

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Saâd Dahleb Blida**  
**Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques**



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme  
de Master Recherche en Biologie  
Option : Génétique et Physiologie.

*Thème :*

---

---

***Typage moléculaire par Spoligotyping des souches de  
Mycobacterium tuberculosis isolées au niveau de la région est de  
l'Algérie***

---

---

Présenté par :

*M<sup>r</sup> Kaïdi Saïd*

Soutenu le : 19 décembre 2012, devant le jury composé de :

<i>M<sup>elle</sup> Rahim I.</i>	<i>Maitre assistante</i>	<i>FSAVB, USDB</i>	<i>Présidente</i>
<i>M<sup>elle</sup> Cherrallah A.</i>	<i>Maitre assistante</i>	<i>FSAVB, USDB</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>M<sup>r</sup> Bessaad M. A.</i>	<i>Maitre assistant</i>	<i>FSAVB, USDB</i>	<i>Examineur</i>
<i>M<sup>me</sup> Boulahbal F.</i>	<i>Professeur</i>	<i>IP Alger</i>	<i>Promotrice</i>
<i>M<sup>me</sup> Ifticene M.</i>	<i>Médecin Microbiologiste</i>	<i>IP Alger</i>	<i>Co-promotrice</i>



## Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement et infiniment M<sup>me</sup> F. Boulahbal, professeur de microbiologie à l'université d'Alger et chef de service du laboratoire de la tuberculose et des mycobactéries à l'Institut Pasteur d'Algérie, de nous avoir accueilli très chaleureusement et accepter la réalisation de ce travail en prenant le soin de l'encadrer et de le suivre, je tiens à vous présenter mes sincères respects et mon profond témoignage de reconnaissance.

Je remercie également M<sup>me</sup> M. Ifticene, médecin microbiologiste-chercheur, chef d'unité biologie moléculaire au laboratoire de la tuberculose et des mycobactéries à l'Institut Pasteur d'Algérie, pour avoir accepté l'encadrement et le suivi de ce travail, je tiens à vous présenter mes sincères respects et mon profond témoignage de reconnaissance.

Je remercie M<sup>elle</sup> I. Rahim, maître assistante, enseignante-chercheur à la FSAVB, l'USDB d'avoir accepté et fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie également, M<sup>elle</sup> A. Cherrallah et M<sup>r</sup> M. A. Bessaâd, maîtres assistants enseignants-chercheurs à la FSAVB, l'USDB, d'avoir accepté de faire partie des membres du jury et d'examiner ce travail.

Je remercie l'ensemble du personnel des différents services de l'IPA, et en particulier du laboratoire de la tuberculose et des mycobactéries.

Je remercie tous le personnel de l'USDB, enseignants et autres pour leur aide.

Je tiens à remercier très particulièrement M<sup>r</sup> M. Oumouna, maître de conférences enseignant-chercheur à la FSAVB, USDB, pour sa précieuse aide, en lui présentant tout mes sincères respects.

Je remercie très particulièrement M<sup>r</sup> R. Mohamed-Saïd, responsable de notre master, enseignant-chercheur à la FSAVB, USDB, pour sa précieuse aide, en lui présentant tout mes sincères respects.

Je tiens aussi à remercier toute personne ayant mis confiance en moi et en mes capacités.

Saïd Kaïdi.

---

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à toute ma famille.*

*Aux personnes qui m'ont connu et côtoyer.*

*Aux personnes qui méritent bien mon respect.*

*Saïd Kaïdi.*

---

# *Sommaire*

---

## Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Sommaire	
Liste d'abréviations	
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>I.    Rappels bibliographiques</b>	<b>3</b>
I.1. Définition	3
I.2. Historique	3
I.3. Agent responsable	3
Morphologie	3
Paroi cellulaire	3
Tuberculo-protéines	3
I.4. Taxonomie	4
I.4.1. Complexe	4
I.4.2. Mycobactéries atypiques	4
I.5. Physiopathologie et histoire naturelle	6
Histoire naturelle de la tuberculose	6
Mode de contamination et source d'infection	6
Facteurs favorisant l'infection tuberculeuse	6
I.6. Génomique et Epidémiologie	8
I.6.1 Génomique de la tuberculose	8
I.6.2. Meilleure compréhension de l'histoire naturelle de la tuberculose	8
I.6.3. Epidémiologie de la tuberculose	10
a. La tuberculose dans le monde	10

---

---

b. La tuberculose en Algérie	14
I.7. Diagnostic :	15
I.7.1. Clinique :	15
Signes cliniques	15
Signes de la tuberculose pulmonaire Maladie	15
I.7.2. Radiologique	16
Signes radiologiques	16
Primo-infection	16
Cas de la tuberculose pulmonaire commune	16
Imagerie actuelle de la tuberculose pulmonaire chez le non-immunodéprimé	16
Formes extrapulmonaires	16
I.7.3. Autres tests :	18
IDR à la tuberculine : performance diagnostique	18
Les examens sérologiques de la tuberculose	18
I.7.4. Bactériologie	18
L'examen direct	18
i. Microscopique	20
ii. Culture	21
iii. Etude de sensibilité des antibiotiques antituberculeux	22
I.8. Traitement	24
Traitement antituberculeux	24
Observance thérapeutique	25
Bacille de Koch résistant	25
BK multirésistants	25
La tuberculose ultrarésistance	26
I.9. Résistance, susceptibilité génétique de l'homme et tuberculose latente :	26
I.10. Prévention :	27
La vaccination BCG	27
I.11. La biologie moléculaire et la tuberculose :	27
I.11.1. Les méthodes rapides de détection de <i>M. tuberculosis</i>	28
• Amplification génique :	28
Amplification par PCR :	28
Amplification de l'ARN par TMA :	28

---

---

Amplification par LCR :	28
Amplification par SDA :	28
Les puces à ADN :	28
I.11.2. Identification des mycobactéries	29
I.11.3. Détection de la résistance aux antibiotiques	31
I.11.4. Utilisation de l'épidémiologie moléculaire pour la compréhension de la pathogénicité et la transmission de la tuberculose	31
Outils génétiques de l'épidémiologie moléculaire	31
a. Spoligotyping	31
b. Le typage MIRU-VNTR	32
c. Méthode RFLP IS6110	32
<b>II. Matériels et méthodes</b>	<b>35</b>
II.1. Matériels	35
II.2. Méthodes	36
II.2.1. Diagnostic bactériologique	36
II.2.2. Technique de typage par Spoligotyping	36
1. Le choix de la technique	36
2. Principe de la méthode Spoligotyping	36
3. Procédure et étape de la technique du Spoligotyping	39
<b>III. Résultats et discussion</b>	<b>43</b>
III.1. Résultats	43
III.1.1. Nature des prélèvements	43
III.1.2. Distribution géo-démographique	43
1. Répartition selon le sexe et les wilayates	43
2. Répartition selon l'âge et le sexe	43
III.1.3. Résultats du test de sensibilité	44
III.1.4. Résultats du typage par spoligotyping	46
III.2. Discussion	53
III.2.1. Observation selon le sexe	53
III.2.2. observation épidémiologiques en fonction des tranches d'âges	53
III.2.3. Observations épidémiologiques selon les wilayates	54
III.2.4. Observation épidémiologiques par rapport aux résistances	56
III.2.5. Comparaison des résultats de notre étude avec certaines	

---

régions du bassin méditerranéen	58
III.2.6. Comparaison de nos résultats avec d'autres études en Algérie	59
III.2.7. Récapitulatif des comparaisons réalisées	60
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>61</b>
Références	
Annexes	
Glossaire	

---

# *Abréviations*

## Liste d'abréviations

<b>AA :</b>	Acides aminés
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique.
<b>ARNm :</b>	Acide ribonucléique messager
<b>ATB :</b>	Antibiotique
<b>BAAR :</b>	bacille acido-alcool-résistant
<b>BCG :</b>	Bacille de Calmette et Guérin
<b>BK :</b>	Bacille de Koch
<b>CHU :</b>	Centre hospitalo-universitaire
<b>CMI :</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>C+ :</b>	culture positive seulement
<b>Da :</b>	Dalton
<b>dNTP :</b>	désoxyribonucléotides triphosphates
<b>DOT :</b>	Directly Observed Therapy
<b>DOTS</b>	Directly Observed Treatment Short
<b>DR :</b>	Direct Repeat
<b>DVR :</b>	Directe Variant Repeat
<b>ECL :</b>	enhanced chemiluminescence (chimioluminescence amplifiée)
<b>ED :</b>	Examen Direct
<b>EMB :</b>	Éthambutol
<b>EPH :</b>	Établissements publics hospitaliers
<b>EPSP :</b>	Établissements publics de santé de proximité
<b>FQ :</b>	Fluoroquinolone
<b>H :</b>	Famille génomique Harleem
<b>IDR :</b>	Intradermoréaction à la tuberculine
<b>IM :</b>	Intramusculaire
<b>INH :</b>	Isoniazide
<b>ITL :</b>	Infection tuberculeuse latente
<b>IV :</b>	Intraveineux
<b>j :</b>	Jour
<b>LAM</b>	Famille génomique Latino-Américano-Méditerranéen
<b>LCR :</b>	Liquide céphalo-rachidien
<b>LCR :</b>	Amplification Ligase Chain Reaction (LCR)
<b>L-J ou LJ :</b>	Löwenstein - Jensen
<b>Mb :</b>	Million de bases
<b>MIRU-VNTR :</b>	Mycobacterial Interspered Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeats
<b>MDR :</b>	tuberculose multi-résistance ou Multi Drug Resistance
<b>MNT :</b>	mycobactéries non tuberculeuses
<b>MR :</b>	Multirésistance
<b>MTb :</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>M. bovis :</b>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<b>M. tuberculosis :</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>M+ :</b>	microscopie positive
<b>M0 :</b>	microscopie négative
<b>M? :</b>	microscopie non faite ou résultat inconnu.

<b>P :</b>	Patient
<b>PAS :</b>	Acide para-amino-salicylique.
<b>Pb :</b>	paires de bases
<b>PCR :</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PM :</b>	Poids moléculaire
<b>PO :</b>	per os
<b>PZA :</b>	Pyrazinamide.
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ORP :</b>	Orphelin
<b>S :</b>	Famille génomique Sardigne-Sicile
<b>SDA :</b>	Amplification par Strand Displacement Amplification (SDA).
<b>SDS :</b>	Sodium Dodecyl Sulfate
<b>ST :</b>	Spoligotype
<b>STR :</b>	Streptomycine
<b>RD :</b>	régions de différence
<b>RFLP :</b>	polymorphisme de longueur des fragments de restriction
<b>RMP :</b>	Rifampicine
<b>T :</b>	Famille génomique T
<b>TB :</b>	Tuberculose
<b>TBE :</b>	Tris/Borate/EDTA
<b>TE :</b>	Tris/EDTA
<b>TEP :</b>	tuberculose extrapulmonaire
<b>TMA :</b>	Amplification par Transcription Mediated Amplification TMA.
<b>TPC+ :</b>	tuberculose pulmonaire à culture positive
<b>TPM+ :</b>	tuberculose pulmonaire à microscopie positive
<b>TPM0 :</b>	tuberculose pulmonaire à microscopie négative
<b>U :</b>	Famille génomique Ukraine
<b>TPM? :</b>	tuberculose pulmonaire à microscopie faite ou résultats inconnu
<b>VIH :</b>	Virus d'immunodéficience humaine
<b>XDR :</b>	tuberculose ultrarésistante

---

# *Introduction*

## Introduction :

La tuberculose est une maladie infectieuse contagieuse, transmise par voie aérienne, due à un ensemble de mycobactéries appartenant au complexe *tuberculosis* [1]. Les origines évolutives de *Mycobacterium tuberculosis* sont incertaines ; la tuberculose peut avoir son origine chez l'homme préhistorique comme une infection zoonotique transmise par les animaux tuberculeux [2].

Les facteurs clés de la lutte contre la tuberculose sont la détection rapide, un traitement adéquat et la recherche de marqueurs pour barrer à d'éventuelle transmission ultérieure [3].

Les principaux objectifs de lutte contre la tuberculose aux niveaux communautaire et individuel sont d'identifier les bactéries responsables de l'infection et de traiter les personnes infectées [4].

Néanmoins, il est essentiel de maîtriser et lutter contre cette maladie en surveillant les souches identifiées comme étant la source de l'infection et donc différencier entre elles [4].

De ce besoin crucial, l'épidémiologie moléculaire est née. Elle est devenue un champ de recherche important dans la science des mycobactéries tuberculeuses au cours des 20 dernières années [4].

Ce domaine scientifique correspond à l'interprétation des données moléculaires dans des études épidémiologiques classiques [4, 5].

Cette discipline fournit des outils pour les cliniciens, les microbiologistes et les épidémiologistes, pour enquêter sur les infections [4].

En effet, l'épidémiologie moléculaire est essentielle pour l'étude de la propagation des épidémies, à l'analyse de la dynamique de transmission, et de déterminer les facteurs de risque de transmission de la tuberculose dans une communauté [4].

Elle joue un grand rôle dans la distinction entre l'infection ou la réinfection exogène et une réactivation endogène. En laboratoire, elle peut également être utilisée pour identifier la contamination croisée [4].

En outre, des outils moléculaires ont fourni des marqueurs en mesure d'identifier les mutations génétiques spécifiques correspondant aux différentes résistances aux médicaments. Le géotypage détermine si le développement de la résistance aux médicaments chez un patient au cours du traitement antituberculeux est causé par la même souche ou par une autre souche due à une réinfection exogène. Concernant la virulence et des études de pathogenèse, l'épidémiologie moléculaire a déjà prouvé sa pertinence pour atteindre un aperçu de la capacité de la souche à être pathogène ou résistante aux médicaments [4].

Enfin, cette discipline devient fondamentale pour l'élaboration de stratégies pour le traitement et la prévention des maladies [4].

Par conséquent, il convient de noter que, pour l'interprétation des résultats d'épidémiologie moléculaire, il est important de considérer non seulement l'ensemble des données cliniques, biologiques et épidémiologiques enregistrées chez des patients tuberculeux, mais aussi phénotypique, biologiques et des données épidémiologiques concernant les isolats de *Mycobacterium tuberculosis* (nécessitant un antibiogramme, le génotypage et la culture) [4].

Dans ce travail, la principale tâche est de passer en revue les différents aspects épidémiologiques pour lesquelles l'épidémiologie moléculaire réalisée dans cette étude peut améliorer ainsi la compréhension de la transmission et la pathogenèse des *Mycobacterium tuberculosis* [6].

Il se repose sur le typage moléculaire par Spoligotyping des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées de patients tuberculeux originaire de l'est de l'Algérie.

Cette étude est réalisée au Laboratoire National de Référence de la Tuberculose et des Mycobactéries, à l'Institut Pasteur d'Algérie (P<sup>F</sup> F. BOULAHBAL).

Les objectifs attendus sont :

- La détermination des profils génétiques et de la diversité des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées dans la région est de l'Algérie.
- L'évaluation de l'ampleur de certaines souches.
- La constitution d'une base de données sur les souches de *Mycobacterium tuberculosis* circulant en Algérie, afin de les comparer entre elles.
- La distinction des potentialités et des caractéristiques de ces bacilles et des populations et l'interrelation entre eux.

*Rappels*  
*Bibliographiques*

## I. Rappel bibliographiques :

### I.1. Définition :

La tuberculose est une maladie infectieuse et contagieuse à transmission essentiellement interhumaine liée aux mycobactéries du complexe tuberculosis, la maladie qui se transmet à partir d'un sujet contagieux à un sujet indemne. Le poumon est la localisation la plus fréquente de la tuberculose : atteinte isolée dans 80 % des cas, ou associée à une atteinte extrapulmonaire dans 10 % des cas [7, 8]. L'agent responsable est souvent *Mycobacterium tuberculosis* (bacille de Koch, BK). L'homme est le seul réservoir, mais une autre espèce *Mycobacterium bovis* peut être responsable de rares cas de tuberculose humaine [9].

### I.2. Historique :

Entre 1876 - 1882 le microbiologiste allemand Robert Koch explore la théorie de germe de la maladie, invente une méthode pour une croissance en culture pure, et découvrit la cause de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) [10], qu'il isola en 1882 et on la dénomma depuis bacille de Koch : BK [9].

### I.3. Agent responsable :

La tuberculose est une maladie infectieuse provoquée par la multiplication de bactéries du genre *Mycobacterium*. La principale bactérie responsable de l'affection est *Mycobacterium tuberculosis* [9]. Cette espèce appartient aux **mycobactéries tuberculeuses** et constituent le «**complexe tuberculosis**» [1, 9].

Morphologie :

Les BK sont des cellules en formes de tiges minces acido-résistantes, d'une largeur de 0.4  $\mu\text{M}$ , et une longueur de 3 - 4  $\mu\text{M}$ , non sporulée (figure 2) [11]. La taille du génome bactérien du BK est de 4.41 Mb [10, 12] ou un contenu élevé en guanine et en cytosine (GC %) de l'acide ribonucléique, compris entre 61 et 71 % est observé (figure 5) [1].

Paroi cellulaire :

Plusieurs caractéristiques du BK sont attribuées à la constitution chimique de sa paroi, une couche muréique, de nombreux lipides et d'autres glycolipides (ex : lipoarabinogalactane), l'acide mycolique, des mycosides, et de la D-cire [11].

Tuberculo-protéines :

- Immunogènes : le plus important d'eux est la protéine de PM de 65 kDa.
- Tuberculine : La tuberculine partiellement purifiée contient un mélange de petites protéines (PM de 10 kDa), la tuberculine est employée pour déterminer l'effet de TB par le biais d'une réaction allergique retardée (voir le test d'IDR) [11].

#### I.4. Taxonomie :

Le phylum Actinobacteria est la catégorie taxonomique incluant les bactéries Gram positives qui ont un pourcentage des bases G + C supérieur à 50 %. En amont, le branchement des actinomycètes filamenteux, les streptomycètes producteurs de spores, et les genres communs *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, et *Micrococcus* [13], le genre *Mycobacterium* appartient à la famille des Mycobacteriaceae (voir figure 1) [1, 11].

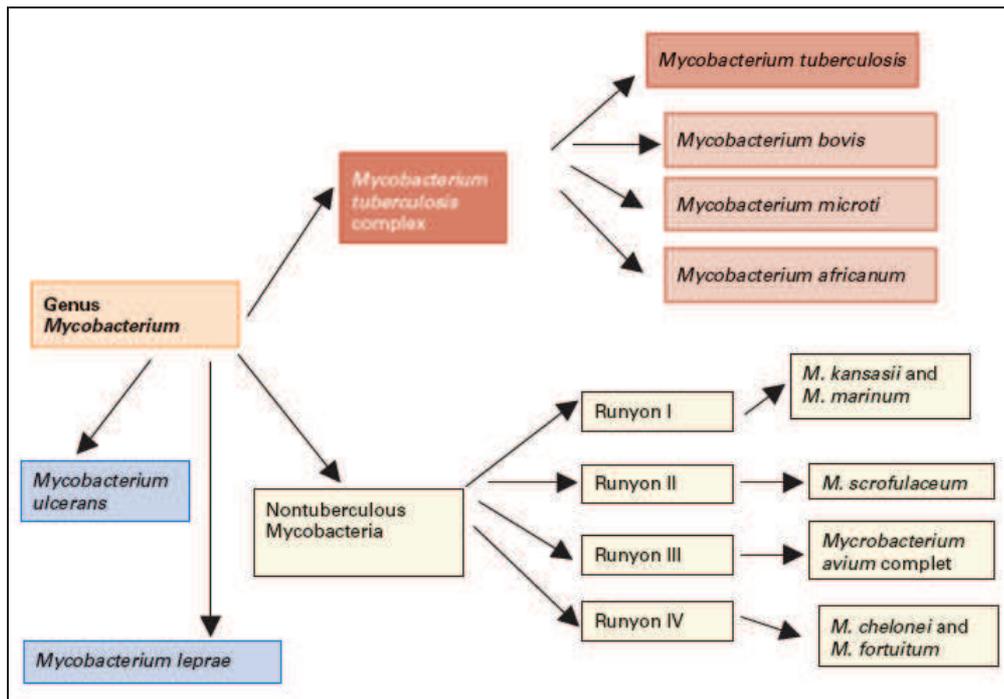
##### I.4.1. Complexe :

Le «**complexe tuberculosis**» est constitué de *Mycobacterium tuberculosis* [1, 9]. A cette espèce s'ajoutent *Mycobacterium bovis*, responsable de la tuberculose chez les bovidés domestiques ou sauvages ; il peut se transmettre de manière rare à l'homme par le biais du lait non pasteurisé ou non bouilli [9], *Mycobacterium africanum* en est une variété qui existe parfois en Afrique de l'Ouest et qui est souvent résistant au thioacétazone [9].

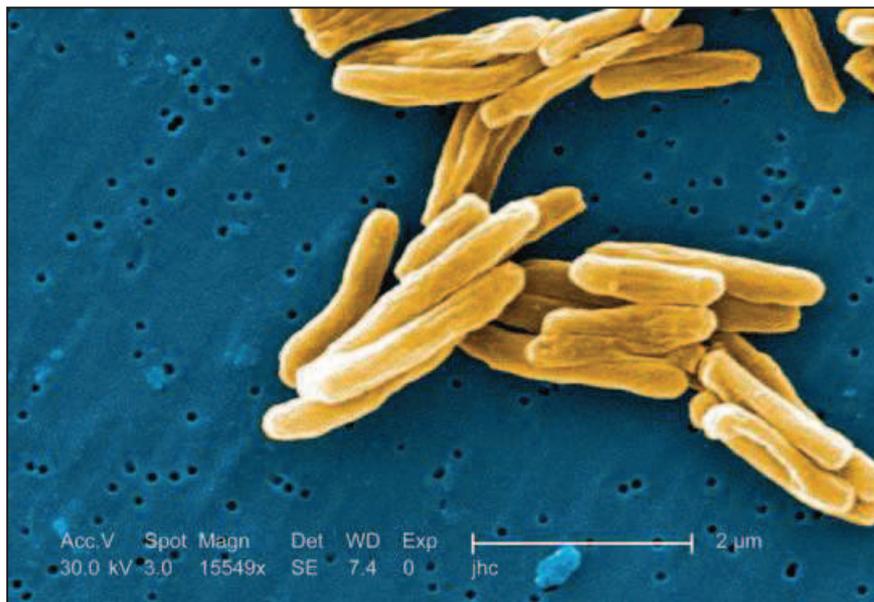
Les espèces *Mycobacterium canetti* (de description récente), *Mycobacterium microti* (pathogène pour le campagnol uniquement) et la souche BCG (souche vaccinale avirulente pour l'homme, mais à l'origine de rares complications post-vaccinales ou après immunothérapie) [1].

##### I.4.2. Mycobactéries atypiques :

Les mycobactéries non tuberculeuses ou mycobactéries atypiques sont souvent non pathogènes, mais peuvent parfois donner des manifestations cliniques (pulmonaires, osseuses, ganglionnaires ou cutanées) simulant ceux de la tuberculose. Ces mycobactéries opportunistes sont responsables d'affections surtout dans les pays de faible prévalence tuberculeuse et chez les malades immunodéprimés [9].



**Figure 1. :** Classification des mycobactéries [17].



**Figure 2. :** *Mycobacterium tuberculosis*, cellules en forme en tige (Grossissement x15500) [11].

## I.5. Physiopathologie et histoire naturelle :

### Histoire naturelle de la tuberculose :

L'histoire naturelle de la tuberculose, maladie infectieuse due au bacille de Koch (BK) transmissible par voie aérienne, conditionne la situation épidémiologique. Le risque d'infection d'un sujet exposé dépend essentiellement de facteurs extérieurs comme la richesse en bacilles émis par le malade, la proximité de celui-ci, la durée d'exposition et l'environnement. L'infection tuberculeuse ou primo-infection consécutive à l'inhalation du bacille est le plus souvent contrôlée à ce stade par une réaction immunitaire efficace et la seule trace de l'infection est une réaction tuberculinique positive [15] (diagnostic de la tuberculose), l'hypersensibilité retardée résultant de cette ITL mettrait environ 8 à 12 semaines avant de s'installer ; son caractère protecteur reste débattu [16]. À la suite de l'infection, la tuberculose va se développer en deux mécanismes distincts : par progression rapide de l'infection primaire, ou après une période de latence qui peut atteindre plusieurs dizaines d'années (figure 3) [15].

La probabilité d'évolution vers une tuberculose maladie à la suite d'une infection est d'environ 10 % pour le reste de la vie mais est maximale pendant les deux années qui suivent l'infection (5 %) [15] (figure 4). Ce risque varie en fonction des individus et est beaucoup plus élevé chez les jeunes enfants et chez les personnes en immunosuppression. Chez les personnes infectées par le VIH, ce risque serait de 8 à 10 % par an [15].

Mode de contamination et source d'infection :

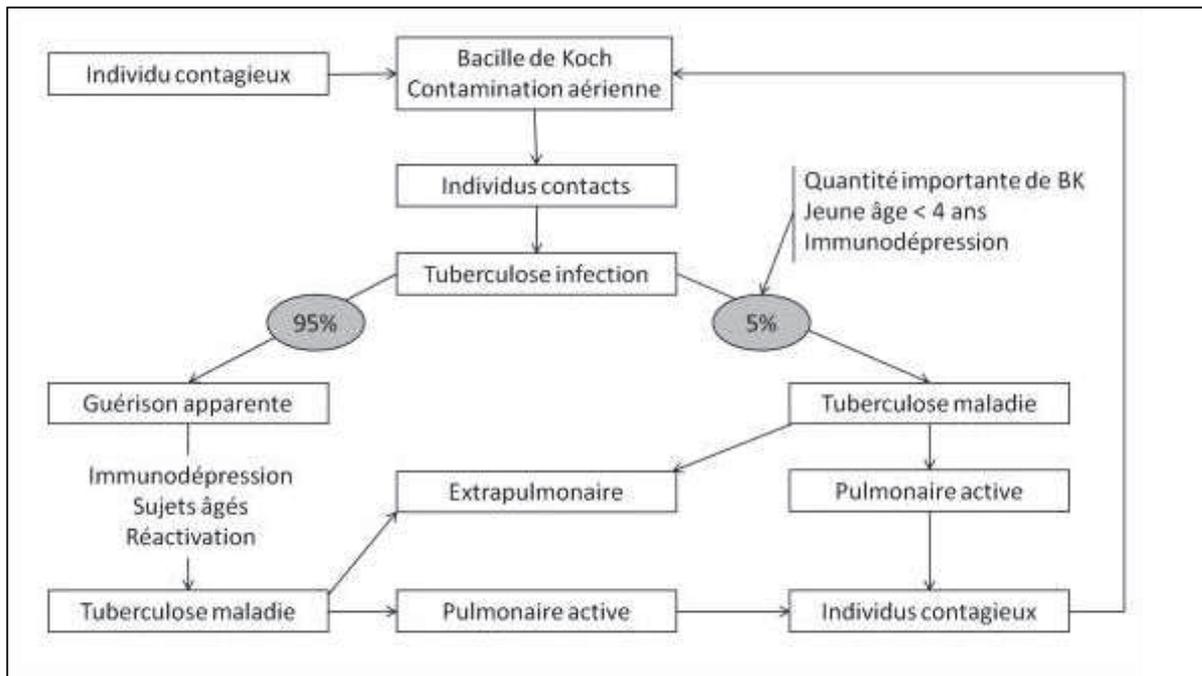
Ce sont les patients bacillifères qui sont à l'origine de la contamination, c'est-à-dire les patients dont l'examen direct de l'expectoration est positif, ce qui signifie qu'il existe au moins  $10^4$  bacilles/ml de sécrétion. C'est le plus souvent le cas des tuberculoses excavées sachant qu'une caverne contient de l'ordre de  $10^7$  à  $10^{10}$  bacilles, alors qu'une lésion caséuse ne contient que  $10^2$  à  $10^3$  bacilles (jusqu'à  $10^5$ )<sup>1</sup> [7, 9].

Facteurs favorisant l'infection tuberculeuse :

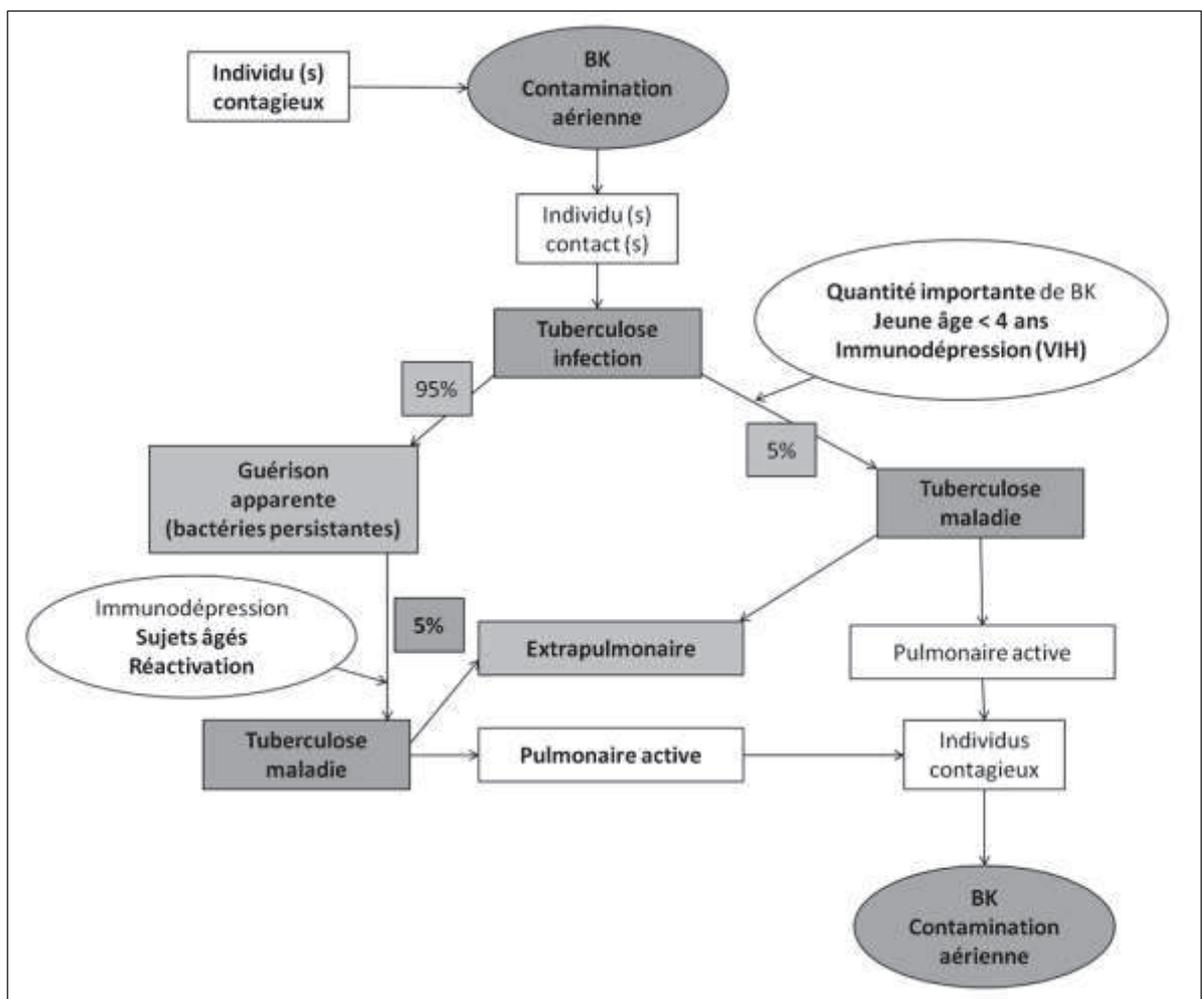
- la qualité et la quantité du régime alimentaire, le niveau d'hygiène. Chez l'homme, de nombreuses études montrent le lien entre nutrition et développement de la maladie comme ces études sur la vitamine D qui montrent que l'administration orale de vitamine D favorise la réaction immunitaire antituberculeuse [17].
- la co-infection VIH [17].
- le sexe : les hommes développent plus facilement la tuberculose en raison de facteurs biologiques, hormonaux et de susceptibilité génétique [17].

---

<sup>1</sup> La contagion est favorisée par la toux et les éternuements qui permettent de disperser dans l'air les particules infectantes : une quinte de toux disperse 3 500 particules, un éternuement un million de particules [7].



**Figure 3. :** Histoire naturelle de la tuberculose [10].



**Figure 4. :** Les différents étapes de la contamination à la tuberculose infection et à la tuberculose maladie et les facteurs associés participant à l'évolution de ces différentes étapes [15].

- Age [17].
- génétique de l'hôte : certains polymorphismes de gènes sont associés à une maladie tuberculeuse. Depuis le polymorphisme du gène NRAMP, qui code pour un transporteur du métal dans les cellules phagocytaires, d'autres polymorphismes ont été décrits, par exemple dans le récepteur de la vitamine D ou dans le promoteur du gène codant pour un récepteur du bacille [17].
- la virulence de la souche tuberculeuse : l'analyse génomique des bacilles tuberculeux a permis d'isoler des souches de génotypes différents dont la virulence est variable chez l'homme [17].

## I.6. Génomique et Epidémiologie :

### I.6.1. Génomique de la tuberculose :

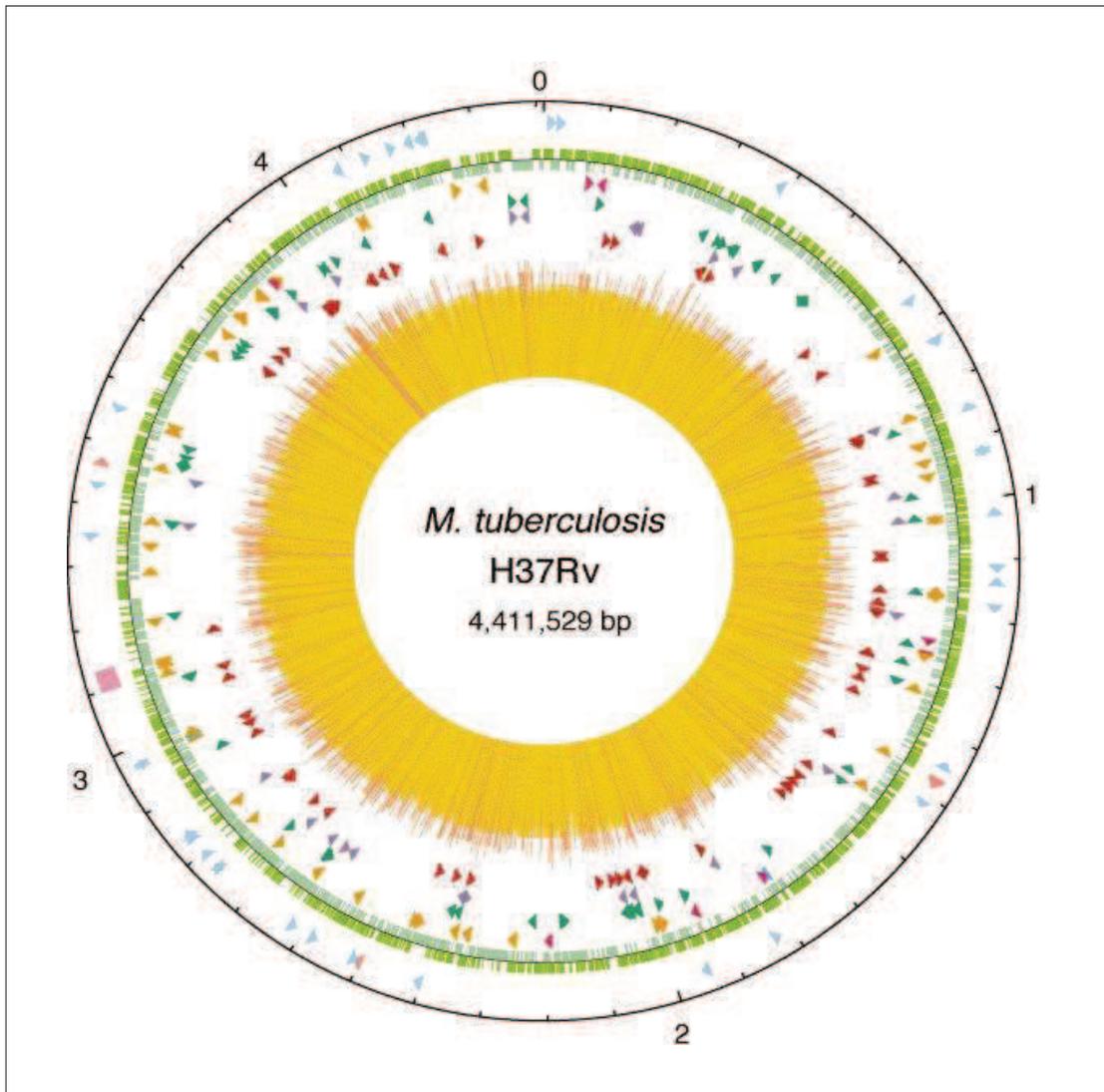
L'étape génomique de la tuberculose débute en 1993, soit plus d'un siècle après la découverte du bacille par Koch. Alors que l'OMS déclare cette année-là la tuberculose « urgence mondiale », l'équipe hollandaise de Van Embden décrit le typage par RFLP permettant pour la première fois de différencier les souches. En 1998, S. T. Cole et son équipe ont finalisé le premier séquençage complet d'une mycobactérie, *Mycobacterium tuberculosis* (figure 5) [12, 18]. Et en 2003, celui de *Mycobacterium bovis*. Actuellement, une soixantaine de souches de mycobactéries sont en cours de séquençage complet [18].

### I.6.2. Meilleure compréhension de l'histoire naturelle de la tuberculose :

Les études génomiques des différentes souches permettent de réaliser des arbres généalogiques de ces souches qui se retrouvent réparties de façon particulière dans le monde, leur distribution et diversité étant un reflet de ceux des humains (figure 6) [18].

La génomique comparative a permis de dater une actino-bactérie comme ancêtre de la tuberculose et de la lèpre à plus de 60 millions d'années [18].

De l'évolution naturelle de ces bactéries est né de l'ancêtre commun à *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium marinum*. L'ancêtre de *Mycobacterium tuberculosis* a acquis des îlots génomiques provenant des bactéries et bactériophages de l'environnement et a évolué jusqu'à devenir *Mycobacterium prototuberculosis*, qui a ensuite donné l'ensemble des souches de *Mycobacterium tuberculosis*. Certains de ces bacilles sont encore présents de nos jours dans l'est de l'Afrique. Il y a environ 35000 ans, le bacille tuberculeux aurait diffusé dans le monde avec son hôte *Homo sapiens* [18].



**Figure 5. :** Le génome de la souche de référence H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.

Le cercle externe noir représente l'échelle en Mb, le zero indique le début de l'origine de la réplication. Le premier anneau de l'extérieur indique les positions des gènes de l'ARN stables (ARNr en bleu, d'autres en rose) et de la région direct repeat (cube rose) ; les seconds anneaux montrent les séquences codantes par brin (sens horaire en vert foncé, antihoraire en vert clair) ; le troisième cercle représente l'ADN répétitif (séquences d'insertion en orange), les autres cercles représentent des séquences de protéines spécifiques. L'histogramme (au centre) représente les bases G + C, avec <65% G + C en jaune, et >65% G + C en rouge. Elle a été produite avec le logiciel de DNASTAR [12].

### I.6.3. Epidémiologie de la tuberculose :

L'étude épidémiologique de la tuberculose permet de mesurer l'ampleur et l'évolution dans le temps du problème posé par la tuberculose. Elle contribue à décider des meilleures mesures collectives à mettre en place dans les pays selon les différents contextes épidémiologiques et à évaluer les résultats de leur mise en œuvre [9].

#### **a. La tuberculose dans le monde :**

La tuberculose est un problème de santé majeur à l'échelle mondiale avec, d'après les estimations de l'OMS, près de huit millions de personnes atteintes chaque année et deux millions de décès. Le nombre de tuberculeux dans le monde est très inégalement réparti. Les pays les plus touchés sont les plus pauvres où se retrouvent 95 % des cas de tuberculose et 98 % des décès. Cette situation est fortement liée à la progression de l'épidémie de VIH/sida dans ces pays et plus particulièrement en Afrique. Environ un tiers de la population infectée par le VIH est co-infectée par *M.tuberculosis* dont 70 % vivent en Afrique sub-saharienne et 22 % en Asie du Sud-Est [15]. La tuberculose reste parmi les maladies infectieuses mortelles les plus répandues (figure 7) [13].

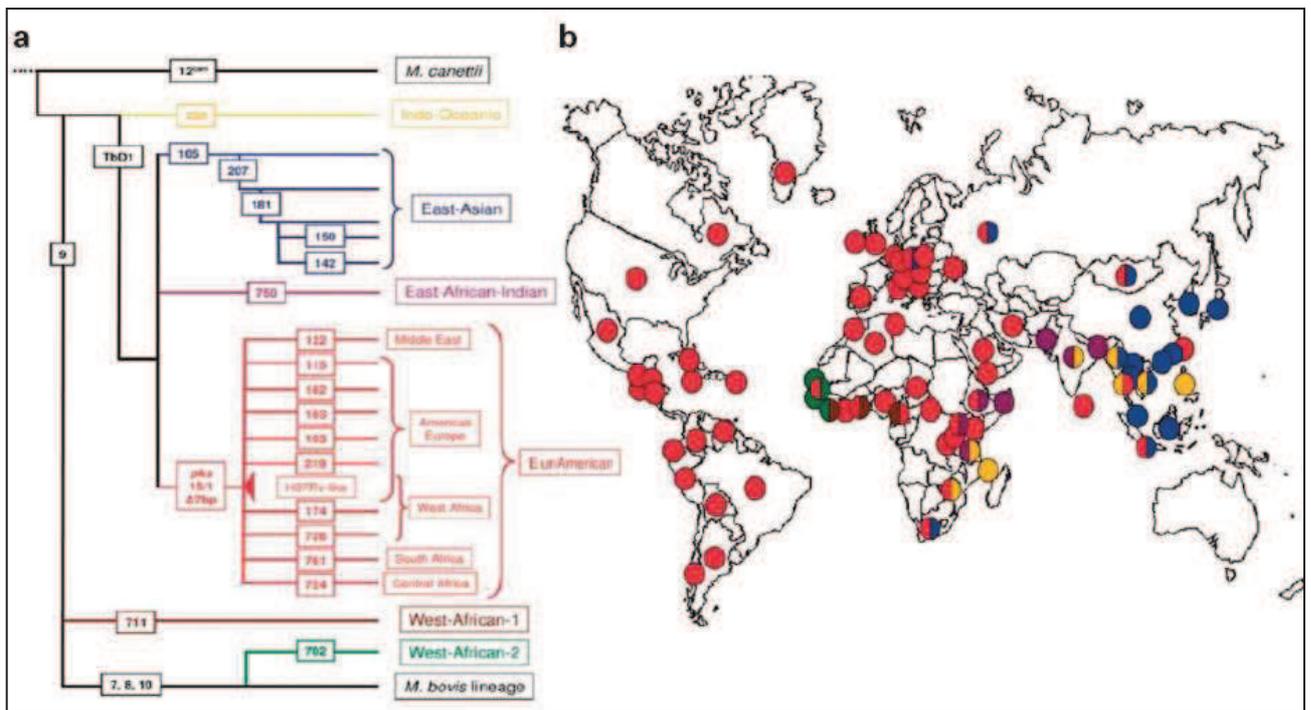
Données épidémiologiques mondiales de la tuberculose :

#### **Charge de morbidité attribuable à la tuberculose :**

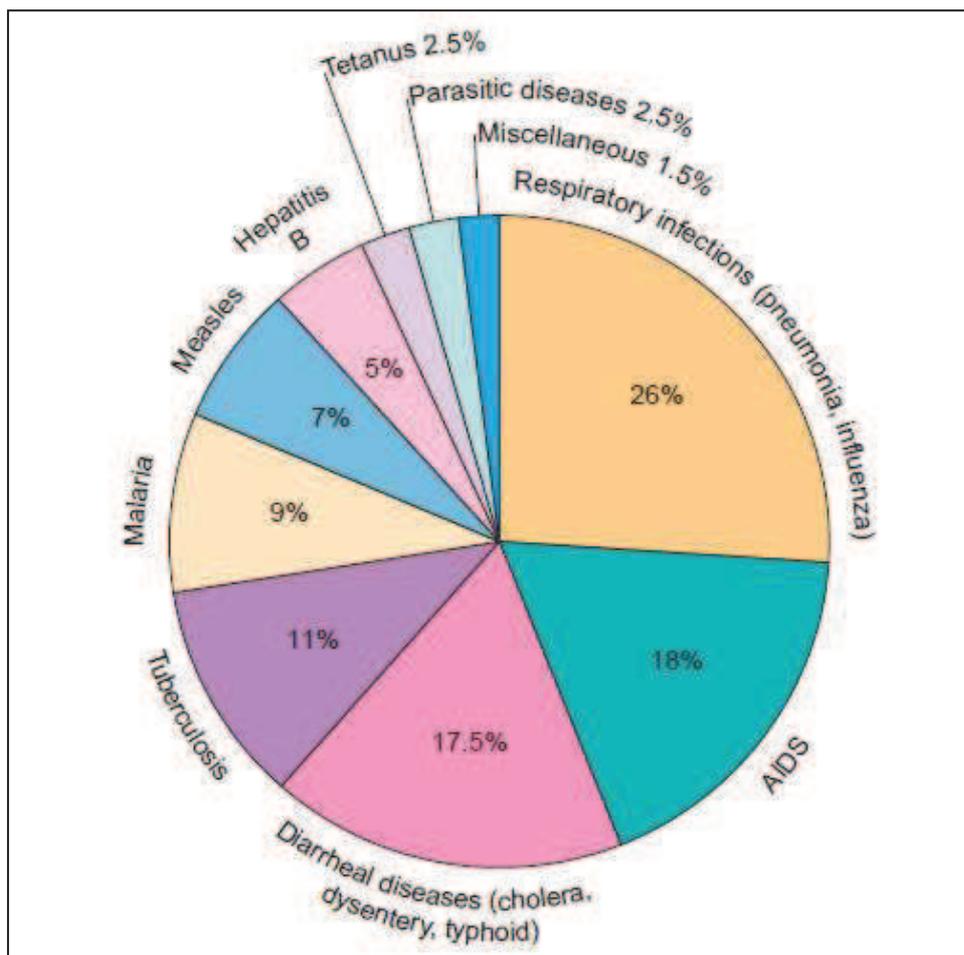
Il y a eu, en 2010, 8,8 millions (fourchette 8,5-9,2 millions) de cas incidents de tuberculose, 1,1 million (fourchette 0,9-1,2 million) de décès dus à la tuberculose dans la population VIH-négative et 0,35 million (fourchette 0,32-0,39 million) de décès dus à la tuberculose associée au VIH.

Au niveau mondial, il faut signaler que :

- le nombre absolu de cas de tuberculose a baissé depuis 2006 ;
- les taux d'incidence de la tuberculose ont baissé depuis 2002 ;
- les estimations du nombre annuel de décès dus à la tuberculose ont été revues à la baisse ;
- en 2009, près de 10 millions d'enfants ont perdu leurs parents à cause de la tuberculose.



**Figure 6. :** Arbre généalogique des différentes souches tuberculeuses et leur répartition mondiale d’après Gagneux et coll. (PNAS, 2006) [18].



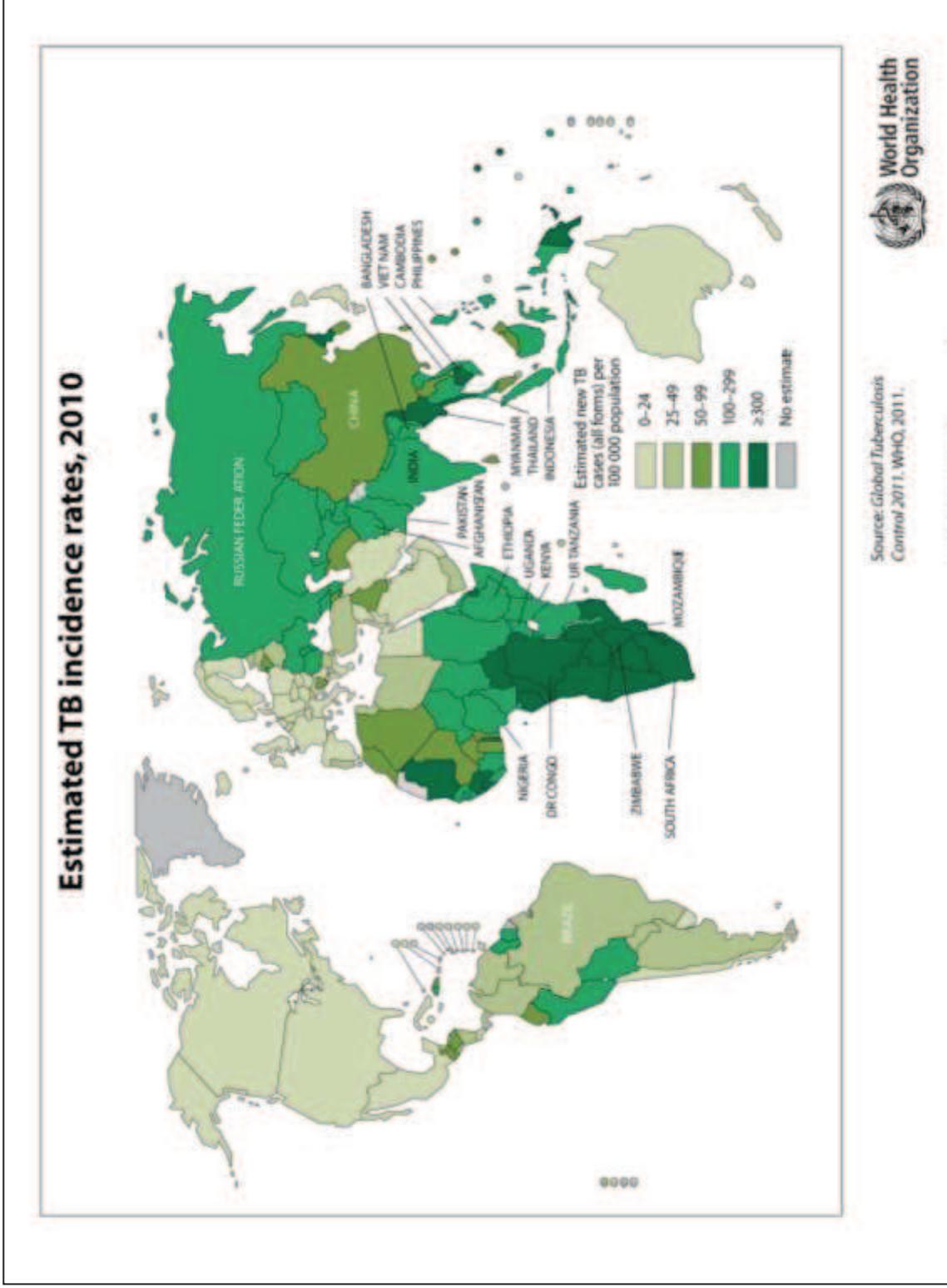
**Figure 5. :** Statistique des maladies infectieuses, figure représentant les 10 plus importante infection mortelle mondiale [13].

D'autres résultats confirment les conclusions des rapports mondiaux précédents :

- Le monde et les six Régions de l'OMS sont en voie de faire baisser les taux d'incidence de la tuberculose d'ici 2015, conformément à la cible fixée dans les objectifs du Millénaire pour le développement.
- Les taux de mortalité attribuable à la tuberculose ont baissé d'un peu plus d'un tiers depuis 1990. Le monde ainsi que toutes les Régions de l'OMS, sauf la Région africaine, sont en voie de réduire de moitié les taux de mortalité d'ici 2015, conformément à la cible fixée par le Partenariat Halte à la tuberculose.
- Il est peu probable que la cible du Partenariat Halte à la tuberculose de réduire de moitié, d'ici 2015, les taux de prévalence par rapport à leur niveau de 1990 soit atteinte au niveau mondial bien qu'elle ait déjà été atteinte dans la Région des Amériques et qu'elle soit tout près de l'être dans la Région du Pacifique occidental.
- On a recensé 3,2 millions (fourchette 3-3,5 millions) de cas incidents de tuberculose et 0,32 million (fourchette 0,20-0,44 million) de décès chez les femmes en 2010.
- Environ 13 % des cas de tuberculose concernent des personnes qui vivent avec le VIH.

En 2010, 5,7 millions de nouveaux cas de tuberculose et de récurrences, équivalant à 65 % (fourchette 63-68 %) du nombre estimé de cas incidents, ont été notifiés. Les cas de tuberculose notifiés au niveau mondial en 2010 se répartissaient comme suit : 40 % en Inde et en Chine, 24 % en Afrique et 82 % dans les 22 pays à forte charge de morbidité. Au niveau mondial, le taux de succès des traitements des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à frottis positif était de 87 % en 2009. Entre 1995 et 2010, 55 millions de patients tuberculeux ont été traités, dont 46 millions avec succès, dans le cadre de programmes ayant adopté la stratégie DOTS/Halte à la tuberculose. Ces traitements ont permis de sauver près de 7 millions de vies.

Mis à part ces succès, le diagnostic et le traitement approprié de la tuberculose multirésistante (MR) restent très problématiques. En 2010, dans la plupart des pays, moins de 5 % des nouveaux patients et des patients déjà traités ont subi un dépistage de la tuberculose MR. Le nombre rapporté de patients suivant un traitement a augmenté, pour atteindre 46 000 en 2010, mais ne représente que 16 % des cas de tuberculose MR, dont le nombre est estimé à 290 000, parmi les patients chez qui une tuberculose a été notifiée [19].



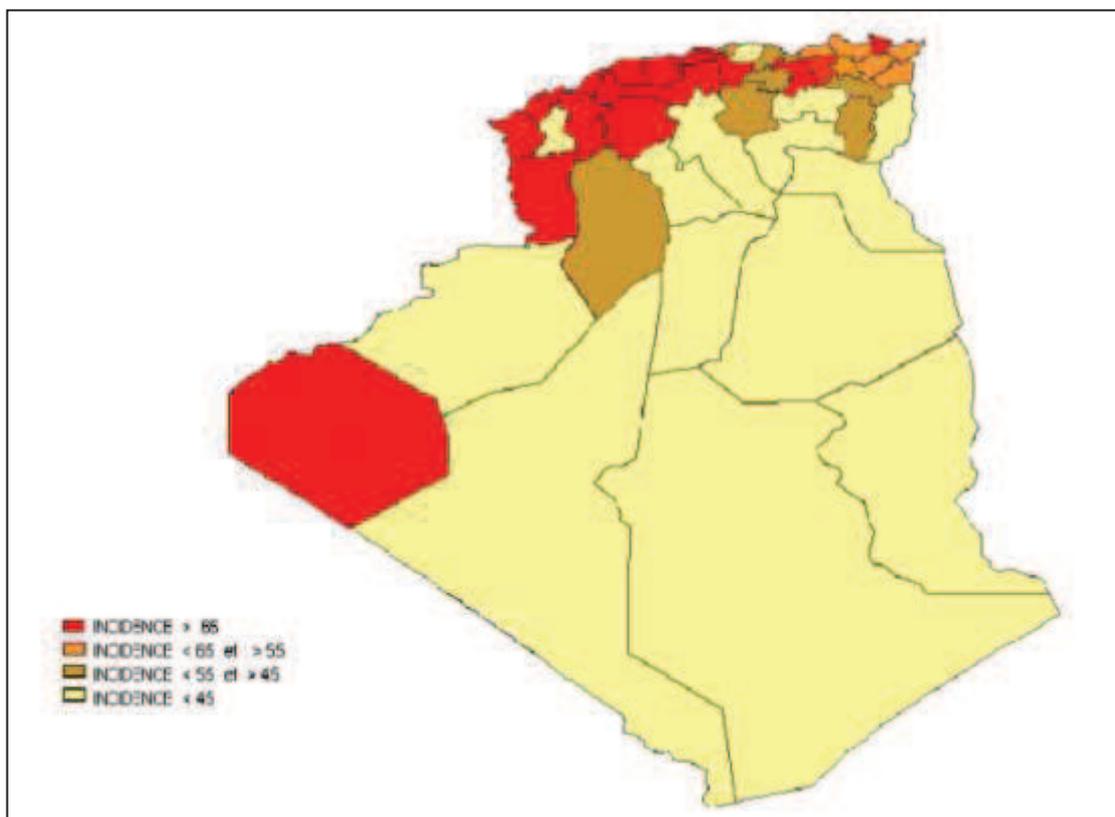
**Figure 8.** : Estimation du taux d'incidence de la tuberculose en 2010 [19].

**b. La tuberculose en Algérie :**

Évolution de la situation épidémiologique de la tuberculose en Algérie :

Au cours de la période 1962-2010, l'Algérie, jadis pays à haute prévalence de tuberculose, a rejoint depuis le début des années 1980 le groupe des pays à prévalence modérée, où l'incidence annuelle de la tuberculose toutes formes se situe entre 20 et 99 cas pour 100.000 habitants (voir annexe 1) [20].

Cette évolution favorable a accompagné le développement socio-économique du pays, et l'application des mesures techniques spécifiques de lutte contre la tuberculose, mesures qui ont-elles même évolué en fonction des progrès des connaissances et des recommandations des institutions internationales [20].



**Figure 9. :** Incidence de la tuberculose toutes formes en 2009 selon les wilayas [20].

## I.7. Diagnostic :

### I.7.1. Clinique :

#### **Signes cliniques :**

Les signes de la primo-infection tuberculeuse se réduisent souvent au virage des réactions cutanées tuberculiques [7].

Ceci impose de connaître la nature des réactions tuberculiques cutanées antérieures, ce qui est peu souvent le cas. La vaccination par le bacille bilié Calmette-Guérin (BCG) fait que la majorité des sujets ont des réactions positives<sup>2</sup> [7].

Signes de la tuberculose pulmonaire Maladie :

Certains sont communs à la primo-infection tuberculeuse (asthénie, fièvre, anorexie, sueurs nocturnes, amaigrissement), d'autres sont évocateurs de tuberculose pulmonaire [7].

Le tableau I résume les symptômes d'appel en fonction du mode de dépistage de la maladie. Malheureusement, le caractère aspécifique de la symptomatologie explique le retard au diagnostic qui est à l'origine du risque de contamination de l'entourage [7].

**Tableau I.** Fréquence des symptômes (%) de la tuberculose. Effet du mode de dépistage de la maladie [7].

Symptômes	Mode de dépistage	
	Radiologique	Symptomatique
Asthénie	16	85
Anorexie	7	44
Amaigrissement	23	68
Fièvre	11	59
Sueurs	11	24
Toux	31	76
Expectoration	19	53
Hémoptysie	3	22
Douleur thoracique	8	26
Dyspnée	12	31
Pleurésie	8	16

<sup>2</sup> On admet qu'une infection est responsable d'une augmentation du diamètre de l'induration d'au moins 10 mm (alors que le BCG est responsable d'une induration de 4 à 10 mm). Les réactions peuvent être faussement positives soit du fait d'une réaction croisée avec d'autres mycobactéries, soit du fait d'un effet *booster* (en effet, si l'intradermoréaction est pratiquée 1 semaine à 1 an après la précédente, l'induration peut être beaucoup plus importante par rapport à la réaction antérieure). Par ailleurs, l'intradermoréaction peut être négative soit du fait d'une mauvaise technique, soit du fait d'une immunodépression. De toute façon une intradermoréaction positive ne permet pas d'affirmer un diagnostic de tuberculose pas plus qu'une intradermoréaction négative ne permet de l'infirmier [7].

### I.7.2. Radiologique :

#### Signes radiologiques :

L'imagerie est utile à toutes les phases de la maladie : diagnostic, bilan lésionnel, recherche de signes d'activité de l'infection, évolutivité, bilan des séquelles [21].

#### ***Primo-infection :***

Les signes sont minimes en cas de primo-infection sans dissémination : chancre d'inoculation et adénopathie satellite mieux visualisée en tomодensitométrie (TDM) ; en cas de dissémination : épanchement pleural ou image de miliaire (figure 10) [7].

#### ***Cas de la tuberculose pulmonaire commune :***

Le poumon est la localisation la plus fréquente de la tuberculose puisqu'il représente 80 % des cas. Les lésions siègent préférentiellement dans les zones apicales et postérieures : segment dorsal et apical du lobe supérieur et du culmen, segment apical des lobes inférieurs. Elles se présentent sous forme de nodules plus ou moins confluents, d'infiltrats, de cavernes (figure 11) [7].

L'évolution vers la rétraction témoigne de lésions relativement anciennes. À ce stade, plus exceptionnellement, un hydropneumothorax témoigne de l'ouverture d'une caverne dans la plèvre et ici le liquide est riche en bacilles. Les adénopathies médiastinales isolées sont plutôt le fait des sujets de race noire et peuvent poser le problème d'un lymphome [7].

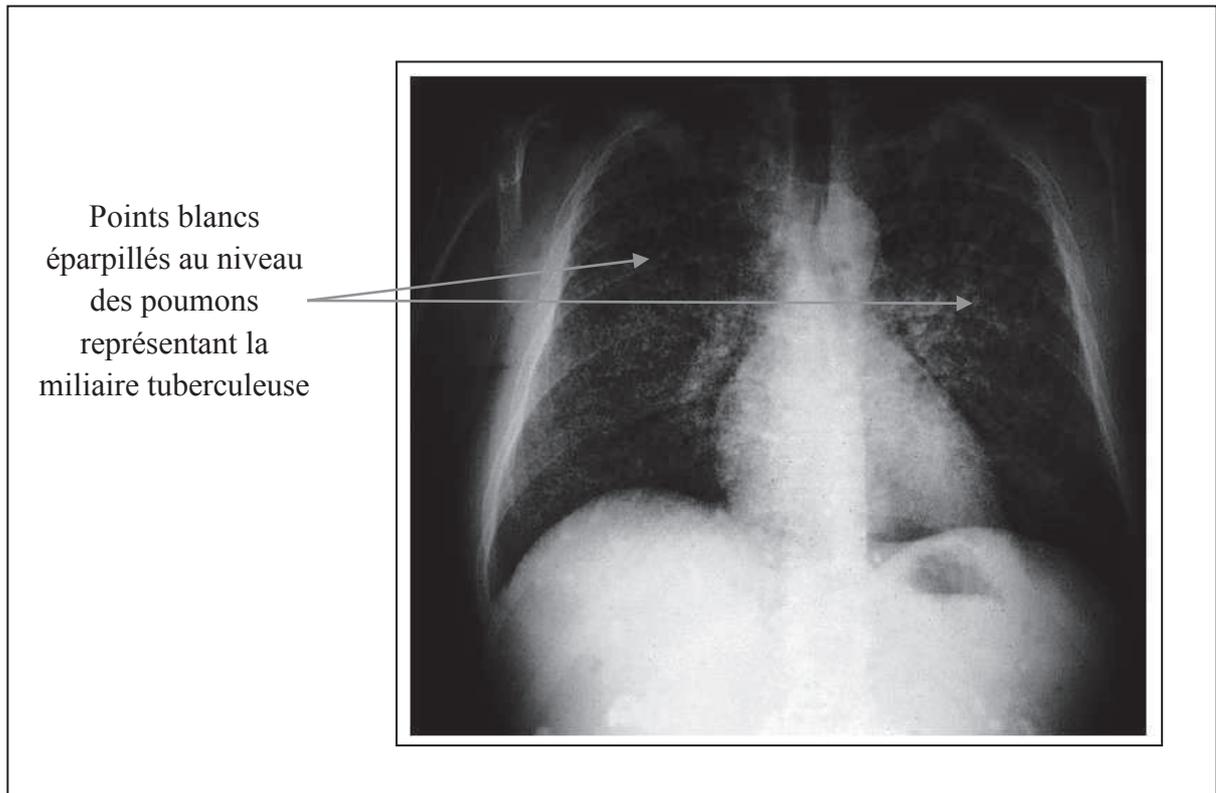
#### ***Imagerie actuelle de la tuberculose pulmonaire chez le non-immunodéprimé :***

La tuberculose primaire se caractérise par un premier contact infectant de l'hôte avec le bacille tuberculeux. Le BK atteint généralement des territoires bien ventilés, lobes moyens. En fonction de la virulence du BK et de l'immunité de l'hôte, il va y avoir une dissémination plus ou moins importante, lymphatique et plus rarement sanguine. La dissémination lymphatique se cantonne généralement aux premiers relais ganglionnaires médiastinaux homolatéraux. Dans 5 % des cas environ, la primo-infection se complique d'une réactivation tertiaire. Celle-ci se caractérise par une atteinte dans les zones supérieures du poumon où la pression partielle en oxygène est élevée et où le drainage lymphatique est moins bon [7].

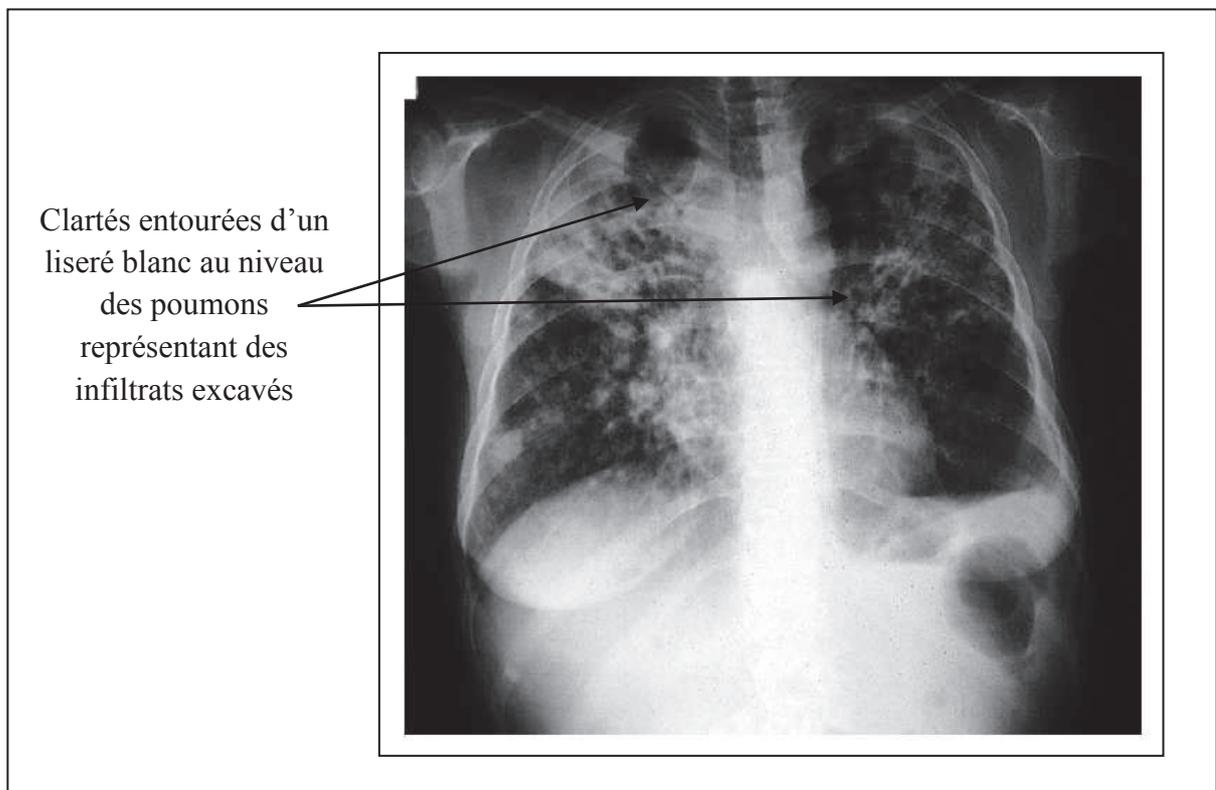
Il y a alors une réaction d'hypersensibilité retardée avec activation des macrophages, constitution de la nécrose caséuse et cavitation. On peut alors observer fréquemment une fistulisation de la cavité dans les bronches avec dissémination bronchogène [21].

#### Formes extrapulmonaires :

Les formes de tuberculose, associées ou non à une atteinte pulmonaire, représentant environ un quart de cas déclarés. L'infection des différents organes par voie hématogène,



**Figure 10. :** Miliaire tuberculeuse [7].



**Figure 11. :** Infiltrat excavé [7].

lymphatique ou aérienne peut se traduire par une localisation prédominante alors que le foyer initial a depuis longtemps disparu ; le diagnostic repose sur l'isolement du BK (urines, LCR) ou sur l'anatomopathologie (ganglion, os, moelle osseuse, etc.) [15].

Les formes extrapulmonaires de la tuberculose sont : ganglionnaire, osseuse, digestive, neuroméningée, urogénitale [15].

### I.7.3. Autres tests :

#### ***IDR à la tuberculine : performance diagnostique :***

Le test de référence est l'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) réalisée à la face antérieure de l'avant-bras [16]. La tuberculine est préparée à partir d'un broyât de *M. tuberculosis* et contient donc des fractions protéiques polyantigéniques. Son injection intradermique provoque chez le sujet infecté la libération de lymphokines à l'origine d'une réaction d'hypersensibilité retardée se traduisant par l'apparition 24 à 72 h après d'une infiltration localisée de la peau. Cette infiltration est due à l'œdème et à l'accumulation des lymphocytes sensibilisés au niveau du point d'injection [9].

Cette réaction d'hypersensibilité retardée induite par des antigènes microbiens de *M. tuberculosis* est également induite par les bacilles du BCG et aussi par certaines mycobactéries atypiques [9]. Le test est dit positif lorsque l'introduction est supérieure ou égale à 5 mm [16].

#### ***Les examens sérologiques de la tuberculose :***

Les examens sérologiques tentent de mettre en évidence la présence d'anticorps circulants en utilisant des antigènes mycobactériens. La reconnaissance des antigènes par des anticorps présents chez les personnes infectées pourrait aider au diagnostic de certaines localisations extra-pulmonaires de la maladie pour lesquelles le diagnostic par la bactériologie ou l'anatomopathologie est difficile. Mais actuellement ces examens coûteux ne sont ni assez sensibles ni assez spécifiques pour être utilisés en pratique courante [9].

### I.7.4. Bactériologie :

#### ***L'examen direct :***

L'examen direct (ED) est indispensable pour la détermination de la contagiosité (ED+). La culture permet la quantification du bacille, la détermination de sa sensibilité aux antibiotiques ainsi que son typage [22].

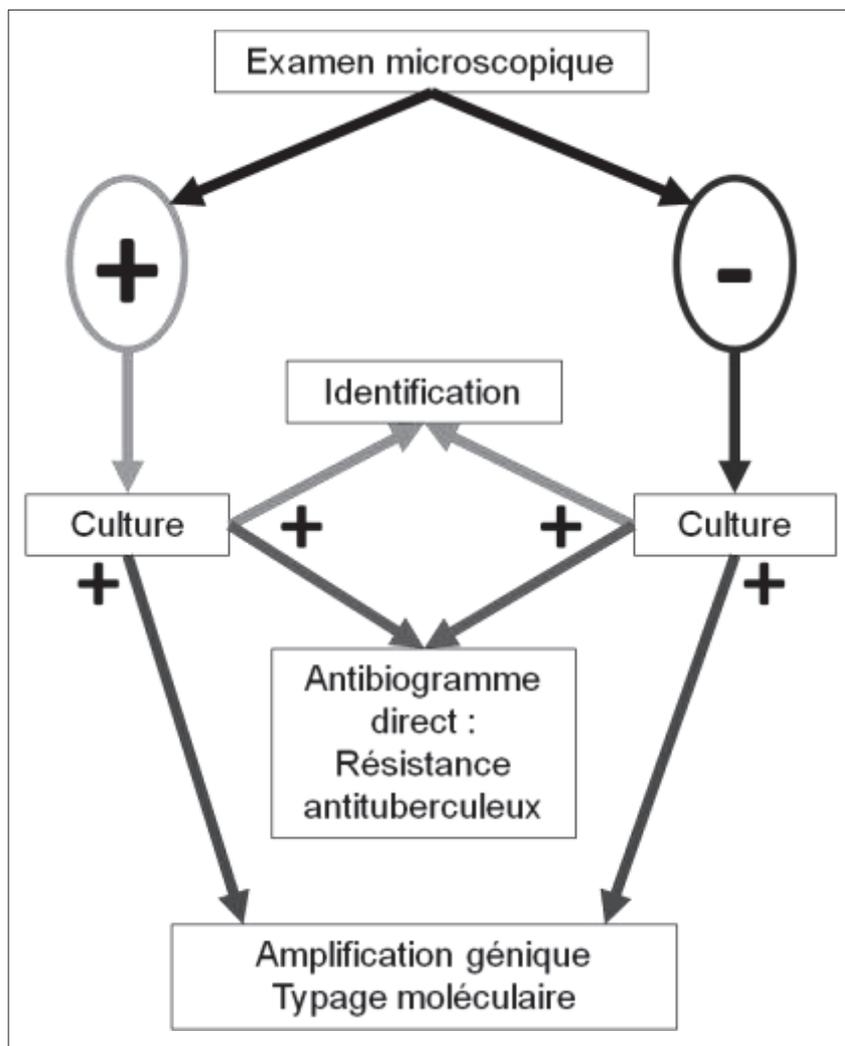
Quatre heures sont nécessaires avant le rendu de l'ED : le recueil des prélèvements doit être matinal pour une réponse bactériologique dans la journée [22].

Les expectorations spontanées doivent être multipliées afin d'augmenter la sensibilité de l'ED et de la culture, de diminuer le risque de contamination des cultures par la flore salivaire et de limiter les faux positifs (contamination par une mycobactérie du laboratoire).

Le volume de l'expectoration (> 5 ml) est un paramètre de qualité garant d'une meilleure sensibilité (92 %) [22].

Dans les autres cas, la recherche se fera par tubage gastrique à jeun avant le lever afin de recueillir des sécrétions bronchiques dégluties pendant la nuit avant la vidange gastrique [7]. Au laboratoire, l'examen microscopique direct des prélèvements est réalisé après coloration à l'auramine. Le caractère acido-alcoolrésistant est confirmé par la méthode de Ziehl-Neelsen à chaud ou à froid [1].

Cet examen permet un dépistage rapide, le jour même, mais il est peu sensible, ne pouvant détecter des concentrations inférieures à 10 000 bacilles/ml. De plus, il manque de spécificité en cas de mycobactériose atypique [1].



**Figure 12. :** Cheminement du prélèvement microbiologique dans le laboratoire de bactériologie.

i. Microscopique :**Mise en évidence :**

Colorés difficilement par les colorants usuels, leur visualisation au microscope optique n'est possible qu'en utilisant des colorations particulières qui imprègnent la paroi du bacille riche en cires [9].

**Coloration de Ziehl Neelsen (annexe 2) :**

Cette méthode a été développée par deux scientifiques remarquables, à savoir : Franz Ziehl (Bactériologiste allemand : 1857-1926), et Friedrich Karl Adolf Neelsen (pathologiste allemand : 1854-1894) [23].

A chaud c'est la méthode de référence. Elle est simple, reproductible, ne nécessite pas d'équipement sophistiqués. Elle peut être pratiquée à froid, les lames sont alors immergées dans un bain de fuschine pendant au moins trois heures. Elle est pratique mais elle est moins sensible que la méthode originale à chaud [24].

La décoloration peut se faire de différentes façons avec un acide fort dilué et l'alcool. Le bleu d'Armand ou le réactif de Fraenkel Gabbet associant dans un même réactif l'acide, l'alcool et le bleu de méthylène, permettent d'assurer, dans une même opération, décoloration et contre-coloration mais les résultats obtenus sont de moins bonne qualité [24].

**Coloration à l'auramine (annexe 2) :**

Si le nombre de frottis à examiner est suffisamment important, si on dispose d'un microscope à fluorescence ; l'utilisation de cette méthode permet un gain de temps appréciable puisque les bacilles, jaune brillant sur fond rouge sombre de la préparation, sont facilement vus au grossissement de 400 (objectif 40X oculaire 10X). Le champ microscopique balayé est alors 5 fois plus grand qu'à l'immersion. Les techniciens expérimentés utilisent le grossissement 250, le champ observé est alors environ 16 fois important que celui examiné à l'immersion. Des variantes existent qui utilisent la rhodamine, l'acridine orange [24].

**Expression des résultats :**

Le résultat de l'examen microscopique est exprimé quantitativement (en précisant la méthode de coloration utilisée), ce qui permet de contrôler la disparition progressive des bacilles sous traitement (voir tableau II). Lorsque le nombre total de bacilles observés est inférieur à 5, après coloration à la fuchsine, ou à 10 après coloration fluorescente, il est prudent, en raison du, risque de confusion entre BAAR et débris cellulaires, de considérer le résultat comme douteux, de le noter mais de ne pas le rendre avant de l'avoir vérifié par l'examen d'autres, frottis préparées à partir du même échantillon ou mieux d'un autre échantillon [24].

**Tableau II. :** Expression des résultats de l'examen microscopique [24].

Nombre de BAAR observés		
Report	Après coloration à la fuchsine (x 1000)	Après coloration avec fluorochrome (x 250)
Absence	0	0
Douteuse	1-2/300 champs	1-9/frottis
1+	1-9/100 champs	1-9/10 champs
2+	1-9/10 champs	1-9/champs
3+	1-9/champs	10-99/champs
4+	> 10/champs	> 100/champs

ii. Culture :

Le BK est un bacille aérobic [9], sa reproduction est augmentée par une présence de 5 à 10% de CO<sub>2</sub>, elle se développe sur milieu enrichi de lipides, ex : œuf enrichi de glycérol (milieu LB) [11] ou milieu de Coletsos enrichi en pyruvate de sodium et cela après des techniques de fluidification-décontamination pour les sélectionner et les concentrer au sein d'un échantillon pluri-microbien [1].

Dans le milieu extérieur ces bacilles sont rapidement détruits par les rayonnements ultraviolets (lumière solaire) [9]. Le temps de génération du BK est de 792-932 mn [10], le BK doit être incubée 3 à 6 ou 8 semaines à 37°C et cela jusqu'à ce que la prolifération devient macroscopiquement évidente [11].

La culture permet d'isoler le BK lorsque les lésions sont peu bacillifères puisqu'elles ne nécessitent que la présence de 10<sup>2</sup> à 10<sup>3</sup> bacilles/ml pour être positive alors que l'examen direct ne peut être positif qu'à partir de 10<sup>4</sup> bacilles/ml de sécrétions. Elle est indispensable pour l'identification de la mycobactérie et pour la réalisation de l'antibiogramme [7].

Le temps nécessaire au développement des colonies sur milieu de Löwenstein-Jensen est de 3 à 4 semaines pour *Mycobacterium tuberculosis* [7]. La culture est sensible et spécifique, mais nécessite deux à huit semaines d'incubation ; ce délai, auquel il faut rajouter en cas de positivité le temps nécessaire à l'identification et à la réalisation de l'antibiogramme, peut être préjudiciable à une prise en charge adéquate du patient [1].

L'utilisation de milieux liquides avec détection fluorimétrique (Bactec) ou colorimétrique (BacT/Alert) permet de raccourcir le délai d'apparition de la positivité [1] (Bactec : le délai est alors raccourci à 9 jours si l'examen direct est positif, à 16 jours s'il est négatif [7]).

iii. Etude de sensibilité des antibiotiques antituberculeux :**Réalisation des antibiogrammes :**

Avant l'obtention de l'antibiogramme, l'interrogatoire doit préciser le risque d'avoir affaire à un bacille résistant aux antituberculeux : antécédent de tuberculose traitée avec mauvaise observance faisant craindre l'existence d'une résistance secondaire [7].

La méthode de référence des antibiogrammes est la méthode des proportions, réalisée en milieu solide ou liquide, est la technique de référence (annexe 4). Elle consiste à répartir des quantités égales d'inoculum bactérien sur des milieux contenant les ATBs à tester. Elle permet de déterminer au sein d'une population donnée le nombre de mutants résistants par rapport à un témoin sans ATB [7].

Ce pourcentage de mutants résistants est à comparer à une « proportion critique » qui varie selon le milieu utilisé et la nature de l'antibiotique ; elle est généralement de 1 % (pour l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol ou la streptomycine) mais elle est fixée à 10 % pour le pyrazinamide [7].

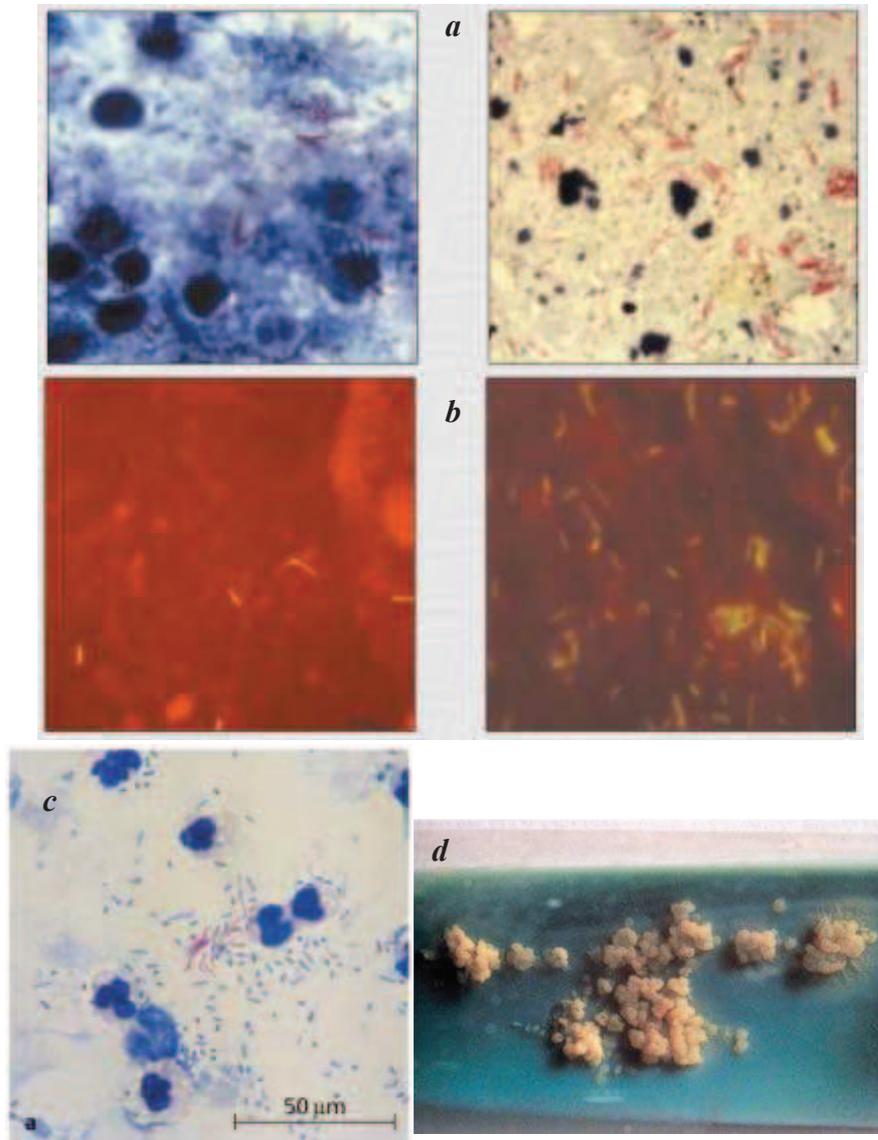
Il existe aussi des techniques automatisées en milieu liquide (type Bactec 460TB et MGIT, Becton Dickinson) qui fournissent des résultats fiables plus rapidement (5 à 10 jours). Les antibiotiques couramment testés par ces méthodes phénotypiques sont l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol, le pyrazinamide et la streptomycine [18, 25].

Détection de la résistance aux antibiotiques par méthode de biologie moléculaire :

Les techniques de biologie moléculaire permettent de détecter la résistance aux antituberculeux majeurs, et ce, plus rapidement que l'antibiogramme classique [14].

En effet, la recherche de mutations sur certains gènes spécifiques est synonyme de résistance [14], de ce fait l'approche moléculaire ne permet que la détection de résistances de support génétique connu. Néanmoins, la facilité et la rapidité d'obtention des résultats en font un outil actuel très intéressant [25].

Même s'il existe des résistances par efflux actif ou inactivation enzymatique, les résistances des mycobactéries vis-à-vis des antituberculeux sont principalement dues à des mutations chromosomiques dans les gènes qui encodent les cibles des antibiotiques ou les enzymes impliquées dans l'activation de ces médicaments [25]. Elle est appliquée en particulier pour les gènes *rpoB* (résistance à la rifampicine), *inhA* et *katG* (résistance à l'isoniazide) (voir annexe 5) [14].



**Figure 13. :** **a.** Coloration de Ziehl Neelsen. Les bacilles apparaissent rouges sur fond bleu de la préparation [24]. **b.** Coloration à l’Auramine : les bacilles apparaissent jaunes fluorescents sur fond rouge [24]. **c.** Photographie en microscope du bacille tuberculeux après coloration de Ziehl-Neelsen [9]. **d.** Culture de *M.tuberculosis* sur : Löwenstein-Jensen : après quatre semaines d’incubation, colonies jaunâtres, d’aspect rugueux en forme de chou-fleur [11].

### I.8. Traitement :

Le traitement de la tuberculose doit être actif sur les bacilles extra- mais aussi intracellulaires. Il comporte toujours une association de plusieurs antibiotiques afin de prévenir la sélection de mutants résistants. Les antituberculeux se prennent une fois par jours, à distance des repos (une demi-heure avant ou deux heures après) [15].

Traitement antituberculeux :

Bien conduit, un traitement antituberculeux entraîne une guérison dans 99 % des cas. Même chez le sujet séropositif pour le VIH, le taux de guérison est supérieur à 95 %. Un traitement précoce permet d'éviter la dissémination de la maladie. Le traitement permet de faire cesser la contagion en 2 à 3 semaines.

Les règles de traitement reposent sur un certain nombre de faits.

- Le BK se multiplie toutes les 20 heures, ce qui permet une prise quotidienne de médicament.
- Une population bacillaire comporte obligatoirement des mutants résistants dont la fréquence diffère en fonction de l'antibiotique.

Plus la population bacillaire est importante, plus grand est le nombre de mutants résistants, qui est donc bien entendu plus important dans les lésions excavées. Une monothérapie est à proscrire pour éviter une sélection de ces mutants résistants et la règle est de donner au départ trois antituberculeux afin d'éviter, en cas de résistance primaire à un des antituberculeux, de sélectionner des mutants résistants au deuxième antituberculeux utilisé. En revanche, lorsque la sensibilité aux différents antituberculeux est confirmée sur l'antibiogramme à 2 mois du début du traitement, on peut réduire le traitement à deux antituberculeux majeurs.

- L'utilisation du pyrazinamide, qui est particulièrement actif sur les bacilles intracellulaires en pH acide, va permettre de raccourcir le traitement de la tuberculose à 6 mois, délai en dessous duquel il n'est pour le moment pas possible d'être efficace (Annexe 3).

Le traitement actuel comporte trois antituberculeux durant les deux premiers mois de traitement : isoniazide, rifampicine, pyrazinamide puis, en cas de bacille sensible à tous les antituberculeux pendant les 4 mois restants, rifampicine, isoniazide. Ces médicaments peuvent être utilisés, soit séparément, soit en association fixe. L'éthambutol est rajouté à cette trithérapie lorsqu'il existe un doute sur une résistance à l'isoniazide [7].

Observance thérapeutique :

L'observance du traitement est une des conditions de la guérison. Les associations de médicaments permettent de simplifier le traitement et d'améliorer l'observance, et en dehors de cas de figure particulier (femme enceinte ou suspicion de résistance à l'isoniazide), l'éthambutol est abandonné dans le traitement initial [7].

Globalement, l'efficacité du traitement se juge sur la défervescence qui le plus souvent s'observe en une dizaine de jours, sur la reprise de poids, sur la diminution des symptômes respiratoires, sur l'amélioration de l'état général [7].

Bacille de Koch résistant :

En cas de suspicion de résistance aux antituberculeux, il peut s'agir d'une résistance secondaire, c'est-à-dire de la sélection d'un mutant résistant au cours d'un traitement antituberculeux mal suivi, ou résistance primaire, c'est-à-dire l'infection par un bacille d'emblée résistant à un ou plusieurs antituberculeux. Le traitement doit comporter au départ trois antituberculeux actifs a priori en tenant compte des facteurs de risque de résistance puis le traitement sera adapté en fonction de l'antibiogramme [7].

En cas de résistance ou d'intolérance à l'isoniazide ou au pyrazinamide, le traitement sera prolongé pendant 9 mois. En cas de résistance à la rifampicine, le traitement sera prolongé 12 mois. D'une façon générale, les traitements courts supposent que l'on peut utiliser l'isoniazide et la rifampicine [7].

BK multirésistants :

Selon l'OMS, la tuberculose (TB) chronique est un cas de tuberculose en échec au régime de retraitement, donne sous la supervision directe d'un agent de sante [11]. Cette TB est due aux bacilles multirésistants [26].

On définit comme multirésistante une tuberculose dont le BK est résistant à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine [7, 26, 27].

Ces tuberculoses multirésistantes sont beaucoup plus fréquentes dans les pays baltes et l'Asie du Sud-Est. Elles sont généralement la conséquence d'une non-standardisation du traitement de première intention. Chez les sujets jamais traités auparavant, elles représentent de 0 à 14 % des cas suivant les pays [7].

Elles peuvent atteindre 40 % chez les patients déjà traités. Elles vont obliger à utiliser des antituberculeux de deuxième ligne (annexe 3) : aminosides et polypeptides (streptomycine, kanamycine, amikacine, capréomycine), quinolones et autres antituberculeux (éthionamide, cyclosérine, acide para-amino-salicylique [PAS]). Le traitement n'est pas standardisé ; il dépend de l'antibiogramme. Il est instauré uniquement en milieu spécialisé. Ce

traitement comportera trois à cinq antituberculeux non déjà utilisés dont un aminoside ou un polypeptide. La durée sera de 12 à 24 mois, la chirurgie des lésions tuberculeuses peut être nécessaire à la stérilisation dans ces cas [7].

#### La tuberculose ultrarésistance :

La tuberculose ultrarésistante (XDR-TB) se définit comme une souche MDR présentant en plus une résistance à une fluoroquinolone et au moins à un des trois médicaments de seconde ligne injectable (carpéomycine, kanamycine et amikacine). La première description de ces souches date de 2006 en Afrique du Sud où 53 patients tous séropositifs ont développé une XDR-TB. 80 % des isolats avaient un profil génomique identique. Depuis, des souches similaires ont été décrites partout dans le monde [27].

### I.9. Résistance, susceptibilité génétique de l'homme et tuberculose latente :

Cependant, l'être humain est remarquablement résistant à la tuberculose, puisque seuls 5 à 10 % des patients en contact avec le bacille développent la maladie [17].

La variation de réponse interindividuelle à l'exposition à *Mycobacterium tuberculosis* illustre cette notion. Elle dépend des facteurs d'exposition, du BK, et de l'hôte. L'âge représente le principal facteur non génétique avec une mortalité plus importante aux âges extrêmes. Les facteurs génétiques d'orientent selon un pôle mendélien (mutation rare avec des effets forts) et/ou complexe (polymorphisme commun aux effets beaucoup plus modérés). L'identification des facteurs génétiques suit une stratégie avec deux étapes principales. La première doit définir certains gènes candidats via soit une stratégie par hypothèses selon des connaissances antérieures acquises, soit une approche explorant l'ensemble du génome (analyse de liaison génétique, étude transcriptomique par expression différentielle, étude d'association du génome entier). Ces stratégies sont complémentaires [28].

Le rôle des facteurs génétiques de l'hôte dans la tuberculose est un concept ancien validé tout d'abord par des modèles expérimentaux chez l'animal, puis par des études chez l'homme de génétique mendélienne et de génétique épidémiologique [28].

La deuxième étape vise à détecter le variant au sein des gènes candidats définis. En génétique mendélienne, l'identification d'une mutation par séquençage conduit à sa validation par des études fonctionnelles. En génétique complexe, l'identification d'un polymorphisme par étude d'association conduit à des études fonctionnelles qui sont plus difficiles, car l'effet biologique de ce polymorphisme est beaucoup plus subtil [28].

### I.10. Prévention :

Au niveau communautaire, le traitement des malades contagieux est la meilleure mesure de prévention de la tuberculose. Au niveau individuel la prévention comporte deux mesures techniques d'inégale efficacité : la vaccination BCG et la prescription d'une chimioprophylaxie aux sujets de groupes à risques [9].

La vaccination BCG :

Le vaccin BCG (Bacille de Calmette et Guérin) est un vaccin bactérien vivant, préparé à partir de bacilles tuberculeux bovins atténués par 230 passages sur pomme de terre glycinée. Les bacilles du vaccin sont donc vivants mais ont perdu leur virulence. L'introduction de ces bacilles dans l'organisme stimule le développement d'une immunité, augmente les moyens de défense de l'organisme sans provoquer la maladie [9].

### I.11. La biologie moléculaire et la tuberculose :

Avant le développement de la biologie moléculaire, la lysotypie (c'est-à-dire la sensibilité des souches à différents phages) était la seule méthode de typage de *M.tuberculosis*, mais se révélait peu discriminante et mal standardisée. Avec la description de la séquence répétée IS6110 et la standardisation de la méthode dite de détermination du polymorphisme de longueurs des fragments de restriction (RFLP) utilisant cet élément comme sonde, le typage de *M.tuberculosis* s'est rapidement répandu et d'autres et d'autres marqueurs sont venus compléter ces outils épidémiologiques [15].

Les techniques de biologie moléculaire et d'amplification génique sont actuellement une alternative à l'étude ou à l'identification de *M. tuberculosis* soit directement à partir du prélèvement initial, soit à partir de la culture [1, 14, 29]. Elles sont également utilisées pour identifier précisément l'ensemble des mycobactéries, tuberculeuses et non tuberculeuses qui regroupent plus de 80 espèces (figure 1) [14].

Elles permettent la détection des résistances vis-à-vis des antibiotiques en reconnaissant la séquence responsable et la mise en évidence d'éventuelles mutations ; elles assurent la compréhension de l'épidémiologie en identifiant des souches ayant la même empreinte génétique responsables de cas groupés [4, 7, 14].

Ainsi la biologie moléculaire sert à :

- la détection rapide de *M.tuberculosis*.
- l'identification des mycobactéries.
- Détection de la résistance aux antibiotiques.
- Utilisation de l'épidémiologie moléculaire pour la compréhension de la pathogénicité et la transmission de la tuberculose.

### I.11.1. Les méthodes rapides de détection de *M.tuberculosis* :

Actuellement, il existe deux techniques bien différentes qui permettent de donner une réponse en quelques heures sur la présence de *M.tuberculosis* dans un produit pathologique. Il s'agit de l'examen microscopique et de l'amplification génique [30].

- **Amplification génique :**

Actuellement, il existe plusieurs techniques d'amplification génique permettant la détection de *M.tuberculosis* à partir des produits pathologiques [30].

Amplification par PCR :

Réaction d'amplification génique par Polymerase Chain Reaction (PCR). Il s'agit de l'amplification d'un fragment du gène codant pour l'ARN 16S de *M.tuberculosis*. Cette technique a l'avantage d'utiliser l'uracile N glycosylase qui permet d'éviter les contaminations, d'autre part cette technique possède un contrôle interne et peut être utilisée de façon manuelle ou automatisée [30].

Amplification de l'ARN par TMA :

Transcription Mediated Amplification (TMA). Cette technique fait appel à l'amplification isotherme d'une séquence spécifique de l'ARN 16S générant des copies d'ARN. Il n'existe pas de contrôle interne et la technique est entièrement manuelle [30].

Amplification par LCR :

Réaction d'amplification génique par Ligase Chain Reaction (LCR). C'est un procédé d'amplification par réalisation de cycle de ligature de 2 sondes nucléotidiques spécifiques de *M.tuberculosis* et choisies de manière à être juxtaposées lorsqu'elles s'hybrident à l'ADN cible. Le système de détection est basé un procédé d'immunocapture et cette technique est automatisée [30].

Amplification par SDA :

Réaction d'amplification par Strand Displacement Amplification (SDA). Il s'agit d'une amplification isotherme d'ADN réalisée dans un automate qui couple amplification et détection. Il existe un contrôle interne automate [30].

Les puces à ADN :

Une technique d'avenir : les puces à ADN, technologie en développement qui a été appliquée aux mycobactéries par Troesh. Les résultats obtenus semblent d'un haut degré de discrimination puisque cette technique permet non seulement d'identifier les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) mais aussi de séparer les différentes espèces du complexe *tuberculosis* [30].

### I.11.2. Identification des mycobactéries :

Dans un objectifs d'identification à partir des cultures, la PCR comporte soit une phase d'amplification et d'hybridation sur bandelettes (différentes en fonction de la présence du complexe tuberculosis et d'une mycobactérie atypiques), soit une amplification suivie d'un séquençage [8, 14].

Elle peut être réalisée par amplification de régions de différence, technique basée sur la connaissances génomiques complètes des mycobactéries tuberculeuses (figure 14) [8, 14].

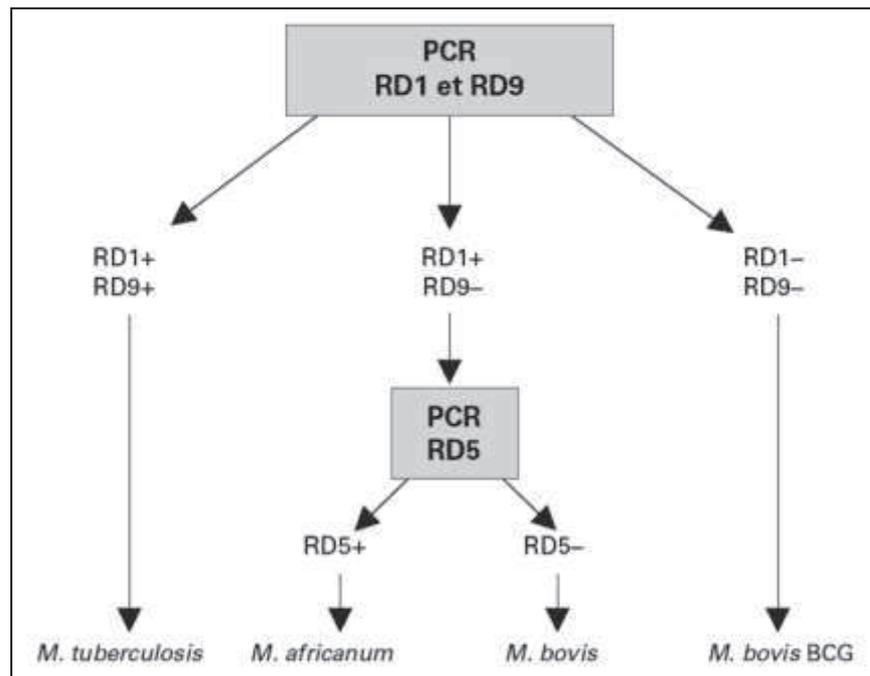
Cependant, suite au séquençage du génome de *M. tuberculosis* H37Rv et après comparaison avec le génome des autres espèces du groupe, des régions de différence (RD) variables entre ces différentes espèces ont été identifiées [10].

Ces RD peuvent être dues soit à des éléments génétiques mobiles comme des prophages ou des séquences d'insertion (par exemple RD5 correspond à l'IS6110), soit à des recombinaisons homologues entre des IS6110 adjacentes, ou bien être dues à des délétions responsables de troncatures de gènes dans des régions codantes (exemples : TbD1, RD1, RD9, RD10) (voir figure 15) [10].

L'apparition des RD pourrait être parallèle à l'évolution de *M. tuberculosis* et à l'émergence des autres espèces [10]. Ainsi, chez *M. bovis* BCG, qui paraît être la souche la plus « récente », les pertes d'ADN au niveau des RD sont les plus fréquentes, tandis que *M. tuberculosis* présente la quasi-totalité des RD [10].

Cependant, cette approche ne permet pas de différencier les souches de *M. microti* parmi *M. africanum* ou *M. bovis* car ces souches sont RD1+, RD9- et RD5 +/- [9, 10]. De même, les souches de *M. canettii* qui sont RD1+, RD9+ et RD5+ [2, 4] ne peuvent pas être repérées parmi les souches de *M. tuberculosis*. *M. microti*, dont le principal réservoir semble être les petits rongeurs (campagnols) est depuis peu rencontré chez les humains [31]. *M. canettii* est, quant à lui, décrit de façon exceptionnelle comme agent de la tuberculose humaine [32].

Or, *M. microti* est caractérisé génotypiquement par l'absence du marqueur IS1561' [9, 22], tandis que *M. canettii* présente une délétion partielle de la région de différence RD12 [9, 10, 22]. Ainsi, ces deux marqueurs semblent être de bons indicateurs génotypiques pour ces deux espèces et leur intérêt potentiel lors de l'identification des mycobactéries du groupe de la tuberculose en pratique courante reste donc à évaluer [8].



**Figure 14.** : Identification des espèces au sein du complexe tuberculosis par analyse des régions de différence [8, 14].

	Séquences des amorces	Tailles des fragments (paires de base)
RD1	RD1ff : 5'-AAG-CGG-TTG-CCG-CCG-ACC-GAC-C-3'	RD1+ : 150 pb
	RD1Int : 5'-CTG-GCT-ATA-TTC-CTG-GGC-CCG-G3'	RD1- : 200 pb
	RD1fr : 5'-GAG-GCG-ATC-TGG-CGG-TTT-GGG-G-3'	
RD9	RD9ff : 5'-GTG-TAG-GTC-AGC-CCC-ATC-C-3'	RD9+ : 306 pb
	RD9Int : 5'-CAA-TGT-TTG-TTG-CGC-TGC-3'	RD9- : 206 pb
	RD9fr : 5'-GCT-ACC-CTC-GAC-CAA-GTG-TT-3'	
RD10	RD10ff : 5'-CTG-CAA-CCA-TCC-GGT-ACA-C-3'	RD10+ : 308 pb
	RD10Int : 5'-GAA-GTC-GTA-ACT-CAC-CGG-GA-3'	RD10- : 202 pb
	RD10fr : 5'-AAG-CGC-TAC-ATC-GCC-AAG-3'	
RD5	RD5intf : 5'-CTG-GTC-GAA-TTC-GGT-GGA-GT-3'	RD5+ : 152 pb
	RD5intr : 5'-ATG-GTC-TCC-GAC-ACG-TTC-GAC-3'	RD5- : pas d'amplification

**Figure 15.** : Séquences des amorces utilisées pour l'identification des mycobactéries [8, 14].

I.11.3. Détection de la résistance aux antibiotiques : Voir étude de sensibilité.

I.11.4. Utilisation de l'épidémiologie moléculaire pour la compréhension de la pathogénicité et la transmission de la tuberculose :

Ces méthodes s'appuient sur le principe que les patients infectés avec des souches à profil génomique identique sont épidémiologiquement liés alors que ceux infectés avec des souches à profil distinct ne le sont pas. La validité de cette hypothèse dépend des propriétés des marqueurs génomiques utilisés qui doivent être suffisamment stables pour identifier les différents isolements d'une même souche [15].

Les techniques d'amplification géniques (PCR ou amplification d'ARN) utilisent des cibles nombreuses dont le choix peut varier d'un laboratoire de bactériologie à l'autre selon les habitudes locales. Ce choix tient également compte des objectifs fixés (identification, recherche de résistance) [14].

***Outils génétiques de l'épidémiologie moléculaire :***

a. Spoligotyping :

Le spoligotyping est une méthode de typage moléculaire fondée sur le polymorphisme des séquences nucléotidiques localisées entre les séquences identiques de 36 pb de la région DR « Direct Repeat » et présent uniquement chez les membres du complexe *M. tuberculosis*.

Le nombre de séquences DR peut varier entre les souches de la même espèce. Ces séquences de 36 pb sont séparées par des séquences non répétitives d'ADN de 36–41 pb appelées séquences inter-DR ou « spacers », dont les variations sont limitées [5, 31, 33].

Elle est basée sur une amplification par PCR du locus DR, suivi d'une hybridation des produits marqués de la PCR à une membrane contenant des oligonucléotides liées à elle par liaison covalente correspondant à chaque'un des 43 spacers (figure 16 et 17) [3, 31, 33, 34].

Sous de bonnes conditions, la technique du spoligotyping requière moins de 24 heures pour l'obtention du résultat, car elle peut être réalisée directement de l'échantillon clinique et ne nécessite pas le passage par la culture [33, 34].

L'utilisation du spoligotyping comme première méthode de caractérisation des souches permet une bonne appréciation de la diversité présente et une analyse de la distribution par comparaison avec la banque mondiale [35].

Cette technique permet une première discrimination simple, rapide et fiable des différentes souches. Les souches présentant des profils identiques sont étudiées ensuite par des méthodes complémentaires qui visent à établir ou à réfuter l'hypothèse de clonalité des souches, permettant ainsi de suggérer l'existence de liens épidémiologiques potentiels [35]. Appliquer une telle méthode serait utile dans la surveillance de la transmission de tuberculose et dans les interventions pour empêcher davantage de diffusion de cette maladie [34].

b. Le typage MIRU-VNTR :

Cette technique est élaborée sur éléments répétitifs spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis*. Des nouvelles unités répétitives intergéniques tout au long du chromosome mycobactérien ont été identifiées et appelées mycobacterial interspersed repetitive units (MIRUs) et variable number of tandem repeats (VNTRs) [4].

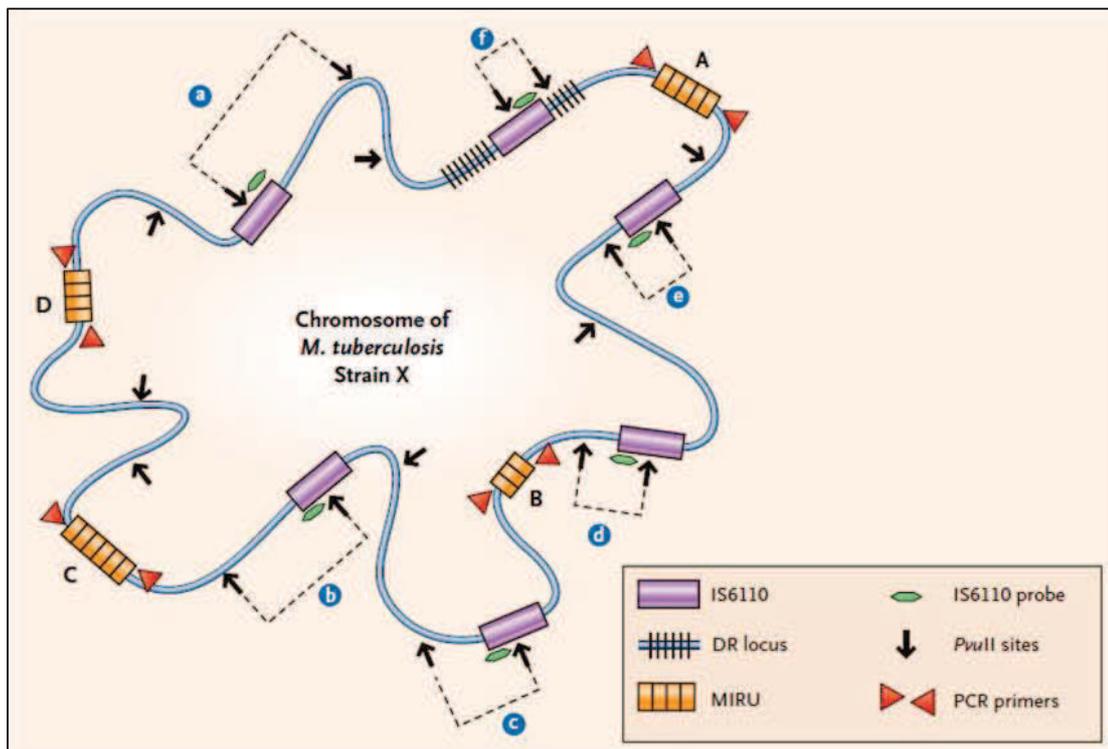
Ces structures sont composées de séquences répétitives de 40-100 bp organisées en tandem direct répété et dispersées en plusieurs emplacements tout au long du chromosome de *M.tuberculosis* H37Rv. Le nombre total des MIRUs ou les VNTRs est estimé à environ 40–50 par génome (41 locus sont présents chez *M.Tuberculosis* H37Rv) [4].

Le typage MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number Tandem Repeats*) consiste en la recherche (par PCR) de ces régions répétées polymorphiques en fonction des souches (figure 16 et 18) [14].

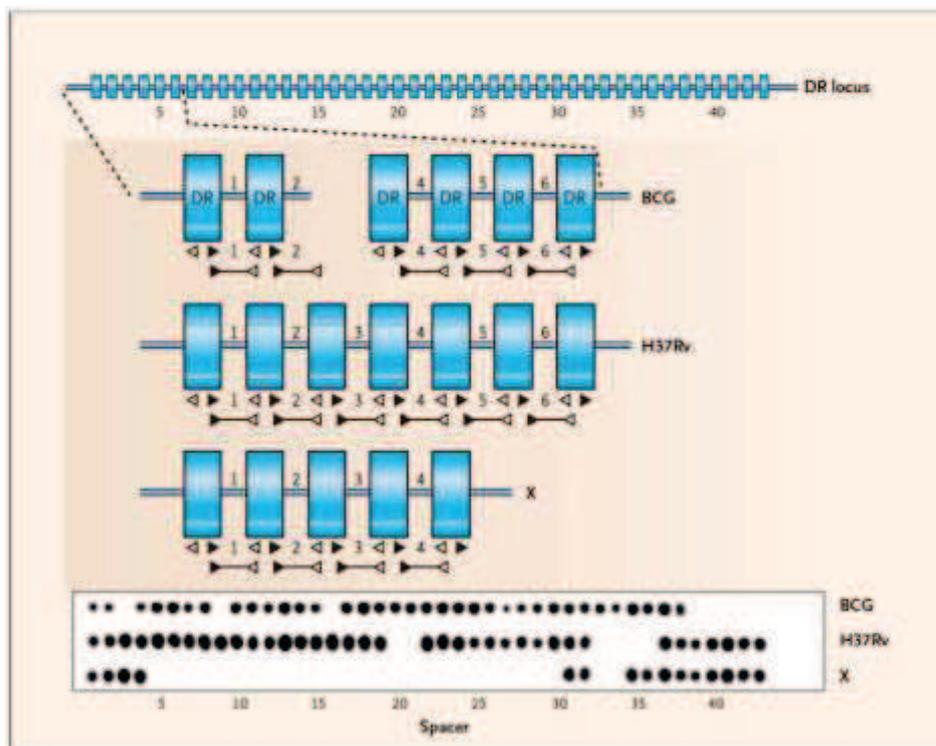
c. Méthode RFLP IS6110 :

L'élément IS6110 est une séquence d'insertion spécifique des bacilles de la tuberculose et absent des autres espèces mycobactériennes. Chez *M. tuberculosis*, la distribution d'IS6110 varie d'une souche à l'autre avec un nombre de copies variable et des localisations différentes sur le chromosome. Ce polymorphisme est le résultat de transpositions ou de divers événements génétiques successifs survenus au cours de l'évolution (figure 16) [15].

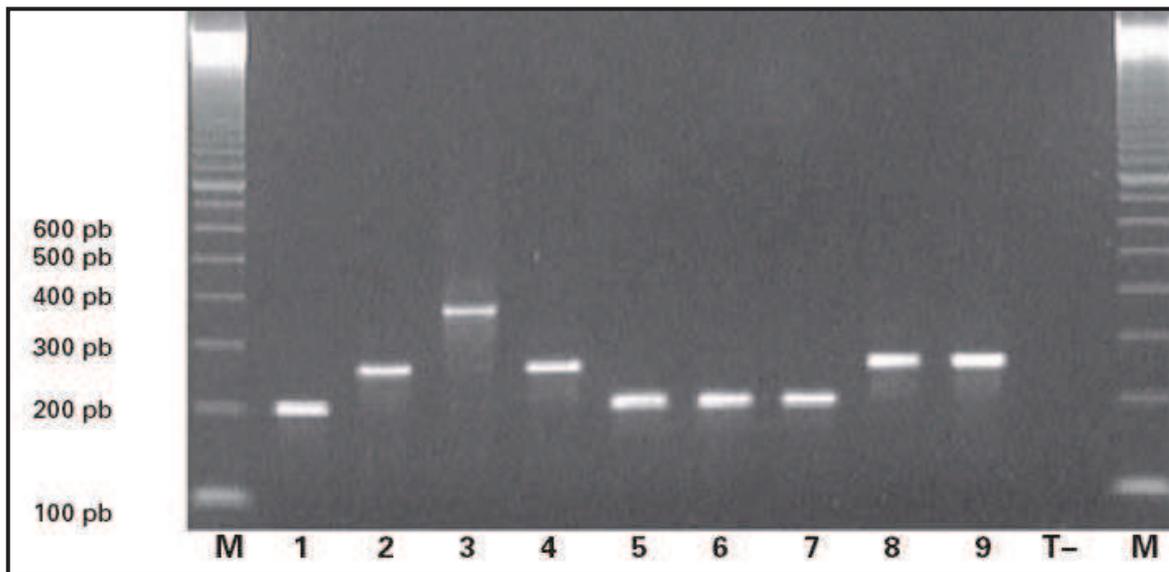
Un protocole standardisé a été proposé pour la méthode RFLP IS6110. La technique consiste à digérer le génome par PvuII, une enzyme de restriction qui ne coupe qu'une fois dans IS6110, puis à séparer les fragments par électrophorèse en gel d'agarose. Par hybridation avec la séquence répétée IS6110, on révèle le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFPL) des quelques fragments d'ADN qui portent IS6110 [15].



**Figure 16. :** Schéma représentant le chromosome de *Mycobacterium tuberculosis*, et montrant les cibles des différentes techniques moléculaire : RLFP IS6110, MIRU-VNTR, Spoligotyping [31].



**Figure 17. :** Spoligotyping. Schéma montrant les 43 directs-repeats (rectangles bleues) et les spacers (lignes horizontales entre eux) existant au niveau du génome de *M. tuberculosis* utilisés en spoligotyping, puis montrant en bas le résultat d'un typage de 3 souches : BCG H37Rv, et une autre souche x : les points noirs correspondent à l'hybridation du produit de l'amplification du spacer [31].



**Figure 18.** : Exemple de résultat obtenu avec le marqueur VNTR 1955 par le technique MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspered Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats) ; les bandes blanches représente des fragments d'ADN de tailles différentes [14].

*Matériels*  
*et*  
*Méthodes*

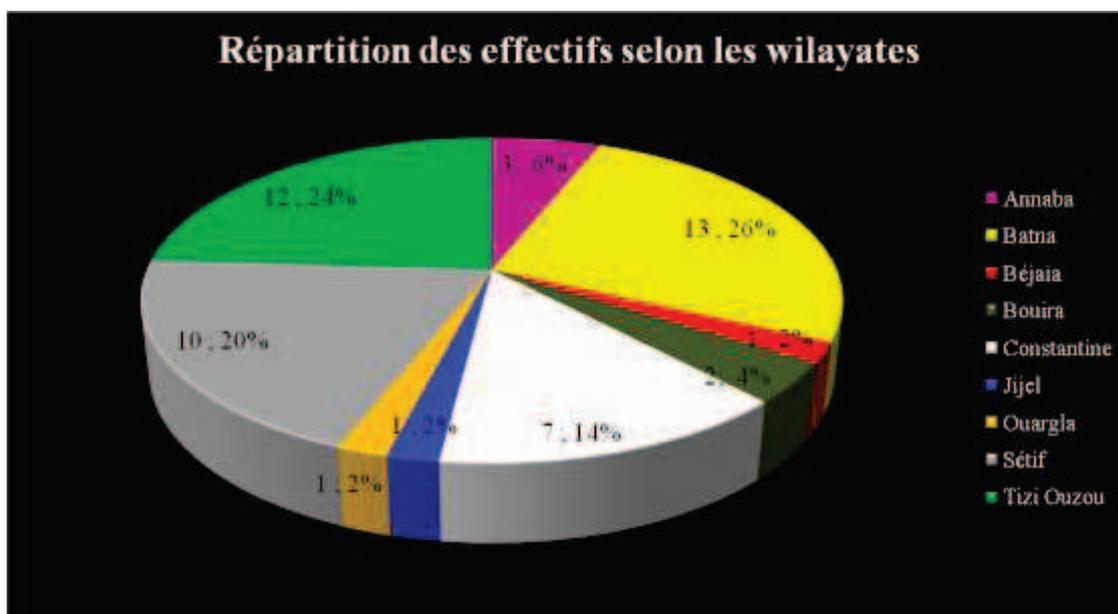
## II. Matériel et méthodes :

### II.1. Matériel :

Il s'agit d'une étude effectuée sur cinquante souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées au cours de l'année 2011 chez 50 patients atteints de tuberculose, originaires de l'est du pays.

Les 50 souches étudiées ont été isolées de prélèvements pulmonaires ou extra-pulmonaires réalisés chez des patients au niveau des EPSP, des EPH, des CHU, de la région est de l'Algérie (voir l'annexe 6). Elles sont représentées selon les wilayates (graphique I).

Pour chacun des patients, les données suivantes figurant sur la fiche de renseignement obligatoire sont : l'âge au moment du diagnostic, le sexe, l'adresse, les antécédents de tuberculose et le traitement éventuel reçu par le patient (voir annexe 6).



**Graphique I. :** Répartition des effectifs selon les wilayates.

## II.2. Méthodes :

### II.2.1. Diagnostic bactériologique :

Un examen microscopique est réalisé selon la méthode Ziehl-Neelsen sur chaque prélèvement, suivi d'une culture sur milieu L-J puis une étude de la sensibilité aux antituberculeux majeurs (Streptomycine, Isoniazide, Rifampicine et Ethambutol) pour les malades jamais traités. En plus de ces antibiotiques, l'étude de sensibilité inclus aussi les antituberculeux de seconde ligne tels que la Kanamycine, Ethionamide, Cycloserine, Ofloxacin pour les malades déjà traités.

### II.2.2. Technique de typage par Spoligotyping :

#### **1. Le choix de la technique :**

Le typage moléculaire représente actuellement une contribution majeure aux enquêtes épidémiologiques classiques concernant la tuberculose [5].

La méthode standardisée utilisée est celle décrite par Kamerbeek et al. qui repose sur la détection du polymorphisme de la région DR (Direct Repeat) [6].

Cette technique rapide (nécessite moins de 48 h de manipulation), facile, non onéreuse et permet d'analyser plusieurs souches à la fois [36], et de les comparer à une base de données mondiale disponible sur le net [37].

Le kit nécessaire à la technique du spoligotyping est disponible et commercialisé par la firme Isogen® (Bioscience BV, Pays Bas), l'avantage de ce kit, c'est que la membrane est réutilisable plusieurs fois.

#### **2. Principe de la méthode Spoligotyping :**

La méthode de typage est basée sur le polymorphisme de l'ADN au niveau d'un locus particulier le "Direct Repeat" (DR), ce dernier est présent uniquement chez les bactéries du complexe *tuberculosis* [36].

Ce locus a été décrit pour la première par Hermans *et al.* après séquençage de la souche *Mycobacterium bovis* BCG. La région DR de *M. bovis* BCG se compose de séquences répétées de 36 paires de bases, qui sont intercalées par d'autres séquences non-répétitives appelées « spacers », longues de 35 à 41 paires de bases. Le nombre de copie de la séquence DR chez *M. bovis* BCG est de 49 ; alors que chez les autres souches *M. tuberculosis*, il est significativement variable. La grande majorité des souches *Mycobacterium tuberculosis* contiennent un ou plusieurs éléments IS6110 au niveau de la région DR (Figure 19) [36].

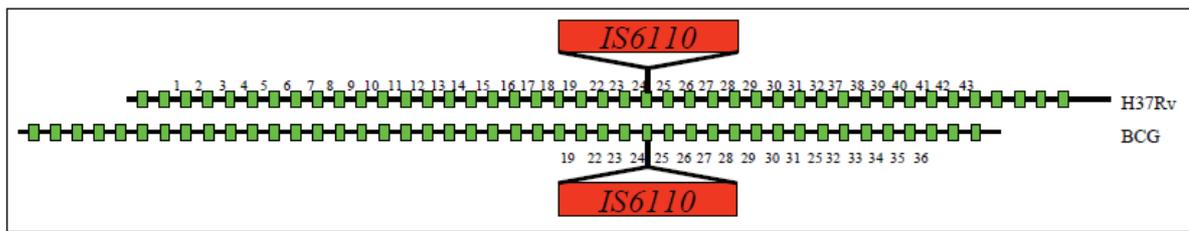
Une séquence DR et son spacer voisin sont appelés "Direct Variant Repeat" DVR. Quand cette région DR de plusieurs souches a été comparée, il a été constaté que l'ordre des ces spacers étaient le même chez toutes les souches, mais des délétions et/ou des insertions de

spacers ou DRs étaient aussi possible (Figure 20). Le mécanisme par le quel ces spacers et ces copies de DRs sont générées est inconnu. Avec cette méthode, la présence ou l'absence au niveau de la région DR d'un ou de plusieurs des 43 séquences connues sous le nom de spacer peut être détecté par hybridation du produit de l'amplification avec l'ensemble des 43 oligonucléotides immobilisées sur une membrane en nitrocellulose commercialisée par Isogen®. Cette méthode sera appelée Spoligotyping (de *spacer oligotyping*). Par spoligotyping, on peut détecter la présence ou l'absence des spacers connus.

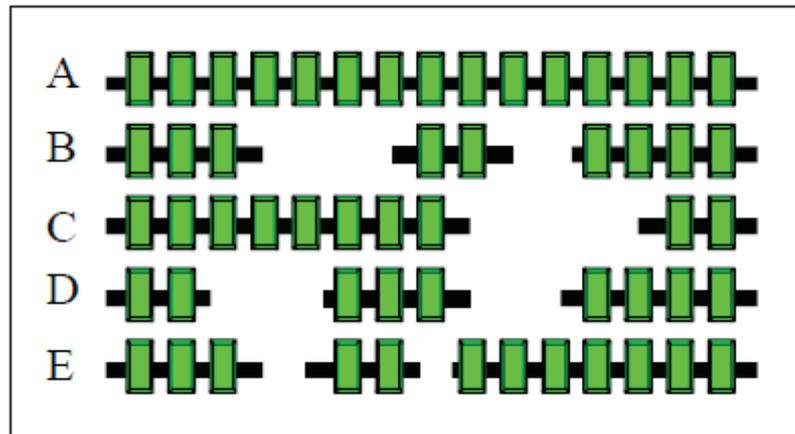
La première étape consiste à amplifier la région DR par PCR. Les amorces utilisées sont basées sur la séquence des DR, et permet l'amplification du (des) spacer (s) entre les DR cibles (Figure 21) [36].

Les produits PCR sont hybridés à des oligonucléotides complémentaires fixés sur une membrane. Après hybridation, la membrane est incubée avec la streptavidine - peroxidase, qui se lie à la biotine fixé sur une des amorces (DRa) des produits PCR. La détection du signal de l'hybridation est optimisée par un mécanisme de détection chimio-lumineux (enhanced chemiluminescence - ECL). La peroxydase présente sur la streptavidine catalyse une réaction provoquant une émission de lumière, cette dernière peut être détectée par autoradiographie [36].

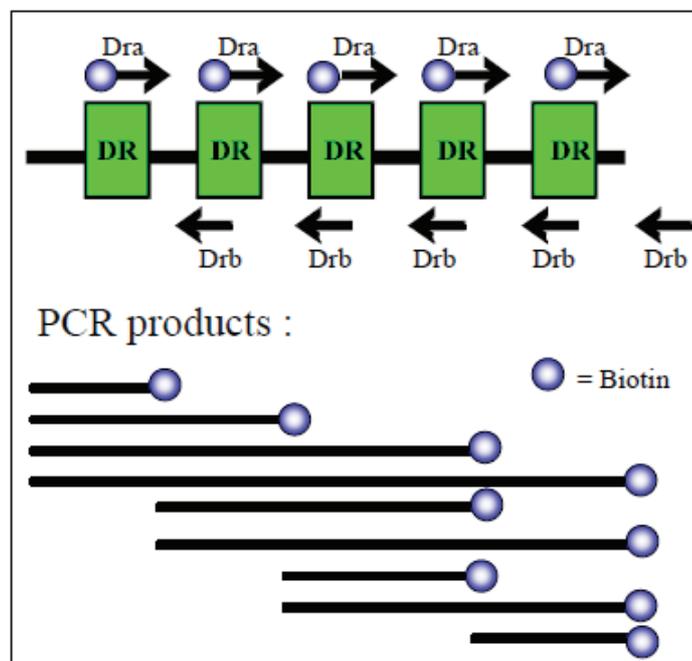
Les résultats ont été exprimés sous forme d'un code binaire et comparés aux données de la banque mondiale de spoligotypes SpolDB4 [6, 37].



**Figure 19.** : Structure du locus DR du génome des souches *M. tuberculosis* H37Rv et *M. bovis* BCG P3. Les rectangles verts représentent les 36 pb du Direct Repeat (DR) [36].



**Figure 20.** : Schéma représentant le polymorphisme de la région DR chez différentes souches de *Mycobacterium tuberculosis*. Les blocs de DVR sont absents d'une souche à une autre. L'ordre des spacers demeure identique [36].



**Figure 21.** : Principe de l'amplification *in vitro* de l'ADN au niveau de la région DR chez *Mycobacterium tuberculosis* [36].

### 3. Procédure et étape de la technique du Spoligotyping :

#### a. Extraction de l'ADN :

À l'aide d'une anse en platine, nous avons prélevé à partir du milieu de L-J quelques colonies de culture de MTb et mises dans un tube à vis de 2 ml contenant 150 µl d'eau de pureté biologique ou du TE.

- ce mélange a été chauffé pendant 30 min à 100 ° C dans un bloc chauffant sous hotte de sécurité bactériologique.
- les produits d'extraction ont été conservés à - 20 ° C jusqu'à utilisation.

#### b. Amplification par PCR :

L'amplification des spacers est accomplie par l'utilisation d'un couple d'amorces Dra biotinée et DRb, qui permettent d'amplifier les espaces inter DR. Une petite quantité d'ADN est requise pour la réaction. Théoriquement, la PCR est exécutée avec 10 ng d'ADN chromosomique mycobactérien purifié mais, avec des adaptations mineures, l'ADN extrait d'échantillons cliniques ou bactérie lysées peut aussi servir pour la PCR [36].

Dans une chambre blanche exempte d'ADN mycobactérien (afin d'éviter la contamination par d'autres ADN), une quantité suffisante d'un mix (mélange de réactifs nécessaires pour la PCR) été préparée.

- répartir à l'aide d'une micropipette 48 µl du mix par microtube stérile de 0,2 ml.
- dans une autre pièce différente de la chambre blanche, on rajoute 2 µl du surnageant du produit d'extraction.
- les microtubes ont été placés dans un thermocycleur selon le programme de la technique spoligotyping (tableau VI).

**Tableau VI.** : Programme PCR pour Spoligotyping.

N°programme	Temps	Température	Nombre de cycle
Dénaturation	3 minutes	96 ° C	1 cycle
	1 minute	96 ° C	30 Cycles
	1 minute	55 ° C	
	30 secondes	72 ° C	
Extension des amorces	5 minutes	72 ° C	1 Cycle
Infini	99h99min	4 ° C	

**c. Electrophorèse :**

Les produits d'amplification sont estimés sur un gel d'agarose à 1,5 %, afin d'apprécier la qualité de la PCR et la disponibilité de l'ADN bactérien pour l'hybridation. En prélevant 2 µl de chacun des produits d'amplification mélangés au bleu de dépôt<sup>1</sup> puis déposés dans des puits. Après migration sous l'effet d'un courant de 90 volts pendant 30 à 90 minutes, les produits sont visualisés sous une rampe UV (plaque, caméra, écran, imprimante).

**d. Hybridation :**

Préparation de la membrane Isogen® pour le typage et son montage dans le miniblottter :

- rincer la membrane<sup>2</sup> 2 fois dans 250 ml de 2X SSPE / 0,1 SDS à 60 ° C pendant 5 min.
- nettoyer parfaitement le miniblottter.
- monter la membrane avec son support de mousse dans le miniblottter de telle sorte que les lignes d'encres soient au même niveau que les orifices des canaux, et que les lignes de dépôt contenant les oligonucléotides (sondes des spacers) soient juxtaposées avec leurs canaux homologues au niveau de la partie supérieure du miniblottter (voir figure 22), ainsi chaque canal en compagnie de sa ligne de dépôt servira à analyser le locus DR d'une souche.
- les parties supérieure et inférieure du miniblottter englobant la membrane et le support de mousse ont été fermées et vissées par 6 vis en plastique.
- à l'aide d'une pompe à vide, on aspire le liquide résiduel au niveau des canaux.

Préparation des échantillons :

- 20 µl de chacun des produits PCR a été dilué dans 150 µl de tampon 2X SSPE / 0,1 SDS ; ainsi on prépare 40 échantillons de souches, en plus de 2 témoins positifs (souches BCG et H37Rv) et un témoin négatif, ce qui fera 43 tubes à préparer ;
- chauffer les tubes à 100 ° C pendant 10 min afin de dénaturer l'ADN, puis les prélèvements sont placés immédiatement dans de la glace pour maintenir cette dénaturation ;

Remplissage du miniblottter :

- on procède au remplissage des canaux successivement et en notant l'ordre de remplissage<sup>3</sup> ;
- les canaux premier et dernier, seront remplis avec du tampon 2X SSPE / 0,1 SDS afin d'éviter tout phénomène de bavage (contamination inter-échantillons) ;
- remplir les 43 canaux avec 150 µl du mélange des tubes chauffées puis refroidies ;

<sup>1</sup> Il sert à la fixation de l'ADN à l'intérieur des puits lors de la migration ;

<sup>2</sup> La membrane doit être tenue aux extrémités par des pinces.

<sup>3</sup> Lors du remplissage, on doit veiller à ne pas former des bulles d'air dans les canaux, et à ne pas déborder sur le canal voisin par crainte de contamination entre les souches.

Incubation de la membrane :

- le miniblottter est incubé en position horizontale pendant 1 h à 60 ° C<sup>4</sup>.
- après incubation, on retire le miniblottter pour aspirer les solutions des canaux dans l'ordre du dépôt, après séparation des deux parties du miniblottter, la membrane est retirée délicatement grâce à une paire de pinces en plastique.

Traitement de la membrane :

- la membrane est lavée 2 fois avec une solution de 150 µl de 2X SSPE / 0,5 SDS à 60°C pendant 10 min avec agitation, puis placée dans une bouteille rotative, contenant une solution de conjugué streptavidine - peroxydase diluée au 1/4000 (3,5 µl de conjugué de streptavidine - peroxydase dans 14 ml de 2X SSPE / 0,5 SDS), cette bouteille à été placée en rotation pendant 45 min à 1 h à une température de 42 ° C<sup>5</sup> ;
- laver de nouveau de la membrane 2 fois dans une solution de 250 ml de 2X SSPE / 0,5 SDS à 42 ° C pendant 10 min sous agitation, puis dans 250 ml de 2X SSPE pendant 5 min à température ambiante sous agitation aussi ;

Détection de la chimioluminescence :

- incuber la membrane pendant 2 min dans 40 ml de solution de détection ECL (mélange des réactifs 1 et 2 en quantité égale) en agitant doucement à la main ;
- la membrane est mise dans une pochette transparente en plastique en chassant les bulles d'air formées et l'excès du liquide, puis placée dans une cassette d'autoradiographie.
- au niveau de la chambre noire, on expose la membrane à un film ECL ultra-sensible (autoradiographique) placé à l'intérieur de la cassette (placé contre la face de la membrane portant les oligonucléotides), d'abord pendant une minute, puis répétée avec un autre film pendant 5 min à 30 min, afin de capter la chimiofluorescence produite suite à l'hybridation des produits PCR (produite par la réaction de la biotine avec le conjugué streptavidine - peroxydase).
- le film est révélé et les résultats de l'hybridation obtenus.

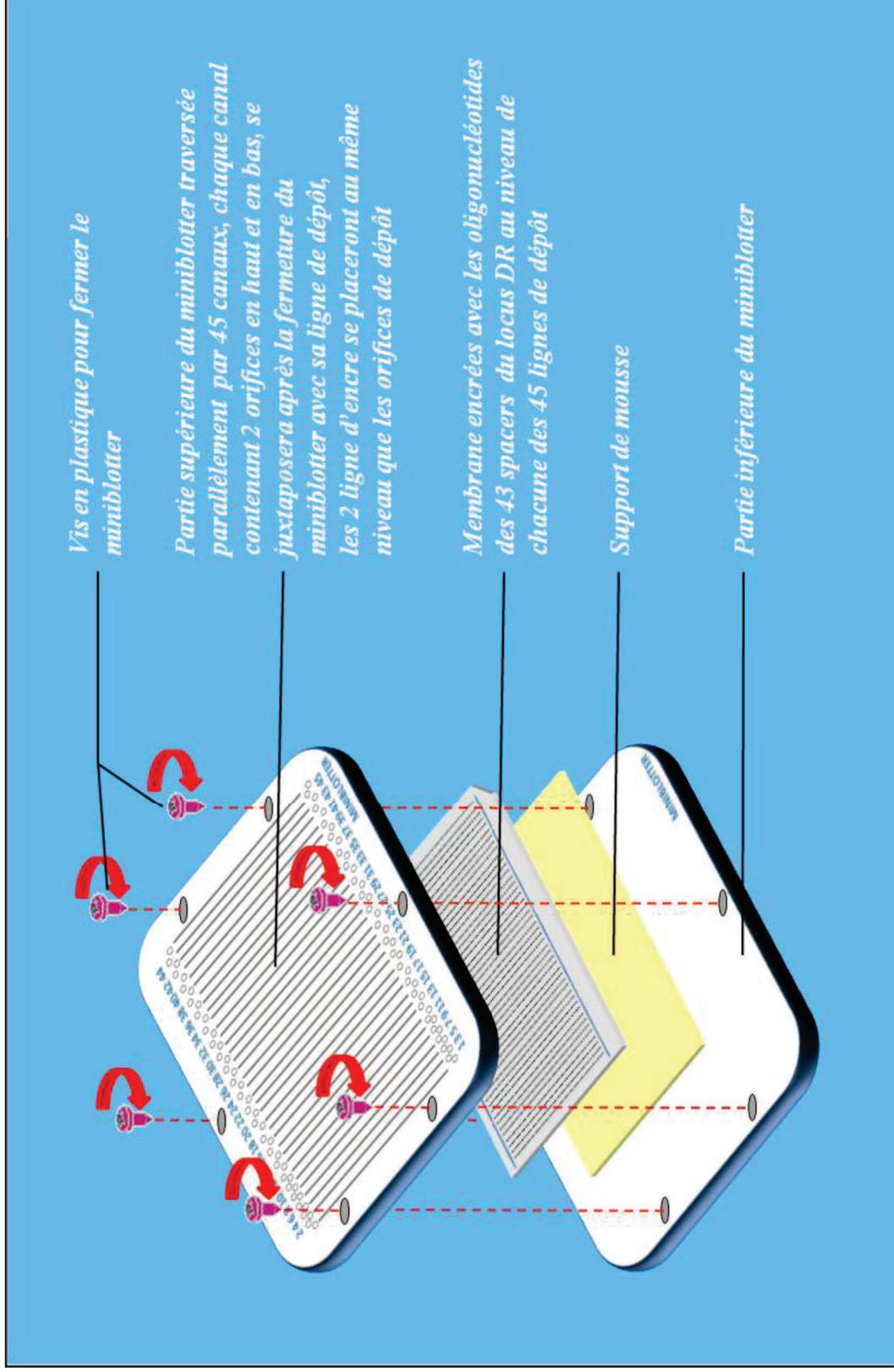
#### **e. Déshybridation et conservation de la membrane :**

Après chaque manipulation, on procède à l'élimination des oligonucléotides fixés sur la membrane par déshybridation, en la lavant 3 fois dans 250 ml de SDS 1 % à 85 ° C pendant 30 min et sous agitation, puis la conservant scellée dans du saran-wrap dans un endroit frais et sec jusqu'à usage ultérieure (chaque membrane peut être réutilisée après lavage soigneux, plusieurs fois).

---

<sup>4</sup> Le miniblottter est maintenu horizontal et sans agitation afin d'éviter tout débordement d'un orifice à un autre (éviter une contamination d'un échantillon par un autre).

<sup>5</sup> Afin d'éviter d'inactiver la peroxydase.



**Figure 22.** : Emplacement de la membrane dans le miniblottier.

*Résultats*  
*et*  
*Discussion*

### III. Résultats et discussion :

#### III.1. Résultats :

##### III.1.1. Nature des prélèvements :

Nos 50 souches ont été récupérées de culture de prélèvements d'origine pulmonaire (48 cas) et d'origine extra-pulmonaire (2 cas), le type et la nature des prélèvements sont résumés dans le tableau VII.

**Tableau VII. :** Type et nature des prélèvements analysés.

Types de prélèvement	Nombre de cas	Nature du prélèvement	Nombre de cas
Pulmonaire	48	Crachats	46
		Aspiration bronchique	1
		Aspiration gastrique	1
Extra-pulmonaire	2	Adénopathies	2

Sur les 50 patients recensés, 40 ont été déjà traités contre la tuberculose, alors que les 10 autres sont de nouveaux cas jamais traités.

##### III.1.2. Distribution géo-démographique :

###### 1. Répartition selon le sexe et les wilayates :

La population d'étude est composée de 50 patients répartis en 29 hommes et de 21 femmes (fréquence de 58 % d'hommes contre 42 % de femmes) la sex-ratio est de 1,38 H/F (graphique II).

Parmi les 50 patients, nous avons recensé en fonction de l'origine géographique, 13 patients de la wilaya de Batna (26 %), 12 de la wilaya de Tizi Ouzou (24 %) et 10 de la wilaya de Sétif (20 %) ; ce qui représente plus de la moitié de la population d'étude. Les autres patients appartenaient à 6 autres wilayas selon des fréquences différentes (graphique I).

###### 2. Répartition selon l'âge et le sexe :

Sur le graphique III sont représentés les effectifs en fonction des différentes tranches d'âges et en fonction du sexe. La moyenne d'âge des patients est d'approximativement 36 ans [4 mois – 86 ans].

III.1.3. Résultats du test de sensibilité :

Les profils de résistance des souches de cette étude établis par la méthode des proportions sont résumés dans le tableau VIII et le graphique IV.

**Tableau VIII.** : Profil de résistance des 50 souches étudiées.

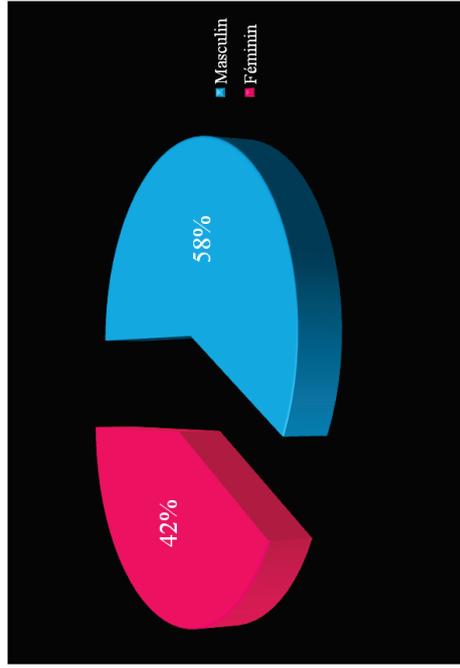
Profil de l'antibiogramme	Sensible	Mono-résistant	Poly-résistant	MDR	Contaminés
Nombre de souches	40	1	1	5	3

Les données clinicoépidémiologiques des patients présentant une souche ayant une résistance à un ou à plusieurs antituberculeux, sont regroupés dans le tableau IX.

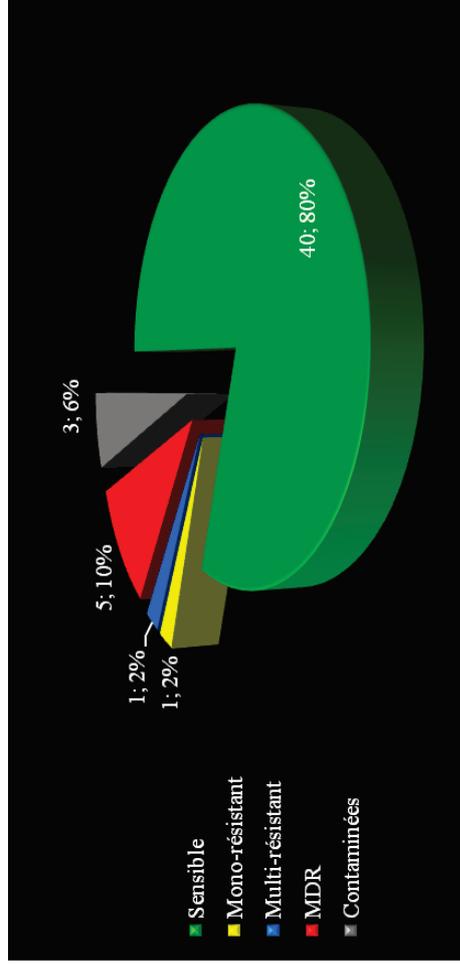
**Tableau IX.** : Caractéristiques clinicoépidémiologiques des patients hébergeant une souche ayant une résistance à au moins un antituberculeux majeur.

Patients	Profil	Antituberculeux	sexe	âge	wilaya	Forme	Malade traité ou non
P40	Mono-résistant	INH	F	48	Tizi Ouzou	Pl	T
P5	Poly-résistant	INH, STR	F	24	Sétif	Pl	T
P45	MDR	INH, STR, RMF, EMB	F	39	Tizi Ouzou	Pl	NT
P15		INH, STR, RMF, EMB	F	15	Constantine	Pl	T
P3		INH, STR, RMF, EMB	M	32	Constantine	Pl	T
P26		INH, STR, RMF, EMB	F	28	Batna	Pl	T
P50		INH, STR, RMF, EMB	M	42	Batna	Pl	T

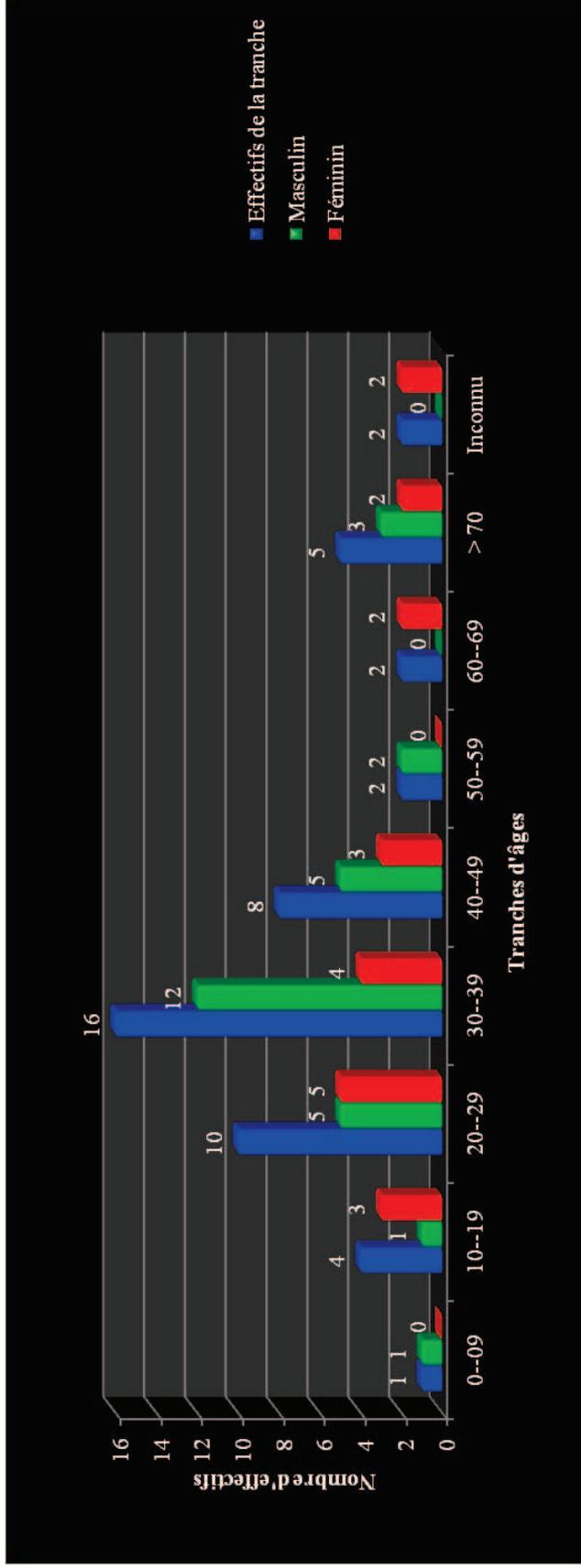
P : patient, F : féminin, M : masculin, Pl : pulmonaire, T : traité, NT : non traité, INH : isoniazide, STR : streptomycine, RMF : rifampicine, EMB : éthambutol.



**Graphique II. :** Données des patients en fonction du sexe.



**Graphiques IV. :** Profil de résistance des souches répertoriées.



**Graphique III. :** Effectifs en fonction des tranches d'âges et le sexe.

#### III.1.4. Résultats du typage par spoligotyping :

L'étude des profils des 50 souches envoyées au LNR par les structures de santé de l'est, au cours de l'année 2011 et après leur comparaison à la banque de données SPOLDB4 (Institut Pasteur de la Guadeloupe), nous a révélé une diversité génétique très élevée : 26 spoligotypes (ST) ont été retrouvés dans la base de données et 6 nouveaux non trouvés (profils orphelins). Le dendrogramme résultant de cette analyse est représenté sur la figure 23.

La répartition selon les grandes familles génomiques a été observée comme suit : famille Latino-Américaine-Méditerranéenne LAM ( $n = 15$ ), famille Haarlem ( $n = 13$ ), famille T ( $n = 11$ ), famille Sardaigne-Sicile ( $n = 3$ ), famille Ukraine (LAM30) ( $n = 2$ ) et des souches n'ayant pas de familles connues ( $n = 6$ ).

De ce fait, on remarque que les familles LAM, H et T sont majoritaires car elles représentent respectivement 30 %, 26 % et 22 % de l'effectif total, les trois familles réunies représentent un taux de 78 % de toutes les souches étudiées (tableau X et graphique V).

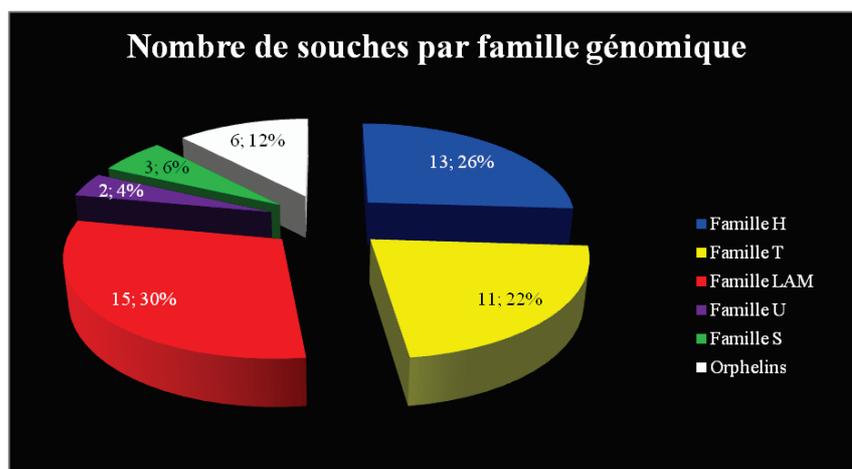
On a remarqué aussi que les 3 familles étaient aussi d'une grande diversité par rapport aux sous-familles des souches ; Les H comprennent les H1, les H2 et les H3, les LAM comprennent aussi les LAM1, les LAM3, les LAM4 et les LAM9 ; or les T comprennent les T1 et une T2-T3 (tableau X et graphique VI).

Ces sous-familles à leur tour, présentent des spoligotypes « ST » différents, ou chaque ST correspond à un profil spécifique (tableau XI).

Les souches spoligotypées, ont présenté 26 profils de ST connus au niveau de la base de données mondiale, par contre 6 profils n'étaient pas présents. N'ayant pas encore d'affiliation génomique, ils doivent être actualisés dans la base de données.

**Tableau X. :** Nombre de souches par familles et sous-familles génomiques.

Types de familles	Nombre de souches	Fréquence	Type de sous-familles	Nombre de souches
Famille LAM	15	30 %	LAM1	1
			LAM3	2
			LAM4	1
			LAM9	11
Famille H	13	26 %	H1	2
			H2	3
			H3	8
Famille T	11	22 %	T1	10
			T2-T3	1
Famille S	3	6 %	S	3
Famille U	2	4 %	U(LAM30)	2
Orphelins	6	12 %	Orphelins	6

**Graphique V. :** Nombre de souches par familles génomiques.

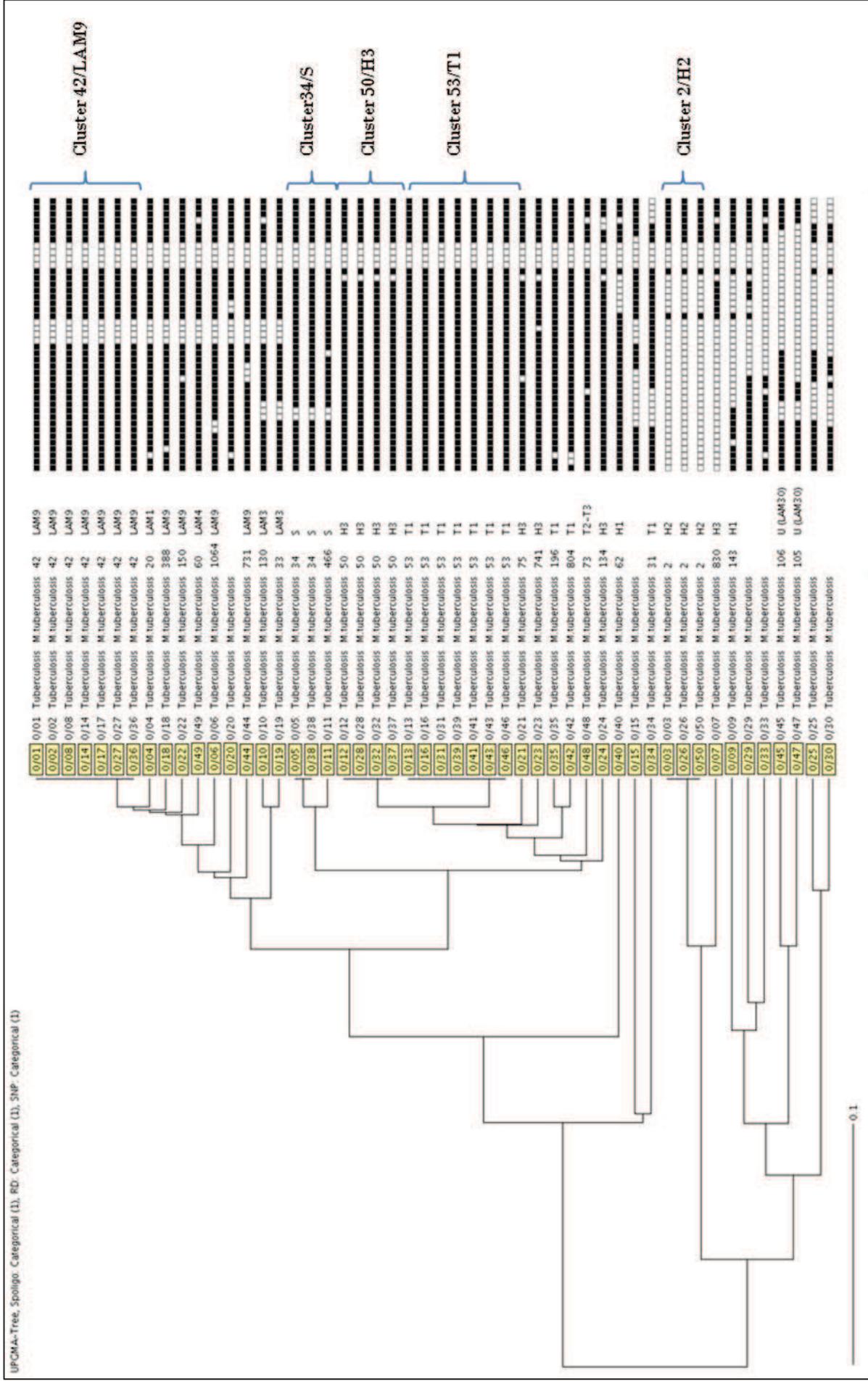


Figure 22.: Dendrogramme des souches isolées en 2011 à la région est de l'Algérie (en utilisant la base de données SPOLDB4) [37].







Chacun de ces profils orphelins est caractérisé par des spacers absents ; le premier peut être classé avec la famille des LAM, car il présente les mêmes caractéristiques c'est-à-dire l'absence des spacers 21-22-23-24 et 33-34-35-36.

Premier profil orphelin : 1101111111111111111100001001111100001111111 ; les spacers absents (0) sont le 3, 21-22-23-24, 26-27, 33-34-35-36.

Alors que les autres profils sont assez compliqués et nécessitent une investigation plus approfondie afin d'être classifiés (voir figure 23).

Deuxième profil orphelin 1111111000000000111100001111111100000111111 est caractérisé par l'absence des spacers 8-9-10-11-12-13-14-15-16, 21-22-23-24, 33-34-35-36.

Troisième profil orphelin 111111111111110000000001001110100001111111 ; les spacers absents sont 16-17-18-19-20-21-22-23-24, 26-27, 31, 33-34-35-36.

Quatrième profil orphelin : 1101111111110110000000000000000000000001110111 ; les spacers absents sont 3, 13, 16-17-18-19-20-21-22-23-24-25-26-27-28-29-30-31-32-33-34-35-36, 40.

Cinquième profil orphelin : 1111111100000011111000000000000100001110000 ; les spacers absents sont 9-10-11-12-13-14, 20-21-22-23-24-25-26-27-28-29-30-31-33-34-35-36, 40-41-42-43.

Sixième profil orphelin : 1111111000000101110000000000000100001110000 ; les spacers absents sont 8-9-10-11-12-13, 15, 19-20-21-22-23-24-25-26-27-28-29-30-31, 33-34-35-36, 40-41-42-43.

Les clusters existants sont au nombre de 5, leur fréquence totale est de 46 %. Les clusters les plus importants sont le cluster du ST n° 53 de la sous famille T1 et le cluster du ST n° 42 de la sous famille LAM9 avec 7 souches chacun.

Les 3 autres clusters existants ont respectivement des fréquences de 8 %, 6 % et 4 %, et correspondent aux ST n° 50 de la sous famille H3, le ST n° 2 de la sous famille H2 et le ST n° 34 de la sous famille S (figure 22).

La présence de ces clusters est probablement le témoin de la transmission active des souches (souches épidémiques ou ubiquitaires).

### III.2. Discussion :

#### III.2.1. Observation selon le sexe :

Cette observation peut confirmer que les hommes sont plus touchés facilement par la tuberculose [30], car le sex-ratio de notre étude est de 1,38H/1F.

Suivant les tableaux XII et XIII, on remarque que chez les patients de sexe masculin, les sous-familles H3 et T1 sont plus présentes par rapport aux patients féminins, car on a respectivement 6 cas à 2 (75 % pour les hommes) et 7 cas à 3 (70 % pour les hommes).

Les souches des sous-familles LAM1, LAM4 et T2-T3 sont toutes présentes chez les patients masculins avec 1 cas pour chacun.

Par contre les souches de la sous-famille génomique LAM3, sont présentes uniquement chez les patients féminins. Pour le reste des souches, on a remarqué que la répartition est presque homogène entre les 2 sexes.

**Tableau XII.** : Les sous-familles et le nombre de souches chez les patients hommes.

S/Famille	H1	H2	H3	T1	LAM1	LAM3	LAM9	LAM4	T2-T3	U(LAM30)	S	ORP	Total
Effectifs	1	2	6	7	1	0	5	1	1	1	1	3	29

**Tableau XIII.** : Les sous-familles et le nombre de souches chez les patientes femmes.

S/Famille	H1	H2	H3	T1	LAM1	LAM3	LAM9	LAM4	T2-T3	U(LAM30)	S	ORP	Total
Effectifs	1	1	2	3	0	2	6	0	0	1	2	3	21

#### III.2.2. Observation épidémiologiques en fonction des tranches d'âges :

Cette observation (tableau XIV et graphique VII) nous permet en fonction des données, de confirmer l'hypothèse de la tranche active c'est-à-dire la tranche d'âge ou la tuberculose est susceptible de se répartir le plus en raison de l'activité élevée et les déplacements fréquents des individus de cette catégorie (travail, études, moyens de transport...).

L'observation démontre que les tranches d'âges actives [20 – 29 ans], [30 – 39 ans] et [40 – 49 ans] contiennent respectivement 10, 16 et 8 cas, ce qui représente 68 % des effectifs.

Ce qui caractérise cette tranche c'est la prédominance masculine, car sur les 34 cas on a 22 hommes contre 12 femmes.

Pour les âges avancés, supérieurs à 60 ans, la tuberculose est due le plus souvent au réveil des bacilles : réinfection endogène suite à l'immunodépression survenue avec l'âge et les éventuelles maladies chroniques. L'effectif féminin est nettement supérieur à celui du sexe masculin : 5 cas contre 2.

**Tableau XIV. :** Répartition des différentes familles génomiques selon les tranches d'âges et de sexe des patients.

Tranches d'âges	0-09		10-19		20-29		30-39		40-49		50-59		60-69		≥ 70		?		
	Masculin	Féminin																	
H1							1			1									
H2						1	1		1										
H3			1		2		1		1	1						2			
T1					1		5	1					1	1	1				
LAM1							1												
LAM3						1													1
LAM9	1			2			1	1	1	1	1			1	1				1
LAM4							1												
T2-T3							1												
U(LAM30)								1	1										
S					1	1		1											
ORP				1	1	2			1			1							
Total	1	0	1	3	5	5	12	4	5	3	1	1	0	2	2	3	0	2	50
	1		4		10		16		8		2		2		5		2		

### III.2.3. Observations épidémiologiques selon les wilayates :

Selon les résultats obtenus durant l'année 2011 au niveau de l'est du pays, les souches étudiées nous ont été envoyées principalement par 4 wilayas : Batna (13 cas), Constantine (7 cas), Sétif (10 cas) et Tizi Ouzou (12 cas), cette concentration est liée essentiellement aux déplacements des malades qui se font traitées dans les grandes villes.

Concernant les résultats du typage des souches isolées dans les wilayas de l'est de l'Algérie on a remarqué (tableau XV, figure 25 et graphique VIII) :

- Pour la wilaya de Batna les LAM9 sont majoritaires avec 4 cas (30 %), ce qui est assez important pour la région ; les souches de la famille Harleem sont tous présents au niveau de cette wilaya (H1 : 8 %, H2 : 15 % et H3 : 8 %) ; les T1 sont aussi présents avec 15 %. Lors de notre analyse nous avons pu détecter la présence de 2 nouvelles souches de profils orphelins ;

**Tableau XV. :** Répartition des différentes sous-familles génomiques selon les wilayas et le sexe.

Sous-familles	Sexe	Annaba	Batna	Béjaïa	Bouïra	Constantine	Jijel	Ouargla	Sétif	Tizi Ouzou	Totaux	
H1	Masculin		1								1	2
	Féminin									1	1	
H2	Masculin		1			1					2	3
	Féminin		1								1	
H3	Masculin		1	1	1				2	1	6	8
	Féminin									2	2	
T1	Masculin	2	1			1			2	2	8	10
	Féminin	1	1								2	
LAM1	Masculin					1					1	1
	Féminin										0	
LAM3	Masculin										0	2
	Féminin		1							1	2	
LAM9	Masculin		2				1		1	1	5	11
	Féminin		2			2			2		6	
LAM4	Masculin					1					1	1
	Féminin										0	
T2-T3	Masculin								1		1	1
	Féminin										0	
U (LAM30)	Masculin									1	1	2
	Féminin									1	1	
S	Masculin					1			1		2	3
	Féminin									1	1	
ORP	Masculin				1				1	1	3	6
	Féminin		2					1			3	
Totaux		3	13	1	2	7	1	1	10	12	50	

ceci est dû au fait qu'au niveau de cette région, on a des zones assez préservées et reculées ou des souches anciennes ou émergence de nouvelles souches non encore répertoriées.

Concernant la wilaya de Constantine, les LAM9 sont majoritaires avec 29 %, les seules souches LAM1 et LAM4 sont présentes exclusivement ici, les LAM réunis représentent 67 % des souches de la région, en plus des T1, S et H2 présents ici, on peut conclure que la ville est caractérisée par sa grande diversité épidémiologique : c'est une grande ville et une capitale régionale et carrefour de toute la région. On assiste alors à des réinfections permanentes et une transmission active des anciennes souches.

La wilaya de Sétif, est aussi assez riche car les familles LAM, T, S et H sont présentes. Les souches LAM9 sont dominantes (30 %), puis les souches T1 (20 %) et H3 (20 %). La seule souche T2-T3 est présente ici ; un profil orphelin a été détecté.

La wilaya de Tizi Ouzou est la plus diversifiée car nous avons observés 8 ST. Les plus présents sont les H3 avec 25 %, mais aussi les T1 et les U avec des fréquences de 17 % chacune. Ces données nous ont permis de détecter qu'au niveau de cette wilaya, une infection avec les souches U est survenue et a commencé à se propager.

Au niveau de la wilaya d'Annaba, une transmission active du ST n° 53, des souches T1 a été détectée, car tous les patients répertoriés étaient porteurs de cette souche.

Par ailleurs, 2 souches porteuses de profils orphelins ont été identifiées au niveau de la wilaya de Bouira et de Ouargla.

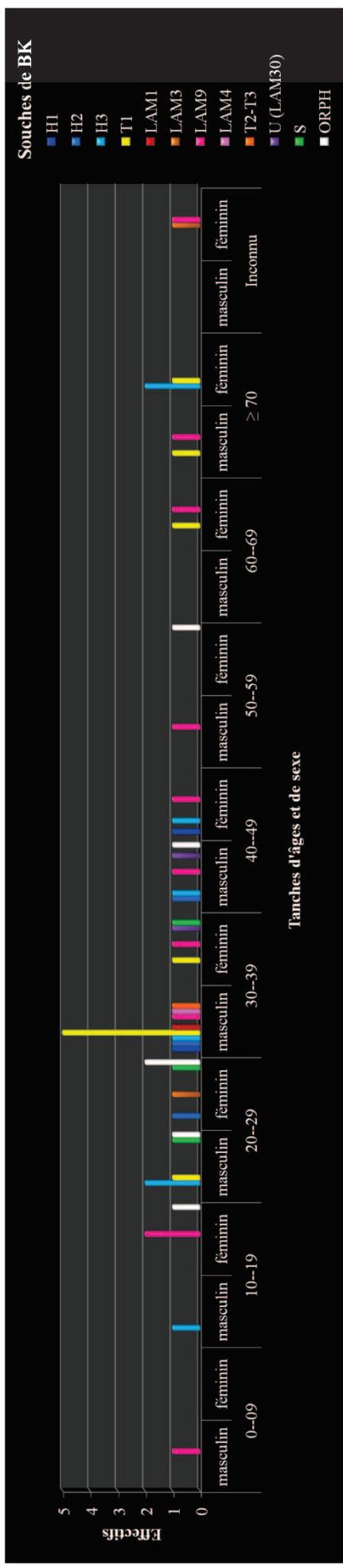
Par l'étude de la distribution des clusters, on a remarqué que les clusters des ST n° 34/S et le n° 2/H2 renseignent sur la présence de souches épidémiques car ces 2 clusters ont une distribution assez restreinte. Alors que les 3 autres clusters (des ST n° 42/LAM9, n° 50/H3, n° 53/T1) renseignent sur des profils ubiquitaires qui se retrouvent au niveau de plusieurs régions (environ 4 wilayas différentes) (tableau XVI, figure 25).

Une notion de transmission interrégionale générale peut être décelée pour les sous-familles H3, T1 et les LAM9 car elles sont présentes presque dans toutes les wilayas de l'est algérien, et la fréquence de leur incidence est assez élevée (16 %, 20 % et 22 % respectivement).

#### III.2.4. Observation épidémiologiques par rapport aux résistances :

La résistance des souches dépend de gène muté chez quelques souches. La souche correspondant au ST n° 62/H1 d'un patient déjà traité de la wilaya de Tizi Ouzou est mono-résistante à l'isoniazide.

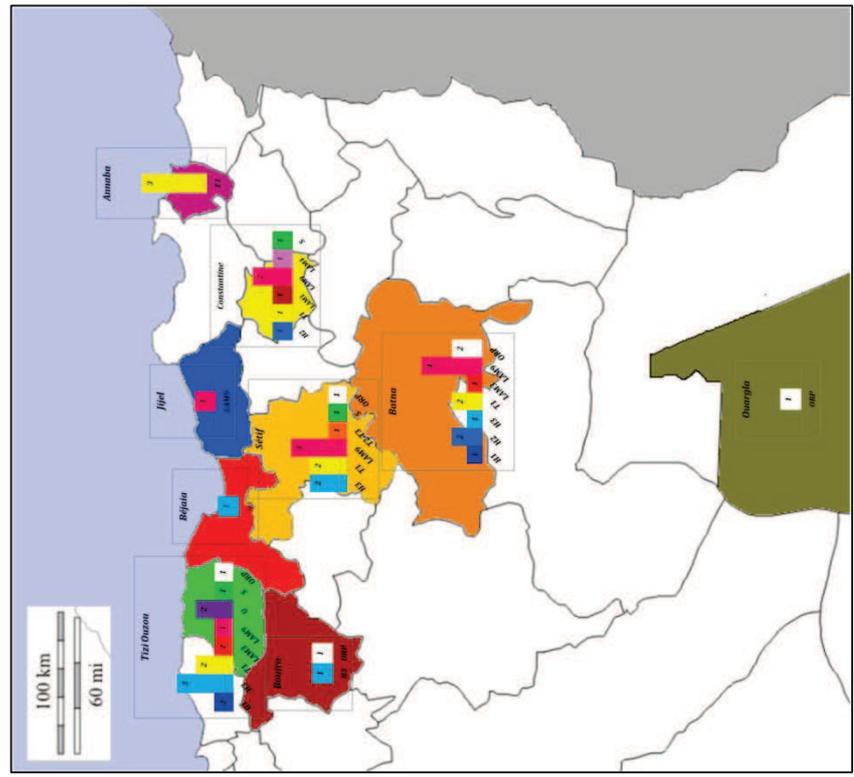
Les souches poly- ou multi-résistantes sont au nombre de 6. Ce sont les souches au profil ST n° 34/S d'un patient déjà traité de la wilaya de Sétif résistant à l'isoniazide et à la streptomycine, le profil ST n° 106/U (LAM30) d'un nouveau cas non traité de la wilaya de Tizi Ouzou résistant à 4 antibiotiques : isoniazide, streptomycine, rifampicine et l'éthambutol, le profil ST n° 388/LAM9 d'un ancien cas malade déjà traité de la wilaya de Constantine résistant à 4 antibiotiques ; à cela s'ajoute toutes les souches au profil ST n° 2/H2 répartis à Batna (2 cas) et à Constantine (1 cas) de patients déjà traités et résistants aux 4 antibiotiques.



**Graphique VII.** : Répartition des différentes familles de souches selon les tranches d'âges et de sexe des patients (en haut).

**Figure 25.** : Représentation géographique de la répartition des différentes grappes à travers les wilayates recensées (à gauche).

**Graphique VIII.** : Profil des souches des 4 wilayas les plus chargées de l'est de l'Algérie : Batna, Constantine, Sétif et Tizi Ouzou (en bas à droite).



### III.2.5. Comparaison des résultats de notre étude avec certaines régions du bassin méditerranéen :

Afin d'avoir une idée plus large sur les éventuelles liens épidémiologiques des flux migratoire et de la persistance et réinfection des anciennes souches, des comparaisons ont été établies avec d'autres régions de pays du bassin méditerranéen.

Une étude de 4 années de la région nord de la Tunisie sur 378 cas, nous indique que la fréquence du ST n° 50/H3 en Tunisie est parmi les plus élevés avec une fréquence de 39 % (8 % dans notre étude), puis vient celle du ST n° 42/LAM9 avec 16 %, (14 % dans notre étude) puis le ST n° 53/T1 arrive en troisième position avec 10,5 % (14 % dans notre étude) ; même le ST n° 60/LAM4 existant en Algérie était très présent en Tunisie avec 3,7 % [38].

Une comparaison avec une étude italienne d'une durée d'une année, dévoile que le ST n° 53/T1 répertorié avec une fréquence de 14 % cas dans notre étude et qui arrive en premier, été présent au niveau de la région de Toscane en Italie, où il représente 12 % de cas et arrive en premier aussi ; le ST n° 50/H3 détecté en 8 % dans notre étude, présente 5 % en Tuscany ; et le ST n° 42/LAM9 présent en 14 %, présente aussi 5,25 % de cas en Tuscany. D'autres sous-familles comme H1, T2, S ont été trouvées [39].

La comparaison avec la région du Limousin en France a révélé que sur 259 cas étudiés pendant 8 ans, le cluster du ST n° 53/T1 été représenté avec 13 % de cas (14 % dans notre étude), et le ST n° 50/H3 aussi avec 8 % (le même dans notre étude) [6].

Au Portugal, une étude s'étalant sur 6 ans réalisée sur 665 cas, élucida que les familles LAM, H et T sont majoritaires, et plus précisément le ST n° 20/LAM1 avec 14,5 % de cas, le ST n° 42/LAM9 avec 10,5 % (14 % dans notre étude) et le ST n° 150/LAM9 avec 3,5 %, et encore le ST n° 33/LAM3 avec 1 % et le ST n° 60/LAM4 avec 1,5 % ; la famille T existe avec le ST n° 53/T1 avec 8 % (14 % pour notre étude) ; la famille H est représenté par le ST n° 50/H3 avec 2,5 % (8 % dans notre étude), et d'autres ST compatibles avec ceux trouvés, même le ST n° 106/U (LAM30) existant en Algérie, a été détecté au Portugal [40].

Ces comparaisons nous ont permis de ressortir avec quelques idées concernant :

- quelques types des profils de souches qui circulent au niveau de cette partie géographique de l'Algérie, et de les comparer aux études menées dans d'autres régions dans le pourtour du bassin méditerranéen ;
- la comparaison des clusters et des familles dominantes dans cette étude de l'est de l'Algérie à ceux dominants ailleurs, ainsi d'avoir une idée sur les souches circulantes le long du pourtour méditerranéen, car déjà les plus dominants sont détectées (les LAM, les T et les H).

### III.2.6. Comparaison de nos résultats avec d'autres études faites en Algérie :

Une autre étude réalisée en parallèle au niveau du LNR de la Tuberculose, sur 79 souches isolées dans la région centre de l'Algérie durant l'année 2011, a révélé des similitudes des profils génétiques détectés avec ceux dans notre étude.

Les familles génomiques les plus représentatives dans cette population d'études sont les LAM, H, T et S avec des fréquences respectives de 22 %, 29 %, 28 % et 5 %, ce qui est assez proche de ceux trouvés dans notre étude (30 % de LAM, 26 % de H, 22 % de T et 6 % de S).

Comparant les spoligotypes retrouvés dans notre étude à ceux de la même étude faite au centre de l'Algérie, des clusters similaires ont été trouvés dans les deux études et ont des fréquences assez proches les uns des autres, le ST n° 42/LAM9 (11 % au centre contre 14 % à l'est), le ST n° 50/H3 (15 % contre 8 % à l'est), le ST n° 53/T1 (19 % contre 14 % de l'est) et le ST n° 34/S (2,5 % contre 4 % de l'est).

Une autre étude réalisée aussi au LNR de la tuberculose, sur 361 souches MDR isolées dans toute l'Algérie, de 2000 à 2010 [données non publiées], a retrouvé les mêmes familles génomiques les plus majoritaires avec les pourcentages suivants : les LAM (26,31 % contre 30 % chez notre étude), les H (15,38 % contre 26 %), les T (21,9 % contre 22 %) et les S (21,9 % contre 6 %).

Les clusters dominants dans cette étude de souche MDR, sont le ST n° 50/H3 avec une fréquence de 4,2 % (contre 8 % dans notre étude), le ST n° 53/T1 avec une fréquence de 7,8 % (contre 14 %), le ST n° 42/LAM9 avec 19,4 % (contre 14 %) et enfin n° 34/S avec 3,6 % (contre 4 % dans cette étude).

Une autre étude sur 162 souches réalisée entre 2000 - 2006, a révélé que les familles plus dominantes étaient les H (29,01 % contre 26 % lors de notre étude), les T (21,6 % contre 22 %), les LAM (19,75 % contre 30 %) et les S (7,4 % contre 6 %) [41].

Les clusters dominants sont le ST n° 50/H3 avec une fréquence de 16,049 % (contre 8 % dans notre étude), le ST n° 53/T1 avec une fréquence de 11,11 % (contre 14 %), le ST n° 42/LAM9 avec une fréquence de 8,024 % (contre 14 %) et enfin le ST n° 34/S avec une fréquence de 3,086 % (contre 4 %) [41].

En général, les familles génomiques les plus dominantes sont toutes les mêmes, la différence concerne le taux retrouvé et cela est lié au type d'études, à l'échantillonnage et à la durée durant laquelle ces études ont été menées.

## III.2.7. Récapitulatif des comparaisons réalisées pour les études établies en Algérie :

**Tableau XVI. :** Données des familles et clusters communs entre les différentes études établies en Algérie.

Etudes	Nombre de souches	Période d'études	Familles génomiques dominantes	Clusters dominants	
LNR-est de l'Algérie. (S. Kaidi)	50	2011	LAM	42/LAM9	14 %
			H	50/H3	8 %
			T	53/T1	14 %
			S	34/S	4 %
LNR-centre de l'Algérie. (M.M. Khechiba)	79	2011	LAM	42/LAM9	11 %
			H	50/H3	15 %
			T	53/T1	19 %
			S	34/S	2,5 %
LNR-MDR toute l'Algérie. (M. Ifficene)	361	2000-2010	LAM	42/LAM9	19,4 %
			H	50/H3	4,2 %
			T	53/T1	7,8 %
			S	34/S	3,6 %
Etude-Alger. (F. Natéche)	162	2000-2006	LAM	42/LAM9	8,024 %
			H	50/H3	16,049 %
			T	53/T1	11,11 %
			S	34/S	3,086 %

# *Conclusion*

## Conclusion et perspectives :

En conclusion, les objectifs fixés pour notre travail concernant le recrutement des souches de *M.tuberculosis* à analyser isolées chez les tuberculeux de la région de l'est de l'Algérie ont été atteints. Une réserve est cependant à faire sur le nombre de souches retenues pour l'étude (50), et la durée de l'étude dans le temps. Ces limites sont liées d'une part au manque de moyens, comme les réactifs et la membrane spécifique à l'étude génotypique et d'autre part aux impératifs imposés pour la soutenance au niveau de l'université.

L'analyse génotypique des 50 souches de *M.tuberculosis* isolées de patients tuberculeux a permis de connaître les profils génétiques circulant dans notre population d'étude et de mettre en évidence 6 nouveaux cas orphelins non encore répertoriés dans la base de données internationale SPOLDB4.

Une publication sera réalisée en vue de publier les résultats de nos analyses, et éventuellement d'introduire à la base de données SPOLDB4 les profils orphelins détectés.

La fréquence de certains génotypes a été évaluée, ce qui nous a donné un aperçu sur leur transmission, sur les clusters existant et nous a permis ainsi d'avoir une idée sur les profils épidémiques et ubiquitaires des souches de *M.tuberculosis* circulant dans la population de notre étude.

Le croisement des profils du spoligotyping avec les données des tests de sensibilité aux antibiotiques, a permis de détecter une sous-famille de souches MDR qui semble se transmettre plus facilement que les autres (spoligotype n° 2 de la sous famille H2) dans notre population.

Des comparaisons avec les données relevées dans la littérature internationale nous ont permis d'identifier des familles génotypiques dominantes dans notre étude et dans celles des pays du bassin méditerranéen, ce qui permettra de donner à nos résultats une importance de niveau international et ils pourront ainsi être utilisés à leur tour comme référence dans des études similaires de nos résultats, bien que le nombre de souches étudiées reste limité.

En conséquence, une étude sur un nombre de souches plus important et plus longue dans le temps, doit être initiée, en veillant à ce qu'elle applique des recommandations de premier plan :

- soit plus représentative.

- collecter le maximum de données cliniques des patients tuberculeux (type et nature de l'infection, résistances aux antituberculeux, antécédents, autres maladies ...).
- Avoir les données géo-démographiques des patients (âge et sexe, adresse personnelle, lieu de traitement, liens familiaux ...).
- Afin de pouvoir mieux déceler les différentes souches, des techniques plus discriminantes doivent être appliquées en parallèle (ex : RFLP, MIRU-VNTR).
- Appliquer les lois de l'épidémiologie clinique, pour l'échantillonnage, l'étude statistique, l'étude de transmission ... ainsi arriver à une enquête épidémiologique proprement dite.

Le développement de l'épidémiologie moléculaire a amélioré la compréhension de la dynamique de transmission du *M.tuberculosis*. Néanmoins, le problème de la tuberculose est loin d'être résolu, en particulier dans les pays en développement. Il y a donc toujours urgence pour le contrôle de la maladie et il est donc essentiel de progresser dans la recherche appliquée [4].

En effet, de nouveaux vaccins, de nouveaux médicaments, et de nouveaux tests de diagnostic sont nécessaires. L'épidémiologie moléculaire est un domaine scientifique qui peut faire le lien entre la recherche appliquée et fondamentale. Les études épidémiologiques moléculaires peuvent être utiles dans le contrôle de la santé publique et dans la gestion des situations cliniques particulières [4].

Au niveau des cas individuels, il est essentiel d'identifier rapidement la source de contamination et de connaître la sensibilité des souches aux médicaments afin de choisir le traitement le mieux adapté au cas [4].

La promotion et le développement de nouvelles technologies génomiques comme les puces à ADN peut être utilisée pour analyser à haut débit le génome de *M.tuberculosis*. Butcher a décrit l'utilité des puces à ADN pour la recherche sur *M.tuberculosis* et leur contribution à l'amélioration d'un programme de lutte contre la tuberculose. Cet examen a révélé une large application des biopuces à la compréhension de la physiologie MTb, l'interaction hôte-pathogène, les mécanismes d'action des médicaments *in vitro* et *in vivo* l'expression des gènes, les réponses de l'hôte, la génomique comparative et la génomique fonctionnelle de gènes particuliers [4].

Il est clair que de nouvelles approches de prévention, de diagnostic et de traitement de la tuberculose sont nécessaires, ce qui dépendra d'une meilleure compréhension du fonctionnement du génome de MTb et des moyens de défense de l'hôte [4].

Le National Heart, Lung, and Blood Institute a élaboré des recommandations pour la recherche sur la tuberculose. Parmi ces différentes recommandations, primordiales pour la lutte contre les maladies infectieuses, cinq concernent directement le domaine de l'épidémiologie moléculaire:

- de nouvelles ressources pour la caractérisation du génome MTb, puces protéomiques pour des diagnostics plus précis,
- des études prospectives associées aux essais cliniques dans les populations atteintes de tuberculose ou qui sont à risque de tuberculose,
- des études d'épidémiologie moléculaire,
- une nouvelle approche en s'aidant de la bio-informatique pour étudier l'interaction entre le MTb et l'hôte infecté.

# *Références*

---

*Références bibliographiques*

- [1]. A. Kerleguer, J.-L. Koeck, M. Fabre, V. Foissaud, R. Teyssou, V. Hervé (mai 2002). Bactériologie : taxonomie et autres actualités, Apport de la Biologie Moléculaire au diagnostic de la tuberculose. *Revue Française des Laboratoires*, n° 343 : 67-70.
- [2]. J. D. McKinney, W. R. Jacobs, JR., and B. R. Bloom, (1998). *Persisting Problems in Tuberculosis*. Emerging Infections by Academic Press.
- [3]. J. Kamerbeek, L. Schouls, A. Kolk, M. van Agterveld, D. van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal and J. van Embden, (1997). Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology. **35** (4) : 907 - 914.
- [4]. M. Tibayrenc, (2007). *Encyclopedia of Infectious Diseases Modern Methodologies*. Edited by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 805 pages.
- [5]. F. Jauréguy, M.-C. Gutierrez, C.-J. Marie, C. Poirier, S. Panseurieu, J. Pascal,
- [6] : H. Bezanahary, M.-C. Baclet, C. Sola, V. Gazaille, P. Turlure, P. Weinbreck, F. Denis, C. Martin, (2008). Intérêt du typage moléculaire pour l'épidémiologie de la tuberculose en Limousin (1998–2006). *Médecine et maladies infectieuses* ; **38** : 309 – 317.
- [7]. M.-C. Dombret, (2004). Tuberculose pulmonaire de l'adulte. *EMC-Médecine* ; **1** : 406-416.
- [8]. F. Gaudrat, A.S. Sauget, I. Cottencin, L. Giraudet, V. Morange, L. Mereghetti, A. Goudeau, P. Lanotte, (2006). Identification moléculaire des espèces de mycobactéries du groupe de la tuberculose par étude des régions de différence. *Ann Biol Clin* ; **64** (1) : 61-6.
- [9]. N. Aït-Khaled et D. A. Enarson, (2003). *Tuberculosis A Manual for Medical Students*. World Health Organization WHO/CDS/TB/99.272, 148 pages.
- D. Valeyre, B. Picard, V. Vincent, P. Dény. (2005). Place du spoligotypage lors d'une enquête épidémiologique devant un cas de suspicion de tuberculose pulmonaire nosocomiale. *Pathologie Biologie* ; **53** : 481 - 484.
- Mayo Clinic Scientific Press and Informa Healthcare USA, Inc. Rochester.Florence, USA. 325 pages.
- [10]. A. Maczulak, (2011). *Encyclopedia of Microbiology*. Facts On File, Inc. ; An imprint of Infobase Learning ; Facts on file science library, New York, 880 pages.
- [11]. F. H. Kayser, K. A. Bienz, J. Eckert, R. M. Zinkernagel (2005). *Medical Microbiology*. Thieme, basic sciences, Flexibook, Stuttgart.New York, 724 pages.
-

- 
- [12]. S. T. Cole & al, (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature ; **393** : 537 – 544.
- [13]. K. P. Talaro, B. Chess, (2012). Foundations in Microbiology, eighth edition, McGraw-Hill Connect Learn Succeed, New York, 934 pages.
- [14]. Orateur : P. Lanotte, Résumé rédigé par : C. Gut-Gobert et S. Jouneau, (2008). Symposium A 07 : diagnostic microbiologique de la maladie tuberculeuse, La PCR : quel apport pour le diagnostic et le traitement ? Rev Mal Respir ; **25** : 40-41.
- [15]. F. Denis, C. Perronne, (2004), *Mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques. Elsevier SAS, Guides Médi/BIO, Paris, 288 pages.
- [16]. Orateur : J. Cadranel, Résumé rédigé par : M. André, (2008). Symposium A 09 : infection tuberculeuse latente, définition et potentiel évolutif. Rev Mal Respir ; **25** : 42-44.
- [17]. Orateur : O.Neyrolles, Résumé rédigé par : A.-C. Volatron, (2008). Symposium A 06 : le bacille tuberculeux et son hôte, Ce que l'on sait de la réponse immunitaire antituberculeuse chez l'homme. Rev Mal Respir ; **25** : 27-30.
- [18]. Orateur : C. Gutierrez, Résumé rédigé par : A.-C. Volatron, (2008). Symposium A 06 : le bacille tuberculeux et son hôte, Ce que le génome de *Mycobacterium tuberculosis* nous a appris. Rev Mal Respir ; **25** : 23-26.
- [19]. Rapport OMS 2011 sur la lutte contre la tuberculose dans le monde.
- [20]. Manuel de la lutte antituberculeuse à l'usage des personnels médicaux, Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière de la République Algérienne Démocratique et Populaire, Direction de la Prévention, Programme National de Lutte Contre la Tuberculose 2011.
- [21]. Orateur : M. Brauner, Résumé réalisé par : G. Léveiller, (2008). Symposium A 12 : imagerie de la tuberculose, Imagerie actuelle de la tuberculose chez le non-immunodéprimé. Rev Mal Respir ; **25** : 52-54.
- [22]. Orateur : N. Veziris, Résumé rédigé par : C. Gut-Gobert et S. Jouneau, (2008). Symposium A 07 : diagnostic microbiologique de la maladie tuberculeuse, La PCR : quelle technique de prélèvement pour quelles situations ? Rev Mal Respir ; **25** : 34-36.
- [23]. A. Kar, (2008). Pharmaceutical Microbiology. New Age International Publishers, New Delhi, 379 pages.
- [24]. B. Carbonnelle, M. Dailloux, L. Lebrun, J. Maugein, C. Pernot, (2003). Cahier de formation Biologie médicale N°29 Mycobactéries Mycobactérioses. BIOFORMA formation continue des biologistes ; 158 pages.
- [25]. V. Cattoir, (2004). Identification moléculaire des mycobactéries et détection de la résistance aux antibiotiques. Revue générale abc ; Ann Biol Clin, **62** (4) : 405-13.
-

- 
- [26]. K. Horo, É. Aka-Danguy, A. Kouassi Boko, A.S. N'gom, C.V. Gode, J.M. Ahui Brou, A.F. Motuom, T. Yacouba, F. Koante-Kone, M.T. Tcharman, N. Koffi, (2011). Tuberculose multirésistante : à propos de 81 patients suivis dans un service de pneumologie en Côte d'Ivoire. *Revue de Pneumologie clinique* ; **67** : 82 – 88.
- [27]. Orateur : A. Trebucq, Résumé rédigé par : A.-C. Volatron, (2008). Symposium A 47 : tuberculose multirésistante, « Les résistances » : définition opérationnelle et épidémiologique dans le monde. *Rev Mal Respir* 2008 ; **25** : 97 – 99.
- [28]. Orateur : L. Abel, Résumé rédigé par : C. Gut-Gobert et M. André, (2008). Symposium A 22 : tuberculose chez l'enfant, Susceptibilité génétique et infection tuberculeuse sévère. *Rev Mal Respir* ; **25** : 65 - 66.
- [29]. J. W. Wilson, L. L. Estes, (2008). *Mayo Clinic Antimicrobial Therapy, Quick Guide*.
- [30]. J. Maugein C ; Bébéar, (2003). Diagnostic microbiologique de la tuberculose et intérêt de la PCR. *Médecine et maladies infectieuses* ; **33** : 153 - 158.
- [31]. P.F. Barnes, M.D. Cave, (2003). Molecular epidemiology of tuberculosis. *New England Journal Medicine* ; **349** (12) : 1149–56.
- [32]. Teresa K. Attwood Richard Cammack Peter N. Campbell J. Howard Parish Anthony D. Smith John L. Stirling Francis Vella, (2006). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology Revised Edition*. Oxford University Press Inc., New York, Second edition published, 738 pages.
- [33]. H. O. F. Molhuizen, A. E. Bunschoten, L. M. Schouls, and J. D. A. van Embden. Rapid Detection and Simultaneous Strain Differentiation of Mycobacterium tuberculosis Complex Bacteria by Spoligotyping. *Methods in Molecular Ecology, Mycobacteria. Protocols*. T. Parish and N. G. Stoker. Humana Press Inc , Totowa. 101 : 14 pages.
- [34]. A. Gori, A. Bandera, G. Marchetti, A. Degli Esposti, L. Catozzi, G. P. Nardi, L. Gazzola, G. Ferrario, J. D.A. van Embden, D. van Soolingen, M. Moroni, and F. Franzetti, (2005). Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases* ; **11** (8) : 1242-1248.
- [35]. K. Brudey, I. Filliol, M. Théodore, C. Sola, N. Rastogi, (2006). Épidémiologie moléculaire de la tuberculose en Guadeloupe de 1994 à 2000. *Pathologie Biologie* ; **54** : 14-21.
- [36]. “SPOLIGOTYPING” a PCR-based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria manual Isogen Life Science Spoligotyping kit manual : 17 pages.
- [37]. <http://www.miru-vntrplus.org>
-

- [38]. A. Namouchi, A. Karboul, B. Mhenni, N. Khabouchi, R. Haltiti, R. Ben Hassine, B. Louzir, A. Chabbou and H. Mardassi, (2008). Genetic profiling of *Mycobacterium tuberculosis* in Tunisia: predominance and evidence for the establishment of a few genotypes. *Journal of Medical Microbiology* ; **57** : 864 – 872.
- [39]. N. Lari, L. Rindi, C. Sola, D. Bonanni, N. Rastogi, E. Tortoli, and C. Garzelli, (2005). Genetic Diversity, Determined on the Basis of *katG463* and *gyrA95* Polymorphisms, Spoligotyping, and IS6110 Typing, of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates from Italy, ; *Journal of Clinical Microbiology*, **43** (4) : 1617 – 1624.
- [40]. S. David, D. Raposo Ribeiro, A. Antunes, C. Portugal, L. Sancho, J. Germano de Sousa, (2007). Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *Infection, Genetics and Evolution* ; **7** : 609 – 617.
- [41]. F. Nateche - Metiaz, (2007). Biodiversité génétique et profil de résistance des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées à Alger (2000 - 2006). Thèse Doctorat d'Etat.
-

# *Annexes*

## Annexe 1.

Données du rapport 2011 de l'OMS à propos de l'Algérie.

**Tableau I. :** Données sur tuberculose entre 1990-2010 en Algérie [19].

Année	Population (millions)	Mortalité (HIV exclu)			Prévalance (HIV inclus)			Incidence (HIV inclus)		
		Chiffres (Mille)	Taux <sup>a</sup>	Chiffres (Mille)	Taux	Chiffres (Mille)	Taux	Chiffres (Mille)	Taux	
1990	25	2.3 (1.2-4.2)	9.2 (4.6-16)	26 (9.4-48)	101 (37-188)	71 (12-22)	66 (48-86)			
1995	28	2.5 (1.2-4.7)	8.7 (4.2-16)	29 (9.8-54)	101 (35-192)	19 (14-25)	68 (50-90)			
2000	31	3.8 (1.9-6.6)	12 (6.3-22)	41 (16-76)	135 (51-249)	27 (19-35)	87 (63-114)			
2005	33	4.2 (2.1-7.5)	13 (6.5-23)	47 (17-87)	142 (53-264)	30 (22-40)	93 (67-122)			
2008	34	3.8 (1.8-6.9)	11 (5.3-20)	43 (15-81)	126 (45-235)	29 (21-39)	85 (62-112)			
2009	35	4.2 (2.1-7.5)	12 (6-21)	47 (17-86)	134 (49-247)	31 (23-41)	89 (65-117)			
2010	35	4.3 (2.1-7.7)	12 (6-22)	48 (18-89)	136 (50-250)	32 (23-42)	90 (65-118)			

<sup>a</sup> le taux est par 100 000 population.

**Tableau II. :** Notification des nouveaux cas positif selon l'âge et le sexe [19].

Année	Masculin						Féminin									
	0-14	15-24	25-34	35-44	45-54	55-64	+65	Inconnu	0-14	15-24	25-34	35-44	45-54	55-64	+65	Inconnu
2000	59	927	1516	610	491	234	299		36	1005	1293	746	314	208	312	
2005	53	1309	1841	919	473	314	426		102	1044	820	389	270	229	465	
2010	52	1203	1669	825	513	392	397		79	1086	826	471	251	222	367	

## Annexe 2.

**Les colorations de l'examen microscopique [24].****Coloration de Ziehl Neelsen :****Matériel & préparation des réactifs :**

<b>1) Solution A : Solution alcoolique saturée de fuschine</b>	
Fuschine basique	3 g
Ethanol 96°	qsp 100 ml
<b>Solution B : Solution de phénol à 5 %</b>	
Phénol cristallisé	10 g
Eau distillée	qsp 200 ml
<b>Mélanger</b>	
Solution A	10 g
Solution B	90 ml
<b>2) Agents décolorants</b>	
a) eau distillée	300 ml
Acide sulfurique concentré	100 ml
b) alcool éthylique 95°	
<b>3) Contre colorant</b>	
Bleu de méthylène	1 g
Alcool 95°	10 ml
Phénol	1 g
Eau distillée	qsp 100 ml

**Technique :**

- Les lames préalablement fixées sont placées sur le portoir du bac à coloration, la face sur laquelle le frottis à été réalisé étant au-dessus.
- Couvrir avec la fuschine, chauffer légèrement jusqu'à émission de vapeurs, ne pas faire bouillir et ne pas sécher le colorant. S'il en manque, on peut en rajouter en cours de préparation. La coloration dure 10 minutes. On aura chauffé trois fois.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Recouvrir à l'alcool et laisser pendant 5 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Recouvrir de la solution d'acide 3 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Recouvrir de la solution de bleu de méthylène et laisser agir 30 secondes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Sécher.
- Examiner à l'immersion, observer 200 champs. Rechercher les bacilles rose rouge sur fond bleu.

Coloration à l'Auramine :**Matériel & préparation des réactifs :**

<b>1) Acide trichloracétique 1 %</b>		
	Acide trichloracétique	10 g
	Eau distillée	qsp 1000 ml
<b>2) Auramine</b>		
<b>Solution A</b>	Auramine	1 g
	Eau distillée	800 ml
<b>Solution B</b>	Chlorure de magnésium	2 g
	Eau distillée	200 ml
	Phénol	50 g
<b>Laisser dissoudre</b>		
<b>Mélanger A et B. Filtrer</b>		
<b>Conserver à 4°C et à l'obscurité</b>		
<b>3) Décolorants</b>		
	Alcool 90°	1000 ml
	Acide chlorhydrique pur	5 ml
	Chlorure de sodium	5 g
<b>4) Solution de rouge de Thiazine</b>		
<b>Solution A</b>	Rouge de thiazine	1 g
	Eau distillée	800 ml
<b>Solution B</b>	Chlorure de magnésium	2 g
	Eau distillée	200 ml
	Phénol	50 g
<b>Laisser dissoudre</b>		
<b>Mélanger A + B. Filtrer</b>		
<b>Conserver à l'obscurité</b>		

**Technique :**

- Les lames préalablement fixées sont placées sur le portoir du bac à coloration, la face sur laquelle le frottis a été réalisé étant au-dessus.
- Recouvrir d'acide trichloracétique à 1 % et laisser agir 30 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet puis recouvrir le frottis d'auramine. Laisser 15 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet. Couvrir le frottis avec le décolorant et laisser agir 5 minutes.
- Rincer à l'eau du robinet.
- Couvrir le frottis avec le rouge thiazine et laisser agir 1 minute 30.
- Rincer à l'eau. Recouvrir le frottis de décolorant. Laisser agir 3 minutes.
- Rincer à l'eau. Sécher à l'air.
- Examiner à l'objectif 40 ou 25 à sec et en fluorescence.
- Observer au moins 200 champs. On recherche des bâtonnets fluorescents sur fond rouge foncé.

## Annexe 3.

**Tableau III. :** Antituberculeux de référence [7, 15].

Médicaments	Posologie quotidienne adulte	Posologie hebdomadaire « DOT »	Effets indésirables	Remarques	Nature de l'action	CMI (mg/l)	Pic sérique (mg/l) après dose standard	Activité selon pH	Elimination
Isoniazide (INH)	4 mg/kg/j PO ou IV (enfant : 10 mg/kg/j) Max-300 mg si non associé à RMP	15 mg/kg/sem PO ou IV Max-900 mg	Hépatite**, polynévrite, algodystrophie, troubles psychiques, amaigrissement	Risque d'hépatite majoré avec l'âge et l'alcool. Polynévrite rare, pyridoxine (50 mg/j) surtout si diabète, VIH, malnutrition, grossesse.	Bactéricide ; bacilles extracellulaires +++ Bacilles intracellulaire +	Entre 0.05 et 0.20	3-4	Constante	Rein
Rifampicine (RMP)	10 mg/kg/j PO ou IV Max-600	10 mg/kg/sem PO ou IV	Coloration orangée des urines et des	Interactions : anticoagulants oraux,	Bactéricide Bacilles extracellulaires	0.2-0.5	7-10	Constante	Foie-rien

	mg	Max-600 mg	sécrétions, nausées, vomissements, hépatite**, fièvre, allergie, hémolyse, thrombopénie	hypoglycémiant oraux, corticoïdes, ketoconazole, anti-VIH, ciclosporine, digitaliques, phénytoïne...	+++ Bacilles intracellulaires +				
Éthambutol (EMB)	15-20 mg/kg/j PO ou IV Max-2,5 mg	50 mg/kg x 2/sem PO ou IV 25-30 mg/kg x 3/sem PO ou IV	Névrite optique rétrobulbaire, nausées, vomissements, céphalées, vertiges, allergie cutanée	Surveiller le champ visuel et toute modification de la vision	Bactériostatique	1-5	3-4	Constante	Rein
Pyrazinamide (PZA)	15-20 mg/kg/j PO ou IV Max-2 g	50-70 mg/kg/sem PO Max-4 g x 2/sem Max-3 g x 3/sem	Hépatite** (dose- dépendante), hyperuricémie, arthralgies, fièvre, nausées, vomissements,	Hyperuricémie habituelle, goutte rare. Arthralgies contrôlées par aspirine.	Bactéricide Bacilles intracellulaires	8 à 20 à pH 5	30 à 50	En pH acide	Rein

Streptomycine (STR)	15 mg/kg/j IM Max-1 g		phototoxicité, allergie cutanée	Diminuer la dose si insuffisance rénale	Bactéricide Bacilles extracellulaires	0.5-8	30 à 40	Neutre ou basique	Rein
---------------------	--------------------------	--	---------------------------------	---	--	-------	---------	-------------------	------

PO : per os ; IV : intraveineux ; IM : intramusculaire.

\*DOT : directly observed therapy ; \*\*Tout patient recevant isoniazide, rifampicine et/ou pyrazinamide doit consulter en cas de symptôme évocateur d'hépatite : anorexie, nausées, vomissements, ictère, malaise général, fièvre de plus de trois jours, douleurs abdominales

Les antituberculeux ont une demi-vie courte (3 heures ou moins) de sorte que leur élimination est totale en 24 heures, sauf pour le pyrazinamide dont la demi-vie est de 8 heures. CMI : concentration minimale inhibitrice.

**Tableau IV. :** Antituberculeux de seconde ligne [15].

Médicaments	Posologie quotidienne	Effets indésirables	Remarques
Amikacine	10 mg/kg/j IV ou IM	Toxicité auditive, vestibulaire et rénale	Audiométrie de référence, surveillance fonction rénale, K <sup>+</sup> , Ca <sup>++</sup> et Mg <sup>++</sup> /sem
Capréomycine	15 mg/kg/j intramusculaire Max-1 g	Toxicité auditive, vestibulaire et rénale	Audimétrie de référence + 1/mois, surveillance fonctions vestibulaire et rénale.
Kanamycine	15 mg/kg/j IV ou IM Max-1 g	Toxicité auditive, vestibulaire et rénale	Audiométrie de référence + 1/mois, surveillance fonctions vestibulaire et rénale
Ciprofloxacine	500-750 mg x 2/j PO	Nausées, vomissements, photosensibilisation	Ofloxacine (300-400 mg x 2/j et lévofloxacine (500 mg x 2j) aussi efficaces
Clofazimine	100-200 mg/j PO	Nausées, vomissements, pigmentation, ichtyose	Dépôts organiques de cristaux de clofazimine, syndrome abdominal douloureux
Cyclosérine	250-500 mg x 2/j PO 15-20 mg/kg/j Max-1 g	Troubles psychiatriques, convulsions, allergie	Évaluation psychiatriques préalable, pyridoxine (50 mg/250 mg cyclosérine)
Ethionamide	250-500 mg x 2/j PO 15-20 mg/kg/j	Nausées, vomissements, hépatite, photosensibilisation, arthralgies, goût métallique	Surveiller bilan hépatique
PAS	4-6 g x 2/j PO 150 mg/kg/j	Nausées, vomissements, hépatite, allergie	

## Annexe 4.

***Etude de la sensibilité aux antibiotiques : (méthode des proportions)***

Pour l'étude de la sensibilité, on a utilisé la méthode des proportions sur le milieu L-J qui consiste à déterminer la proportion des bacilles ayant poussés sur les milieux avec antibiotiques en les comparant à la population bactérienne ayant poussée sur les tubes témoins. La proportion est déterminée par le rapport du nombre de bacilles résistants à chacun des antibiotiques (R) au nombre total de bacilles poussant sur les tubes témoins (S : bacilles sensibles + R : bacilles résistants).

$$\% \text{ de R} = [\text{nombre de R} / \text{population totale (S+R)}] \times 100.$$

**Technique :**

L'échantillon prélevé comprend le plus grand nombre possible de colonies de la culture à étudier qui a été placé dans un ballon stérile contenant une trentaine de billes de verre de 5 mm de diamètre. Pour obtenir une suspension homogène, le ballon a été agité pendant 30 sec puis après avoir ajouté 5 ml d'eau distillée stérile, il a été agité à nouveau. La suspension bacillaire a été alors transférée dans un tube à essai et ajustée par adjonction d'eau distillée à l'opacité d'une suspension bacillaire-étalon titrant 1 mg/ml afin de fournir après culture des colonies dénombrables (moins de 100) à la fois sur les tubes témoin et sur les tubes avec antibiotique et pouvoir ainsi calculer la proportion de colonies résistantes.

**Ensemencements :**

La solution mère et les dilutions  $10^{-2}$  et  $10^{-4}$  ont été ensemencées sur milieu de L-J, à l'aide d'une anse calibrée (0,01 ml) en raison de deux tubes par préparation servant au dénombrement. La suspension mère, a été ensuite ensemencée dans le milieu L-J contenant la TCH et PNB qui serviront à l'identification. Enfin, la suspension mère et la dilution  $10^{-2}$  a été ensemencée sur les milieux L-J additionnés d'antibiotiques : Streptomycine, Isoniazide, Rifampicine et Ethambutol pour les malades non traités. Pour ceux déjà traités on ajoute la Kanamycine, la Capréomycine, l'Ofloxacine et la Cyclosérine.

Après ensemencement, les tubes ont été placés à l'étuve à 37°C (bouchon légèrement dévissé) inclinés pour que le liquide recouvre toute la surface du milieu mais sans atteindre le bouchon et que l'évaporation se fasse au mieux. La lecture s'effectue au 28<sup>ème</sup> et au 42<sup>ème</sup> jour.

---

## Annexe 5.

**Tableau V. :** Principaux gènes associés à la résistance aux antibiotiques chez *M.tuberculosis* [25].

Antibiotique	Gène	Taille du gène <sup>a</sup>	Résistance <sup>c</sup> %	Produit <sup>b</sup>
RIF	<i>rpoB</i>	3519 pb	96	Sous-unité $\beta$ ARN polymérase 1172 AA
INH <sup>a</sup>	<i>katG</i>	2223 pb	90	Catalase-peroxydase 740 AA
	<i>inhA</i>	810 pb		Enoyl-ACP réductase NADH dép. 269 AA
	<i>ahpC</i>	588 pb		Alkyl hydroperoxyde réductase C 195 AA
	<i>kasA</i>	1251 pb		$\beta$ -cétacyl-ACP synthase 416 AA
	<i>ndh</i>	1392 pb		NADH déshydrogénase 463 AA
EMB	<i>embB</i>	3297 pb	47-65	Arabinosyltransférase 1098 AA
PZA	<i>pncA</i>	561 pb	72-97	Pyrazinamidase (PZase) 186 AA
STR	<i>rpsL</i>	375 pb	70	Protéine ribosomale S12 124 AA
	<i>rrs</i>	1537 pb		ARN 16S
FQ	<i>gyrA</i>	2517 pb	75-94	Sous-unité A ADN gyrase 838 AA
	<i>gyrB</i>	2145 pb		Sous-unité B ADN gyrase 714 AA

a, b : Les tailles des gènes et des protéines sont ceux décrits pour la souche de *M. tuberculosis* H37Rv ;

c : Pourcentage de la résistance associé à une mutation dans le gène décrit [25].





43	M	35	CHU Annaba	Annaba	Crachat	T	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
44	F	47	CHU Constantine	Constantine	Crachat	T	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
45	F	39	EPSP Azzazga	Tizi Ouzou	Crachat	NTr	Résistant	Résistant	Résistant	Résistant	NT	NT
46	M	75	CHU Ben Badis	Constantine	Crachat	T	Sensible	Contaminé	Sensible	Sensible	Sensible	NT
47	M	45	EPH Draâ Ben Khedda	Tizi Ouzou	Crachat	T	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	NT	NT
48	M	34	CHU Sétif	Sétif	Crachat	T	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	NT	NT
49	M	32	CHU Constantine	Constantine	Crachat	T	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible	NT	NT
50	M	42	EPS Batna	Batna	Crachat	T	Résistant	Résistant	Résistant	Résistant	Sensible	Résistant

T : malade traité ; NTr : malade non traité ; NT : non testé.

## Annexe 7.

**Tableau V. :** Quantité des réactifs nécessaires pour la réalisation de la PCR.

Réactifs pour PCR	Pour 10 réactions	
	Initiale	Finale
H <sub>2</sub> O	149 µl	
Tampon taq	100 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	70 µl	7 mM
Amorce 1 (Dra) 20 pmol	40 µl	0,4 µl
Amorce 2 (Drb) 20 pmol	40 µl	0,4 µl
DNTP 2,5 mM	80 µl	0,4 µl
Taq Tth polymérase	1 µl	0,5 U/µl

**Séquences des amorces utilisées pour la PCR des spacers du locus DR :**

DRa : 5' Biotine-GGT TTT GGG TCT GAC GAC- 3'

DRb : 5' -CCG AGA GGG GAC GGA AAC- 3'

**Séquences des différents oligonucléotides spécifiques aux spacers du locus DR :**

- |   |                                |
|---|--------------------------------|
| 1: ATAGAGGGTCGCCGGTCTGGATCA <sup>1</sup>  | 23: AGCATCGCTGATGCGGTCCAGCTCG  |
| 2: CCTCATAATTGGGCGACAGCTTTTG <sup>2</sup> | 24: CCGCCTGCTGGGTGAGACGTGCTCG  |
| 3: CCGTGCTTCCAGTGATCGCCTTCTA              | 25: GATCAGCGACCACCGCACCTGTCA   |
| 4: ACGTCATACGCCGACCAATCATCAG              | 26: CTTCAGCACCACCATCATCCGGCGC  |
| 5: TTTTCTGACCACTTGTGCGGGATTA              | 27: GGATTTCGTGATCTCTTCCCGCGGAT |
| 6: CGTCGTCATTTCCGGCTTCAATTC               | 28: TGCCCCGGCGTTTAGCGATCACAAC  |
| 7: GAGGAGAGCGAGTACTCGGGGCTGC              | 29: AAATACAGGCTCCACGACACGACCA  |
| 8: CGTGAAACCGCCCCAGCCTCGCCG               | 30: GGTTGCCCGCGCCCTTTTCCAGCC   |
| 9: ACTCGGAATCCCATGTGCTGACAGC              | 31: TCAGACAGGTTTCGCGTGCATCAAGT |
| 10: TCGACACCCGCTCTAGTTGACTTCC             | 32: GACCAAATAGGTATCGGGCGTGTTCA |
| 11: GTGAGCAACGGCGGGCGGCAACCTGG            | 33: GACATGACGGCGGTGCCGCACTTGA  |
| 12: ATATCTGCTGCCCGCCCGGGGAGAT             | 34: AAGTCACCTCGCCACACCGTCGAA   |
| 13: GACCATCATTGCCATTCCCTCTCCC             | 35: TCCGTACGCTCGAAACGCTTCCAAC  |
| 14: GGTGTGATGCGGATGGTCGGCTCGG             | 36: CGAAATCCAGCACCACATCCCGCAGC |
| 15: CTTGAATAACGCGCAGTGAATTCG              | 37: CGCGAACTCGTCCACAGTCCCCCTT  |
| 16: CGAGTTCCCGTCAGCGTCGTAAATC             | 38: CGTGGATGGCGGATGCGTTGTGCGC  |
| 17: GCGCCGGCCCCGCGCGGATGACTCCG            | 39: GACGATGGCCAGTAAATCGGGCTGG  |
| 18: CATGGACCCGGGCGAGCTGCAGATG             | 40: CGCCATCTGTGCCTCATAAGGTCC   |
| 19: TAACTGGCTTGGCGCTGATCCTGGT             | 41: GGAGCTTTCGGCTTCTATCAGGTA   |
| 20: TTGACCTCGCCAGGAGAGAAGATCA             | 42: ATGGTGGGACATGGACGAGCGCGAC  |
| 21: TCGATGTCGATGTCCCAATCGTCGA             | 43: CGCAGAATCGCACCGGGTGCGGGAG  |
| 22: ACCGCAGACGGCACGATTGAGACAA             |                                |

<sup>1</sup> L'actuelle séquence chez H37Rv sous le nucléotide souligné est le C.<sup>2</sup> L'actuelle séquence chez H37Rv sous le nucléotide souligné est le GC.



**Figure 1. :** Résultat du typage par Spoligotyping des souches de *Mycobacterium tuberculosis*, différents profils obtenus sur un film d'autoradiographie (H : souche de référence H37Rv, B : souche BCG, - : témoin négative).

---

## Annexe 8.

### ***Préparation des solutions :***

- TRIS-EDTA :

Trisma base  $C_4H_{11}NO_3$  : PM = 121,1 g/mole.

EDTA :  $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 + 2 H_2O$  : PM = 372,2 g/mole

Pour préparer 100 ml de TRIS-EDTA il faut :

0,2 ml EDTA à 0,5 M (186,1 g) + 1 ml TRIS à 1 M (12,11 g) +  $H_2O$  QSP 100 ml.

- TBE 10X (pH = 8) :

Pour préparer 1000 ml de il faut :

40 ml EDTA à 0,5 M + 180 g de Trisma base + 55 g d'acide borique +  $H_2O$  QSP 1000 ml.

- SSPE 20X (pH = 7,4) :

NaCl (175,3 g) +  $NaH_2PO_4$  (27 g) + EDTA (7,4 g) + 800 ml  $H_2O$  + 6,5 ml de NaOH 10N +  $H_2O$  QSP 1L.

- SDS 20X :

SDS (100 g) + 1L de  $H_2O$ .

### ***Réactif pour l'électrophorèse :***

- Gel d'agarose :

Agarose (2,25 g) + TBE 10X (15 ml) + bromure d'éthidium (200  $\mu$ l) + 135 ml de  $H_2O$ .

### ***Tampons de lavage pour Spoligotyping :***

- 2X SSPE (100 ml de SSPE 20X +  $H_2O$  QSP 1l).
- 2X SSPE/0,1 % SDS (100 ml de SSPE 20X + 5 ml SDS 20 % +  $H_2O$  QSP 1l).
- 2X SSPE/0,5 % SDS (100 ml de SSPE 20X + 25 ml SDS 20 % +  $H_2O$  QSP 1l).
- EDTA 20Mm à température ambiante (40 ml EDTA 0,5 M +  $H_2O$  QSP 1l).

### ***Déshybridation :***

- SDS 1 %, 50 ml SDS 20X +  $H_2O$  QSP 1l.
  - EDTA.
-

# *Glossaire*

## Glossaire

**Anorexie** : médicalement, est un symptôme qui correspond à une perte de l'appétit.

**Asthénie** : affaiblissement de l'organisme, fatigue physique. Par extension, elle peut concerner l'état psychique.

**Chancre d'inoculation** est une petite image nodulaire à la base droite, en général isolée, de type alvéolaire (contours flous).

**Clade** : voir Cluster.

**Cluster** : Se réfère à un génotype particulier partagé par deux ou plusieurs isolats de MTb.

**DNASTAR** : C'est une société de logiciels de bioinformatique basée à Madison, Wisconsin, USA. Qui développe des logiciels-ordinateurs pour l'analyse de l'ADN, l'ARN et des séquences de protéines.

**DOTS** : Directly Observed Treatment, Short course, ou traitement de courte durée sous supervision directe.

**Dyspnée** est une difficulté respiratoire, soit à inspirer ou à expirer de l'air.

**Épidémiologie** : Ce domaine scientifique correspond à l'étude de la distribution et des déterminants de la santé liés états et d'événements dans les populations et le contrôle des problèmes de santé.

**Étiologie** : En médecine, les causes des maladies ou pathologies.

**Famille H** : Famille Haarlem, elle est retrouvée le plus dans pays d'Europe du Nord, isolée la première fois aux Pays-Bas.

**Famille LAM** : Famille Latino-Américano-Méditerranéenne, elle trouvée le plus dans les pays d'Amérique Latine et du bassin méditerranéen.

**Famille S** : Famille Sardaigne-Sicile, isolée la première fois en Italie.

**Famille T** : Famille génomique encore mal définie.

**Famille U** : Famille USA, isolée la première fois en USA.

**Grappe** : voir Cluster.

**Hémoptysie** est un rejet de sang issu des voies aériennes sous-glottiques, le plus souvent au cours d'un effort de toux.

**Incidence** : Le taux d'incidence d'une maladie est égale au nombre de nouveaux cas pendant une période donnée divisée par la population totale pendant cette période.

**MDR-TB** : La tuberculose multirésistante. C'est une souche présentant une résistance à au moins deux antibiotiques anti-tuberculeux, l'isoniazide et la rifampicine.

---

**National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) :** est une division du National Institutes of Health (NIH), située à Bethesda, Maryland, USA. Elle est chargée de faire avancer la compréhension des maladies, du développement, de la progression, du diagnostic, du traitement, de la prévention dans le système médical américain.

**Phénotype :** Les caractéristiques observables d'un organisme, l'expression d'allèles de gènes (génotype) comme un trait observable physique ou biochimique. Elle est le résultat de l'interaction entre le génotype et l'environnement.

**Phylogénie :** Ce domaine scientifique étudie l'histoire de l'évolution d'une espèce ou groupe d'espèces apparentées.

**Pleurésie** est une inflammation aiguë ou chronique de la plèvre (en anatomie, la **plèvre** est une séreuse délimitant un espace virtuel situé entre les poumons en dedans et la paroi thoracique en dehors), avec ou sans épanchement.

**Prévalence :** La prévalence d'une maladie est définie comme le rapport entre le nombre de cas d'une maladie dans une population à un moment donné et le nombre d'individus dans la population à cette époque.

**Runyon :** C'est une classification des mycobactéries non tuberculeuses. Il a été introduit par Ernest Runyon en 1959.

**Taxonomie :** Cette science se réfère à la théorie et à la pratique de la classification biologique. Cela regroupe les théories et les techniques pour nommer, décrire et classer les organismes, l'étude des relations entre les taxons, y compris les changements de position qui n'impliquent pas de changements dans les noms de taxons.

**TDM :** La tomodensitométrie (TDM), dite aussi scanographie, ou simplement scanner pour l'appareil, est une technique d'imagerie médicale qui consiste à mesurer l'absorption des rayons X par les tissus puis, par traitement informatique, à numériser et enfin reconstruire des images 2D ou 3D des structures anatomiques.

**Vaccin BCG (Bacille de Calmette - Guérin) :** c'est un vaccin contre la tuberculose, préparé directement à partir de la souche *Mycobacterium bovis* atténuée, qui a perdu sa virulence par culture dans un milieu artificiel spécial pendant des années. Les bacilles gardent une antigénicité suffisante pour devenir un vaccin efficace dans la prévention de la tuberculose humaine. Utilisé depuis les années 1940 sur le plan mondial.

**XDR-TB :** La tuberculose ultrarésistante, se définit comme une souche MDR présentant en plus une résistance à une fluoroquinolone et au moins à un des trois médicaments de seconde ligne injectable (carpéomycine, kanamycine et amikacine).

---



## ملخص :

السل هو من الأمراض المعدية، ناتج عن الإصابة بإحدى الأنواع من المتفطرات السلية. ومن بين العوامل التي تؤدي إلى مكافحة السل الكشف المبكر، وكذا العلاج المناسب والبحث عن علامات وراثية لمنع أي انتقالات أخرى. ويكون ذلك من خلال تتبع المتفطرات والتميز بينها باستخدام أدوات علم الأوبئة الجزيئي. في هذا العمل، أجرينا تصنيفا للنموذج جزيئيا لسلاسل المتفطرة السلية عن طريق تقنية « Spoligotyping » بعد عزل 50 عينة لمرضى السل من الشرق الجزائري خلال سنة 2011. هذه الدراسة تمت في المختبر المرجعي الوطني للسل و المتفطرات، معهد باستور الجزائر. كشف هذا التحليل الوراثي ترددات الأنماط الجينية الموجودة في دراستنا ومجموعات الأسر المتشابهة (والتي كانت كالأتي : الأسرة LAM : 30٪، والأسرة H : 26٪ ، الأسرة T : 22٪، الأسرة S : 6٪ والأسرة U : 4٪)، و قدم لنا لمحة عن كيفية تنقلها. تحقيق جزيئي معمق وواسع من حيث العينات المأخوذة هو قيد العمل.

## الأهداف :

تحديد التنوع الوراثي للسلاسل المتفطرة السلية المعزولة في منطقة الشرق الجزائري وطريقتها في التنقل.

## كلمات المفتاح :

علم الأوبئة الجزيئي، المتفطرة السلية، Spoligotyping، SPOLDB4.

## **Résumé :**

La tuberculose est une maladie infectieuse contagieuse, due à un ensemble de mycobactéries appartenant au complexe *tuberculosis*. Les facteurs clés de la lutte contre la tuberculose sont la détection rapide, un traitement adéquat et la recherche de marqueurs pour barrer à d'éventuelle transmission ultérieure. Et cela en surveillant les souches identifiées et en différenciant entre elles en usant des outils de l'épidémiologie moléculaire.

Dans ce travail, nous avons réalisé un typage moléculaire par Spoligotyping des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées durant l'année 2011 à partir de 50 patients tuberculeux originaire de l'est de l'Algérie. Cette étude est réalisée au Laboratoire National de Référence de la Tuberculose et des Mycobactéries, à l'Institut Pasteur d'Algérie.

Cette analyse génotypique a permis de déceler les fréquences des génotypes existant dans notre population d'étude (famille LAM : 30 %, famille H : 26 %, famille T : 22 %, famille S : 6 % et la famille U : 4 %) et des clusters existant, ainsi avoir un aperçu sur leur transmission. Une étude plus poussée moléculairement et plus large en population est envisagée.

## **Objectifs :**

Déterminer la diversité génétique des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées à la région est de l'Algérie ainsi que leur mode de circulation.

## **Mots clés :**

Épidémiologie moléculaire, *Mycobacterium tuberculosis*, spoligotyping, SPOLDB4.

## **Summary :**

The tuberculosis is an infectious contagious disease, due to a set of mycobacteria belonging to the tuberculosis complex. Key factors of the fight against tuberculosis are early detection, adequate treatment and the search of markers to block any further transmission. And this by monitoring of strains identified and differentiating between them by using of the molecular epidemiology tools.

In this work, we performed molecular typing by spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during the year 2011 start from 50 TB patients from eastern Algeria. This study is realized in the National Reference Laboratory for Tuberculosis and Mycobacteria, Pasteur Institute of Algeria.

This genotypic analysis revealed genotype frequencies existing in our study population (LAM family: 30 %, H family : 26 %, T family : 22 %, S family: 6 % and the U family : 4 %) and the existing clusters, so have an overview of their transmission. A further molecularly and wider population study is considered.

## **Objectives :**

Determine the molecular genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in the eastern part of Algeria, to define their pattern of circulation.

## **Key words :**

Molecular epidemiology, *Mycobacterium tuberculosis*, spoligotyping, SPOLDB4.