug Resistant) par IS6110-RFLP : pour environ 1/3 de ces souches, l'évolution des profils RFLP s'est avérée trop rapide pour pouvoir interpréter les résultats du typage sur une période de plusieurs années (4). Hormis ces cas, les profils obtenus par IS6110-RFLP sont stables et permettent des comparaisons entre les souches (115,119,80,81,123).

IS6110-RFLP, spoligotyping et MIRU-VNTR sont les 3 méthodes de typage les plus utilisées (111,78). En 2005, Scott *et al.* ont déterminé la sensibilité et la spécificité de ces deux

dernières techniques (96). En effet, le développement de techniques rapides offre de nouvelles perspectives, mais l'utilité de ces méthodes dépend de leur capacité à classer les souches de façon appropriée. La sensibilité de la technique est définie par le pourcentage de souches RFLP identiques qui ont des spoligotypes ou des profils MIRU identiques. La spécificité est définie par le pourcentage de souches avec un profil RFLP unique qui ont des profils uniques en spoligotyping ou MIRU. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau I.

	Spoligotyping	MIRU-VNTR
Sensibilité	83%	52%
Spécificité	40%	56%

Tableau I : Sensibilité et spécificité des techniques de spoligotyping et MIRU-VNTR

Les résultats de cette étude indiquent que ces 2 techniques rapides sont insuffisantes si elles sont utilisées seules. Elles constituent de bons tests de screening mais sont ensuite complétées par une IS6110-RFLP.

La technique RFLP basée sur l'IS6110 étant la méthode de référence et par ailleurs la technique la plus discriminante, standardisée, nous avons décidé de la mettre en place au laboratoire.

II. Travail expérimental : Application de l'IS6110- RFLP au laboratoire

Nous avons choisi d'appliquer la technique d'IS6110-RFLP au laboratoire afin de pouvoir typer les souches isolées au laboratoire et de les comparer. L'objectif de ce typage moléculaire est de mieux comprendre les chaînes de transmission de la tuberculose et les liens qui unissent certains cas.

A. Matériels et Méthodes

1. Souches bactériennes étudiées

Trente-cinq souches de *Mycobacterium tuberculosis* d'origine clinique, isolées au laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy, et la souche de référence Mt14323 ont été étudiées, elles sont répertoriées dans le tableau D ci-dessous.

La souche Mt14323 est une souche de référence de *Mycobacterium tuberculosis* car elle possède un nombre important de copies d'IS6110, élément capital de notre technique.

Numéro de la souche	Patients	Nature du prélèvement
1	RP	Expectoration
2	SJ	Expectoration
3	KC	Expectoration
4	JN	Expectoration
5	GK	Expectoration
6	HE	Expectoration
7	VJM	Expectoration
8	MG	Expectoration
9	LF	Expectoration
10	BP	Expectoration
11	LM	Expectoration
12	MA	Expectoration
13	MM 2000	Expectoration
14	MM 2002	Expectoration
15	JB	Expectoration
16	JC	Expectoration
17	JM	Expectoration
18	JMC	Expectoration
19	SH	Expectoration
20	SA	Expectoration
21	BJ	Expectoration
22	BY	Expectoration
23	Mt14323	Souche de référence
24	RY	Expectoration
25	ML	Expectoration
26	ML	Biopsie (Absès)
27	CN 2003	Expectoration
28	CN 2004	Expectoration
29	BB 2002	Expectoration
30	BB 2003	Expectoration
31	BT	Expectoration
32	MO	Expectoration
33	RA	Urine
34	RA	Expectoration
35	LJ	Expectoration
36	KK	Expectoration

Tableau D: Souches étudiées et nature des prélèvements

2. Matériels

▪ Dans la pièce P3 :

- PSM : Poste de Sécurité Microbiologique
- Bain-marie 80°C
- Etuve 37°C
- Micropipettes et embouts stériles munis de filtres
- Vortex

▪ Autres pièces :

- Balance
- Bain-marie (37 et 65°C)
- Centrifugeuse 12000 tours/min
- Vortex
- Evaporateur Speed Vac
- Générateur et cuve pour électrophorèse
 - Petit format pour les électrophorèses de contrôle
 - Grand format pour la migration avant transfert
- Rampe UV
- Appareil photo
- Agitateur
- Four à hybridation GFL 7061
- Thermocycleur Perkin Elmer 2400
- Plaque chauffante
- Hypercassette Kodak
- Micropipettes et embouts stériles munis de filtres
- Feuilles Whatman 3MM
- Membrane Hybond-N+
- Films Kodak Biomax MR Film
- Kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN)

3. Réactifs

➤ TE 10 :1

Solutions mères : TRIS HCl (pH 8) 0,5 M

EDTA (pH 8) 0,5 M

TE 10 :1 TRIS 2 mL

EDTA 200 µL

H₂O qsp 100 mL

Autoclaver

➤ SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate)

2,5 g SDS

H₂O distillée qsp 25 mL

Chauffer à 37°C pour solubiliser.

Ne pas autoclaver.

➤ NaCl 5M

29,22 g NaCl

H₂O qsp 100 mL

Autoclaver

➤ CTAB/NaCl (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)

1,025 g NaCl

2,5 g CTAB

H₂O qsp 25 mL

Dissoudre à 65°C. Ajuster le volume à 25 mL avec H₂O tant que la solution est encore chaude.

Ne pas autoclaver.

➤ Ethanol à 70°

100 mL Ethanol 95°

39,18 mL H₂O

➤ TBE 10X

108 g TRIS Base

55 g Acide Borique

40 mL EDTA 0,5 M (pH 8)

H₂O qsp 1 L

Autoclaver

➤ Lysozyme (Sigma)

Conservation à -20°C.

Préparation extemporanée.

20 mg Lysozyme

1 mL H₂O

➤ Protéinase K

10 mg Protéinase K (Boehringer)

H₂O qsp 1 mL

Aliquoter et congeler.

➤ Chloroforme/ Alcool isoamylique 24V/1V (Normapur)

➤ Isopropanol (Sigma)

➤ 20 SSC (Sodium Saline Citrate)

175,3 g NaCl

88,2 g Citrate de Sodium

H₂O qsp 800 mL

Ajuster à pH 7

Compléter avec H₂O qsp 1 L

Autoclaver

➤ Solution de dépurination : HCl 0,25M

86,2 ml HCl 37%

H₂O qsp 1 L

➤ Solution de dénaturation

175,3 g NaCl

40 g NaOH

H₂O qsp 2 L

➤ Solution de neutralisation

175,3 g NaCl

242,2 g TRIS

110 mL HCl 37% fumant

H₂O qsp 2 L

Ajuster à pH 8

➤ Tampon d'hybridation

14,61 g NaCl

25 g Blocking Reagent (kit)

500 mL tampon (kit)

Dissoudre le NaCl dans le tampon, chauffer à 60-65°C et ajouter petit à petit le réactif bloquant pour bien le dissoudre. Aliquoter et conserver à -20°C.

➤ Solution de lavage

360 g Urée

4 g SDS ou 40 mL SDS 10%

25 mL 20SSC

H₂O qsp 1 L

➤ Agarose

➤ Solution de Bleu de Bromophénol

➤ Témoin de poids moléculaire Promega DNA Ladder 100-1500 pb

➤ Bromure d'ethidium BET

Cet agent intercalant est mutagène et nécessite le port de 2 paires de gants pour sa manipulation. Il se conserve à l'abri de la lumière.

➤ Enzyme PvuII et son tampon (Invitrogen)

➤ Taq polymérase et son tampon

➤ kit ECL Amersham : Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System

DNA Labelling Reagent

Glutaraldehyde

Detection Reagent 1 (H₂O₂)

Detection Reagent 2 (Luminol)

➤ Révélateur Kodak Cmax

Diluer au ¼ avant utilisation

➤ Fixateur Kodak CMax

Diluer au ¼ avant utilisation

4. Mode opératoire

4.1. *Extraction et quantification de l'ADN*

4.1.1. *Principe*

Lyse bactérienne

L'ADN génomique des mycobactéries est obtenu par lyse bactérienne, sous l'action de la chaleur, à partir d'une culture jeune et abondante obtenue sur milieu de Loewenstein- Jensen.

La lyse bactérienne est facilitée par l'action du lysozyme qui hydrolyse le mucopeptide, couche rigide de la paroi assurant la protection osmotique de la cellule.

La dissociation des protéines est obtenue en utilisant un détergent comme le SDS qui permet de dénouer les chaînes protéiques et/ou en faisant agir une protéase comme la protéinase K qui est active jusqu'à 65°C même en présence de SDS.

L'ajout de NaCl permet d'éliminer des protéines par précipitation à concentration ionique importante.

Le CTAB permet d'éliminer par complexation les débris cellulaires, les protéines dénaturées et certains polysaccharides, tout en maintenant les acides nucléiques en solution.

Extraction de l'ADN (66)

L'élimination des protéines et des lipides est réalisée par extraction sélective au chloroforme qui dénature les protéines. Le chloroforme est non miscible à l'eau et a une densité supérieure à l'eau. L'alcool isoamylique est un agent antimousse qui stabilise la séparation des phases. Le mélange chloroforme / alcool isoamylique est ajouté au lysat bactérien. Les acides nucléiques ne sont pas solubles dans le chloroforme et après agitation, l'ADN est extrait et se trouve exclusivement dans la phase aqueuse supérieure.

La précipitation de l'ADN est effectuée par l'isopropanol, le froid (-20° C) permet d'accélérer cette précipitation. A ce stade il est possible d'observer le filament d'ADN.

Purification de l'ADN

L'ADN précipité peut être purifié par lavage par de l'éthanol à 95° qui permet l'élimination des sels.

Quantification de l'ADN

Une quantification de l'ADN est nécessaire.

La méthode de choix est l'absorptiométrie UV. La mesure s'effectue à 260 nm, longueur d'onde spécifique d'absorption. Une unité d'absorbance correspond à 50 µg/mL. La concentration en ADN est calculée selon la relation : $[\text{ADN}] \text{ en } \mu\text{g/mL} = A_{260 \text{ nm}} \times 50 \times \text{facteur de dilution}$. La présence de protéines peut conduire à une erreur par excès. L'absorbance à 320 nm peut être soustraite de l'absorbance à 260 nm ce qui permet d'éliminer en partie l'erreur due aux contaminants. Cette méthode a l'inconvénient d'être peu sensible aussi pour les concentrations < 250 ng/mL.

Une autre méthode consiste à évaluer la concentration d'ADN par fluorescence en présence de bromure d'ethidium (BET). La fluorescence d'un spot ou d'une bande d'ADN en présence de BET émise lors d'une exposition aux UV peut être imprimée sur une image photographique. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la masse d'ADN dans le dépôt, par unité de masse la quantité de BET incorporé est identique. Le principe est de comparer après photographie des bandes sur gel, l'intensité de la lumière émise par l'ADN. Cette méthode est relativement sensible, elle permet de détecter moins de 5 ng d'ADN.

L'ADN purifié peut-être conservé à +4°C. Pour une conservation longue il est nécessaire de procéder à la congélation ; cependant, les congélations et décongélations qui favorisent les cassures des ADN longs sont à proscrire.

4.1.2. Protocole

Lyse bactérienne

La première étape, consistant à manipuler les souches encore virulentes, se pratique dans un local de type P3 (9). Les colonies prélevées à l'öse sur un milieu de Loewenstein-Jensen sont mises en suspension dans 500 µL de tampon TE 10 :1 puis placées 30 minutes au bain-marie à 80°C afin de détruire les bactéries par la chaleur.

Après retour à température ambiante, on ajoute 50 µl d'une solution de lysozyme à 20 mg/mL et on laisse incuber les tubes après les avoir agités 1 heure à 37°C.

A partir de ce stade, les bactéries sont lysées et ne présentent plus le même risque infectieux. Une culture du lysat sur milieu de Loewenstein-Jensen a permis de vérifier l'absence de bacille viable.

La suite des manipulations est donc réalisée dans un laboratoire extérieur au P3. On ajoute alors 70 µL de SDS 10% et 5µL de Protéinase K 10 mg/mL dans chaque tube. L'ensemble est vortexé et incubé au bain-marie 10 minutes à 65°C. Puis 100 µL de NaCl 5M et 100 µL de CTAB préchauffé à 65°C sont ajoutés, les tubes sont vortexés jusqu'à ce que le mélange devienne laiteux puis ils sont placés 10 minutes au bain-marie à 65°C.

Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est alors réalisée par addition de 750 µL d'un mélange Chloroforme/ Alcool isoamylique 24V/1V préalablement incubé dans un bécher ayant séjourné au congélateur.

Les tubes sont vortexés pendant 1 minute puis centrifugés 10 minutes à 12 000 tours/min et le surnageant aqueux est récupéré. L'ADN contenu dans cette dernière phase est alors précipité avec 500 µL d'isopropanol et maintenu à -20°C pendant 30 minutes minimum.

C'est à ce moment que l'on observe le filament d'ADN se constituer progressivement, par retournements successifs du tube. (Photo 1)



Photo 1 : Filament d'ADN obtenu après extraction et précipitation

Purification de l'ADN

L'ADN extrait est ensuite purifié : après centrifugation 15 minutes à 12000 tours/min, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 1 mL d'éthanol à 95° conservé à -20°C.

Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 12000 tours/minute, le surnageant est éliminé et le culot est séché grâce à un évaporateur, sous une lampe ou à l'air libre.

Ce culot est repris dans du tampon TE 10 :1 dont le volume varie selon la quantité d'ADN, en général 50 µL ; l'ADN se trouve dissous dans ce tampon.

Sous cette forme, l'ADN peut être conservé pendant un an à -20°C.

Quantification de l'ADN

Dans un premier temps, nous avons réalisé une quantification de l'ADN par spectrophotométrie UV sur le spectrophotomètre Pharmacia Gene Quant II ; différentes dilutions d'un même échantillon ont été utilisées ; l'objectif était d'effectuer une sorte d'étalonnage permettant par la suite d'évaluer l'intensité des spots et donc la quantité d'ADN à l'œil. Nous avons dosé l'ADN extrait d'une souche et avons obtenu une concentration de 200µg/mL.

En pratique, l'habitude nous a permis d'évaluer la quantité d'ADN simplement en visualisant l'intensité des spots sur le gel d'électrophorèse ; cette précision s'est avérée suffisante pour la suite des manipulations.

En effet, le dosage par spectrophotométrie est une technique plus précise mais qui consomme une quantité non négligeable d'échantillon (75 μ L) et notre technique requiert elle aussi une quantité importante d'ADN.

Pratiquement 4 μ l de la solution d'ADN sont additionnés d'une goutte de bleu de bromophénol et déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 1%, la migration se déroule ensuite pendant 1 heure à 100 V.

La quantité d'ADN extrait est estimée de façon semi quantitative par observation de l'intensité des spots obtenus, sous une lampe à UV.

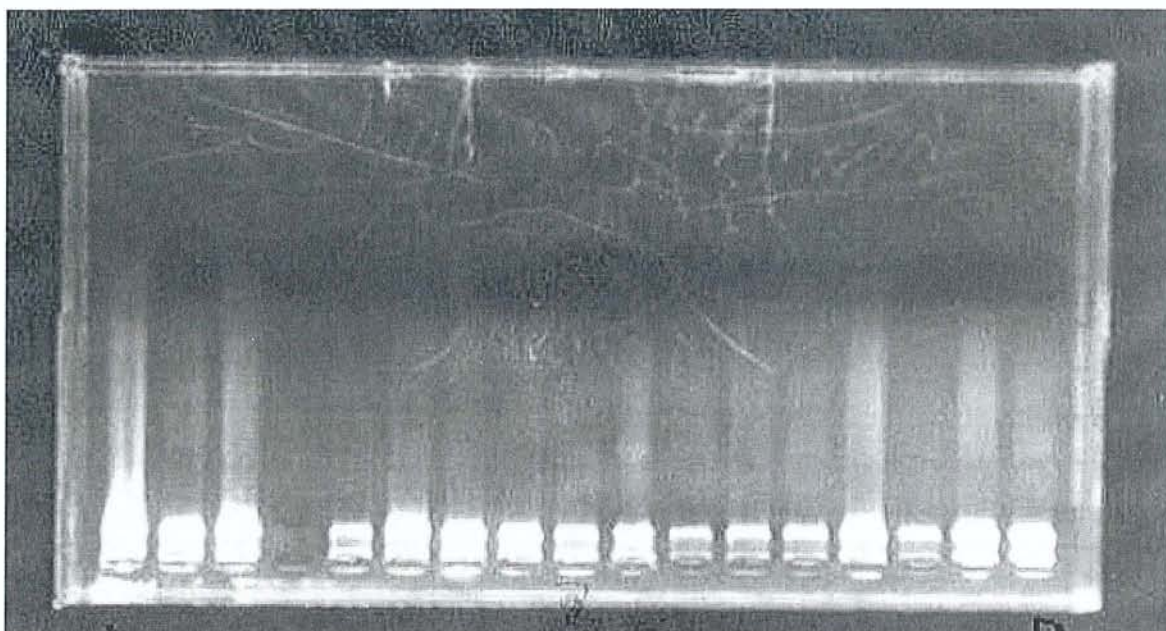


Photo 2 : Electrophorèse de contrôle de l'extraction

4.1.3. Remarques

Il est conseillé de préchauffer le mélange CTAB/NaCl au bain-marie à 65°C afin de le rendre moins visqueux et de faciliter le pipetage.

Concernant la quantification de l'ADN, le BET ne doit pas être incorporé à l'agarose tant que la température n'est pas inférieure à 65°C, et le gel ne doit comporter aucune bulle.

4.2. Digestion de l'ADN

4.2.1. Principe

Les enzymes de restrictions sont des endonucléases qui se lient spécifiquement à une courte séquence (4 ou 6 nucléotides) : le site de restriction. Elles catalysent une coupure double brin par hydrolyse d'une liaison phosphodiester spécifique au niveau du site de restriction. Dans le cas des bacilles tuberculeux, l'endonucléase *PvuII* produite par *Proteus vulgaris* clive le génome au niveau de séquences de reconnaissance : CAG / CTG

GTC / GAC

L'IS6110 comprend un site de coupure pour *PvuII* (118). Les sites de restriction sont souvent de type palindrome, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Lorsque l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait au centre de symétrie du palindrome toutes les paires de nucléotides restent appariées : les fragments qui en résultent sont dits « à bouts francs ».

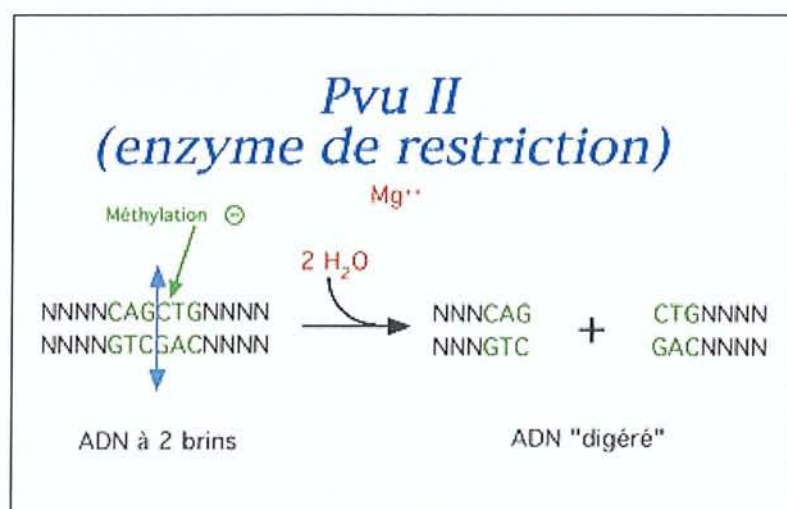


Figure 4: Hydrolyse par *PvuII*.

Pour obtenir une hydrolyse maximale certaines conditions techniques doivent être respectées. La quantité d'enzyme à utiliser doit être évaluée en fonction de la masse d'ADN à digérer. Une unité d'enzyme de restriction est la quantité théorique d'enzyme capable d'hydrolyser

complètement 1 µg d'ADN en une heure dans des conditions définies de salinité, de pH et de température, dans un volume de 50 µL. En pratique il est recommandé de tester chaque préparation enzymatique avec sa propre préparation d'ADN. On travaille toujours en excès d'enzyme et le rapport 2 à 5 U/µg d'ADN est couramment utilisé.

L'enzyme est fournie avec son propre tampon d'hydrolyse (concentré 10X), dilué au 1/10 il permet d'obtenir les conditions de salinité et pH optimales pour la réaction.

Les enzymes de restriction sont des produits fragiles qui doivent être manipulées avec attention. Conservées au congélateur à -20° C dans un tampon contenant 50% de glycérol, elles ne doivent être sorties du congélateur qu'au dernier moment, placées dans la glace et replacées au congélateur immédiatement après usage. Le prélèvement doit être fait avec des embouts neufs et stériles ; à chaque prélèvement changer d'embout.

La digestion s'effectue pendant une durée déterminée à la température optimale de l'enzyme.

Le contrôle de la digestion est effectué en pratiquant une électrophorèse en gel d'agarose. Celle-ci permet de visualiser les fragments d'ADN obtenus par hydrolyse. En cas de bonne digestion, les différents fragments d'ADN forment une bande, à l'inverse si la digestion n'a pas été complète l'ADN non fragmenté ne migre pas.

Une digestion incomplète ou nulle peut s'expliquer par un manque d'enzyme soit par concentration inadaptée soit par dégradation lors de la conservation.

Des mauvaises conditions d'extraction d'ADN peuvent également empêcher la digestion enzymatique. Le plus souvent il s'agit d'un excès de sel ; dans ce cas on réalise une dialyse sur filtre 0,45 µM. La totalité de l'échantillon est déposée sur le filtre mise à la surface d'une boîte de Pétri remplie d'eau distillée stérile. Après ¼ d'heure de contact on récupère l'ADN dialysé et on procède à une nouvelle digestion.

L'électrophorèse permet également d'évaluer les concentrations en ADN. Selon l'intensité des bandes, il est alors possible d'évaluer les dilutions à effectuer afin d'obtenir des quantités comparables d'ADN d'une souche à l'autre. Il est important d'avoir une concentration d'ADN à peu près égale dans chaque bande, une différence trop importante perturbe la phase de révélation.

4.2.2. Protocole

	Volume par tube (μL)
Eau pour biologie moléculaire	39
Tampon de l'enzyme	6
Enzyme PvuII 10 U/μL	3
ADN (200μg/mL)	12

Tableau E : Mode opératoire de la digestion d'ADN

Volume réactionnel : 60 μL

Les tubes sont incubés une nuit au bain-marie à 37°C pour optimiser l'action de PvuII, en présence du tampon approprié. Nous nous situons dans un rapport de 5 U d'enzyme pour 1 μg d'ADN environ, ce qui correspond aux données de la littérature (63).

On réalise ensuite une électrophorèse de contrôle en gel d'agarose. Celle-ci permet de visualiser les fragments d'ADN digéré. Selon l'intensité des bandes, il est alors possible d'évaluer les dilutions à effectuer afin d'obtenir des quantités comparables d'ADN d'une souche à l'autre.

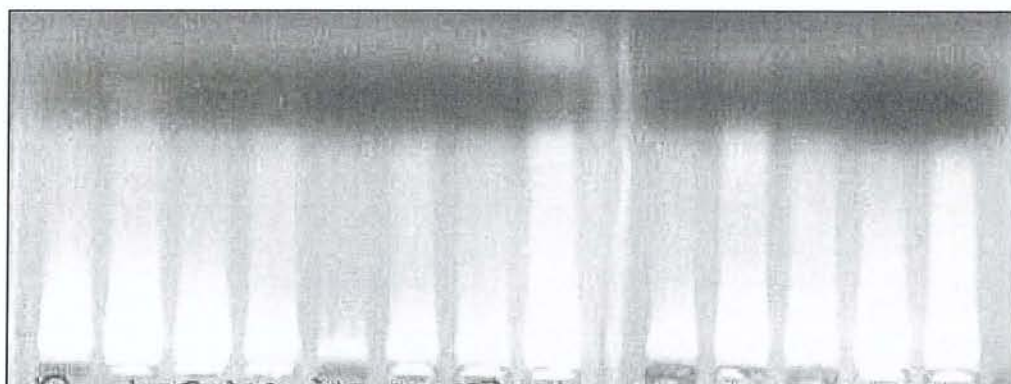


Photo 3 : Electrophorèse de contrôle de la digestion

4.2.3. Remarques

Le volume de l'enzyme de restriction ne doit pas excéder 10% du volume final, sinon le glycérol contenu dans le tampon perturbe la digestion. On choisit donc toujours l'enzyme la plus concentrée possible.

4.3. Séparation des fragments d'ADN

4.3.1. Principe

Les fragments d'ADN produits par l'hydrolyse enzymatique sont séparés et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. La migration des molécules d'ADN est inversement proportionnelle au log du nombre de paire de bases. Le pouvoir de séparation des ADN sur le gel d'agarose est plus important si le voltage est plus faible. Pour obtenir une séparation optimale il est préférable de procéder à une électrophorèse toute la nuit à un voltage faible 0,8V/cm.

L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaires permet une estimation précise de la taille des fragments de restriction.

4.3.2. Protocole

Vingt microlitres d'ADN digéré sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 1%. La migration s'effectue à 100 V pendant 15 minutes afin de faire sortir l'ADN des puits puis à 40 V pendant 24 heures environ. La souche de référence sert de souche témoin lorsqu'on veut comparer différents gels entre eux. Une fois l'électrophorèse terminée, une photographie est réalisée afin de visualiser les fragments séparés.

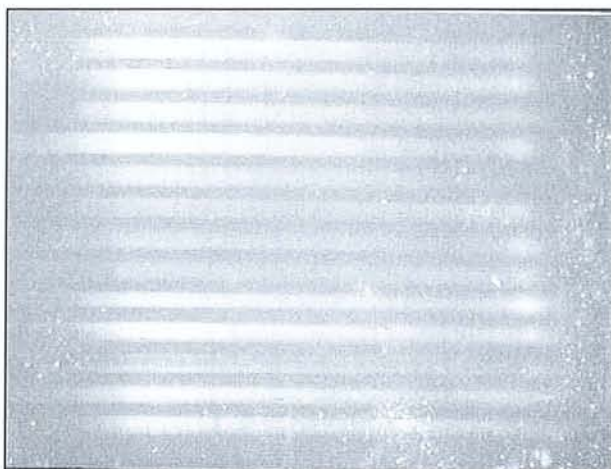


Photo 4 : Electrophorèse des fragments d'ADN digérés

Le gel est alors exposé 5 minutes aux UV afin de faciliter le transfert ultérieur des fragments de haut poids moléculaire.

4.4. Transfert par Southern Blot

4.4.1. Principe

Afin de faciliter le transfert des ADN, le gel doit être traité. Un traitement par l'acide chlorhydrique (dépurination) permet de couper les morceaux d'ADN de poids moléculaire élevé. Le temps doit être limité car un traitement prolongé peut hydrolyser l'ADN de manière trop excessive et générer des morceaux d'ADN trop petits qui se fixeront mal sur la membrane.

La dénaturation des ADN est obtenue par passage du gel dans une solution de dénaturation contenant de la soude.

La méthode de transfert capillaire est utilisée, les fragments d'ADN sont transférés du gel sur la surface d'une membrane par un flux liquide. Le liquide (tampon 20SSC) est aspiré à travers le gel par une action capillaire qui est établie et maintenue par un paquet de papier absorbant. Dans un tel système de transfert (cf. schéma) le gel est placé en contact avec la membrane, le tampon élue les acides nucléiques du gel et les dépose sur la membrane (63).

Après le transfert, la membrane est rincée et les ADN sont fixés par passage aux UV. A ce stade la membrane peut être hybridée immédiatement ou conservée à +4° C.

4.4.2. Protocole

Le gel est placé 10 minutes dans un bain d'HCl 0,25M sous agitation, rincé à l'eau distillée puis lavé 2 fois 15 minutes dans la solution de dénaturation. Après rinçage dans l'eau distillée, on réalise 2 lavages de 15 minutes dans la solution de neutralisation avant de rincer à nouveau le gel dans l'eau distillée. Le gel est ensuite placé dans le dispositif de transfert, mis en contact avec la membrane en nylon Hybond N+ préalablement humidifiée. Ce transfert passif s'effectue pendant une nuit, à l'aide de papier Whatman 3MM. Lorsque le transfert est terminé, la membrane est rincée puis exposée aux UV afin de fixer l'ADN. On contrôle alors que le transfert s'est bien passé en plaçant le gel sous les UV : il ne doit plus rester de bande visible.

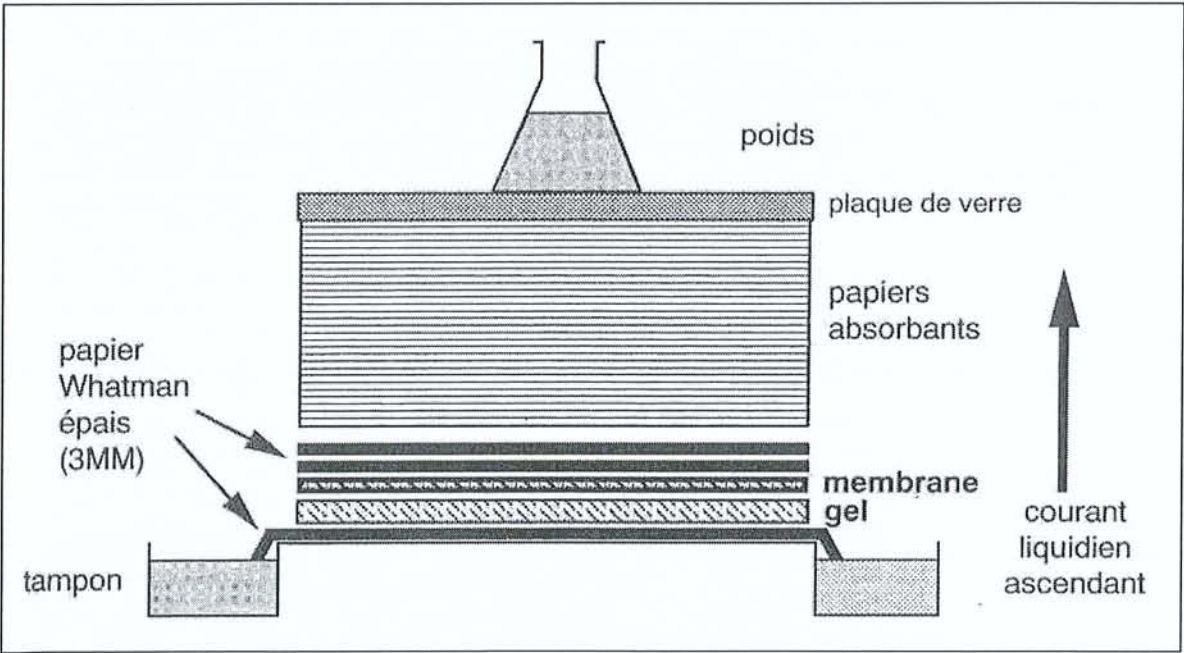


Figure 5: Dispositif de transfert par capillarité

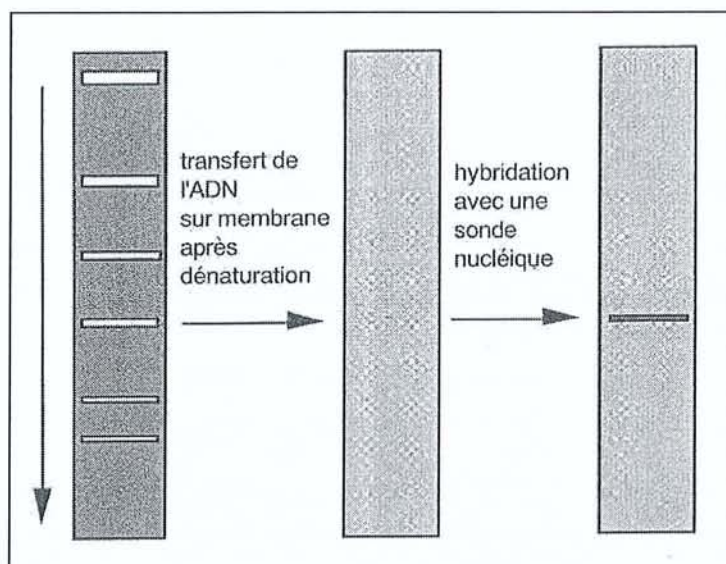


Figure 6: Principe du Southern Blot (66)

4.4.3. Remarques

La manipulation du gel nécessite d'extrêmes précautions afin de ne pas le casser.

Il est impératif de vérifier l'absence de bulles d'air dans le montage car elles empêchent le transfert correct des fragments d'ADN.

Un repère est inscrit dans un coin de la membrane afin de savoir de quel côté se trouve l'ADN au moment de la révélation.

4.5. Préparation de la sonde

4.5.1. Principe

Après l'hydrolyse enzymatique, de nombreux fragments d'ADN ont été produits, les seuls qui dans cette étude ont un intérêt sont ceux qui contiennent le fragment droit S2 de la séquence IS6110 et qui pourront être reconnus par la sonde préparée à partir de l'IS6110. (Figure 7)

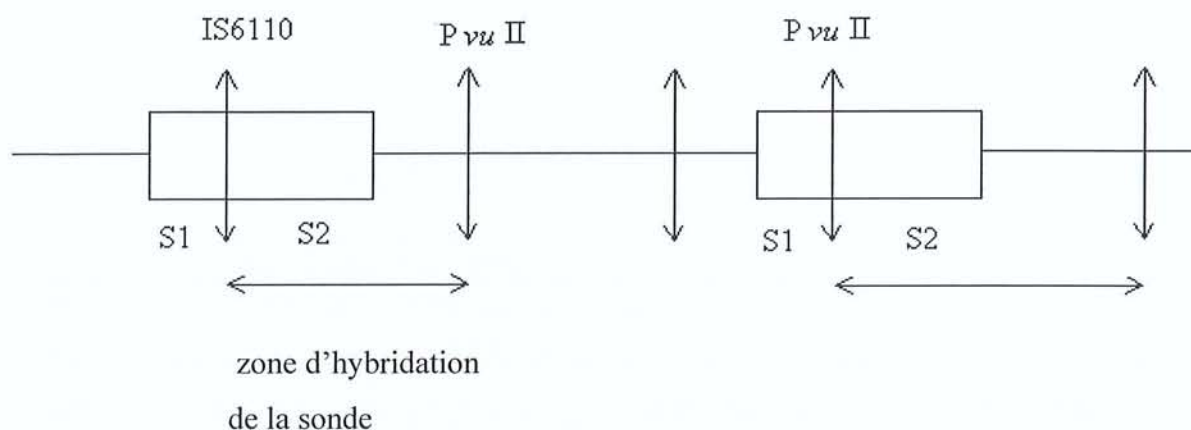


Figure 7 : Action de PvuII sur l'ADN

La sonde utilisée pour la révélation est préparée à partir de la souche de référence *Mycobacterium tuberculosis* Mt 14323. Cette souche a l'avantage de posséder de nombreuses copies IS6110 (11 copies). L'utilisation des primers INS-1 et INS2 permet d'amplifier par PCR une séquence de 245 pb appartenant à la fraction S2 de l'IS6110. Le produit d'amplification est contrôlé par électrophorèse sur gel d'agarose en présence d'un marqueur de poids moléculaire. L'ADN amplifié est purifié sur une colonne qui retient les fragments constituant la sonde puis ces derniers sont élués.

La sonde ainsi obtenue peut être aliquotée et congelée afin d'être conservée.

4.5.2. Protocole

La sonde est obtenue à partir de la souche de référence Mt 14323. L'ADN de cette souche est extrait selon la technique décrite précédemment puis on réalise une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) d'une séquence de 245 paires de bases appartenant à l'IS6110.

Préparation du mélange réactionnel (Tableau F)

		Concentration initiale	Volume par tube (µL)	Concentration finale
Amorce INS-1		10 µM	5	1 µM
Amorce INS-2		10 µM	5	1 µM
Tampon PCR		10 X	5	1 X
MgCl2		50 mM	1,5	1,5 mM
TAQ polymerase		5 U/tube	0,2	1 U/tube
dNTP	A	10 mM	1	200 µM
	T			
	G			
	C			
DMSO			5	
Eau pour BM			22, 3	
ADN			5	

Tableau F : Préparation du mélange destiné à la PCR

Volume réactionnel : 50 µL

Les amorces utilisées présentent les séquences suivantes :

INS-1 : 5' CGTGAGGGCATCGAGGTGGC 3'

INS-2 : 5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA 3'

ADN :

Il s'agit d'ADN extrait de la souche de référence Mt 14323, purifié et repris dans du TE, dilué au 1/100 avant de réaliser la PCR, ce qui correspond à 10 ng d'ADN environ.

Conditions d’amplification

L’amplification est réalisée dans un Thermocycleur 2400 Perkin Elmer. Les cycles se déroulent de la façon décrite dans le tableau G :

94 °C	7 min	
94 °C	1min	40 cycles
57 °C	1min	
72 °C	1min	
4°C	∞	

Tableau G : Conditions de la PCR

Contrôle de la PCR

On réalise une électrophorèse en gel d’agarose à 1%, en présence de témoins de poids moléculaire.

L’ADN amplifié est ensuite purifié sur un système de colonne Qiagen®.

Une fois préparée, la sonde se conserve aliquotée et congelée à -20 °C pendant 6 mois, au-delà le signal obtenu s’affaiblit et ne permet plus de travailler dans de bonnes conditions.

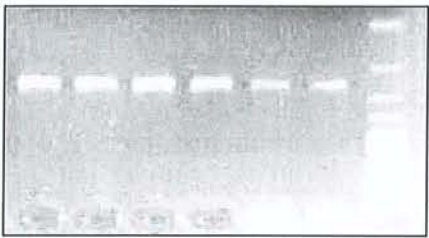


Photo 5: Electrophorèse de contrôle de la sonde purifiée

4.6. Hybridation de la membrane et révélation de la réaction

4.6.1. Principe

La sonde purifiée est marquée extemporanément avec une peroxydase (HRP : Horseradish peroxidase) ce qui permettra de révéler les produits d'hybridation par chimiluminescence. La peroxydase catalyse l'oxydation d'un substrat luminol qui en présence d'un réactif de détection, entraîne une émission de lumière qui est directement détectée sur un film photographique. Chaque bande contenant l'IS6110 est ainsi révélée.

4.6.2. Protocole

Marquage de la sonde

Il est réalisé à l'aide du kit ECL Amersham : Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System. La sonde aliquotée et congelée est diluée au 1/5 dans de l'eau pour biologie moléculaire (4 μ L de sonde + 16 μ L d'eau) puis marquée par la peroxydase. Les réactifs fournis par le kit pour le marquage de la sonde sont le DNA Labelling Reagent (20 μ L) contenant la peroxydase et le glutaraldéhyde (20 μ L) qui assure des liaisons covalentes entre la sonde et la peroxydase.

Préhybridation de la membrane

Dans un tube approprié, la membrane est mise en contact avec le tampon d'hybridation dans un four à hybridation à 42°C, pendant 30 minutes, à raison de 0,125 ml de tampon par cm² de membrane.

Hybridation

La sonde marquée (volume total de 60 μ L) est ajoutée dans le tube et l'hybridation se déroule pendant une nuit à 42°C, dans un mouvement de rotation. (Photo 6)

La température ne doit pas excéder 42°C pour ne pas inactiver la peroxydase.



Photo 6: Four à hybridation

Révélation/ Détection

Après hybridation, la membrane est lavée 2 fois 20 minutes dans une solution d'urée à raison de 2 mL/cm² de membrane puis 2 fois 5 minutes dans du tampon 2 SSC.

La phase de révélation se déroule en chambre noire. La solution de révélation (Kit Amersham) est préparée extemporanément en mélangeant volume à volume les 2 réactifs fournis (volume total de cette solution : 0,125 mL/cm² de membrane). Le premier réactif contient le peroxyde d'hydrogène, substrat de la peroxydase, tandis que le second contient du luminol qui une fois oxydé permet l'émission de lumière. La membrane est alors mise en contact avec cette solution pendant 1 minute à 1 minute 30, sous agitation. La membrane est ensuite essuyée entre deux papiers Whatmann puis placée dans une cassette (Hypercassette Neutral 18x24 cm- Amersham Pharmacia Biotech) et laissée au contact d'un film (Kodak Biomax MR Film) pendant une durée variable. Nous avons laissé la membrane et le film en contact pendant une heure, cette durée s'est révélée être la meilleure pour obtenir des bandes bien visibles et pouvoir ensuite comparer les profils de restriction. Le film est alors révélé jusqu'à l'observation de bandes, soit pendant 10 minutes, rincé à l'eau puis fixé pendant quelques minutes et séché.

La membrane peut être réhybridée avec la même sonde (ou une autre) en cas de problème, ce qui évite de recommencer la technique depuis le début.

4.7. Comparaison des profils

A l'observation du film, il est facile de noter pour chaque souche le nombre de bandes obtenu correspondant aux copies d'IS6110 ainsi que leur position et de les comparer les unes aux autres. Cette comparaison des profils par simple observation est suffisamment discriminante pour distinguer facilement les souches apparentées

Si les empreintes sont différentes, cela signifie qu'il s'agit de souches différentes et on peut exclure un lien épidémiologique entre les cas. Si les empreintes sont identiques, c'est-à-dire si les souches comportent le même nombre de bandes et que celles-ci sont positionnées aux mêmes endroits, cela signifie qu'il s'agit de souches non différentes mais pas forcément identiques ; il reste à démontrer l'existence d'un lien épidémiologique entre les cas. Un lien familial, géographique ou autre permet souvent de relier ces cas.

Les souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées chez des patients présentant des liens épidémiologiques montrent fréquemment des profils identiques. Les cas sont également considérés comme apparentés lorsqu'ils présentent une bande de différence. En présence de 2 bandes de différences, la meilleure attitude à adopter est de recourir à une autre technique de typage pour confirmer les suspicions de liens, spoligotyping, MIRU-VNTR ou PGRS (20).

En vue de réaliser une base de données, il est possible de lire les profils grâce au logiciel Gel Compar et de les archiver. Dans ce cas, la souche de référence Mt 14323 sert d'étalon interne, elle est intégrée dans chaque série.

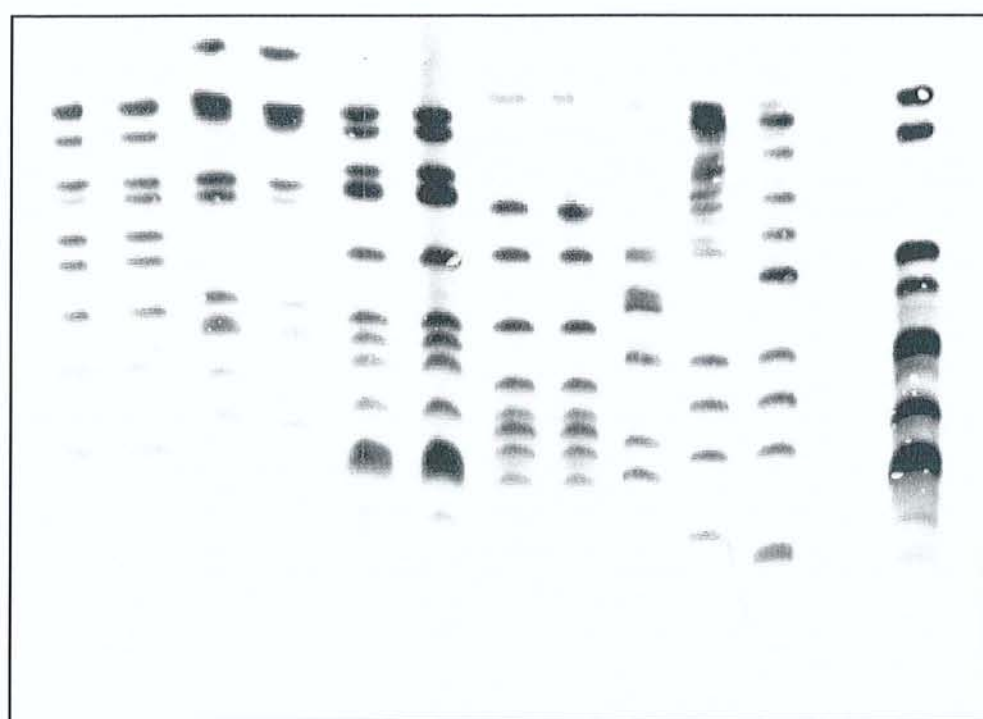
B. Résultats

1. Résultats observés



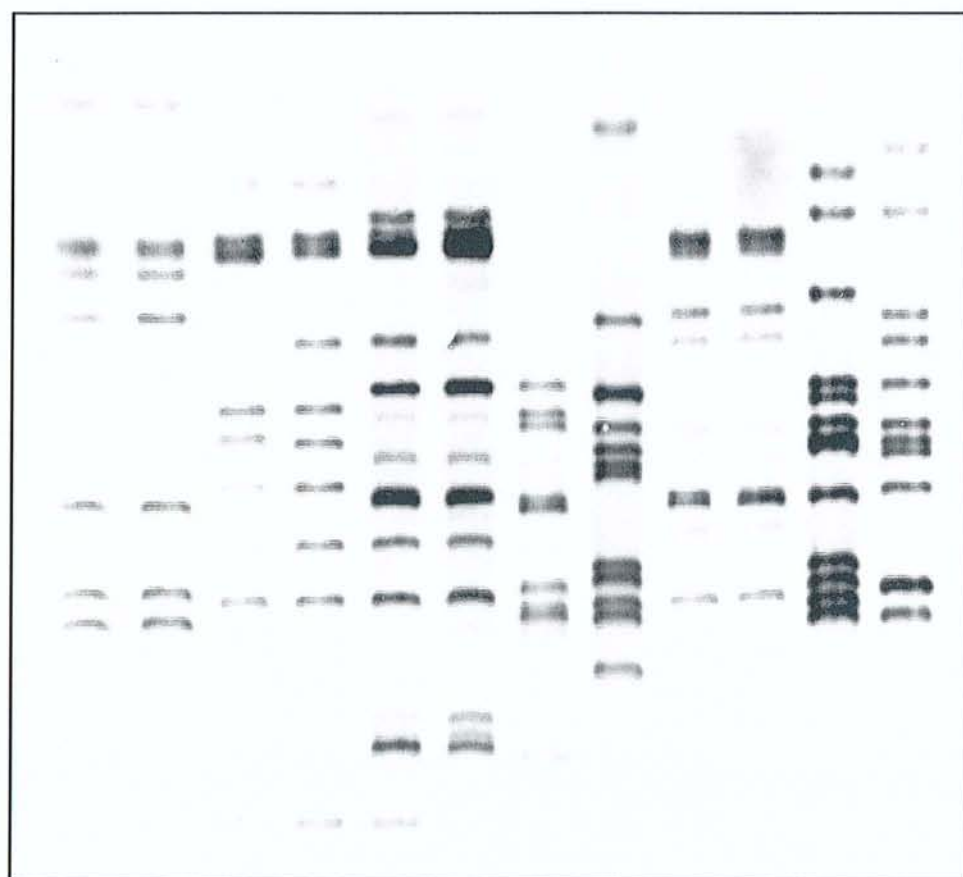
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Photo 7: Film n°1



Dépôts

Photo 8: Film n°2



Dépôts

25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36

Photo 9: Film n°3

2. Interprétation

Dans le cadre de la mise au point de la technique de RFLP au laboratoire de Bactériologie, nous avons testé 35 souches de *Mycobacterium tuberculosis*. Différentes séries ont été réalisées selon le mode opératoire décrit précédemment.

Les souches sont comparées en fonction

- du nombre de bandes
- de leurs positions respectives

Chacune de ces bandes correspond à une copie de la séquence IS6110. Le nombre de bandes observé pour chacune des souches est répertorié dans le tableau H.

Numéro de la souche	Nombre de bandes	Comparaison des souches
1	12	
2	8	
3	9	
4	8	
5	13	
6	8	
7	9	
8	7	
9	16	
10	8	
11	11	
12	11	
13	10	Même nombre de bandes Mêmes positions
14	10	
15	9	Même nombre de bandes Mêmes positions
16	9	
17	12	Même nombre de bandes Mêmes positions
18	12	
19	9	Même nombre de bandes Mêmes positions
20	9	
21	8	Différentes
22	13	
23	11	
24	12	
25	7	Même nombre de bandes Mêmes positions
26	7	
27	9	Différence : 1 bande Mêmes positions
28	10	
29	14	Même nombre de bandes Mêmes positions
30	14	
31	10	
32	12	
33	8	Différence : 1 bande Mêmes positions
34	9	
35	12	
36	11	

Tableau H : Nombre de bandes observé pour chacune des souches étudiées

C. Discussion. Analyse des résultats

La technique RFLP basée sur l'IS6110 pour l'étude épidémiologique de la tuberculose est connue depuis plusieurs années. Van Embden a publié en 1993 un protocole pour standardiser cette méthode afin qu'elle puisse être utilisée par un plus grand nombre de laboratoires. Actuellement, elle sert de méthode de référence mais elle reste longue et délicate à pratiquer. Elle nécessite des étapes successives où chaque élément a son importance et conditionne la qualité du résultat final. Avant de démarrer la technique au laboratoire nous avons été nous former à sa pratique au laboratoire de bactériologie du CHU de Bordeaux. Malgré cela une adaptation nécessitant plusieurs semaines a été utile pour avoir une bonne maîtrise de la technique et obtenir des résultats reproductifs. Cette méthode peut actuellement être pratiquée régulièrement au laboratoire. A chaque étape de la technique nous avons revu les éléments importants qui conditionnent les résultats.

La technique IS6110-RFLP utilise un transfert par Southern Blot et se pratique sans amplification. La quantité d'ADN nécessaire est donc particulièrement importante. *Mycobacterium tuberculosis* est comme nous l'avons vu précédemment une bactérie à croissance lente, le délai nécessaire pour obtenir une culture suffisante est donc long, de 3 à 6 semaines. De plus, les colonies sont incrustées dans le milieu et peuvent être difficiles à prélever. Par ailleurs, nous avons eu recours au mélange chloroforme/alcool isoamylique traditionnellement utilisé pour l'extraction des acides nucléiques. Nous avons essayé de réaliser cette extraction de façon automatisée sur un appareil Magna Pure[®], afin d'éviter la manipulation de solvants organiques ; la quantité d'ADN obtenue était insuffisante et nous avons donc abandonné cette éventualité.

L'hydrolyse enzymatique de l'ADN par PvuII doit se dérouler dans les conditions optimales de température comme cela a été décrit mais il faut s'assurer que la conservation de l'enzyme a été faite dans de bonnes conditions. A température ambiante l'activité d'une enzyme de restriction diminue rapidement, sa conservation sera meilleure sous forme la plus concentrée. La quantité d'enzyme est en rapport avec la quantité d'ADN à hydrolyser. Dans cette technique, l'ADN n'est pas quantifié précisément mais sa concentration doit être évaluée sur gel d'électrophorèse après l'extraction. Le dosage d'ADN que nous avons effectué lors des premières manipulations nous indique que le rapport enzyme/ADN est de l'ordre de 5 u d'enzyme/1 µg d'ADN, ce qui correspond aux quantités préconisées dans la littérature. Le contrôle de la digestion par électrophorèse doit aussi permettre de visualiser la charge en

ADN. Dans l'étape ultérieure de migration des ADN fragmentés il est important de pouvoir déposer des quantités d'ADN similaires afin de faciliter l'interprétation.

La migration des fragments d'ADN lors de l'électrophorèse doit se dérouler de façon régulière, éviter les effets de bord, le faible voltage utilisé permet une bonne séparation des fragments.

Il est important de ne pas étudier trop de souches simultanément ; en effet la manipulation du gel lors des différentes étapes de lavages est délicate et un gel de taille trop importante risque plus facilement de se casser.

Lors du transfert, le contact entre le gel et la membrane doit être uniforme, il faut vérifier l'absence de bulles d'air ou de plis qui pourraient gêner ce transfert.

La préparation de la sonde par PCR est une étape au cours de laquelle nous avons rencontré quelques difficultés. Après avoir vérifié la séquence des amorces synthétisées, les concentrations de Taq polymérase, de $MgCl_2$, nous ne parvenions toujours pas à amplifier le fragment d'ADN. Nous avons alors ajouté du Diméthyl Sulfoxyde au milieu réactionnel. Le DMSO est un adjuvant de la PCR qui facilite la rupture des liaisons hydrogènes reliant les 2 brins de la molécule d'ADN. Or le GC% élevé de *Mycobacterium tuberculosis* rend l'ADN plus difficile à dénaturer. Ce solvant nous a permis de préparer la sonde avec succès.

Après purification, la sonde se conserve à $-20^{\circ}C$, aliquotée afin d'éviter les congélations/décongélations, et non marquée, ce qui augmente sa stabilité. Nous avons pu observer que dans ces conditions la sonde se conserve 6 mois. Le marquage de la sonde se fait extemporanément.

Après transfert des fragments d'ADN, la membrane est préhybridée avec du tampon d'hybridation afin de la saturer et d'éviter les hybridations non spécifiques. L'hybridation se déroule ensuite dans un four, à une température n'excédant pas $42^{\circ}C$ pour ne pas dégrader la sonde, dans un mouvement de rotation régulier assurant un bon contact entre la membrane et le tampon contenant la sonde.

La phase de révélation se pratique dans le noir complet car les films sont très sensibles, ce qui nécessite une certaine organisation. En effet, nous nous sommes aperçus qu'une ampoule inactinique ou le moindre voyant lumineux présent dans la pièce (étuve, congélateur...) suffisait à voiler le film. Nous utilisons simplement une ampoule inactinique rouge au moment de la préparation du réactif de révélation, afin de mesurer les volumes dans une

éprouvette. Ensuite, il est important que ce réactif de révélation recouvre toute la membrane, nous optimisons ce contact par une agitation lente. Avant de se placer dans le noir, il faut repérer le côté marqué de la membrane pour la disposer correctement dans la cassette, au contact du film. En ce qui concerne la durée du contact, nous laissons un premier film pendant une heure et nous en plaçons un deuxième immédiatement après, pendant la révélation du premier ; nous pouvons ainsi adapter la durée de contact pour avoir un film le plus lisible possible.

Les résultats sont considérés comme valides lorsque chacune des étapes s'est déroulée avec succès et que sur le film obtenu nous pouvons observer des bandes distinctes et bien visibles (28). L'IS6110-RFLP est une technique peu discriminante lorsque les souches de *Mycobacterium tuberculosis* possèdent peu de copies d'IS6110, en pratique moins de 5 copies (27). Dans ce cas, une technique complémentaire de typage est nécessaire (123). Parmi les souches que nous avons étudiées, aucune n'entraîne dans cette catégorie et nous avons donc pu typer toutes les souches dont nous disposions. Lors des premières étapes, une électrophorèse de contrôle permet de vérifier que l'extraction de l'ADN, sa purification ainsi que la digestion enzymatique se sont bien déroulées. L'observation du bon déroulement des étapes suivantes a lieu au moment de la révélation : en cas d'hybridation non homogène ou d'autres problèmes, il est possible de réhybrider la membrane. Nous avons dû recourir à une réhybridation de membrane suite à l'utilisation d'une sonde donnant un signal trop faible. En revanche, si les profils ne sont pas lisibles parce que la quantité d'ADN est trop faible, il faut reprendre l'ensemble des étapes depuis la culture et l'extraction d'ADN, ce qui occasionne une perte de temps considérable. Il est donc important d'avoir suffisamment d'ADN dès le début de la manipulation.

Parmi les 35 souches cliniques étudiées, 26 clones ont été identifiés, chacun regroupant une ou deux souches. Nous n'avons pas mis en évidence de clones de taille plus importante au cours de notre étude. Le but de cette étude était de mettre au point la technique. Actuellement, elle peut être utilisée sur l'ensemble des souches de *Mycobacterium tuberculosis* au laboratoire.

La première série de manipulations a été réalisée afin de mettre au point la technique, en utilisant les souches de *Mycobacterium tuberculosis* disponibles, c'est-à-dire pour lesquelles

la culture sur milieu de Loewenstein-Jensen était suffisamment abondante. Nous n'avons donc effectué aucune sélection concernant les premières souches à tester : il apparaît clairement que les souches n° 1 à 12 ont des bandes bien visibles mais que les profils observés ne sont pas apparentés. Cette série nous a néanmoins permis de déterminer les conditions opératoires optimales et d'effectuer quelques ajustements pas rapport aux données de la littérature (108). Lors des séries suivantes, nous avons sélectionné des souches pour lesquelles nous suspicions un lien épidémiologique. Nous avons juxtaposé ces souches, ce qui facilite la lecture et l'interprétation des résultats. Lorsque 2 souches situées sur des films différents semblent apparentées, la meilleure solution consiste à les passer sur un même gel, l'une à côté de l'autre.

La souche 23 correspond à la souche de référence Mt14323, elle est surtout utile en tant qu'étalon interne lorsque l'on veut comparer des souches sur différents films ou établir une base de données. Nous l'avons intégrée dans une de nos séries.

Parmi les souches que nous avons étudiées, nous avons mis en évidence 3 contextes pour lesquels le typage moléculaire en général et l'IS6110-RFLP ont une utilité incontestable :

1. Lien familial

La survenue de plusieurs cas de tuberculose dans une même famille fait immédiatement suspecter un lien entre les cas.

Les souches 15 et 16 ont été isolées chez un couple dont la femme est infirmière. Les deux profils sont rigoureusement identiques, ce qui confirme la contamination d'un des sujets par son conjoint. De par sa profession, la femme était exposée à un risque de tuberculose plus important et il est vraisemblable qu'elle se soit contaminée sur son lieu de travail avant de transmettre la bactérie à son mari. Cependant, ce dernier a développé des symptômes de tuberculose avant son épouse mais comme nous l'avons vu précédemment des facteurs individuels entrent en ligne de compte. Nous pouvons donc en déduire que les 2 cas sont liés mais nous ne pouvons pas affirmer qu'il s'agit d'une contamination professionnelle : d'une part nous ne disposons pas de données concernant d'éventuels cas de tuberculose survenus dans le service où travaille cette personne, et d'autre part son conjoint a pu contracter la maladie dans un espace confiné, les transports en commun...

Nous avons également comparé les souches 17 et 18 isolées chez une mère et sa fille et les profils sont identiques.

Dans ces deux derniers cas, la RFLP vient confirmer une forte suspicion de relation entre les cas du fait du lien familial et du contact étroit qui existe entre ces personnes. Ces cas familiaux confirment le fait que vivre sous le même toit augmente le risque de transmission de tuberculose.

Les souches 19 et 20 concernent deux cousins et les profils observés sont également identiques. Il s'agit ici d'un contact familial a priori moins étroit. Cependant, ces 2 cousins sont des réfugiés politiques kosovars récemment arrivés en France et il est probable qu'ils soient venus ensemble ou aient vécu sous le même toit.

La souche 21 a été isolée chez un homme et la souche 22 a été isolée chez sa femme : le nombre de bandes diffère (8/13) et leurs positions sont radicalement différentes. Aucun lien n'existe entre ces deux souches. Chacun de ces sujets a pu se contaminer de son côté ou il peut également s'agir pour l'un et/ou l'autre d'une réactivation. Dans ce cas, la RFLP montre l'absence de lien entre deux cas que l'on pensait apparentés.

2. Lien professionnel

La souche 32 correspond à une tuberculose observée chez un membre du personnel soignant exerçant son activité dans un service d'endoscopie, service considéré à haut risque en ce qui concerne la transmission de la tuberculose. Il est donc plausible que ce membre du personnel se soit contaminé à l'hôpital. Les souches 24, 25, 26, 31, 35 et 36 correspondent à des patients qui sont passés dans le service d'endoscopie en question.

Il n'a pas été possible de prouver un lien entre ce membre du personnel et un patient, ni entre les patients.

Cependant, cette liste de patients n'est pas exhaustive et ne concerne que les malades diagnostiqués au CHU dans une période de quelques mois située au moment où une contamination semble pouvoir avoir eu lieu. Il se peut tout à fait que ce membre du personnel

soignant se soit contaminé ailleurs qu'à l'hôpital ou surtout que la primo infection date de plusieurs mois ou années. Il est difficile de connaître la date de contamination, la tuberculose maladie pouvant survenir lors d'une baisse de l'immunité.

Cette étude est faite a posteriori, ce qui ne permet pas d'élargir les recherches ; il aurait été intéressant d'établir un screening plus large et de disposer de l'outil qu'est la RFLP au moment où se sont déroulés ces événements.

3. Chez un même patient

Les souches 13 et 14 ont été isolées d'expectorations chez un même patient, respectivement en 2000 et 2002. Nous pouvons observer que chacune de ces souches possède 10 copies d'IS6110 et que les bandes sont positionnées au même endroit ; ceci nous permet de conclure à une réactivation d'une souche endogène chez ce malade, 2 ans après un premier épisode, et non à une réinfection par une souche différente.

De même, les souches 29 et 30 ont été isolées chez un même patient deux années successives. Les 2 profils sont identiques et correspondent à une réactivation endogène. Cependant, l'intensité des bandes correspondant au profil 29 est un peu faible et une ou deux bandes sont moins visibles.

Les deux profils suivants correspondent à un même patient, la souche 27 ayant été isolée en 2003 et la souche 28 en 2004. Nous pouvons observer une bande supplémentaire pour la souche 28 ; à part cette différence, les autres bandes sont situées aux mêmes endroits. Concernant l'interprétation des profils de RFLP dans la littérature, des profils rigoureusement identiques ou ne différant que par une seule bande sont considérés apparentés, surtout si un autre lien existe (20). C'est le cas ici puisqu'il s'agit du même patient. Il a dû se produire une transposition affectant une copie de l'IS6110 durant l'année qui s'est écoulée entre les deux prélèvements, ce qui est fort probable puisque les transpositions ne sont pas rares.

La souche 25 a été isolée d'une expectoration chez une patiente et la souche 26 provient d'un abcès chez cette même patiente 4 mois plus tard : les 2 profils correspondent bien à une même souche. Ce cas correspond à une tuberculose pulmonaire avec dissémination, situation que nous avons décrite précédemment.

La souche 33 a été isolée dans l'urine d'un patient et la souche 34 dans une expectoration chez ce même patient. On observe une bande surnuméraire pour la souche 34 mais les autres bandes sont identiques. Ce patient présente à la fois une tuberculose pulmonaire et une tuberculose urinaire.

Parmi les souches étudiées, nous avons mis en évidence des cas de réactivation mais pas de cas de réinfection. Nous sommes dans une zone géographique où le taux de transmission de tuberculose est plutôt faible, il est donc logique que les réactivations soient plus fréquentes que les réinfections par des souches différentes. Ces données sont confirmées dans la littérature (64).

L'utilisation de l'IS6110-RFLP au laboratoire nous a permis de typer toutes les souches que nous désirions étudier dans un premier temps, aucune ne possédait moins de 5 copies d' IS6110. Cette technique nous permet désormais de comparer un plus grand nombre de souches de *Mycobacterium tuberculosis*

CONCLUSION

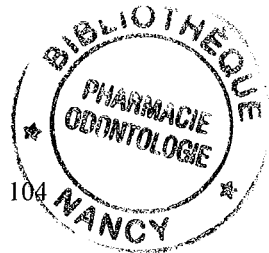
Mycobacterium tuberculosis est un agent pathogène redoutable, responsable chaque année d'un taux de morbidité et de mortalité élevés. Ses caractères bactériologiques et de résistance nécessitent des traitements longs. Il est donc important de pouvoir mieux connaître cette bactérie et le séquençage de son génome ouvre de nouvelles perspectives en terme de compréhension de la maladie, de démarche diagnostique, d'épidémiologie et de typage des souches.

Notre travail consistait à développer au laboratoire une technique de typage moléculaire de *Mycobacterium tuberculosis*, afin de pouvoir comparer les souches isolées au CHU. Notre choix s'est porté sur la technique de RFLP basée sur l'IS6110 car cette technique est la plus discriminante parmi celles qui se sont développées ces dernières années. Cette technique est pratiquée dans de nombreux laboratoires. De plus, cette technique a été standardisée afin de pouvoir comparer les résultats de différents laboratoires et constitue toujours à l'heure actuelle la technique de référence.

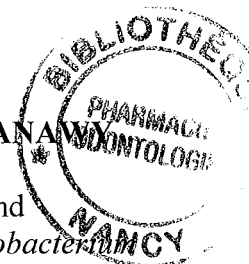
Les souches que nous avons étudiées nous ont permis d'identifier différents clusters. Les souches apparentées correspondent souvent à une transmission familiale, liée à un contact étroit entre les patients. Cette technique fait également la distinction entre une réinfection et une réactivation chez un même patient. Elle permet par ailleurs d'identifier des contaminations de laboratoire, des micro épidémies survenant dans des communautés mais aussi des cas de transmission nosocomiale de tuberculose, même si nous n'avons pas eu de cas de ce genre au sein de notre étude.

L'IS6110-RFLP est un puissant outil épidémiologique qui nous a permis de typer toutes les souches étudiées et d'établir des liens entre certaines d'entre elles. Par ailleurs, les souches que nous avons regroupées présentaient des profils rigoureusement identiques ou une bande de différence seulement. Nous n'avons pas été confrontés à des souches suspectées apparentées pour lesquelles deux bandes ou plus différaient ; nous n'avons donc pas eu besoin d'une technique complémentaire de typage (20).

L'IS6110-RFLP peut désormais être utilisée en routine au laboratoire et permet ainsi de typer l'ensemble des souches isolées au CHU, voire dans la région.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- 1. ABBADI S., RASHED H. G., MORLOCK G. P., WOODLEY C. I., EL SHANAWAN O., COOKSEY R. C.**
Characterization of IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns and Mechanisms of Antimicrobial Resistance for Multidrug- Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from a major Reference Hospital in Assiut, Egypt
J. Clin. Microbiol. 2001,39,6,2330-2334
- 2. AHMED N., ALAM M., RAO K.R., KAUSER F., KUMAR N.A., QAZI N.N., SANGAL V., SHARMA V.D., DAS R., KATOCH V.M., MURTHY K.J., SUNEETHA S., SHARMA S.K., SECHI L.A., GILMAN R.H., HASNAIN S.E.**
Molecular genotyping of a large, multicentric collection of tubercle bacilli indicates geographical partitioning of strain variation and has implications for global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*.
J. Clin. Microbiol. 2004,42,7,3240-3247
- 3. AHMED N., HASNAIN S.E.**
Genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: old threats and new trends.
Indian J. Med. Res. 2004,120,4,207-212
- 4. ALITO A., MORCILLO N., SCIPIONI S., DOLMANN. A., ROMANO M. I., CATALDI A., VAN SOOLINGEN D.**
The IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism in Particular Multidrug- Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains May Evolve Too Fast for Reliable Use in Outbreak Investigation.
J. Clin. Microbiol., 1999, 37,3,788-791
- 5. ANTOUN F., VALIN N., CHOUAID C., RENARD M., DAUTZENBERG B., LALANDE V., AYACHE B., MORIN P., SOUGAKOFF W., THIOLET J.M., TRUFFOT-PERNOT C., JARLIER V., DECLUDT B.**
Epidémie de tuberculose dans un foyer de migrants à Paris en 2002.
BEH, 2003, 10-11,58-60
- 6. AUBIER M., FOURNIER M., PARIENTE R.**
Pneumologie
Paris : Flammarion, 1996 : 972p
- 7. BARLOW R.E.I., GASCOYNE-BINZI D.M., GILLEPSIE S.H., DICKENS A., QAMER S., HAWKEY P.M.**
Comparison of Variable Number Tandem Repeat and IS6110-Restriction Fragment Length Polymorphism analyses for discrimination oh high and low-copy-number IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* isolates
J. Clin. Microbiol. 2001,39,7,2453-2457
- 8. BAUER J., THOMSEN V. Ó., POULSEN S., ANDERSEN Á. B.**
False-Positive Results from Cultures of *Mycobacterium tuberculosis* Due to Laboratory Cross-Contamination Confirmed by Restriction Fragment Length Polymorphism.
J. Clin. Microbiol., 1997,35,4,988-991

9. BEMER- MELCHIOR P., DRUGEON H. B.

Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* for DNA Typing Analysis.
J. Clin. Microbiol., 1999,37,7,2350-2351

10. BIFANI P., MOGHAZEH S., SHOPSIN B., DRISCOLL J., RAVIKOVITCH A., KREISWIRTH B. N.

Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra Variants:
Distinguishing the Mycobacterial Laboratory Strain
J. Clin. Microbiol. 2000,38,9,3200-3204

11. BIFANI P., MATHEMA B., LIU Z., MOGHAZEH S., SHOPSIN B., TEMPALSKI B., DRISCOLL J., FROTHINGHAM R., MUSSER J.M., ALCABES P., KREISWIRTH B.

Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology.
JAMA., 1999,282,24,2321-2327

12. BONORA S., GUTIERREZ M.C., DI PERRI G., BRUNELLO F., ALLEGIANZI B., LIGOZZI M., FONTANA R., CONCIA E., VINCENT V.

Comparative evaluation of Ligation-Mediated PCR and spoligotyping as screening methods for genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains.
J. Clin. Microbiol., 1999, 37,10,3118-2123

13. BRANDI O., PROD'HOM G., ROCHAT T., ZELLWEGER J-P.

Clinique et diagnostic de la tuberculose
Forum Med Suisse, 2003,21,492-497

14. BULLETIN EPIDEMIOLOGIQUE HEBDOMADAIRE

Tuberculose en France: la situation aujourd'hui
BEH, 2003,10-11,53-68

15. BULLETIN EPIDEMIOLOGIQUE HEBDOMADAIRE

Tuberculose: Traitement et Prévention
BEH, 1997,N° spécial

16. BULLETIN EPIDEMIOLOGIQUE HEBDOMADAIRE

Epidémiologie moléculaire de la tuberculose au sein de la communauté urbaine de Brest
BEH, 2000,31

17. BURGOS M.V., MENDEZ J.C., RIBON W.

Molecular epidemiology of tuberculosis : methodology and applications
Biomedica., 2004,24,1,188-201

18. CAILHOL J., CHE D., CAMPESE C., DECLUDT B.

Les cas de tuberculose déclarés en France en 2001.
BEH, 2003, 10-11,54-57

19. CARBONNELLE B., DAILLOUX M., LEBRUN L., MAUGEIN J., PERNOT C.

Mycobactéries. Mycobactérioses.
Paris : Cahier de formation Bioforma, 2003.- 159p

20. CAVE M.D., YANG Z.H., STEFANOVA R., FOMUKONG N., IJAZ K., BATES J., EISENACH K.D.

Epidemiologic import of tuberculosis cases whose isolates have similar but not identical IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns.
J. Clin. Microbiol., 2005, 43,3,1228-1233

21. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC)

Tuberculosis transmission in multiple correctional facilities—Kansas, 2002-2003
MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2004, 53(32): 734-738

22. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC)

Tuberculosis transmission in a renal dialysis center-Nevada, 2003
Morb Mortal Wkly Rep, 2004, 53,37,873-875

23. CENTRE D'EXPERTISE COLLECTIVE DE L'INSERM

Tuberculose. Place de la vaccination dans la maîtrise de la maladie.
Paris : Inserm, 2004,- 282p

24. CHE D., CAILHOL J., CAMPESE C., DECLUDT B.

Epidemiology of tuberculosis in Ile-de-France in 2001.
Rev. Mal. Respir., 2004,21,2,272-278

25. COLE S.T., BROSCHE R., PARKHILL J., GARNIER T., CHURCHER C., HARRIS D., GORDON S.V., EIGLMEIER K., GAS S., BARRY E., TEKAIA F., BADCOCK K., BASHAM D., BROWN D., CHILLINGWORTH T., CONNOR R., DAVIES R., DEVLIN K., FELTWELL T., GENTLES S., HAMLIN N., HOLROYD S., HORNSBY T., JAGELS K., KROGH A., MC LEAN J., MOULE S., MURPHY L., OLIVER K., OSBORNE J., QUAIL M.A., RAJANDREAM M.A., ROGERS J., RUTTER S., SEEGER K., SKELTON J., SQUARES R., SQUARES S., SULSTON J.E., TAYLOR K., WHITEHEAD S., BARRELL B.G.

Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence;
Nature, 1998,393,537-544

26. COWAN L.S., MOSHER L., DIEM L., MASSEY J.P., CRAWFORD J.T.

Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units.
J. Clin. Microbiol., 2002,40,5,1592-1602

27. DALE J.W., AL-GHUSEIN H., AL-HASHMI S., BUTCHER P., DICKENS A.L., DROBNIOWSKI F., FORBES K.J., GILLEPSIE S.H., LAMPRECHT D., MC HUGH T.D., PITMAN R., RASTOGI N., SMITH A.T., SOLA C., YESILKAYA H.

Evolutionary relationships among strains of *Mycobacterium tuberculosis* with few copies of IS6110.

J Bacteriol., 2003,185,8,2555-2562

28. DE BOER A.S., KREMER K., BORGDORFF M.W., DE HAAS P.E.W., HEERSMA H.F., VAN SOOLINGEN D.

Genetic heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates reflected in IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism patterns as low intensity bands.

J. Clin. Microbiol., 2000,38,12,4478-4484

29. DECLUDT B., CAMPESE C., InVS

Les cas de tuberculose déclarés en France en 2000.

Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 2002,16/17, 68-70

30. DE JUAN L., MATEOS A., DOMINGUEZ L., SHARP J.M., STEVENSON K.

Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from goats detected by pulsed-field gel electrophoresis.

Vet. Microbiol., 2005,105,249-257

31. DROBNIEWSKI F.A., GIBSON A., RUDDY M., YATES M.D.

Evaluation and utilization as a public health tool of a national molecular epidemiological tuberculosis outbreak database within the United Kingdom from 1997 to 2001.

J. Clin. Microbiol., 2003,41,5,1861-1868

32. ELIA-PASQUET S., DABIS F., TEXIER-MAUGEIN J., DESSUS-BABUS S., MEYNARD J., BOUIGES M.

Transmission de la tuberculose en Gironde : approche épidémiologique par l'analyse génomique de *Mycobacterium tuberculosis*

Rev. Epidemiol. Santé Publ., 2000,48,2,127-136

33. ELIA-PASQUET S., DABIS F., DECLUDT B., TEXIER-MAUGEIN J., TESSIER J.F.

Transmission de la tuberculose en France: compte-rendu d'un atelier d'experts, Bordeaux, 16 novembre 2000.

BEH, 2002,2

34. EPIDEMIOLOGIE ET MALADIES INFECTIEUSES

Epidémiologie moléculaire de la tuberculose.

Paris, 2002,9,175-176

35. FARNIA P., MOHAMMADI F., MASJEDI M.R., VARNEROT A., ZARIFI A.Z., TABATABEE J., DOURAGHEI M., GHAZISAEEDI K., MANSORRI D., BAHADORI M., VINCENT V., GUTIERREZ C., VELAYATI A.A.

Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran : using RFLP and spoligotyping methods.

J. Infect., 2004,49,2,94-101

36. FEDERATION NATIONALE DES OBSERVATOIRES REGIONAUX DE LA SANTE

La santé observée dans les régions de France : la tuberculose-1^{ère} édition

Paris, 1999,1-15

- 37. FEIZABADI M.M., ROBERTSON I.D., COUSINS D.V., HAMPSON D.J.**
Genomic analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by isoenzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis
J. Clin. Microbiol., 1996, 34,5,1136-1142
- 38. FLEISCHMANN R.D., ALLAND D., EISEN J.A., CARPENTER L., WHITE O., PETERSON J., DE BOY R., DODSON R., GWINN M., HAFT D., HICKEY E. KOLONAY J.F., NELSON W.C., UMayAM L.A., ERMOLAEVA M., SALZBERG S.L., DELCHER A., UTTERBACK T., WEIDMAN J., KHOURI H., GILL J., MIKULA A., BISHAI W., JACOBS W.R., VENTER J.C., FRASER C.M.**
Whole genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains.
J. Bacteriol., 2002,184,19,5479-5490
- 39. FRENEY J., RENAUD F., HANSEN W., BOLLET C.**
Précis de Bactériologie Clinique 2000
Paris: ESKA,2000.- 1692p
- 40. FRENEY J., RENAUD F., HANSEN W., BOLLET C.**
Manuel de Bactériologie Clinique, 2^{ème} édition.
Paris : Elsevier Option Bio, 1994.-3, 1756p
- 41. FROTA C.C., HUNT D.M., BUXTON R.S., RICKMAN L., HINDS J., KREMER K., VAN SOLLINGEN D., COLSTON M.J.**
Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans
Microbiology, 2004,150,5,1519-1527
- 42. GASCOYNE-BINZI D.M., BARLOW R.E.L., FRONTHINGHAM R., ROBINSON G., COLLYNS T.A., GELLETLIE R., HAWKEY P.M.**
Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using Variable Number Tandem Repeat analysis.
J. Clin. Microbiol., 2001, 39,1,69-74
- 43. GILLESPIE S.H., DICKENS A., MC HUGH T.D.**
False molecular clusters due to nonrandom association of IS6110 with *Mycobacterium tuberculosis*.
J. Clin. Microbiol., 2000, 38,6,2081-2086
- 44. GIRA A.K., REISENAUER A.H., HAMMOCK L., NADIMINTI U., MACY J.T., REEVES A., BURNETT C., YAKRUS M.A., TONEY S., JENSEN B.J., BLUMBERG H.M., CAUGHMAN S.W., NOLTE F.S.**
Furunculosis due to *Mycobacterium mageritense* associated with footbaths at a nail salon.
J. Clin. Microbiol., 2004, 42,4,1813-1817
- 45. GITHUI W. A., WILSON S. M., DROBNIEWSKI F. A.**
Specificity of IS6110-Based DNA Fingerprinting and Diagnostic Techniques for *Mycobacterium tuberculosis* Complex.
J. Clin. Microbiol., 1999,37,4,1224-1226

46. GOGUET DE LA SALMONIERE Y.O., LI H.M., TORREA G., BUNSHOTEN A., VAN EMBDEN J., GICQUEL B.

Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*.
J. Clin. Microbiol., 1997,35,9,2210-2214

47. GOULDING J. N., STANLEY J., SAUNDERS N., ARNOLD C.

Genome- Sequence- Based Fluorescent Amplified- Fragment Length Polymorphism Analysis of *Mycobacterium tuberculosis*
J. Clin. Microbiol., 2000,38,3,1121-1126

48. GOYAL M., SAUNDERS N. A., VAN EMBDEN J. D. A., YOUNG D. B., SHAW R.J.

Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Spoligotyping and IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism.
J. Clin. Microbiol., 1997,35,647-651

49. GROENEN P.M.A., BUNSHOTEN A.E., VAN SOOLINGEN D., VAN EMBDEN J.D.A.

Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method.
Mol. Microbiol., 1993,10,5,1057-1065

50. GUTTIERREZ M.C., VINCENT V.

Contribution du typage moléculaire à la surveillance de la tuberculose multirésistante en France, 1995-2000.
BEH, 2002,16/17, 73-75

51. GUTIERREZ M. C., VINCENT V., AUBERT D., BIZET J., GAILLOT O., LEBRUN L., LE PENDEVEN C., LE PENNEC M. P., MATHIEU D., OFFREDO C., PANGON B., PIERRE-AUDIGIER C.

Molecular Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk Factors for Tuberculosis Transmission in Paris, France, and Surrounding Area.
J. Clin. Microbiol., 1998,36,2,486-492

52. HAWKEY P.M., SMITH E.G., EVANS J.T., MONK P., BRYAN G., MOHAMED H.H., BARDHAN M., PUGH R.N.

Mycobacterial interspersed repetitive unit typing of Mycobacterium tuberculosis compared to restriction fragment length polymorphism analysis for investigation of apparently clustered cases of tuberculosis.
J. Clin. Microbiol., 2003,41,8,3514-3520

53. HIDAKA E., HONDA T., UENO I., YAMASAKI Y., KUBO K., KATSUYAMA T.

Sensitive identification of mycobacterial species using PCR-RFLP on bronchial washings.
Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2000,161,930-934

54. HILLARUS M., LUCET J.C., RUIMY R., LONGUET P., BOUVET E., VILDE J.L.

Evaluation de la transmission nosocomiale de la tuberculose d'un soignant aux patients exposés.
BEH, 2003, 10-11,64

- 55. HO T.B., ROBERTSON B.D., TAYLOR G.M., SHAW R.J., YOUNG D.B.**
Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* genomes reveals frequent deletions in a 20 kb variable region in clinical isolates.
Yeast, 2000,17,4,272-82
- 56. HUGHES V.M., STEVENSON., SHARP J.M.**
Improved preparation of high molecular weight DNA for pulsed-field gel electrophoresis from mycobacteria.
J. Microbiol. Methods., 2001,44,3,209-215
- 57. IJAK K., YANG Z., TEMPLETON G., STEAD W.W., BATES J.H., CAVE M.D.**
Persistence of a strain of *Mycobacterium tuberculosis* in a prison system.
Int. J. Tuberc. Lung Dis., 2004,8,8,994-1000
- 58. INFUSO A., ANTOINE P., BARBOZA P.**
Surveillance européenne de la tuberculose en 1999 et tendances récentes.
BEH, 2002,16/17, 66-67
- 59. JOURNEE BOUZEKRI SUR LA TUBERCULOSE (4 ; 1999 ; Rabat)**
Société marocaine des maladies respiratoires
- 60. KAMERBEEK J., SCHOULS L., KOLK A., VAN AGTERVELD M., VAN SOOLINGEN D., KUIJPER S., BUNSCHOTEN A., MOLHUIZEN H., SHAW R., GOYAL M., NAV EMBDEN J.**
Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology
J. Clin. Microbiol., 1997,35,4,907-914
- 61. KATO-MAEDA M., BIFANI P.J., KREISWIRTH B.N., SMALL P.M.**
The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*.
J. Clin. Invest., 2001, 107,5,33-37
- 62. KREMER K., AU B.K., YIP P.C., SKUCE R., SUPPLY P., KAM K.M., VAN SOOLINGEN D.**
Use of variable-number tandem-repeat typing to differentiate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family isolates from Hong Kong and comparison with IS6110 restriction fragment length polymorphism typing and spoligotyping.
J. Clin. Microbiol., 2005,43,1,314-320
- 63. KREMER K., VAN SOOLINGEN D., FROTHINGHAM R., HAAS W. H., HERMANS P. W. M., MARTIN C., PALITTAPONGARNPIM P., PLIKAYTIS B. B., RILEY L. W., YAKRUS M. A., MUSSER J. M., VAN EMBDEN J. D. A.**
Comparison of Methods Based on Different Molecular Epidemiological Markers for Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Interlaboratory Study of Discriminatory Power and Reproducibility.
J. Clin. Microbiol., 1999,37,8,2607-2618

- 64. KULAGA S., BEHR M., MUSANA K., BRINKMAN J., MENZIES D., BRASSARD P., KUNIMOTO T.N., THIBERT L., JOSEPH L., BOIVIN J.F., SCHWARTZMAN K.**
Molecular epidemiology of tuberculosis in Montreal.
CMAJ, 2002, 167, 4, 353-354
- 65. KWARA A., SCHIRO R., COWAN L.S., HYSLOP N.E., WISER M.F., ROAHEN HARRISON S., KISSINGER P., DIEM L., CRAWFORD J.T.**
Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates.
J. Clin. Microbiol., 2003, 41, 6, 2683-2685
- 66. LANDE D., AMAUDRIC M., JACOTY C.**
Biosciences et techniques. Génie génétique.
Paris: Dion, 1993,- 439p
- 67. LA TUBERCULOSE EN FRANCE EN L'AN 2000. Colloque (11 ; 2000 ; Bordeaux)**
- 68. LAURENT C.**
Etude épidémiologique de la tuberculose dans les Vosges: à propos d'une enquête effectuée de 1985 à 1990.
Th : Pharm : Nancy I : 1993
- 69. LE MINOR L., VERON M.**
Bactériologie médicale.
Paris : Flammarion, 1990.- 1107p
- 70. LEVY-BRUHL D., BARRAULT Y., DECLUDT B., SCHWOEBEL V.**
BCG et tests tuberculiniques: évolutions de la politique vaccinale française
BEH, 2003, 10-11, 61-63
- 71. MAHILLON J., CHANDLER M.**
Insertion sequences.
Microbiol and Mol. Biol. Rev., 1998, 62, 3, 725-774
- 72. MC HUGH T. D., GILLESPIE S. H.**
Non-random association of IS6110 and *Mycobacterium tuberculosis*: implications for molecular epidemiology studies.
J. Clin. Microbiol., 1998, 36, 5, 1410-1413
- 73. MC NABB., KAMMERER J.S., HICKEY A.C., BRADEN C.R., SHANG N., ROSENBLUM L.S., NACIN T.R.**
Added epidemiologic value to tuberculosis prevention and control of the investigation of clustered genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolates.
Am. J. Epidemiol., 2004, 160, 6, 589-597

74. MOKROUSOV I., NARVSKAYA O., LIMESCHENKO E., VYAZOVAYA A., OTTEN T., VYSHNEVSKIY B.

Analysis of the allelic diversity of the mycobacterial interspersed repetitive units in *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing family: practical implications and evolutionary considerations.

J. Clin. Microbiol., 2004,42,6,2438-2444

75. MONTORO E., VALDIVIA J., CARDOSO LEAO S.

Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Havana, Cuba, by IS6110- Restriction Fragment Length Polymorphism analysis and by the Double Repetitive Element PCR method.

J. Clin. Microbiol., 1998,36,10,3099-3102

76. MOSTRÖM P., GORDON M., SOLA C., RIDELL M., RASTOGI N.

Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis.

Clin. Microbiol. and Infect., 2002,8,11,694-704

77. MOUTON Y., DEBOSCKER Y., DUBREUIL L., THABAUT A.

Antibiotiques, antiviraux, anti-infectieux.

Paris : John Libbey Eurotext, 1997.- 261p

78. NGUYEN D., BRASSARD P., MENZIES D., THIBERT L., WARREN R., MOSTOWY S., BEHR M.

Genomic characterization of an endemic *Mycobacterium tuberculosis* strain: evolutionary and epidemiologic implications.

J. Clin. Microbiol., 2004,42,6,2573-2580

79. NGUYEN L.N., GILBERT G.L., MARKS G.B.

Molecular epidemiology of tuberculosis and recent developments in understanding the epidemiology of tuberculosis

Respirology, 2004, 9,3,313-319

80. NIEMANN S., RICHTER E., RÜSCH-GERDES S.

Stability of *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns and Spoligotypes Determined by Drug- Resistant Tuberculosis.

J. Clin. Microbiol., 1999,37,2,409-412

81. NIEMANN S., RÜSCH-GERDES S., RICHTER E., THIELEN H., HEYKES6UDEN H., DIEL R.

Stability of IS6110- Restriction Fragment Length Polymorphism patterns of *Mycobacterium tuberculosis* strains in actual chains of transmission.

J. Clin. Microbiol., 2000,38,7,2563-2567

82. OTAL I., SAMPER S., ASENSIO M.P., VITORIA M.A., RUBIO M.C., GOMEZ-LUZ R., MARTIN C.

Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures.

J. Clin. Microbiol., 1991,29,6,1252-1254

83. OTAL I., MARTIN C., VINCENT-LEVY-FREBAULT V., THIERRY D., GICQUEL B.

Restriction Fragment Length Polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis.

J. Clin. Microbiol., 1999,37,2,409-412

84. PATNAIK M., LIEGMANN K., PETER J.B.

Rapid detection of smear-negative *Mycobacterium tuberculosis* by PCR and sequencing for rifampicin resistance with DNA extracted directly from slides.

J. Clin. Microbiol., 2001,39,1,51-52

85. PROD'HOM G., GUILHOT C., GUTIERREZ M.C., VARNEROT A., GICQUEL B., VINCENT V.

Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by Ligation-Mediated PCR fingerprinting analysis.

J. Clin. Microbiol., 2001,35,12,3331-3334

86. QUITUGUA T.N., SEAWORTH B.J., WEIS S.E., TAYLOR J.P., GILLETTE J.S., ROSAS I.I., JOST C., MAGEE D.M., COX R.A.

Transmission of drug-resistant tuberculosis in Texas and Mexico.

J. Clin. Microbiol., 2002,40,8,2716-2724

87. RADHAKRISHNAN I., MANJU Y.K., KUMAR R.A., MUNDAYOOR S.

Implications of low frequency of IS6110 in fingerprinting field isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Kerala, India.

J. Clin. Microbiol., 2001,39,4,1683

88. RASOLOFO-RAZANAMPARANY V.,RAMAROKOTO H., AUREGAN G., GICQUEL B., CHANTEAU S.

A combination of two genetic markers is sufficient for Restriction Fragment Length Polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex in areas with a high incidence of tuberculosis.

J. Clin. Microbiol., 2001, 39,4,1530-1535

89. RICHTER E., WEIZENEGGER M., RUSCH-GERDES S., NIEMANN S.

Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates.

J. Clin. Microbiol., 2003, 41,6,2672-2675

90. RICHTER E., WEIZENEGGER M., FAHR A.M., RUSCH-GERDES S.

Usefulness of the Genotype MTBC assay for differentiating species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in cultures obtained from clinical specimens.

J. Clin. Microbiol., 2004, 42,9,4303-4306

91. RUIZ M., RODRIGUEZ J.C., RODRIGUEZ-VALERA F., ROYO G.

Amplified-Fragment Length Polymorphism as a complement to IS6110-based Restriction Fragment Length Polymorphism analysis for molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis*.

J. Clin. Microbiol., 2003,41,10,4820-4822

92. SAHADEVAN R., NARAYANAN S., PARAMASIVAN C.N., PRABHAKAR R., NARAYANAN P.R.

Restriction Fragment Length Polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of Direct-Repeat probe.

J. Clin. Microbiol., 1995,33,11,3037-3039

93. SALMERON S., DUROUX P., VALEYRE D.

Tuberculose et mycobactérioses non tuberculeuses pulmonaires

Le livre de l'interne- Pneumologie

Paris : Flammarion, 1997 : 825

94. SAVINE E., WARREN R.M., VAN DER SPUY G.D., BEYERS N., VAN DEN HELDEN P.D., LOCHT C., SUPPLY P.

Stability of Variable Number Tandem Repeats of Mycobacterial Interspersed Repetitive Units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*.

J. Clin. Microbiol., 2002, 40,12,4561-4566

95. SCHOH O.D., PFYFFER G.E., BUHL D., PAKY A.

False-positive *Mycobacterium tuberculosis* culture revealed by restriction fragment length polymorphism analysis.

Infection. 2003,31,3,189-191

96. SCOTT A.N., MENZIES D., TANNENBAUM T.N., THIBERT L., KOZAK R., JOSEPH L., SCHWARTZMAN K., BEHR M.A.

Sensitivities and specificities of spoligotyping and mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing methods for studying molecular epidemiology of tuberculosis.

J. Clin. Microbiol., 2005,43,1,89-94

97. SINGH S.P., SALAMON H., LAHTI C.J., FARID-MOYER M., SMALL P.M.

se of pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiologic and population genetic studies of *Mycobacterium tuberculosis*.

J. Clin. Microbiol., 1999,37,6,1927-1931

98. SINGH S.K., VERMA R., SHAH D.H.

Molecular fingerprinting of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India by restriction fragment length polymorphism (RFLP).

J. Vet. Sci., 2004,5,4,331-335

99. SOCIETE DE PNEUMOLOGIE DE LANGUE FRANCAISE

Recommandations de la société de pneumologie de langue française pour la prise en charge de la tuberculose en France.

Rev. Mal. Respir., 2004,21,3,3S3-3S104

100. SOLA C., FILLIOL I., MAISETTI J., CARBONNELLE B., RASTOGI N ;

Epidemiological study of tuberculosis in the area of Angers, France, as studied by 3 PCR-based fingerprinting methods.

Pathol. Biol., 2003,51,1,13-20

- 101. SOLA C., HORGEN L., MAÏSETTI J., DEVALLOIS A., GOH K.S., RASTOGI N.**
 Spoligotyping followed by double-repetitive-element PCR as rapid alternative to IS6110
 fingerprinting for epidemiological studies of tuberculosis.
 J. Clin. Microbiol., 1998, 36,4,1122-1124
- 102. SREEVATSAN S., PAN X., STOCKBAUER K.E., CONNELL N.D.,
 KREISWIRTH B.N., WHITTAM T.S., MUSSER J.M.**
 Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex
 indicates evolutionarily recent global dissemination
 Proc Natl Acad Sci USA, 1997,94,18,9869-9874
- 103. SUN Y.J., BELLAMY R., LEE A.S.G., NG S.T., RAVINDRAN S., WONG S.Y.,
 LOCHT C., SUPPLY P., PATON N.I.**
 Use of Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable- Number Tandem Repeat Typing
 to examine genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore
 J. Clin. Microbiol., 2004,42,5,1986-1993
- 104. SUN Y.J., LEE A.S., NG S.T., RAVINDRAN S., KREMER K., BELLAMY R.,
 WONG S.Y., VAN SOOLINGEN D., SUPPLY P., PATON N.I.**
 Characterization of ancestral *Mycobacterium tuberculosis* by multiple genetic markers and
 proposal of genotyping strategy.
 J. Clin. Microbiol., 2004,42,11,5058-5064
- 105. SUPPLY P., MAZARS E., LESJEAN., VINCENT V., GICQUEL B., LOCHT C.**
 Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome.
 Mol. Microbiol., 2000,36,3,762-771
- 106. SUPPLY P., LESJEAN S., SAVINE E., KREMER K., VAN SOOLINGEN D.,
 LOCHT C.**
 Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium
 tuberculosis* based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units
 J. Clin. Microbiol., 2001,39,10,3563-3571
- 107. SYNTHÈSE ET RECOMMANDATIONS DU GROUPE DE TRAVAIL DU
 CONSEIL SUPÉRIEUR D'HYGIÈNE PUBLIQUE EN FRANCE (2002-2003)**
 Prévention et prise en charge de la tuberculose en France
 Rev. Mal. Respir., 2003,20,2,7S3-7S106
- 108. TANAKA M.M., SMALL P.M., SALAMON H., FELDMAN M.W.**
 The dynamics of repeated elements: applications to the epidemiology of tuberculosis
 Proc Natl Acad Sci USA, 2000,97,7,3532-3537
- 109. TANAKA M.M., ROSENBERG N.A., SMALL P.M.**
 The control of copy number of IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*
 Mol Biol Evol., 2004,21,12,2195-2201
- 110. THIERRY D., BRISSON-NOËL A., VINCENT-LEVY-FREBAULT V., NGUYEN
 S., GUESDON J.L., GICQUEL B.**
 Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its
 application in diagnosis.
 J. Clin. Microbiol., 1990,28,12,2668-2673

111. TORREA G., OFFREDO C., SIMONET M., GICQUEL B., BERCHE P., PIERRE-AUDIGIER C.

Evaluation of tuberculosis transmission in a community by 1 year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates.

J. Clin. Microbiol., 1996,34,5,1043-1049

112. TOUNGOUSOVA O.S., SANDVEN P., MARIANDYSHEV A.O., NIZOVTSOVA N.I., BJUNE G., CAUGANT D.A.

Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the archangel Oblast, Russia.

J. Clin. Microbiol., 2002, 40,6,1930-1937

113. VAN DER SPUY G.D., WARREN R.M., RICHARDSON M., BEYERS N., BEHR M.A., VAN HELDEN P.D.

Use of genetic distance as a measure of ongoing transmission of *Mycobacterium tuberculosis*.

J. Clin. Microbiol., 2003,41,12,5640-5644

114. VAN EMBDEN J. D. A., CAVE M. D., CRAWFORD J. T., DALE J. W., EISENACH K. D., GICQUEL B., HERMANS P., MARIN C., MC ADAM R., SHINNICK T. M., SMALL P. M.

Strain Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Fingerprinting:

Recommendations for a Standardized Methodology.

J. Clin. Microbiol., 1993,31,2,406-409

115. VAN SOOLINGEN D., HERMANS P. W. M., DE HAAS P.E.W., SOLL D. R., VAN EMBDEN J. D. A.

Occurrence and Stability of Insertion Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis.

J. Clin. Microbiol., 1991,29,11,2578-2586

116. VAN SOOLINGEN D., PETRA E., DE HAAS W., HERMANS P.W.M., GROENEN P.M.A., VAN EMBDEN J.D.A.

Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*

J. Clin. Microbiol., 1993,31,8,1987-95

117. VAN SOOLINGEN D., DE HAAS P.E., HAAGSMA J., EGER T., HERMANS P.W., RITACCO V., ALITO A., VAN EMBDEN J.D.

Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis.

J. Clin. Microbiol., 1994,32,10,2425-2433

118. VAN SOOLINGEN D., DE HAAS P.E.W., BLUMENTHAL R.M., KREMER K., SLUIJTER M., PIJNENBURG J.E. M., SCHOULS L.M., THOLE J.E.R., DESSENS-KROON M.W.G., VAN EMBDEN J.D.A., HERMANS P.W.M.

Host-Mediated Modification of *Pvu*II Restriction in *Mycobacterium tuberculosis*.

J. Bacteriol., 1996,178,78-84

119. VAN SOOLINGEN D., ALITO A., MORCILLO N.

Stability of IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism Patterns of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains

J. Clin. Microbiol., 1999,37,9,3078-3079

120. VAN SOOLINGEN D.

Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements.

J. Int. Med., 2001,249,1-26

121. VINCENT V., GUTTIEREZ C.

Principe et intérêt du typage moléculaire appliqué à *Mycobacterium tuberculosis*

Rev. Franç. Labo., 2000,30,25-30

122. VINCENT V., RASTOGI N.

Apport de la biologie moléculaire en mycobactériologie

In Précis de Bactériologie Clinique

ESKA 2000,1095-1106

123. WARREN R., RICHARDSON M., SAMPSON S., HAUMAN J.H., BEYERS N., DONALD P.R., VAN HELDEN P.D.

Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* with additional markers enhances accuracy in epidemiological studies.

J. Clin. Microbiol., 1996,34,9,2219-2224

124. WARREN R.M., VAN DER SPUY G.D., RICHARDSON M., BEYERS N., BOOYSEN C., BEHR M.A., VAN HELDEN P.D.

Evolution of the IS6110-based Restriction Fragment Length Polymorphism pattern during the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*.

J. Clin. Microbiol., 2002, 40,4,1277-1282

125. WARREN R.M., VICTOR T.C., STREICHER E.M., RICHARDSON M., VAN DER SPUY G.D., JOHNSON R., CHIHOTA V.N., LOCHT C., SUPPLY P., VAN HELDEN P.D.

Clonal expansion of a globally disseminated lineage of *Mycobacterium tuberculosis* with low IS6110 copy numbers.

J. Clin. Microbiol., 2004, 42,12,5774-5782

126. WORLD HEALTH ORGANISATION

Tuberculose

Aide mémoire n°104, 2005

127. YANG Z.H., IJAZ K., BATES J.H., EISENACH K.D., CAVE M.D.

Spoligotyping and polymorphic GC-rich repetitive sequence fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains having few copies of IS6110.

J. Clin. Microbiol., 2000,38,10,3572-3576

128. YATES M.D., DROBNIEWSKI F.A., WILSON S.M.

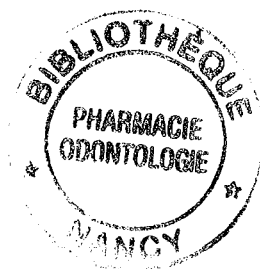
Evaluation of a rapid PCR-based epidemiological typind method for routine studies of *Mycobacterium tuberculosis*
J. Clin. Microbiol., 2002,40,2,712-714

129. ZHANG Y., MAZUREK G.H., CAVE M.D., EISENACH K.D., PANG Y., MURPHY D.T., WALLACE R.J.

DNA polymorphisms in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analyzed by pulsed-field gel electrophoresis: a tool for epidemiology.
J. Clin. Microbiol., 1992,30,6,1551-1556

130. ZHANG Y., YAKRUS M.A., GRAVISS E.A., WILLIAMS-BOUYER N., TURENNE C., KABANI A., WALLACE R.J.,

Pulsed-field gel electrophoresis study of *Mycobacterium abscessus* isolates previously affected by DNA degradation.
J. Clin. Microbiol., 2004,42,12,5582-5587



EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA TUBERCULOSE : ETUDE DES SOUCHES DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* PAR LA TECHNIQUE IS6110-RFLP

Thèse soutenue le 28 Juin 2005

Par Carole DESCHASEAUX ép LEBEL

RESUME

L'épidémiologie actuelle de la tuberculose indique que cette pathologie est encore bien présente, notamment dans les pays en voie de développement. Le typage moléculaire des souches de *Mycobacterium tuberculosis* apporte de nombreux renseignements et joue un rôle primordial dans la lutte contre la tuberculose ; il complète les enquêtes épidémiologiques classiques. Différents marqueurs peuvent être utilisés comme cibles. Ces techniques de biologie moléculaire permettent d'établir des liens entre les souches cliniques isolées chez différents patients, de mieux comprendre la part réelle de la transmission active de la tuberculose par rapport au phénomène de réactivation, de mettre en évidence des infections nosocomiales ou encore des contaminations de laboratoire. Parmi les différentes techniques disponibles à ce jour, L'IS6110-RFLP est la méthode de référence. De plus, elle est standardisée et constitue la technique la plus discriminante.

L'IS6110-RFLP est basée sur la présence d'une séquence d'insertion en nombres et en positions variables. Après extraction de l'ADN bactérien, celui-ci est digéré par une enzyme qui clive le génome au niveau des séquences IS6110. Les fragments ainsi générés sont séparés puis transférés par Southern Blot sur une membrane où ils sont hybridés à l'aide d'une sonde marquée à la peroxydase qui reconnaît une partie de la séquence IS6110. Après révélation des films obtenus, les profils des souches sont observés sous forme de bandes, leur nombre et leurs positions sont caractéristiques. Les profils sont comparés et des clusters correspondant à des souches apparentées sont établis.

Nous avons étudiées des souches isolées au CHU et nous avons pu établir l'existence de liens notamment familiaux : plusieurs membres d'une même famille présentaient des profils identiques. Nous avons également observé des cas de réactivation d'une souche endogène chez des patients qui présentaient deux épisodes de tuberculose à plusieurs années d'intervalle. Chez d'autres patients, la même souche de *Mycobacterium tuberculosis* était présente au niveau de différents organes. Cette technique un peu lourde à mettre en œuvre nous a permis d'étudier toutes les souches dont nous disposions, elle peut désormais être utilisée au quotidien au laboratoire.

MOTS CLES : *Mycobacterium tuberculosis*- IS-6110- RFLP- épidémiologie

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
Dr M. DAILLOUX	Laboratoire de Bactériologie Hôpital de Brabois (CHRU) 54500 Vandoeuvre les Nancy	Expérimentale	<input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique	<input type="checkbox"/>
		Thème	<input type="checkbox"/>

Thèmes

1- Sciences fondamentales
3- Médicament
5- Biologie

2- Hygiène/Environnement
4- Alimentation – Nutrition
6- Pratique professionnelle