

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 :

***Diversité génétique des souches de Mycobacterium tuberculosis
typées par Spoligotyping isolées au niveau de la région centre de
l'Algérie***

Présenté par :

M^r Khechiba Mesbah-Mounir

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

<i>M^{me} Saïdi F.</i>	<i>Maitre assistante A</i>	<i>FSAVB, USDB</i>	<i>Présidente</i>
<i>M^{me} Aïssani R.</i>	<i>Maitre assistante A</i>	<i>FSAVB, USDB</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>M^r Bessaâd M. A.</i>	<i>Maitre assistant B</i>	<i>FSAVB, USDB</i>	<i>Examineur</i>
<i>M^{me} Boulahbal F.</i>	<i>Professeur</i>	<i>IP Alger</i>	<i>Promotrice</i>
<i>M^{me} Ifticène M.</i>	<i>Médecin Microbiologiste</i>	<i>IP Alger</i>	<i>Co-promotrice</i>

Année universitaire 2011/2012

Remerciement

Au terme de ce travail, Nous remercions ALLAH tout puissant pour le courage, la patience, et surtout la santé qui nous a été utile pour réaliser ce mémoire.

Nous tenons à exprimer tous nos remerciement à :

M^{me}F. Boulahbal pour avoir accepté d'être notre promotrice pour son aide, conseils précieux, sa gentillesse et sa sympathie.

Nous tenons à exprimer notre gratitude envers M^{me} M. Ifticéne notre co-promotrice responsable du laboratoire pour sa disponibilité, son temps et sa patience.

M^{me}M.S. Abdul-Hosseïn, M^{me}R. Aissani et M^r M.A. Bessaad' avoir accepté de faire partie des membres du jury et d'examiner ce travail.

Nous remercions également M^r Mezidi Nadir pour son aide, ses conseils et ses précieuses orientations, pour sa disponibilité et sa gentillesse.

Nos sincères remerciements et toute notre gratitude vont au personnel de l'institut de pasteur Ruisseau.

Nous remercions aussi nos familles respectives pour le soutien inconditionnel qu'elles nous ont apporté tout au long de notre parcours.

Enfin, nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire

Résumé :

La tuberculose est une maladie infectieuse et contagieuse en pleine recrudescence et dont la surveillance épidémiologique a été renforcée par des techniques de biologie moléculaire. Notre travail s'est basé sur le typage moléculaire par Spoligotyping des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées de patients tuberculeux diagnostiqués dans le centre de l'Algérie. Cette étude a été effectuée sur un échantillon de 79 souches isolées de *Mycobacterium tuberculosis* de patients atteints de tuberculose durant l'année 2011.

L'analyse des profils obtenus nous a permis de mettre en évidence trois familles génomiques dominantes : la famille Haarlem (N=24), la famille T (N=22) et la famille LAM (N=18) (Latino-américaine et méditerranéenne). L'analyse des spoligotypes a révélé 29 profils uniques et 09 grappes. Ces dernières sont représentées par :

- le ST n° 53/T1 (N=14), le ST n° 118/T2 (N=3), le ST n° 196/T1 (N=2).
- le ST n° 50/H3 (N=12), le ST n° 39/H3 (N=3), le ST n° 134/H1 (N=3),
- le ST n° 3/H3 (N=2), le ST n° 42/LAM9 (N=9) et enfin le ST n° 34/S (N=2).

La technique utilisée dans cette étude est le spoligotyping, qui doit être complétée par des techniques plus discriminantes telles que le RFLP-IS6110 et MIRUs-VNTR.

Abstract :

The Tuberculosis is an infectious and contagious disease which rapidly increases and epidemiological surveillance has been strengthened by molecular biology techniques. Our work is based on molecular typing by spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from tuberculosis patients diagnosed in central Algeria. This study was conducted on a sample of 79 isolates from TB patients in the year 2011. The analysis of the profiles obtained allowed us to identify three genomic dominant families: family Haarlem (N = 24), the family T (N = 22) and LAM family (N = 18) (Latin American and Mediterranean). The analysis revealed spoligotypes 29 unique profiles and 09 clusters. These are represented by:

- ST 53/T1 n° (N = 14), the ST 118/T2 n° (N = 3), the ST 196/T1 n° (N = 2)
- ST 50/H3 n° (N = 12), the ST 39/H3 n° (N = 3), the ST 134/H1 n° (N = 3),
- ST n°3/H3 (N = 2), ST n°42/LAM9 (N = 9) and finally the ST n° 34/S (N = 2).

The technique used in this study is spoligotyping, which should be complemented by more discriminative techniques such as IS6110-RFLP and VNTR-MIRUs.

ملخص:

السل هو مرض معدي والذي تزيد الإصابة به بسرعة وقد تم تعزيز الترصد الوبائي من خلال تقنيات البيولوجيا الجزيئية. ويستند عملنا على التشفير الجزيئي بواسطة تقنية " spoligotyping " لسلاسل المتفطرة السلية معزولة بعد التشخيص لمرضى السل في الجزائر وسط. وقد أجريت هذه الدراسة على عينة من 79 مريض خلال سنة 2011. وبعد الحصول على التحليل تم تحديد ثلاث عائلات جينية مسيطرة : عائلة H (N = 24)، و عائلة T (N = 22) و عائلة LAM (أمريكا اللاتينية ومنطقة البحر الأبيض المتوسط) (N = 18).

وكشف التحليل كذلك على 29 نوعا منفردا وعلى 09 مجموعات. وتتمثل هذه الأخيرة في :

- le ST n° 53/T1 (N=14), le ST n° 118/T2 (N=3), le ST n° 196/T1 (N=2).
- le ST n° 50/H3 (N=12), le ST n° 39/H3 (N=3), le ST n°134/H1(N=3),
- le ST n° 3/H3 (N=2), le ST n° 42/LAM9 (N=9) , le ST n° 34/S (N=2).

التقنية المستخدمة في هذه الدراسة هي تقنية "spoligotyping"، والتي ينبغي أن تستكمل باستعمال تقنيات أكثر تصنيفا مثل RFLP-IS6110 وMIRUS VNTR.

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Sommaire	
Abréviations	
Introduction	1
I. Rappel bibliographique	2
I.1. Définition	2
I.2. Taxonomie	2
I.3. Classification médicale des mycobactéries	3
I.4. Epidémiologie de la tuberculose	3
I.4.1. La tuberculose dans le monde	3
I.4.2. En Algérie	5
I.5. Diagnostic de la tuberculose	6
I.5.1. Symptomatologie clinique	6
I.5.1.1. Les signes cliniques de tuberculose pulmonaire	6
I.5.1.2. L'intradermoréaction à la tuberculine	6
I.5.1.3. La radiographie pulmonaire standard	6
I.5.2. Diagnostic bactériologique	6
I.5.2.1. les signes cliniques de tuberculose pulmonaire	6
I.5.2.2. Examen microscopique	6
I.5.2.3. Culture	7
I.5.2.4. Les tests de sensibilités	7
I.5.2.3.1. Méthode Classique (Proportion)	7
I.5.2.3.2. Méthode de biologie moléculaire	8
I.5.2.3.2.1. Test génétique de détection des résistances à la rifampicine et à l'isoniazide du complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTB DR plus et MTBDR sl)	8
I.6. Les formes cliniques de la tuberculose	8
I.6.1. Tuberculoses pulmonaires	8
I.6.2. Tuberculoses extra-pulmonaires	9
I.7. Epidémiologie moléculaire	9
I.7.1. Le génome de <i>M. tuberculosis</i>	9
I.7.2. Méthodes de typage de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
I.7.2.1. La Technique RFLP (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)	11
I.7.2.2. La Technique de spoligotyping	12

I.7.2.3.MIRUs-VNTR	13
II. Matériels et méthodes	14
II.1. Matériels	14
II.2. Méthodes	14
II.2.1. Le choix de la technique	14
II.2.2. Principe de la méthode Spoligotyping	16
II.2. 3. Les étapes de la technique	16
1. Prélèvement et extraction d'ADN	16
2. Préparation de la PCR	16
3. Préparation de la membrane pour l'hybridation	17
4. Résultats et lectures	19
5. Dés-hybridation et conservation de la membrane	19
III. Résultats et discussion	18
III.1. Résultats	20
III.1.1. Description Géo-démographique de la population	20
III.1.1.1. Répartition des cas par l'origine géographique	20
III.1.1.2. Répartition des cas par sexe	20
III.1.1.3. Répartition des cas par tranche d'âge	21
III.1.2. Résultats du typage par la méthode de spoligotypage	21
III.1.2.1. Répartition des Familles génomiques entre des différentes wilayas incluses dans l'étude	22
a. Wilaya d'Alger	25
b. Wilaya de Tipaza	27
c. Wilaya de Boumerdés	28
d. Wilaya de Blida	29
e. Wilaya de Médéa	30
III.2. Discussion	31
III.2.1. Analyse des résultats Géo-démographique de la population	31
III.2.2. Analyse des résultats du typage moléculaire	31
Conclusion	37
Référence bibliographique	
Annexe	

Introduction

Introduction :

La tuberculose est une maladie infectieuse et contagieuse à l'état endémique. En 2010, l'Organisation Mondiale de la Santé a estimé que le plus grand nombre de nouveaux cas de tuberculose est enregistré en Asie avec 60% des nouveaux cas à l'échelle mondiale. Toutefois, l'Afrique subsaharienne compte la plus grande proportion de nouveaux cas par habitant, avec plus de 270 cas pour 100 000 habitants en 2010[1].

En Algérie l'incidence de la tuberculose est supérieure à 65 cas /100000 habitants dans la région Nord. Alors qu'au Sud cette incidence diminue largement pour atteindre un taux de 45 cas /100000 habitants durant l'année 2008[2].

La surveillance au niveau national permet de suivre les tendances de la maladie et l'évolution des groupes à risque. Au niveau départemental, elle permet d'adapter les actions de lutte antituberculeuse. De ce fait, un laboratoire ayant une activité nationale de référence sur la tuberculose et les mycobactéries est implanté à l'Institut Pasteur d'Alger.

Notre travail s'est basé sur le typage moléculaire par Spoligotyping des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées de patients tuberculeux originaire du centre de l'Algérie, les objectifs de notre étude sont les suivants :

- Déterminer la diversité génétique des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées dans la région centre de l'Algérie.
- Constituer une base de données incluant toutes les souches isolées dans toutes les régions de l'Algérie,
- Déterminer le mode de circulation (Transmission récente ou réactivation) et l'interrelation entre les différentes régions.

Après une recherche bibliographique sur les mycobactéries du complexe tuberculosis, ainsi que sur les différentes méthodes de typage mises en application, les résultats du typage par la méthode spoligotyping effectuée sur des souches isolées chez des tuberculeux durant l'année 2011, vous seront présentés afin de les discuter.

Rappel
bibliographique

I. Rappel bibliographique :

I.1. Définition :

La tuberculose est une maladie infectieuse contagieuse, transmise par voie aérienne, due à un ensemble de mycobactéries appartenant au complexe *tuberculosis* [3].

I.2. Taxonomie :

Les mycobactéries sont des bactéries appartenant le genre *Mycobacterium* est le seul représentant de la famille des Mycobacteriaceae. Les mycobactéries sont aérophiles, immobiles, et non sporulées. Morphologiquement, les cellules varient de la forme coccoïde à celle en bâtonnet (0.3 à 0.6 µm de large et 0.5 à 6 µm de long).

La définition actuelle du genre *Mycobacterium* repose sur trois critères [4] :

- l'acido-alcoolo-resistance des bacilles,
- l'existence d'acides mycoliques,
- et la valeur du contenu en guanine et en cytosine (GC %) de l'acide ribonucléique(ADN), compris entre 61 et 71 % (voir figure n°1).

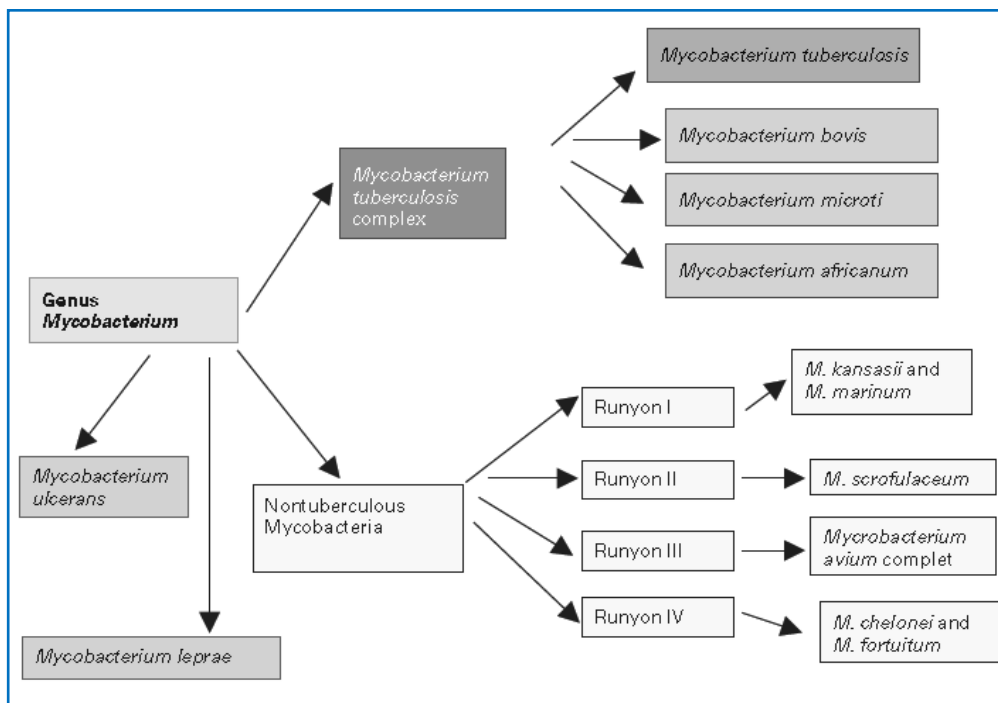


Figure n°1 : Classification des Mycobactéries [3].

I.3. Classification médicale des mycobactéries [5] :

Les mycobactéries peuvent être classées en trois groupes différents :

1° groupe : les mycobactéries responsables de tuberculose (maladie transmissible). Ces bactéries appartiennent au « complexe tuberculosis ».

- *Mycobacterium tuberculosis* appelé aussi bacille tuberculeux ou bacille de Koch (B.K). Il est responsable de la majorité des tuberculoses humaines en Algérie.
- *Mycobacterium bovis* responsable des tuberculoses bovines, mais l'homme peut être contaminé accidentellement.
- *Mycobacterium africanum* responsable de tuberculose en Afrique centrale et occidentale ; il n'a jamais été isolé en Algérie.

2°groupe: les mycobactéries responsables de mycobactérioses (maladie non transmissible) appelées mycobactéries de l'environnement ; mycobactéries opportunistes ou mycobactéries atypiques. Dans ce groupe, on retrouve une centaine d'espèces, tel que :

- *Mycobacterium avium* souvent responsable de mycobactériose chez l'immunodéprimé (SIDA).
- *Mycobacterium fortuitum*.
- *Mycobacterium gordonae*.

3° groupe : mycobactéries responsables de la lèpre :

- *Mycobacterium leprae* ou bacille de Hansen qui est un bacille non cultivable in-vitro, responsable de la lèpre chez l'homme.
- *Mycobacterium leprae murium* responsable de la lèpre chez la souris.

I.4. Epidémiologie de la tuberculose :

I.4.1. La tuberculose dans le monde aujourd'hui :

La tuberculose est une maladie infectieuse et contagieuse à l'état endémique. En 2010, l'organisation Mondiale de la Santé a estimé que le plus grand nombre de nouveaux cas de tuberculose est enregistré en Asie avec 60% des nouveaux cas à l'échelle mondiale. Toutefois, l'Afrique subsaharienne compte la plus grande proportion de nouveaux cas par habitant, avec plus de 270 cas pour 100 000 habitants en 2010 (voir figure n°2).

En 2010, environ 80% des cas signalés de tuberculose sont survenus dans 22 pays. Dans certains pays, le déclin dans le nombre des cas est important, tandis que dans d'autres, le nombre de cas ne diminue que très lentement. Le Brésil et la Chine figurent par exemple parmi les 22

pays ayant enregistré un déclin notable du nombre de cas de tuberculose au cours des 20 dernières années. La Chine en particulier a fait des progrès énormes dans la lutte contre la tuberculose. Entre 1990 et 2010, le taux de mortalité par tuberculose dans le pays a chuté de près de 80% et le nombre total de personnes développant la maladie a été divisé par deux.

Le nombre de personnes développant la tuberculose chaque année est, selon les estimations, en diminution – bien que très lente – ce qui signifie que le monde est sur la bonne voie pour atteindre l’objectif du Millénaire pour le développement consistant à inverser la tendance de la maladie d’ici à 2015[1].

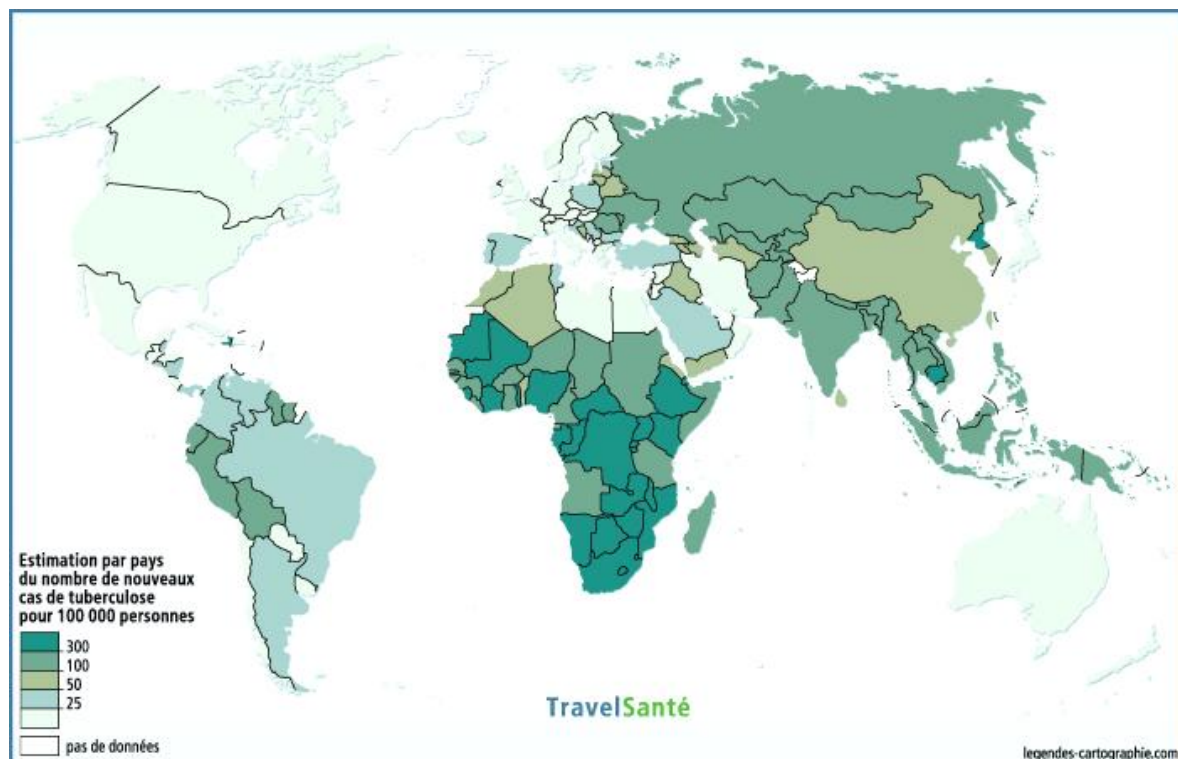


Figure n°2 : Nouveaux cas de tuberculose estimés dans le monde en 2010

<http://www.who.int/topics/tuberculosis/fr/>

I.4.2. En Algérie :

Le nombre de cas de tuberculose déclarés par Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière Algérie (MSPRH) en 2008 est rapporté dans le tableau suivant :

Tableau n°1 : Nombre de cas et l'incidence de tuberculose déclarés en 2008 :

Paramètres	Tuberculose		
	Toutes formes	Pulmonaire à microscopie positive	Extrapulmonaire
Nombre des cas	20070	8621	9908
Incidence (nombre de cas/100000 habitants)	58,6	25.2	28.2
Sexe ratio	1.1 (51.6% d'homme)	1.6 (61.3% d'homme)	Non Déterminé

En Algérie l'incidence de la tuberculose est supérieure à 65 cas /100000 habitants dans la région Nord. Alors qu'au Sud cette incidence diminue largement pour atteindre un taux de 45 cas /100000 habitants durant l'année 2008 [2] (voir figure n°3).

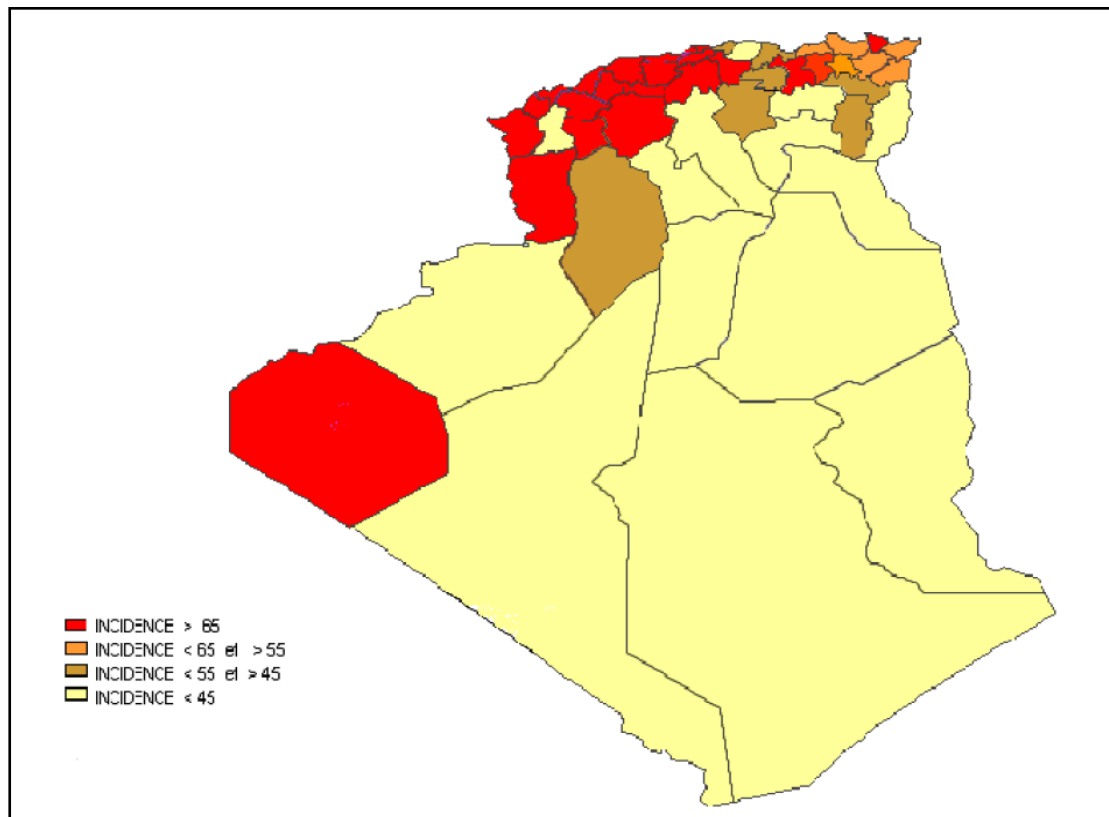


Figure n°3 : l'incidence de la tuberculose toutes formes confondues durant l'année 2008.

<http://www.Sante.dz/tuberculose /epidemiologie-algerie.pdf>

I.5. Diagnostic de la tuberculose :

I.5.1. Symptomatologie clinique :

I.5.1.1. Les signes cliniques de tuberculose pulmonaire :

Les signes généraux, fièvre en moyenne à 38°C le soir, sueurs nocturnes profuses, anorexie, asthénie sont peu spécifiques et c'est leur persistance, accompagnée d'un net amaigrissement, qui inquiète le malade [6].

I.5.1.2. L'intradermoréaction à la tuberculine

Les tests cutanés à la tuberculine, ou intradermoréaction, sont utilisés pour le diagnostic de primo-infection tuberculeuse. Ils consistent en une injection intra-dermique de 0,1 ml de solution liquide de tuberculine, mélange standardisé de fragments de mycobactéries. Un "virage" positif se traduit par une réaction cutanée tuberculinique (RCT) caractérisée par un érythème ainsi qu'une induration mettant en évidence une réaction d'hypersensibilité retardée. Cette réaction est induite par la présence d'antigènes de *M. tuberculosis*, ou de certaines mycobactéries atypiques, ainsi que par les antigènes du BCG, raison pour laquelle l'IDR doit être interprétée en fonction des antécédents de vaccination [7].

I.5.1.3. La radiographie pulmonaire standard

Elle permet de faire un bilan des lésions thoraciques. Mais les anomalies radiologiques constatées peuvent être des séquelles d'une tuberculose ancienne [7].

I.5.2. Diagnostic bactériologique :

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose repose sur la mise en évidence des bacilles de la tuberculose, Les méthodes bactériologiques à mettre en œuvre comprennent la recherche de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) par l'examen microscopique, la mise en culture sur milieux spécifiques, l'identification par méthode biochimique des bacilles obtenus en culture et les tests de sensibilité aux antituberculeux [8].

I.5.2.1. Examen microscopique :

L'examen microscopique d'un produit pathologique est la première étape du diagnostic bactériologique de la tuberculose. Il est effectué directement sur le frottis d'une parcelle purulente ou hémorragique du produit pathologique ou mieux, sur le culot du produit homogénéisé et centrifugé après un traitement fluidifiant décontaminant.

Pour mettre en évidence les mycobactéries, on utilise leur propriété d'acido alcool-résistance, c'est-à-dire leur capacité à former des complexes stables avec des colorants basiques, fuchsine ou fluorochromes phéniqués, qui persistent malgré la double action de l'alcool et des acides [8].

En pratique, deux méthodes sont bien codifiées, elles sont bien adaptées à la pratique quotidienne où elles ont fait leurs preuves. Ce sont la méthode de Ziehl-Neelsen et la méthode de coloration à l'auramine (voir Annexe 4).

i. Coloration de Ziehl-Neelsen :

La technique d'examen est basée sur le caractère acido-alcool-résistants du bacille. Traité par la coloration de Ziehl-Neelsen (ZN), le bacille retient le colorant rouge (fuchsine) et résiste à la décoloration par l'alcool-acide. La méthode de référence est la méthode de ZN à chaud. L'examen peut être quantifié en utilisant une classification basée sur le nombre de BK identifiée par champ [6].

ii. Coloration à l'auramine (microscopie à fluorescence) :

Il consiste à colorer le BK par un fluorochrome (auramine) et à utiliser une lumière qui le rend fluorescent. La coloration employée est celle de Holst Mitchison et Radhakrishna (1959), les bacilles vont apparaître comme des petits bâtonnets brillants de couleur jaune sur fond sombre en microscopie à fluorescence, se sont des bacilles de 2 à 5 µm de long et de 0,3 µm de large rectilignes ou légèrement incurvés, aux extrémités arrondies, ces bacilles sont non capsulés, non sporulés. Dans les produits pathologiques ils sont sous forme isolée ou en petits amas [6].

I.5.2.2. Culture :

Cette méthode, comme la microscopie directe, permet de confirmer le diagnostic de TB.

- Les prélèvements non contaminés sontensemencés directement sur le milieu de LJ et placés dans une étuve à 37°C.
- Les prélèvements contaminés sont décontaminés avant leur mise en culture sur milieu de LJ.

Délai d'obtention des résultats sur milieu solide de Lowenstein –Jensen (méthode Standard) est de 4 à 6 semaines [9].

I.5.2.3. Les tests de sensibilités :

I.5.2.3.1. Méthode Classique :

La méthode phénotypique de mesure de la sensibilité aux antituberculeux la plus couramment utilisée est la méthode dite des proportions, réalisée sur milieu solide. Elle permet de déterminer la proportion de bacilles résistants à chaque antituberculeux dans une population bacillaire donnée. L'antibiogramme sur milieu solide de Lowenstein-Jensen, ou méthode des proportions de Canetti, est la méthode de référence. Les colonies obtenues sur les tubes témoins sans antibiotique indiquent le nombre de germes viables contenus dans l'inoculum. Les milieux avec l'antibiotique ont reçu le même inoculum. Les colonies qui y apparaissent ne représentent

que les seuls bacilles résistants. Leur nombre, rapporté à celui des germes viables, permet d'apprécier la proportion de bactéries résistantes. Il faut déterminer la proportion de bactéries résistantes et la comparer à la proportion critique. La proportion critique est de 1% pour l'isoniazide, la rifampicine, l'ethambutol et la streptomycine. L'inconvénient de la technique en milieu solide réside dans la lenteur des résultats, obtenus entre 8 à 10 semaines après le prélèvement [10].

I.5.2.3.2. Méthode de biologie moléculaire :

Les techniques de biologie moléculaire réduisent le temps de détection de la résistance en 24 à 48h au lieu de 8 à 10 semaines [11].

I.5.2.3.2.1. Test génétique de détection des résistances à la rifampicine et à l'isoniazide du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTB DR plus):

C'est une technique qui repose sur la recherche des mutations sur le gène *rpoB* qui codent pour la résistance à la Rifampicine, et sur le gène *katG* et le gène *inhA* qui codent pour la résistance à l'isoniazide.

Ce test permet l'identification des souches du complexe tuberculosis. Le test peut se faire sur les colonies de culture et se fait aussi sur les crachats à microscopie positifs, ce test repose sur une PCR multiplexe suivi d'une hybridation et révélation.

La résistance de la RIF est codée par le gène *rpoB* dans plus de 98%. La résistance à l'INH est codée par les 2 gènes : *KatG* dans 60 à 90% et *InhA* dans 15 à 43% [12].

I.6. Les formes cliniques de la tuberculose :

La forme la plus fréquente est la tuberculose commune atteignant les poumons, et les formes les plus rares sont les formes aiguës disséminées et les tuberculoses extra-pulmonaires.

I.6.1. Tuberculoses pulmonaires :

Certaines images radiologiques anormales évoquent une tuberculose pulmonaire active :

- Les nodules sont des opacités arrondies à limites nettes et leur taille varie du micronodule (dont le diamètre est inférieur à 3mm), au nodule (supérieur à 3 mm et inférieur à 1 cm), jusqu'à l'opacité ronde (supérieur à 1 cm).
- Les opacités en nappe, ou « infiltrations », ont des contours irréguliers dégradés en périphérie. Ces opacités sont de taille variable, parfois étendues à tout un lobe.
- Les cavernes sont les images les plus évocatrices de la tuberculose commune. La caverne est une hyperclarté, limitée par une paroi relativement épaisse (plus de 1mm), prolongé souvent à son pôle inférieur par des lignes opaques parallèles dirigées vers le hile du poumon correspondant à la bronche drainage. Il existe parfois au sein de cette cavité un bas fond liquidien (caséum liquéfié) [6].

I.6.2. Tuberculoses extra-pulmonaires :

Toutes les localisations de la tuberculose situées en dehors du parenchyme pulmonaire sont des tuberculoses extra-pulmonaires. Outre toutes les localisations extra-thoraciques de la tuberculose aisément classées comme extra-pulmonaires, certaines formes à localisation totalement ou partiellement intra-thoracique doivent être classées comme extra-pulmonaires:

La tuberculose pleurale et la tuberculose des ganglions médiastinaux sont des tuberculoses extra-pulmonaires lorsqu'elles ne s'accompagnent pas de lésion au niveau du parenchyme pulmonaire.

La tuberculose miliaire est une tuberculose disséminée qui atteint tous les organes et ne se limite pas aux poumons [6].

I.7. Epidémiologie moléculaire :

Le typage moléculaire, c'est-à-dire l'analyse génétique des souches bactériennes isolées chez les patients, permet de mettre en évidence les patients porteurs de la même souche clonale. Cette information est importante puisque la mise en évidence de nombreux clones identiques (donc potentiellement issus d'une même bactérie "mère") chez des patients, peut être le reflet d'une épidémie [12].

I.7.1. Le génome de *M. tuberculosis* :

Le génome de *M. tuberculosis* H37Rv est composé de 4 411 522 paires de bases et correspond à environ 4000 gènes ; qui contient un pourcentage de GC assez haut de 65.5%.

Près de 4000 gènes ORF (open reading frames) codent potentiellement aux protéines, 16% sont spécifiques aux mycobactéries, 44% similaires aux autres protéines et 40% ne révèlent pas de fonctions précises. 250 enzymes distinctes sont impliquées dans le métabolisme des acides gras, par comparaison chez *E.coli* il existe que 50, bon nombre de ces enzymes contribuent à l'élaboration de la paroi riche en lipides. 8 % du génome contribue au métabolisme lipidique.

On retrouve également des gènes impliqués dans le métabolisme anaérobie, expliquant la capacité d'adaptation de *M. tuberculosis* à des environnements pauvres en oxygène comme le granulosoïde.

Le plus important dans le génome de *M. tuberculosis* est la présence de plusieurs éléments répétés, soit des répétitions en tandem insérées dans des régions inter-cistroniques de gènes d'un même opéron (mycobacterial insertion repetitive units, MIRU). Soit des séquences d'insertion comme IS6110 largement utilisée dans le typage moléculaire des souches [4]. Cette séquence fait partie de la famille des IS3, elle est abondante et joue un rôle important dans la

plasticité du génome. La souche H37Rv contient 16 séquences IS6110, elle est utilisée comme souche de référence pour l'étude épidémiologique des isolats [7].

L'analyse du protéome a mené à l'identification de deux grandes familles de protéines PE (Pro-Glu) et PPE (Pro-Pro-Glu) riches en proline et glycine dont la composition en acides aminés diffère de celle de la plupart des protéines. Elles occupent 10% du génome (Cole et al., 1998) ; ces gènes codent à des protéines souvent associés avec le polymorphisme GC rich sequence PGRSs et major polymorphic tandem repeat (MPTRs). La fonction de cette famille de protéine est encore inconnue et semble être impliquée dans la variation antigénique.

L'élucidation du génome de *M. tuberculosis* fournit beaucoup d'informations pouvant contribuer à présent et dans le futur aux stratégies de contrôle de la tuberculose comme l'identification de quelque cible de résistance aux antibiotiques, production de vaccin ou autre[4].

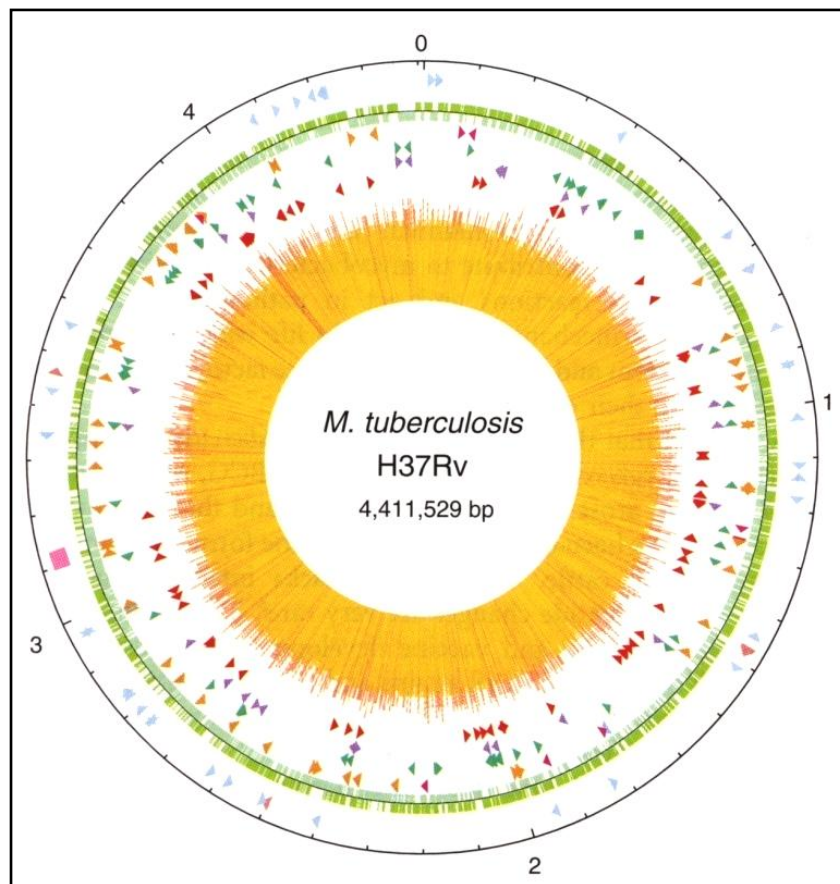


Figure n°4: Représentation schématique du génome de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [4].

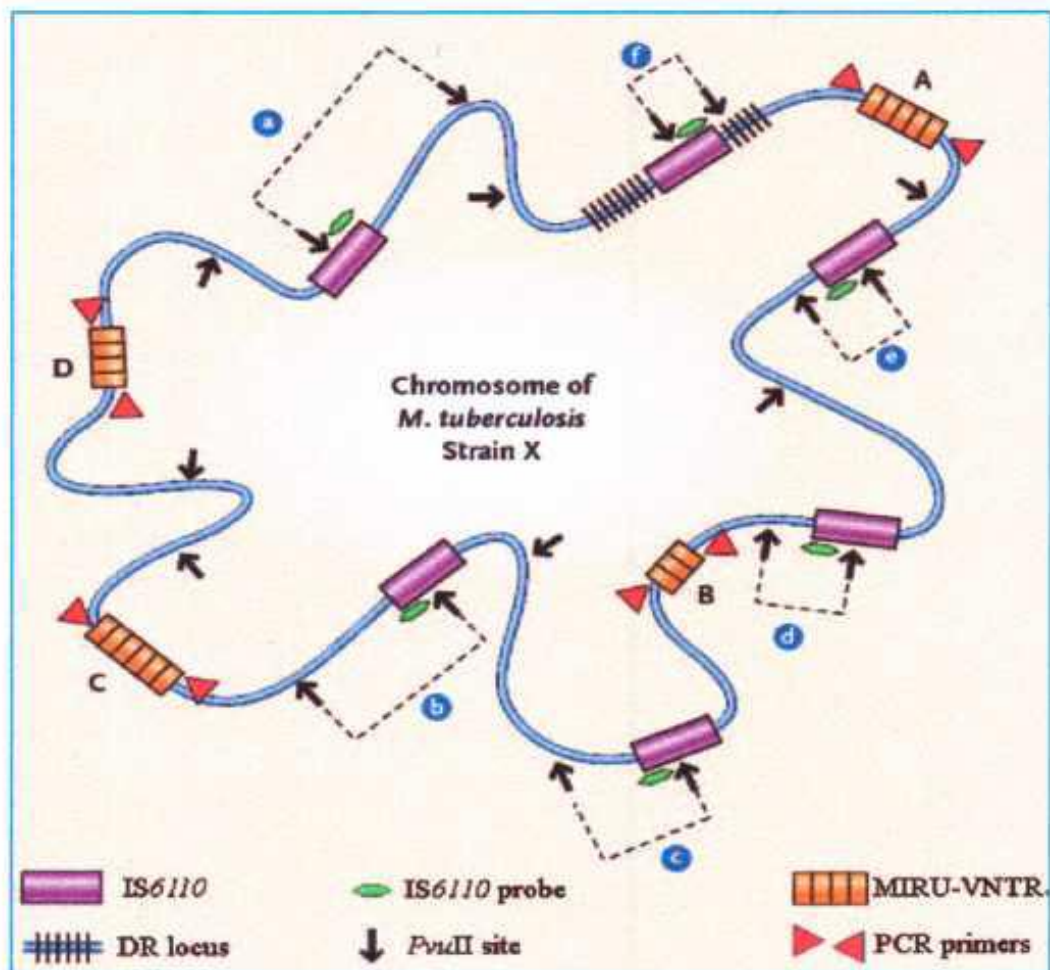


Figure n°5 : Schéma reprenant les trois principaux types de marqueurs utilisés pour le génotypage des isolats du complexe *M. tuberculosis* [13].

I.7.2. Méthodes de typage de *Mycobacterium tuberculosis* :

Il existe actuellement un large panel de techniques moléculaires utilisables pour typer les souches de *Mycobacterium tuberculosis*. Les séquences cibles de ces techniques (ou marqueurs) peuvent être soit des séquences d'insertion, dont les plus utilisées sont IS6110 et IS1081, soit des éléments répétitifs du génome tels que le locus DR (*direct repeat*), les loci PGRS (*polymorphic sequences polymorphes riches en GC*), ETR (*exact tandem repeat*) et MIRU (*Mycobacterial interspersed repetitive units*) [7]. Les différentes méthodes d'investigation de ces marqueurs sont :

I.7.2.1. La Technique RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) :

Cette Technique utilise des enzymes de restriction pour découper l'ADN chromosomal en un certain nombre de fragments de restriction, la technique d'amplification PCR de certaines régions cibles de l'ADN ou de l'ARN de *M. tuberculosis* [14].

La technique repose sur l'analyse du nombre et de la position des copies d'IS6110, variables d'un isolat à l'autre et reflété par un polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) après clivage de l'ADN génomique au moyen de l'enzyme PvuII. La technique IS6110-RFLP standardisée est actuellement la méthode de référence pour le typage des isolats du complexe *M. tuberculosis* [7].

I.7.2.2. Le spoligotypage ou typage oligonucléotidique des espaceurs du locus DR :

Le spoligotypage correspondant à une hybridation inversée de produits de PCR sur une membrane où ont été fixés préalablement 43 espaceurs connus, a été réalisé selon la méthode standard (voir la figure n°6). Les profils obtenus ont été saisis sur une feuille Excel sous forme de code binaire. À chaque profil est attribué un type, déterminé de manière informatique par comparaison avec une base de données Spol DB4.0 [15].

i. Avantages

Cette méthode étant spécifique de *Mycobacterium tuberculosis*, elle permet d'éliminer les autres sous-espèces de *Mycobacterium* et les mycobactéries atypiques [16]. Cette méthode présente également l'avantage de pouvoir être utilisée directement sur des isolats cliniques car, grâce à la PCR, elle nécessite très peu d'ADN [17]. Enfin, cette méthode est simple, rapide, robuste, et peu coûteuse [14].

ii. Inconvénients

Le pouvoir discriminant de cette méthode est assez faible par rapport à IS6110-RFLP [16 ; 14]. Cependant, cette méthode peut être appliquée en première intention avant d'appliquer une seconde technique ayant un pouvoir discriminant plus important, ce qui est de plus en plus conseillé [14].

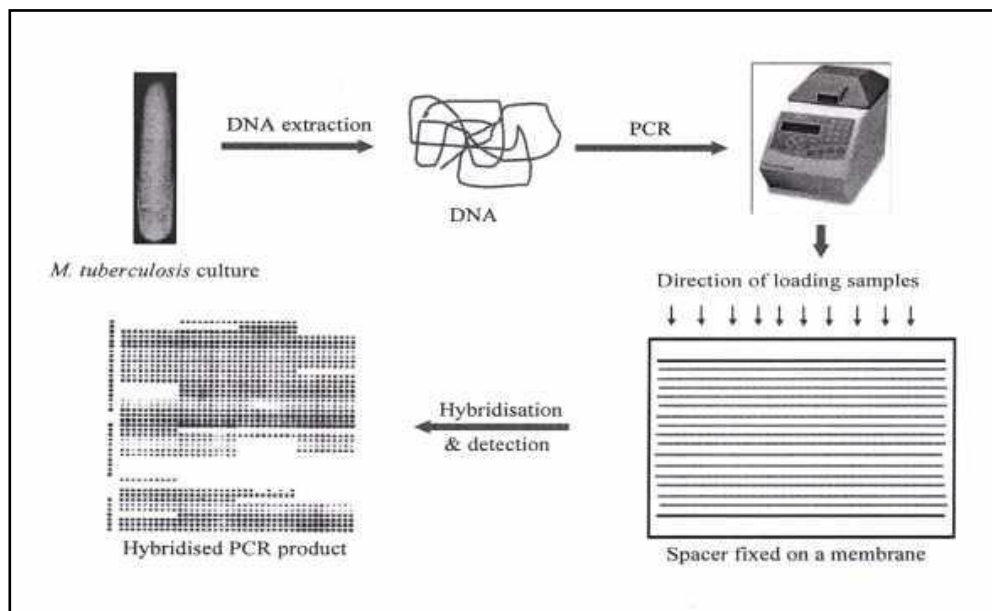


Figure n°6: la Procédure et les étapes de la technique spoligotypage [7].

I.7.2.3.MIRU VNTR :

La méthode de typage VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) repose sur le dénombrement de répétitions en tandem, qui dans un cas particulier sont nommées MIRUs (Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) chez les mycobactéries.

Le terme VNTRs fait référence aux répétitions de séquences complexes supérieures à 6pb nommées minisatellites. Ces minisatellites, comme les microsatellites constitués de séquences simples de 1 à 6pb, sont présents dans tous les organismes connus, des virus jusqu'au eucaryotes en passant par les procaryotes comme les mycobactéries.

Ces répétitions de séquences simples ou complexes subissent des mutations, comme les délétions et les insertions de leurs séquences répétitives, qui conditionnent leur extension. Les MIRUs sont en fait des VNTRs particulières, qui procèdent des éléments de régulation de la transcription, comme le codon d'initiation ATG et les codons terminateurs TGA, TAA, TAG, ou des éléments régulateurs de la traduction comme les sites d'attache du ribosome bactérien 5'-TGA GGA GGA GC-3'. De plus, les éléments de répétitions MIRUs mesurent de 40 à 100pb et sont intercistroniques, c'est à dire qu'ils se situent entre ou à l'intérieur de gènes.

En pratique, le dénombrement de séquences répétées en tandem passe par l'utilisation de la PCR (Polymerase Chain Reaction), qui amplifie des loci comportant ces séquences répétées en tandem, afin d'en déduire leurs tailles. Connaissant pour un locus amplifié, la taille de la séquence répétée afférente, ainsi que la taille des régions amplifiées qui n'intègrent pas la répétition en tandem, il est donc possible de déterminer le nombre de séquences répétées en tandem pour un locus donné de la souche analysée [7].

i. Avantages

Cette méthode, également basée sur une méthode PCR, peut se faire directement sur des isolats [14]. De plus, la méthode est simple et rapide.

ii. Inconvénients

Utilisée seule, cette méthode est faiblement discriminante, mais utilisée en seconde intention, complémentaire à une première analyse, elle permet de subdiviser les grappes de souches ubiquistes, ces grappes étant obtenus par une méthode préliminaire [18].

Matériel

&

Méthode

II. Matériels et méthodes :

Cette étude a été réalisée au Laboratoire National de Référence de la Tuberculose et des Mycobactéries, à l'Institut Pasteur d'Algérie.

Notre travail s'est basé sur le typage moléculaire par Spoligotyping des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées de patients tuberculeux diagnostiqués dans le centre de l'Algérie.

II.1. Matériels :

Cette étude a été effectuée sur un échantillon de 79 souches isolées de *Mycobacterium tuberculosis* sélectionné de façon aléatoire à partir de 300 souches de patients atteints de tuberculose durant l'année 2011 et adressés au LNR à partir des EPSP, des EPH, des hôpitaux, des CHU, de la région de centre de l'Algérie.

Les informations ont été recueillies, à partir des fiches de renseignement des malades et du registre du laboratoire, elles comprennent l'âge, le sexe, l'origine géographique ou le lieu de traitement des malades au moment du diagnostic et le statut thérapeutique (voir Annexe).

II.2. Méthodes :

II.2.1. Le choix de la technique :

L'utilisation de la Méthode de spoligotyping dans notre étude se justifie par le nombre d'avantage qu'elle présente. En effet, elle permet le typage de 43 souches en même temps dans une même manipulation. Elle nécessite très peu d'ADN [17], cette méthode est simple, rapide, robuste, et peu coûteuse [14], par rapport aux autres techniques de typage (RFLP, MIRUs-VNTR).

II.2.2. Principe de la méthode Spoligotyping :

C'est une méthode pré-conceptualisée par Groenen *et al.* (1993) et développée par Kamerbeek *et al.* (1997). Elle repose sur la détection du polymorphisme de 43 séquences oligonucléotides du génome de *M. tuberculosis*, intégrés dans le locus DR (*direct repeat*). Le locus DR est constitué de courtes séquences d'ADN répétées (DR) de 36 paires de base (pb), séparées par des séquences variables de 35 à 41 pb appelées espaceurs ou séquences inter-DR [19]. Ces séquences varient d'une souche à l'autre par leur longueur, leur séquence et leur nombre. Cette technique repose sur une amplification par PCR, elle nécessite une moindre quantité d'ADN (applicable sur un échantillon positif à l'examen direct) [20], puis à l'hybrider sur une membrane où sont fixées de façon covalente 43 espaceurs (94 ont été identifiés, mais seulement 43 sont utilisés en routine). Les fragments hybridés sur la membrane sont ensuite

révélés par chimioluminescence. Les résultats montrent la présence ou l'absence des 43 séquences des espaces inter DR dans la souche testée (**voir figure n°7**).

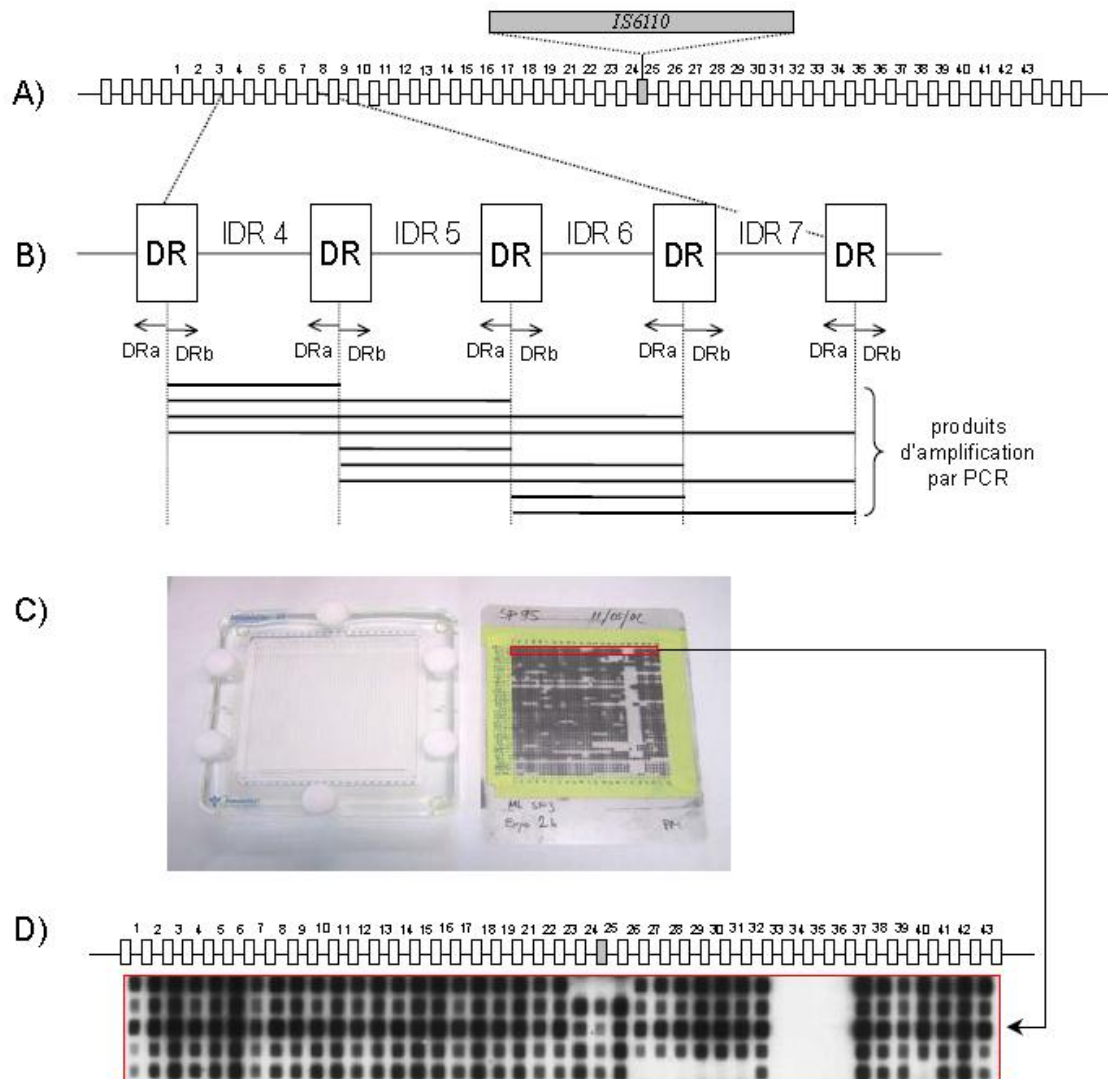


Figure n°7 : la Procédure et les étapes de la technique spoligotypage[17]

(A) Structure du locus DR du génome des mycobactéries.

(B) Amplification in vitro de la région DR par PCR grâce aux amorces DRa et DRb. Chaque DR du locus peut servir de départ à l'amplification, donc le résultat d'amplification donne un mélange de fragments d'ADN de taille multiples.

(C) Détection des espaces inter-DR (IDR) par hybridation sur un système matriciel, à gauche (membrane sur laquelle sont liées de façon covalente les 43 séquences oligonucléotidiques correspondant aux 43 espaces).

À droite, photographie après révélation par chimioluminescence (ECL, Amersham).

(D) Motifs d'hybridation (spoligotypes) des souches de *M. tuberculosis* testées (une souche par ligne). La coloration noire indique la présence de l'espaceur dans la souche considérée alors que le blanc indique l'absence de cet espaceur.

II.2. 3. Les étapes de la technique [27]:

1. Prélèvement et extraction d'ADN :

Dans des microtubes à vis de 2ml mettre 150 μ l de Tris-EDTA; sous une hotte de sécurité bactériologique à coté du bec du bunsen, à l'aide une anse jetable, prélever des colonies et mettre en suspension dans des microtubes de Tris-EDTA.

L'extraction d'ADN a été pratiquée soit par le chauffage des microtubes à 100°C au moins 20 min pour tuer les souches et libérer les fragments d'ADN.

2. Préparation de la PCR :

Dans une chambre blanche exempte d'ADN bactérien munie d'une hotte chimique, dans un microtube préparer une quantité suffisante du Mix pour le nombre d'échantillons, le témoin négatif et des deux souches de référence H37Rv et Bovis BCG. Répartir 48 μ L dans chaque microtube de 0.2 μ l stérile (voir le Tableau n°2). Pour notre étude, nous avons préparé un Mix suffisant pour 79 souches, deux Témoins positives (BCG et H37Rv) et un Témoin négatif.

Tableau n°2 : Quantité des réactifs nécessaires pour la PCR.

Réactifs		Quantité Pour 1 réaction	Concentration Finale
H2O		14,9 μ L	
TamponTaq	5×	10 μ L	1×
MgCl2	50Mm	7 μ L	7mM
Amorce 1 (Dra)	20 pmol	4 μ L	0,4mM
Amorce 2 (Drb)	20 pmol	4 μ L	0,4mM
dNTP	2,5mM	8 μ L	0,4mM
Taq Tth polymérase	5U/μL	0,1 μ L	0,5U/ μ L

Dans une autre pièce, ajouter 2ml de surnagent des différents produits d'extraction dans chaque microtube de Mix. Les tubes sont placés dans un thermo-cycler (Applied Biosystems) selon le programme suivant (voir Tableau n°3) :

Tableau n°3 : Programme de la PCR

N° programme	Temps	Température	Nombre de cycle
Dénaturation	3min	96°C	1 Cycle
	1min	96°C	30 Cycle
	1min	55°C	
	30sec	72°C	
Extensions des amorces	5min	72°C	5 Cycle
Infini	99h99	+4°C	

Après avoir terminé la PCR, 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 mélangé à du bleu de dépôts puis en les déposant dans des puits, on apprécie l'amplification avec une lampe UV, et cela après migration par électrophorèse dans un gel d'agarose, avec un courant de 90 volts pendant 30 min.

3. Préparation de la membrane pour l'hybridation :

- Rincer la membrane (Nitrocellulosique commercialisée par ISOGENE Bioscience BV) deux fois par 250ml 2xSSPE / 0,1 SDS à 60°C pendant 5mn.
- Placer la membrane dans le miniblottier sur un support de mousse, de manière à avoir les deux traits de la membrane du côté des canaux, fermer les 06 vis (figure n°8).
- A l'aide d'une pompe à vide, chasser l'eau des canaux.
- Diluer les échantillons (150 µl de SSPE 0,1 % + 20 µl de produit PCR), en suite chauffer les prélèvements dans un bain marie à 100°C pendant 10mn pour dénaturer l'ADN, refroidir dans de la glace pour garder les deux brins séparés.
- Remplir successivement les canaux de 150ul du produit de chaque tube dans chaque puits du miniblottier en évitant les bulles d'air (le premier et dernier pour éviter le phénomène de bavage) par 2xSSPE / 0,1 SDS à 60°C.
- Incuber le miniblottier à 60°C dans un incubateur en position horizontale pendant 1h, et à la fin de l'incubation, aspirer les échantillons déposés dans le sens de leurs dépôts.

- Démonter le miniblatter, enlever la membrane et laver deux fois dans 250 ml 2XSSPE/0,5% SDS à 60°C dans un incubateur sous agitation pendant 15mn dans un récipient sous agitation.
- Placer la membrane dans une bouteille rotative de façon à avoir la face comportant les Oligonucleotide du coté interne de la membrane, incubé à 42°C dans une solution de conjugué streptavidine-péroxydase diluée à 1/4000 (diluer 3,5ul de conjugué de la streptavidine dans 14ml de SSPE/SDS 0,5%) pendant 45mn.
- Laver la membrane deux fois dans 250ml de tampon 2xSSPE/0,5% SDS à 42°C pendant 10 min.
- Rincer deux fois dans 250ml de 2xSSPE pendant 5min à température ambiante sous agitation.
- La détection se fait à l'aide d'un Kit ECL.
- Préparer 40ml de liquide de détection ECL en mélangeant 20ml de la solution 1 et 20ml de la solution 2, incubé pendant 2min sous agitation.
- Envelopper la membrane dans du papier cellophane puis chasser l'air et l'eau.
- Placer la membrane dans une cassette de développement face oligonucleotides vers le haut.
- Dans une chambre noire, exposer la membrane à un film d'auto radiographique ECL pendant 02 mn répéter les expositions pendant 10mn puis 30mn.
- Développer les films (voir Annexe).

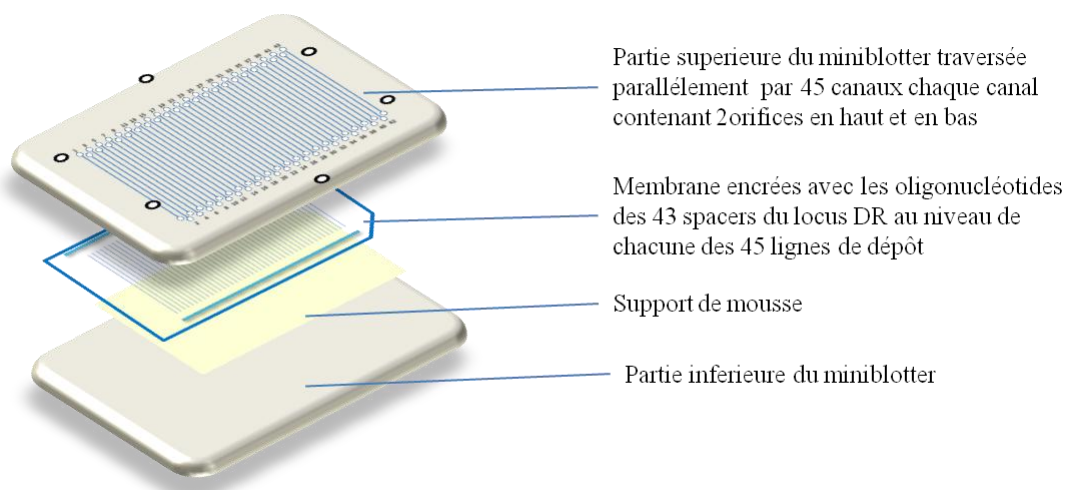


Figure n°8 : Emplacement de la membrane dans le miniblatter [27].

4. Résultats et lectures :

Les profils génomiques sont révélés après hybridation avec la membrane portant l'ensemble des 43 séquences inter-DR connues. On définit un spoligotype sur la présence ou l'absence d'un ou plusieurs spacers.

Après exploration de locus DR par la méthode spoligotyping, il en résulte une empreinte génétique constitué de 43 séquences qui se manifestent sur la radiographie sous forme de points noirs ou blanc qui marquent respectivement la présence ou l'absence des spacers. La détermination du spoligotype et la famille génomique de chaque souche se fait en comparant les profils à une banque de données SPOLDB4.

5. Dés-hybridation et conservation de la membrane:

Les membranes utilisées pour le spoligotyping sont réutilisables, à condition de libérer les oligonucléotides des produits d'amplification qui s'y sont fixés.

- i. Laver la membrane dans 250 ml de SDS 1% à 85°C pendant 30 minutes sous agitation. Répéter la procédure à trois reprises;
- ii. Laver la membrane dans 250 ml d'EDTA 20 Mm à pH 8 pendant 15 minutes à température ambiante sous agitation. Répéter la procédure une deuxième fois;
- iii. Emballer la membrane à 4°C dans un sachet en plastique jusqu'à une nouvelle utilisation.

Résultat
&
Discussion

III. Résultats et discussion :

III.1. Résultats :

III.1.1. Description Géo-démographique de la population :

Les résultats énoncés ci-après concernent la répartition par origine géographique, par sexe et par âge des cas confirmés de tuberculose à partir d'un échantillonnage aléatoire de 79 souches étudiées sur un total de 300 isolées dans le Laboratoire Nationale de Référence dans les wilayas du centre de l'Algérie en 2011.

III.1.1.1. Répartition des cas par l'origine géographiques :

Sur les 79 patients inclus dans notre étude, 39 ont été diagnostiqués à Alger soit un pourcentage de 49%, 17 à Tipaza avec un taux de 22%, 10 cas à Boumerdes soit 13%, 09 cas recensés à Blida soit 11% et enfin 04 patients de la wilaya de Médéa avec un pourcentage de 5% des patients étudiés (voir le tableau n°4).

Tableau n°4: Répartition des patients selon l'origine géographique

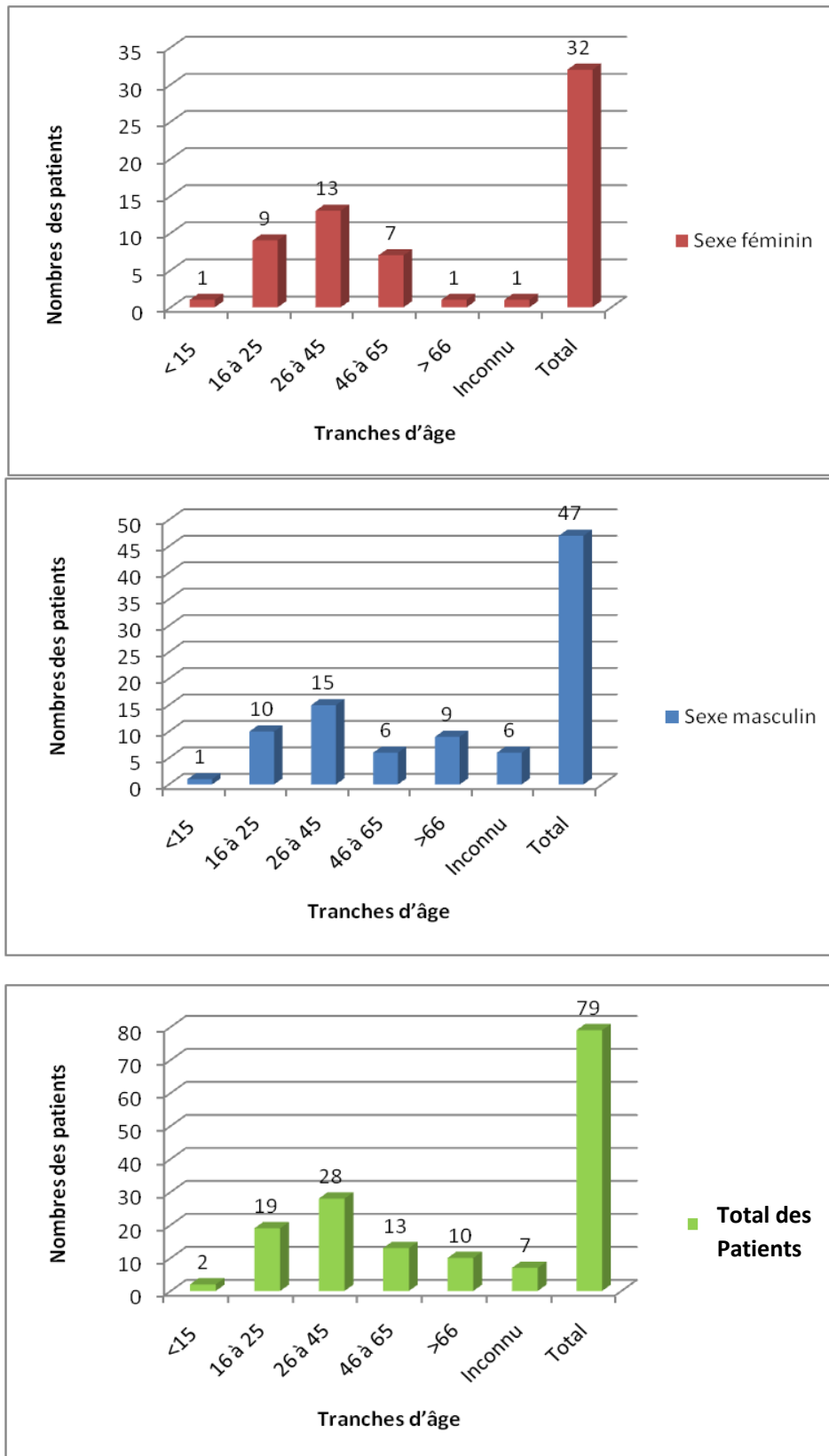
<i>Wilaya</i>	<i>Nombres</i>	<i>Fréquence(%)</i>
Alger	39	49
Tipaza	17	22
Boumerdes	10	13
Blida	9	11
Médéa	4	5
Σ (Somme)	79	100

III.1.1.2. Répartition des cas par sexe :

Sur les 79 patients étudiés, le sexe masculin est plus dominant avec 47 cas (59,49%) et 32 cas (40,50 %) de sexe féminin, soit un sexe ratio H/F de 1,5. (Voir le tableau n°5 et les graphique I).

Tableau n°5: Répartition des patients par tranche d'âge et par le sexe

Tranche d'âge (Ans)	Patients	Sexe masculin	Sexe féminin
	Nombre	Nombre	Nombre
<15	2	1	1
16 à 25	19	10	9
26 à 45	28	15	13
46 à 65	13	6	7
>66	10	9	1
Inconnu	7	6	1
Total	79	47	32



Graphiques I : Nombres des patients selon les tranches d'âges ; en haut : pour le sexe féminin, au centre : pour le sexe masculin, en bas : pour la totalité.

III.1.1.3. Répartition des cas par tranche d'âge :

Chez **79 patients** tuberculeux, La répartition des 79 malades selon l'âge a montré que la tranche d'âge de moins de **15 ans** est représentée par deux patients un de sexe féminin et un de sexe masculin, les patients âgés entre **15 et 25 ans** sont au nombre de **19 (10 de sexe masculin et 09 de sexe féminin)** avec un pourcentage de **24%**.

La tranche d'âge située entre **26 et 45 ans** est composée de **28 patients** avec un pourcentage de **35% (15 de sexe masculin et 13 de sexe féminin)**.

Pour la tranche d'âge située entre **46 et 65 ans**, nous avons enregistré **13 patients** avec un pourcentage de **16% (06 de sexe masculin et 07 de sexe féminin)** et enfin les patients âgés de **plus de 66 ans** représentent **13%** (09 de sexe masculin et 01 de sexe féminin);

A signaler 06 cas de sexe masculin et 01 cas de sexe féminin dont d'âge est inconnu et qui représentent un pourcentage de **9%** (Voir graphique I).

On a remarqué que la tuberculose touche toutes les tranches d'âge mais surtout les patients adultes actifs dans la tranche d'âge varient entre **16 et 65 ans**, qui représentent **75%** de patients (voir le tableau n°6).

Tableau n°6: La fréquence des patients selon la tranche d'âge

Tranche d'age(Ans)	Nombre	Fréquence (%)
<15	2	3
16 à 25	19	24
26 à 45	28	35
46 à 65	13	16
>66	10	13
Inconnu	7	9
Total	79	100

III.1.2. Résultats du typage par la méthode de spoligotyping :

Après L'exploration de locus DR par la méthode spoligotyping, la détermination des profils génomiques des souches testées se fait en comparant les profils obtenus à une banque de données SPOLDB4 (voir la figure n°9). L'ensemble des souches ayant un profil génétique identique définit une grappe, ou « cluster » [20].

L'analyse des profils des 79 souches isolées dans les différentes wilayas retenues (wilaya de Blida, Médéa, Boumerdes, Tipaza et Alger) a montré une grande diversité génétique.

Nous avons obtenu nerfs (9) familles génomiques, qui sont :

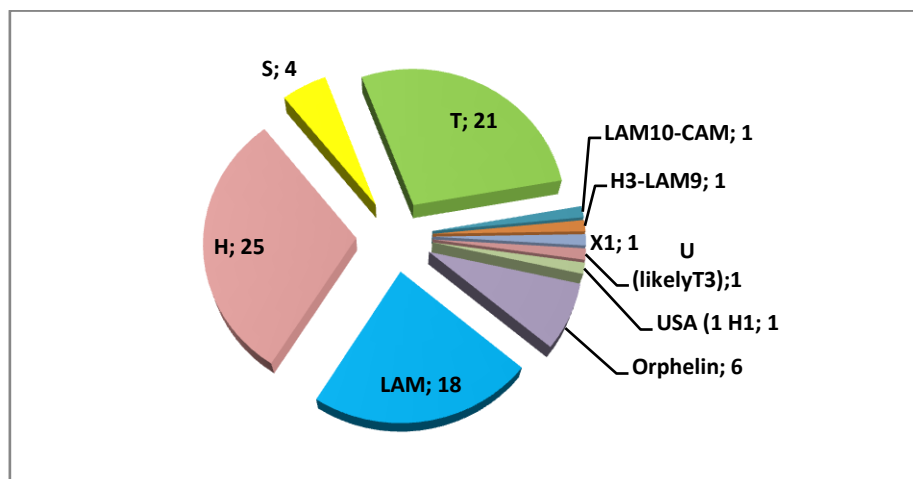
(LAM, H, S, T, LAM10-CAM, H3-LAM, X1, U (likely T3), USA(1H1)).

Les trois familles génomiques dominantes sont représentées par la famille Haarlem « H » formée de 25 souches (31%), la famille « T » formée de 21 Souches (27%); suivi par la famille LAM composée de 18 souches (23%); la famille « S » représenté par 4 souches, soit 6% ; Les souches restants appartient aux familles LAM10-CAM, H3-LAM, X1, U(Likley T3) et USA(1H1) de pourcentage 1% ; Enfin 06 profils Orphelins (8%) (Voir Graphique II). Dans ce lot de 79 souches typées, on a identifiées 08 grappes, une grappe de 14 isolat, une grappe de 12 isolat, ainsi une grappe de 9 isolats, 3 grappes de 3 isolats et enfin 2 grappes avec deux (02) isolats (Voir la figure n°9). La répartition des familles génomiques des 79 souches étudiées est représentée dans le tableau n°7).

Tableau n°7 : La répartition des souches selon des familles génomiques

Familles	Famille H		Famille T		Famille LAM		Autres	
	ST/Famille	Nbre	ST/Famille	Nbre	ST/Famille	Nbre	ST/Famille	Nbre
	50/H3	12	53/T1	14	42/LAM9	9	335/H3-LAM9	1
	99/H3	3	196/T1	2	150/LAM9	1	61/LAM10-CAM	1
	143/H1	3	118/T2	3	1530/LAM9	1	34/S	2
	3/H3	2	37/T3	1	469/LAM9	1	88/S	1
	47/H1	1	1547/T3	1	822/LAM9	1	1063/S	1
	151/H1	1			1064/LAM9	1	56/U (likely T3)	1
	134/H3	1			1075/LAM9	1	1644/USA(1H1)	1
	75/H3	1			1106/LAM9	1	878/X1	1
	1908/H3	1			423/LAM1	1	Orphelin	6
					1066/LAM6	1		
Total	25/79		21/79		18/79		15/79	
Fréquence	31%		27%		23%		19%	

LAM (Latino-américaine et méditerranéenne), H (Haarlem), S (Sardaigne-Sicile), CAM (Cameroun).



Graphique II: Les familles génomiques identifiées dans le centre de l'Algérie.

III.2.1. Répartition des Familles génomiques entre des différentes wilayas incluses dans l'étude :

a. Wilaya d'Alger :

L'analyse des profils des souches isolées a montré trois familles génomiques majoritaires, qui sont représentées par les familles « **H** » (40%), « **T** » (27%) et « **LAM** » (18%) (Voir graphique III).

La famille « **H** » est composée de deux sous familles H3 et H1; Dans la sous famille H3 nous avons identifiée 11 souches dont **07** constituent une grappe qui correspond au ST n°50; La famille « **T** » est composée de trois sous familles T1, T2 et T3.

La sous famille T1 est composée de 04 souches constituant une grappe qui correspond au ST n°53 et aussi une sous famille T2 constituée de 03 souches formant une grappe qui correspond au ST n°118.

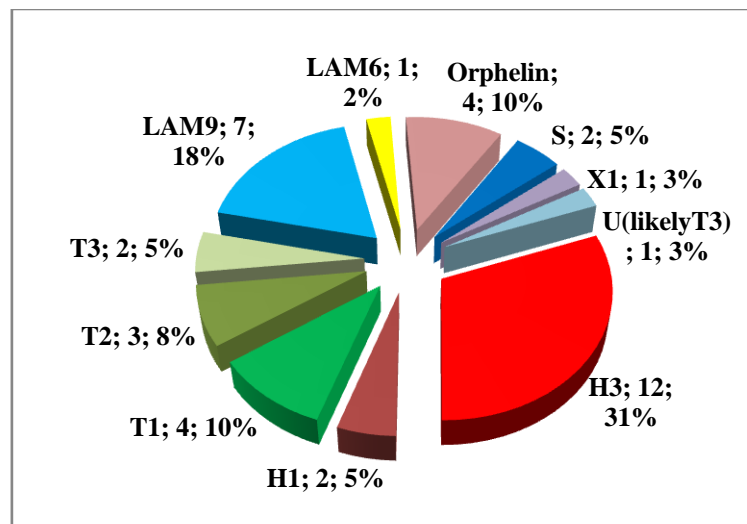
La famille « **LAM** » est composée de deux sous familles LAM6 et LAM9; La sous famille LAM9 est composée de 06 souches dont **03** constituent une grappe qui correspond au ST n° (42); L'analyse a montré aussi 03 souches a profil unique appartenant aux familles : « **X1** » ST n° 878, « **U (likley T3)** » ST n°56 et « **S** » ST n° (34 ; 88).

Enfin après cette analyse 04 profils Orphelins sont apparues, ces dernières ne figure pas dans la banque de donnée SPOLDB4.

Tableau n°8: Répartition des familles génomiques et des spoligotypes identifiées dans la wilaya d'Alger :

Origine	Famille	Spoligotype	Nombre des familles	Fréquence	
ALGER	H3	50	7	18%	36%
		1908	1	profil unique	
		99	1		
		134	1		
		75	1		
		3	1		
	H1	143	1	profil unique	
		151	1		

	T1	53	4	11%	23%
	T2	118	3	8%	
	T3	1547	1	profil unique	
		37	1	profil unique	
	LAM9	150	1	profil unique	20%
		469	1		
		1106	1		
		1530	1		
		42	3	8%	
	LAM6	1066	1	profil unique	
	U (likely T3)	56	1	profil unique	3%
	S	34	1	profil unique	5%
		88	1	profil unique	
	X1	878	1	profil unique	3%
ORPHELIN	?	1	profil unique	2,5%	
	?	1		2,5%	
	?	1		2,5%	
	?	1		2,5%	



Graphique III: Les familles génomiques identifiées dans la wilaya d'Alger.

b. Wilaya de Tipaza :

L'analyse faite sur 17 les souches isolées dans la wilaya de Tipaza a montré trois familles génomiques majoritaires, qui sont représentées par les familles « **H** » (18%), « **T** » (47%) et « **LAM** » (29%) (Voir graphique IV).

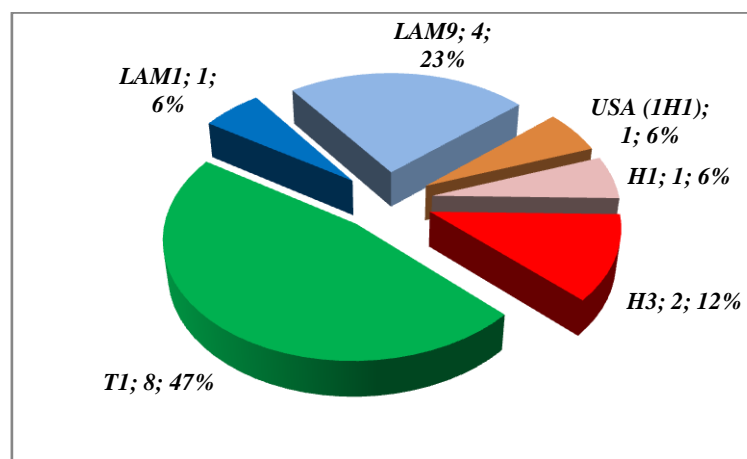
La sous famille T1 est composée de 08 souches dont 7 constituent une grappe qui correspond au ST n° 53;

La famille « **H** » est composée de deux sous familles H1 et H3; La sous famille H3 est composée de 02 souches, qui constituent une grappe qui correspond au ST n°50;

La famille « **LAM** » est composée de deux sous famille LAM1 et LAM9; La sous famille LAM9 est composée de 04 souches dont 3 constituent une grappe qui correspond au ST n° 42; L'analyse a montré aussi la présence d'une souche à profil unique appartenant la famille « **USA (1H1)**» qui correspond au ST n°1644.

Tableau n°9: Répartition des Familles génomiques et des spoligotypes identifiées dans la wilaya de Tipaza :

Origine	Famille	Spoligotype	Nombre des familles	Fréquence	
TIPAZA	H1	143	1	profil unique	18%
	H3	50	2	12%	
	T1	53	7	41%	47%
		196	1	profil unique	
	LAM1	423	1	profil unique	29%
	LAM9	822	1		
		42	3		
	USA (1 H1)	1644	1	profil unique	6%



Graphique IV: Les familles génomiques identifiées dans la wilaya de Tipaza.

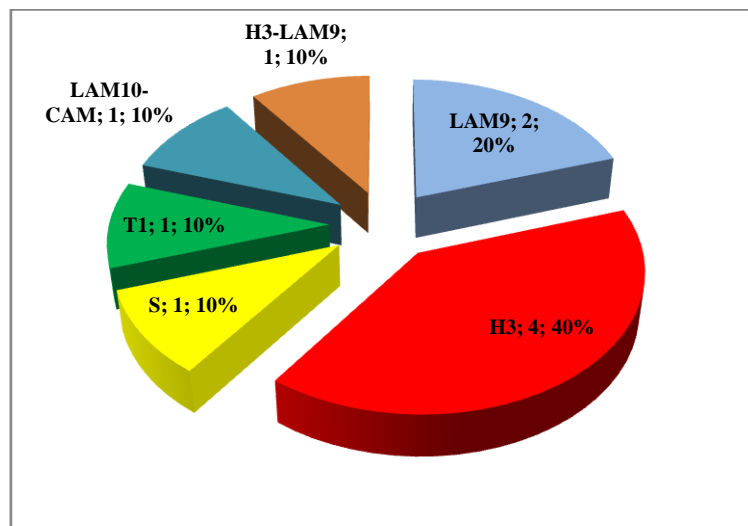
e. Wilaya de Boumerdés :

Dans cette wilaya l'analyse a été faite sur 10 souches, les résultats ont révélé la présence de quatre (04) familles, qui sont la famille « H », « T », « LAM » et la famille « S » (Voir graphique V).

La sous famille H3 est composée de 04 souches dont 03 constituent une grappe qui correspond au ST n°50 ; suivi par La sous famille LAM9 qui est composée de 02 souches constituant une grappe qui correspond au ST n° 42. En plus de 04 profils uniques dont la famille « LAM10-CAM» qui correspond au ST n° 61(voir le Tableau n°12).

Tableau n°10: Répartition des Familles génomiques et des spoligotypes identifiées dans la wilaya de Boumerdes :

Origine	Famille	Spoligotype	Nombre des familles	Fréquence	
BOUMERDES	LAM9	42	2	20%	20%
	H3	50	3	30%	40%
		3	1	profil unique	
	S	1063	1	profil unique	10%
	T1	196	1		10%
	LAM10-CAM	61	1		10%
	H3-LAM9	335	1		10%



Graphique V : les familles génomiques identifiées dans la wilaya de Boumerdes.

c. Wilaya de Blida :

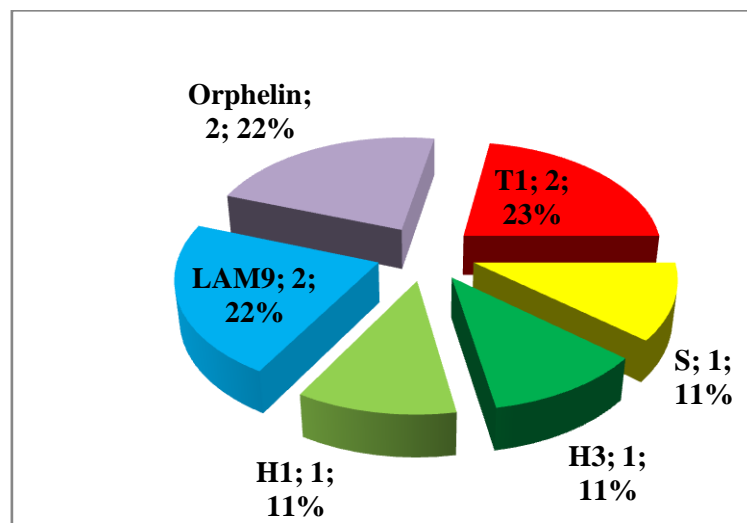
L'analyse faite sur 09 souches isolées dans cette wilaya a montré trois familles génomiques, qui sont représentées par les familles « H » (28%), « T » (29%) et « LAM » (29%).

La sous famille T1 est composé de 02 souches, qui constituent une grappe qui correspond au ST n° 53(Voir graphique VII).

Enfin cette analyse a révélé la présence 05 profils uniques et de 02 profils Orphelins (voir le Tableau n°11).

Tableau n°11: Répartition des Familles génomiques et des spoligotypes Identifiées dans la wilaya de Blida :

Origine	Famille	Spoligotype	Nombre des familles	Fréquence	
BLIDA	T1	53	2	23%	23%
	S	34	1	profil unique	11%
	H3	99	1	profil unique	12%
	H1	143	1	profil unique	
	LAM9	1064	1	profil unique	22%
		42	1	profil unique	
	ORPHELIN	?	1	profil unique	11%
	ORPHELIN	?	1	profil unique	11%



Graphique VII: Les familles génomiques identifiées dans la wilaya de Blida.

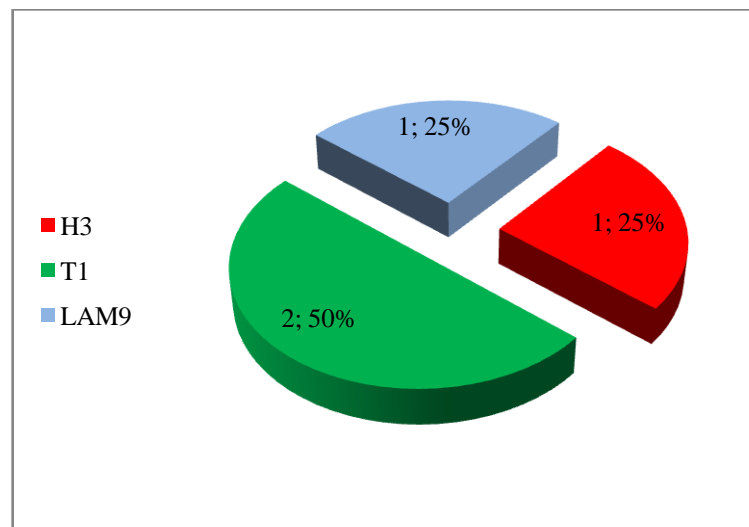
d. Wilaya de Médéa :

L'analyse faite sur 04 souches identifiées dans la wilaya de Médéa, a montré la présence de trois familles, la famille « H », la famille « T » et la famille « LAM ».

La sous famille **T1** composée de 02 souches constituant une grappe qui correspond au STn°53. On a aussi deux profils uniques qui correspondent au ST **99/H3** et ST n° **1075/LAM9** (Voir graphique VII).

Tableau n°12: Répartition des Familles génomiques et des spoligotypes identifiées dans la wilaya de Médéa :

Origine	Famille	Spoligotype	Nombre des familles	Fréquence des grappes
MEDEA	H3	99	1	profil unique
	T1	53	2	50%
	LAM9	1075	1	profil unique



Graphique VI: Les familles génomiques identifiées dans la wilaya de Médéa.

III.2. Discussion :

III.2.1. Analyse des résultats Géo-démographique de la population :

D'après nos résultats, il apparaît que sur notre échantillon de 79 souches isolées de patients originaire de wilayas de centre de l'Algérie, les patients de sexe masculin sont plus dominants de sexe ratio de 1,4. Une étude faite en Allemagne sur 75 souches [16], montrent que l'incidence de la tuberculose en fonction du sexe est généralement réservé aux patients de sexe masculin, le sexe ratio homme /femme est de 1,6.

La tuberculose touche toute les tranches d'âge et surtout la tranche active entre 16 et 65 ans, qui représente 75% des patients.

III.2.2. Analyse des résultats de typage moléculaire :

Les résultats de typage moléculaire par la méthode de spoligotyping sur les 79 souches ont montré 09 familles génomiques, qui sont (T, LAM, H, S, LAM10-CAM, H3-LAM, X1, U (likleyT3), USA (1H1)). Les trois familles génomiques dominantes représentent par la famille Haarlem H (29%), T (28%) et LAM (22%) ; Elles sont présentes dans toutes les wilayas étudiées. Nous avons noté l'existence de 06 profils orphelins (Non encore inclus dans la banque de données SPOLDB4).

L'analyse des spoligotypes a révélé 29 profils uniques et 08 grappes, une grappe de 14 isolat, une grappe de 12 isolat, ainsi une grappe de 9 isolats, 3 grappes de 3 isolats et enfin 2 grappes avec deux (02) isolats. Parmi ces 8 grappes, Les souches en grappes (clusterisées) représentent 63% de la totalité des souches étudiées, elles sont représentées par le ST n°53 (T1 clade) avec (18 % du total des isolats), le ST n°50 (famille H3 avec 15%), le ST n°42 (Latino-américaine et méditerranéenne avec 11%), le ST n°118 (T2 clade) avec (4%), le ST n°39 (famille H3 avec 4%), le ST n°134 (famille H1 avec 4%), le ST n° 34 (famille S avec 3%) et enfin le ST n°196 (T1 clade) avec (2%), le ST n°3 (famille H3 avec 2%).

Après une comparaison de nos résultats avec d'autres études qui faites en Algérie (Voir le tableau n°15); Une étude réalisée dans la même période au niveau du laboratoire national de référence (LNR) de la tuberculose et Mycobactéries, sur 50 souches isolées dans la région est de l'Algérie, a révélé des similitudes des profils génétiques détectés avec ceux retrouvés dans notre étude ; les familles les plus prédominant dans cette population d'études sont les LAM, H, T et S avec des fréquences respectives de 28 %, 26 %, 22 % et 3%, ce qui est assez proche de ceux trouvées dans notre étude (22 % de LAM, 29 % de H, 28 % de T et 5 % de S).

Comparant les spoligotypes retrouvés dans notre étude a ceux de la même étude faite sur les souches isolées à l'est de l'Algérie, on a constaté des fréquences assez proches les uns

des autres, pour le ST n° 42/LAM9 (12% au centre par rapport 11% à l'est), le ST n° 50/H3 (15% par rapport 8% de l'est), le ST n° 53/T1 (19 % par rapport 14 %) et le ST n° 34/S (3 % par rapport 4%).

Une autre enquête réalisée au LNR de la Tuberculose, sur 361 souches MDR isolées dans toute l'Algérie, de 2000 à 2010 [données non publiées], nous a montré que les familles les plus majoritaires sont les mêmes trouvées dans notre étude avec les pourcentages suivants : les LAM (26,31 % contre 22% dans notre étude), les H (15,38 % contre 29% dans notre), les T (21,9% contre 28%) et enfin pour les S (21,9 % contre 5% dans notre étude) [données non publiées].

Pour cette dernière étude les spoligotypes dominants sont le ST n°50/H3 avec une fréquence de 4,2 % (contre 15% dans notre étude), le ST n° 53/T1 avec une fréquence de 7,8% contre 19 %, le ST n° 42/LAM9 avec une fréquence de 19,4 % contre 11% et enfin le ST n° 34/S avec une fréquence de 3,6 % contre 3 %.

Une autre étude faite sur 162 souches isolées [11] de 2000 à 2006, a révélé que les familles plus dominantes étaient les H (29,01 % contre 29 % dans notre étude), les T (21,6 % contre 28 %), les LAM (19,75 % contre 22 %) et enfin pour les S (7,4 % contre 5%).

Dans cette étude les spoligotypes dominants sont le ST n° 50/H3 avec une fréquence de 16,049 % (contre 15 % dans notre étude), le ST n° 53/T1 avec une fréquence de 11,11 % (contre 19 %), le ST n° 42/LAM9 avec une fréquence de 8,024 % (contre 11%) et enfin le ST n° 34/S avec une fréquence de 3,086 % (contre 4 % dans notre étude) [11].

Tableau n°15: Données des familles et clusters communs entre les différentes études établies en Algérie.

Etudes	Nombre de souches	Période d'études	Familles génomiques dominantes		Clusters	
LNR-centre de l'Algérie (M. Khechiba)	79	2011	LAM (N=18)	22 %	42/LAM9	11 %
			H (N=24)	29 %	50/H3	15 %
			T (N=22)	28 %	53/T1	19 %
			S (N=4)	5 %	34/S	2,5 %
LNR-est de l'Algérie (S. kaidi)	50	2011	LAM (N=15)	30 %	42/LAM9	12 %
			H (N=13)	26 %	50/H3	8 %
			T (N=11)	22 %	53/T1	14 %
			S (N=3)	6 %	34/S	4 %
LNR-MDR toute l'Algérie (M. Ifticéne)	361	2000-2010	LAM (N=95)	26,31 %	42/LAM9	19,4 %
			H (N=56)	15,38 %	50/H3	4,2 %
			T (N=80)	21,9 %	53/T1	7,8 %
			S (N=80)	21,9 %	34/S	3,6 %
Etude au niveau de wilaya d'Alger (F. Natéche)	162	2000-2006	LAM (N=32)	19,75 %	42/LAM9	8,024 %
			H (N=42)	26 %	50/H3	16,049 %
			T (N=36)	22 %	53/T1	11,11 %
			S (N=10)	6 %	34/S	3,086 %

N : Nombre de souche.

La comparaison suivante établie avec celles des régions des pays du bassin méditerranéen.

Une étude italienne faite indique que le ST n°53 (T1) répertories en 29/248 cas (11,7%), été présent au niveau de la région de Toscane en Italie et arrive en premier; le ST n°50 (S/Famille Haarlem H3) présent 18/248 cas (7,3%) et aussi le ST n° 42 (LAM9) présente aussi 13/248(5,2%) cas en Toscane [21].

Une étude tunisienne faite sur 378 cas, a indiqué que le ST n°50 (H3) répertories en 110/378 cas (29,10%), était présent parmi les plus élevé en Tunisie; Suivi par le ST n° 42(clade Latino-américaine et méditerranéenne LAM9) présente 60/378 cas (15,8%), puis le ST n°42 (LAM9) présente aussi 40/378 cas (10,6%)arrive en troisième position [22].







Une comparaison avec la région du Limousin de 1998 au 2006 (France) sur 259 patients, a montré trois familles de souches représentnts : T1 (30 %), Haarlem (30 %) et LAM (20 %). Parmi Les 26 grappes, les deux principales étaient les grappes ST n°53 (N = 36) (13,9%) et ST n°50 (N = 19) (7,3%) [23].

Une étude portugaise faite sur 665 cas, indique que la répartition entre les familles spoligotype majeurs, y compris la Méditerranée Amérique latine (LAM), T, Haarlem et Beijing . L'importance de la famille LAM, et surtout les sous-familles LAM1 et LAM9 qui représentaient à eux seuls 38% de tous les isolats de cette étude, nous a amené à croire qu'au moins sur ce point la structure de la population était plus proche de celle de l'Afrique et de l'Amérique du Sud que de l'Europe. le ST n° 42 (LAM9) présent 69/665 cas 10,4%, puis le ST n°53 T1 présent 52/665cas (7,8%) [25].

En général les familles génomiques les plus souvent sont rencontrés toutes les même, la différence concerne le pourcentage (%) retrouvé, qui est liées au type d'étude, l'échantillonnage et durant la quelle ces études ont été faites.

En plus, l'analyse nous a permis la mise en évidence d'autres génotypes Tel que le ST n°61 de la famille génomique Cameroun à Boumerdes, le ST n°1644 de la famille USA(1H1) à Tipaza et enfin le ST n°878 de la famille (X1) originaires des États-Unis d'Amérique, le ST n°56 de la famille (U (Likely T3) en Belgique, Guadeloupe et USA) dans la wilaya d'Alger, L'apparition de ces génotypes originaux proviennent des zones géographiques éloignées qui peuvent provoquer la transmission de tuberculose dans un proche avenir [21].

Pour les 06 souches spolygotypées, qui ont présenté des profils orphelins, après la banque de donnée SPOL DB4. Ils sont résumés par l'ordre de tableau suivant :

N°	ST	Description binaire	Nombre
1	?		1
2	?		1
3	?		1
4	?		1
5	?		1
6	?		1

Les profils **n°1** et **n°2** peuvent être classés dans la famille génomique LAM, car il y a l'absence des spacers **21, 22, 23, 24** et 33, 34, 35, 36 comme toutes les souches de *Mycobacterium tuberculosis*.

Le profil **n°3** peut être classés dans la famille génomique Haarlem dans la sous famille H3 car il y a l'absence de spacers **31, 33, 34, 35** et 36 et le profil orphelin **n°4** dans la sous famille H1 car il y a l'absence des spacers **26, 27, 28, 29, 30, 31** et 33, 34, 35, 36.

Le profil **n°5** peut être classé avec la famille génomique T2, car l'absence des spacers 33, 34, 35, 36 ; et le dernier profil **n°6**, nous avons pu classer dans la famille CANETTI. (Après la banque de donnée SPOL DB4).

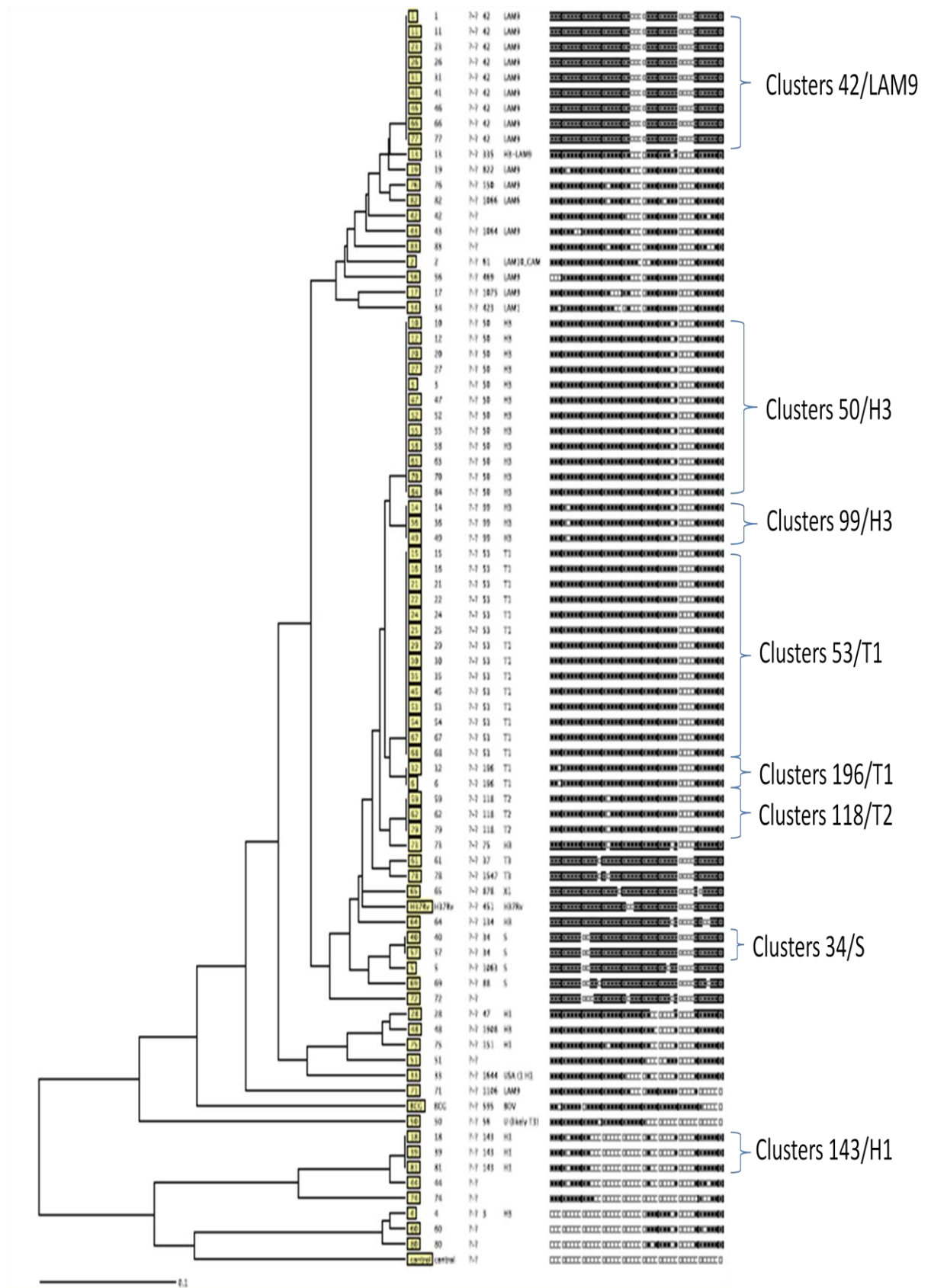


Figure n°10: Dendrogramme des souches isolées en 2011 dans la région du centre de l'Algérie (en utilisant la base de données SPOLDB4) [26].

Conclusion

Conclusion :

L'étude faite sur 79 souches offre une approche d'analyse sur la biodiversité des souches de *Mycobacterium tuberculosis* circulant au centre de l'Algérie (Alger, Blida, Médéa, Boumerdes, Tipaza) ainsi que sur la distribution des familles génomiques dominantes.

L'analyse nous a permis de mettre en évidence trois familles génomiques dominantes : la famille H (31%), T (28%) et la famille LAM (23%). L'analyse des spoligotypes a révélé 29 profils uniques et 08 grappes.

Les souches groupées (Clusterisées) représentent 63% de la totalité des souches étudiées, elles sont représentées par le ST n°53 (T1 clade) avec (18 % du total des isolats), le ST n°50 (famille H3 avec 15%), le ST n°42 (Latino-américaine et méditerranéenne avec 11%), le ST n°118 (T2 clade) avec (4%), le ST n°39 (famille H3 avec 4%), le ST n°134 (famille H1 avec 4%), le ST n° 34 (famille S avec 3%) et enfin le ST n°196 (T1 clade) avec (2%), le ST n°3 (famille H3 avec 2%).

La comparaison de nos résultats avec ceux obtenus dans d'autres études réalisées au niveau de LNR de la tuberculose et des mycobactéries de l'Algérie et certains pays du bassin méditerranéen a montré presque le même pourcentage des spoligotypes et des familles génomiques dominantes.

En plus, l'analyse nous a permis la mise en évidence d'autres génotypes Tel que le ST n°61 de la famille génomique Cameroun à Boumerdes, le ST n°1644 de la famille USA (1H1) à Tipaza et enfin le ST n°878 de la famille (X1) originaires des États-Unis d'Amérique, le ST n°56 de la famille (U (Likely T3) en Belgique, Guadeloupe et USA) dans la wilaya d'Alger.

La technique utilisée dans cette étude est le spoligotyping, qui doit être complétée par des techniques plus discriminantes telles que le RFLP-IS6110 et MIRUs-VNTR.

Enfin, le typage moléculaire est devenu un outil complémentaire à la conduite d'enquêtes épidémiologiques classiques et prend aujourd'hui une place importante dans la lutte contre la tuberculose.

Références

Référence bibliographique

1. Rapport OMS 2011 sur la lutte contre la tuberculose dans le monde.
2. Ali halassa Sofiane, 2009. Programme National antituberculeux journée mondiale de la tuberculose, P 30.
3. Orateur : P. Lanotte, Résumé rédigé par : C. Gut-Gobert et S., 2008. Symposium A 07 : diagnostic microbiologique de la maladie tuberculeuse, La PCR : quel apport pour le diagnostic et le traitement, Jouneau, Rev Mal Respir ; 25 : 40-41
4. François denis, christian perronne, 2004. Mycobacterium tuberculosis et mycobactéries atypiques, Elsevier SAS, 301p
5. Yala D. et Tazir M., 2007. Diagnostic bactériologique de la tuberculose et des mycobactériose, Institut Pasteur d'Algérie, P 4.
6. Bernard Carbonnelle, Michèle Dailloux, Léa Lebrun, Jeanne Maugein, Chantal Pernet., 2003. Cahier de formation Biologie médicale N°29. Mycobactéries Mycobactérioses BIOFORMA formation continue des biologistes, 158 P
7. Guernier vanina., 2006. Combiner analyse spatiale et épidémiologie pour l'aide à la décision dans la lutte contre La tuberculose en guyane française, thèse présentée à l'université d'orléans pour obtenir le grade de docteur de l'université d'orléans; discipline : environnement et santé, P 220.
8. Tuberculose pulmonaire de l'adulte, M.-C. Dombret 2004 EMC-Médecine :406–416
9. Vanessa Mathys., 2010. Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance de Mycobacterium tuberculosis aux agents antituberculeux, Thèse de docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques. Institut Scientifique de Santé Publique (ISP); Laboratoire de Pathologie Moléculaire de la Tuberculose, P 21
10. Roquette M., Chabert M., Gobert S., Morellato N., 2007 : Guide des analyses spécialisées (5ème édition, Pasteur CERBA laboratoire, Elsevier Masson SAS et laboratoire Pasteur CERBA), P 705.
11. Nateche-Metiaz F., 2007. Biodiversité génétique et profil de résistance des souches de Mycobactérium tuberculosis isolées à Alger 2000-2006, thèse doctorat d'état, P 34-35.
12. Hunter, P. (1990). Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. Journal of Clinical Microbiology 28: 1903-1905.
13. P.F. Barnes, M.D. Cave, Molecular epidemiology of tuberculosis; 2003. New England Journal Medicine; 349 (12):1149–56.
14. Kanduma, E., McHugh, T.D., Gillespie, S.H. (2003). Molecular methods for Mycobacterium tuberculosis strain typing: a user guide. Journal of Applied Microbiology 94: 781-791.

15. K. Brudey et al., 2003. Caractérisation moléculaire et biodiversité de *Mycobacterium tuberculosis* dans la région Antilles-Guyane et analyse comparative à une région métropolitaine, l'Aquitaine ; P 284.
16. Burgos, M.V. et Pym, A.S. (2002).Molecular epidemiology of tuberculosis. *EuropeanRespiratory Journal* 20 (Suppl. 36): 54–65.
17. Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S. et al. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 907-914.
18. Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valétudie G, et al (2002). Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis*; 8:1347–9
19. Devallois, A., Horgen, L., Sola, C., Rastogi, N. (1998). Le typage moléculaire des mycobactéries. *Pathologie Biologie* 46(8): 625-636.
20. Cave et al., 2005. New Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Program for rapid genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of the American Medical Association* 293: 2086.
21. Nicoletta Lari, Laura Rindi, Christophe Sola, Daniela Bonanni, Nalin Rastogi, Enrico Tortoli, and Carlo 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*, Apr. 2005, p. 1617–1624
22. Amine Namouchi, Anis Karboul, Bisma Mhenni, Neila Khabouchi, Raja Haltiti, Ridha Ben Hassine, Béchir Louzir, Abdellatif Chabbou and Helmi 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
23. H. Bezanahary a, M.-C. Baclet b, C. Sola c, V. Gazaille d, P. Turlure e, P. Weinbreck f, F. Denis b, C. Martin., 2008. Intérêt du typage moléculaire pour l'épidémiologie de la tuberculose en Limousin (1998–2006) b, *Médecine et maladies infectieuses* 38 : 309–317
25. Suzana David, Diana Raposo Ribeiro, Abílio Antunes, Clara Portugal, Luísa Sancho., (2007).Contribution of spoligotyping to the characterization of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal. *José Germano de Sousa Infection, Genetics and Evolution* 7:609–617
27. « spoligotyping » a PCR-based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria manual Isogen Life Science Spoligotyping kit manual : 15 P.
28. Nadia ait-khaled, Donald Enarson., 1999. Tuberculose manuel pour les étudiants en médecine organisation mondiale de la santé union internationale contre la tuberculose et les maladies respiratoires : p 149.

Site d'internet (SI) :

29. www.hain-lifescience.de | Home.

30. <http://www.who.int/topics/tuberculosis/fr/>

31. <http://www.miru-vntrplus.org/MIRU/index.faces>

Annexes

Annexe n°1.

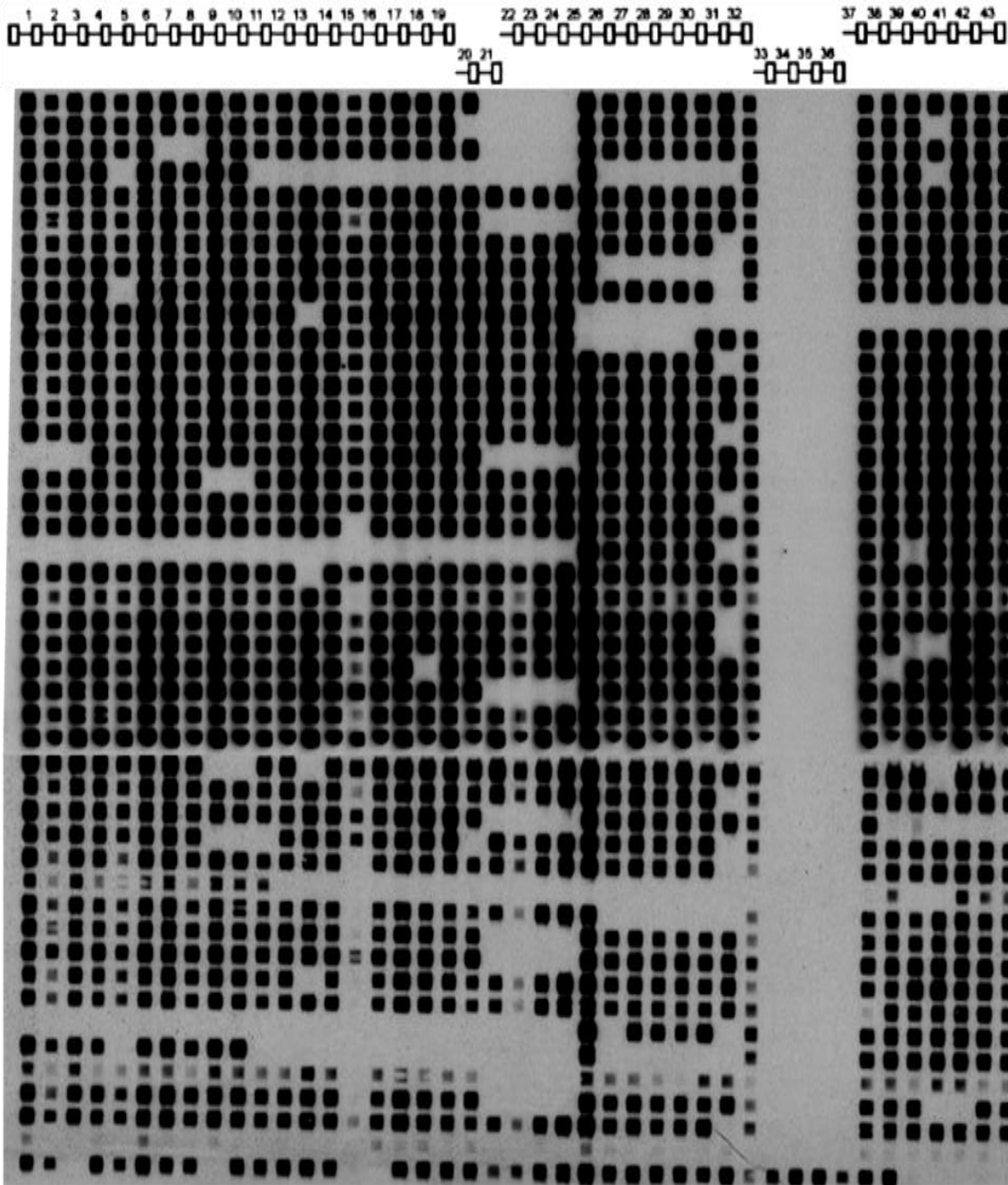
Tableau : La liste des patients classés selon âge, le sexe et la région géographique.

<i>Origine</i>	<i>N°</i>	<i>sexe</i>	<i>Age</i>
ALGER	1	H	50
	2	F	20
	3	H	32
	4	H	
	5	H	78
	6	F	27
	7	F	30
	8	F	64
	9	F	48
	10	F	37
	11	F	42
	12	H	27
	13	F	37
	14	F	20
	15	H	63
	16	F	54
	17	H	77
	18	H	76
	19	F	48
	20	H	37
	21	H	39
	22	H	38
	23	H	25
	24	F	28
	25	H	63
	26	F	28
	27	F	28
	28	H	31
	29	F	61
	30	H	23
	31	F	40
	32	H	22
	33	H	75
	34	H	52
	35	H	43
	36	H	66
	37	F	36
	38	F	25
	39	H	18

<i>Origine</i>	<i>N°</i>	<i>sexe</i>	<i>Age</i>
MEDEA	1	H	61
	2	F	19
	3	F	4
	4	H	24
TIPAZA	1	H	29
	2	F	47
	3	F	18
	4	H	2
	5	F	53
	6	H	28
	7	H	45
	8	H	29
	9	H	20
	10	F	20
	11	F	20
	12	F	76
	13	F	22
	14	H	
	15	H	
	16	F	37
	17	H	67
BLIDA	1	H	28
	2	F	40
	3	H	21
	4	H	70
	5	H	67
	6	H	21
	7	H	22
	8	H	34
	9	F	23
BOUMERDES	1	H	75
	2	H	23
	3	H	23
	4	H	75
	5	H	42
	6	F	41
	7	H	27
	8	F	
	9	F	
	10	F	

Annexe n°2.

Figure : film photographique révélant les profils de spoligotypage.



Annexe n°3.

Tableau : La liste des patients classés selon l'âge, le sexe, l'origine, le stade thérapeutique et les tests de sensibilité.

<i>Origine</i>	N°	Sexe	Age	T ou NT	Isoniazide	Streptomycine	Rifampicine	Ethambutol
BOUMERDES	1	H	75	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	2	H	23	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	3	H	23	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	4	H	75	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	5	H	42	NT	resistant	resistant	sensible	sensible
	6	F	41	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	10	H	27	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	11	F		NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	12	F		NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	13	F		NT	sensible	sensible	sensible	sensible
<i>Origine</i>	N°	Sexe	Age	T ou NT	Isoniazide	Streptomycine	Rifampicine	Ethambutol
MEDEA	1	H	61	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	2	F	19	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	3	F	4	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	4	H	24	T	sensible	sensible	sensible	sensible
<i>Origine</i>	N°	sexe	Age	T ou NT	Isoniazide	Streptomycine	Rifampicine	Ethambutol
TIPAZA	1	H	29	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	2	F	47	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	3	F	18	T	sensible	sensible	sensible	sensible
	4	H	2	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	5	F	53	T	sensible	sensible	sensible	sensible
	6	H	28	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	7	H	45	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	8	H	29	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	9	H	20	NT	resistant	resistant	sensible	sensible
	10	F	20	NT	sensible	sensible	sensible	sensible

	11	F	20	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	12	F	76	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	13	F	22	T	resistant	resistant	resistant	resistant
	14	H		T	sensible	sensible	sensible	sensible
	15	H		NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	16	F	37	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	17	H	67	NT	sensible	resistant	sensible	sensible
Origine	N°	Sexe	Age	T ou NT	Isonizide	Streptomycine	Rifampicine	Ethambutol
BLIDA	1	H	28	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	2	F	40	T	sensible	sensible	sensible	sensible
	5	H	21	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	6	H	70	T	sensible	sensible	sensible	sensible
	7	H	67	T	sensible	resistant	sensible	sensible
	8	H	21	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	9	H	22	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	10	H	34	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	11	F	23	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
Origine	N°	sex	Age	T ou NT	Isonizide	Streptomycine	Rifampicine	Ethambutol
ALGER	1	H	50	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	2	F	20	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	3	H	32	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	4	H		NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	5	H	78	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	6	F	27	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	7	F	30	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	8	F	64	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	9	F	48	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	10	F	37	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	11	F	42	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
	12	H	27	T	resistant	resistant	resistant	?

13	F	37	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
14	F	20	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
15	H	63	T	sensible	sensible	sensible	sensible
16	F	54	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
17	H	77	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
18	H	76	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
19	F	48	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
20	H	37	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
21	H	39	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
22	H	38	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
23	H	25	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
24	F	28	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
25	H	63	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
26	F	28	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
27	F	28	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
28	H	31	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
29	F	61	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
30	H	23	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
31	F	40	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
32	H	22	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
33	H	75	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
34	H	52	T	sensible	sensible	sensible	sensible
35	H	43	T	sensible	sensible	sensible	sensible
36	H	66	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
37	F	36	T	sensible	sensible	sensible	sensible
38	F	25	NT	sensible	sensible	sensible	sensible
39	H	18	NT	sensible	sensible	sensible	sensible

Annexe n°4.

Les types de prélèvements

On distingue deux types de prélèvements :

I. D'origine pulmonaire :

Ces prélèvements comprennent : les crachats, le tubage gastrique, l'aspiration ou les lavages bronchiques [27].

a- Les crachats :

Les échantillons d'expectoration sont les prélèvements les plus fréquemment reçus au laboratoire. Chez un malade suspect de tuberculose pulmonaire il convient, chaque fois que possible, de recueillir trois échantillons selon les modalités suivantes:

- Après la consultation dans un centre de santé, un dispensaire ou une polyclinique, ou lorsque le malade se présente au laboratoire, le premier échantillon est recueilli sous la supervision de l'infirmier dans un crachoir rigide, à ouverture large, avec un couvercle à vis, fermant hermétiquement. L'infirmier explique au malade que l'expectoration doit se faire après un effort de toux profond et vigoureux afin de ramener des mucosités bronchiques.

- L'infirmier confluence alors un deuxième crachoir au malade et lui demande de recueillir un deuxième prélèvement durant la nuit ou le matin au réveil (over night ou collection spécimen) et de le ramener le plus rapidement possible au laboratoire.

-Lorsque le malade revient un troisième prélèvement peut être fait sur place (spot specimen).

Le risque de dissémination de « gouttelettes infectantes » est considérable lorsque le malade tousse : aussi le prélèvement doit être effectué à l'extérieur de la consultation ou du laboratoire ou dans une pièce isolée, devant une fenêtre ouverte et loin de toute autre personne [2].

b-Tubage gastrique :

Cette technique de prélèvement est utilisée chez les enfants et les malades qui n'arrivent pas à expectorer. Les enfants de moins de 12 ans et les femmes sont habituellement incapables d'expectorer volontairement.

Dans ces cas, le tubage gastrique à jeun (le matin), pour recueillir les sécrétions bronchiques dégluties durant la nuit, est nécessaire pour retrouver le bacille de la tuberculose par l'examen directe et la culture. Cette technique nécessite une courte hospitalisation du malade, la veille au soir [2].

c- Aspiration ou lavage bronchique :

Les brossages et les liquides de lavages alvéolaires recueillis lors d'une fibroscopie sont aussi contributifs dans le diagnostic de tuberculose. À la suite de ces examens endoscopiques, les recherches par tubages se révèlent souvent positives.

II. D'origine extra-pulmonaire (E.P) :

Il faut distinguer deux types de prélèvements :

a. D'origines extra-pulmonaires contaminées:

Ils proviennent des collections purulentes s'écoulant à l'extérieur et dont la souillure est inévitable malgré les précautions aseptiques prises lors du prélèvement. On distingue :

1. Les urines : les premières urines du matin sont préférées.
2. Les pus d'abcès fistuleux.
3. Tous les autres produits pathologiques prélevés sans précautions d'asepsie.

b- D'origine extra-pulmonaire non contaminé :

Ce sont les liquides séreux ou séropurulents se trouvant dans les cavités fermées. Ils sont recueillis par ponction dans un tube stérile après désinfection de la peau, tel que :

1. Le liquide céphalo-rachidien (LCR).
2. Le liquide pleural.
3. Le liquide péritonéal ou péricardique.
4. Les biopsies chirurgicales [5].

