

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1999

N° 125/1

EPIDEMIOLOGIE MOLECULAIRE DE LA TUBERCULOSE :
Application de deux techniques (RAPD et RFLP IS6110) aux souches
isolées en Limousin entre 1995 et 1997



THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE
obtenu après soutenance du

MEMOIRE
du Diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

Présenté et soutenu publiquement
le 18 mai 1999 à LIMOGES

par

JEAN-CHRISTOPHE PECH

Né le 19/08/1967 à MELUN

JURY

Monsieur le Professeur DENIS

Président

Monsieur le Professeur BONNAUD

Juge

Madame le Professeur BOSGIRAUD

Juge

Monsieur le Professeur PIVA

Juge

Madame le Docteur DELCLEVE-PAULHAC

Juge

Monsieur le Docteur MARTIN

Juge

Je dédie ce travail à mon père

rien ne pourra jamais te remplacer...

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur DENIS

Professeur des Universités de Bactériologie Virologie Hygiène

Biologiste des hôpitaux

Chef de service

Assesseur de la Faculté de Médecine

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites
en acceptant de présider notre jury de thèse.

Tout au long de notre internat, vous nous avez fait partager
vos immenses connaissances et avez toujours été disponible
pour nous enseigner la rigueur et nous encourager.

Que ce travail soit l'expression de notre profonde gratitude
et de notre profond respect.

A notre jury de thèse

Monsieur le Professeur PIVA
Professeur des Universités de Médecine Légale
Médecin des hôpitaux
Chef de service
Doyen de la Faculté de médecine

Nous tenons à vous remercier pour l'honneur que
vous nous faites en acceptant de juger ce travail et
de siéger dans notre jury.

Que ce travail soit le témoignage de notre profond
respect.

A notre jury de thèse

Monsieur le Professeur BONNAUD
Professeur des Université de Pneumologie
Médecin des hôpitaux
Chef de service
Doyen Honoraire

Nous n'ignorons pas l'honneur que vous nous faites
en acceptant de juger ce travail.

Nous vous en remercions et tenons à vous exprimer
notre profond respect.

A notre jury de thèse

Madame le Professeur BOSGIRAUD

Professeur des Universités de Bactériologie Virologie Parasitologie

Faculté de Pharmacie

Vous avez aimablement accepté de nous faire l'honneur
de participer à notre jury de thèse.

Veillez trouver dans ce travail le témoignage de notre
respectueuse gratitude.

A notre jury de thèse

Madame le Docteur DELCLEVE-PAULHAC

Biologiste des hôpitaux

Praticien hospitalier

Je tiens à te remercier d'avoir accepté de siéger dans ce jury.
Merci de m'avoir un jour parlé de P.M.A. et de m'avoir ouvert
les portes de ton laboratoire.
S'il m'est donné un jour de travailler dans le domaine de la
procréation médicalement assistée, c'est à toi que je le devrai.
Que ce travail soit le témoignage de ma profonde gratitude et
de mon éternelle amitié.

A notre jury de thèse

Monsieur le Docteur MARTIN
Biologiste des hôpitaux
Praticien hospitalier

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de me
donner ce sujet.

La qualité de l'encadrement dont j'ai bénéficié, la
disponibilité dont vous avez fait preuve malgré un
emploi du temps très chargé, n'ont d'égal que la
gentillesse que vous m'avez témoigné

Je voudrais vous exprimer mon profond respect
et mon éternelle reconnaissance.



A Véronique,
Avec tout mon amour

A ma mère,
Admirable de courage

A ma famille,
Pour leur amour et leur soutien

A tous mes amis,
Pour les grands moments passés et futurs

Tous mes remerciements vont également aux assistants et à tous les membres du service de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges, en particulier Carole Grélaud, Isabelle Traccard, Sylvie Jubertie, Claudine Rochet, M. Françoise Verger et Isabelle Boisseau. Merci pour votre disponibilité et votre aide si précieuse.

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur PIVA Claude

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

Monsieur le Professeur DENIS François

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS:

* C.S = Chef de Service

ADENIS Jean-Paul * (C.S)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Jean-Luc (C.S)	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise (C.S)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
BARTHE Dominique	HISTOLOGIE EMBRYOLOGIE CYTOGENETIQUE
BAUDET Jean (C.S)	CLINIQUE OBSTETRICALE ET GYNECOLOGIE
BENSAID Julien (C.S)	CLINIQUE MEDICALE CARDIOLOGIQUE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie (C.S)	DERMATOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S)	HÉMATOLOGIE ET TRANSFUSION
BOULESTEIX Jean (C.S)	PEDIATRIE
BOUTROS-TONI Fernand	BIostatistique ET INFORMATIQUE MEDICALE
BRETON Jean-Christian	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
CATANZANO Gilbert	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	RADIOTHERAPIE
CHRISTIDES Constantin	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
COLOMBEAU Pierre (C.S)	UROLOGIE
CUBERTAFOND Pierre (C.S)	CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
DARDE Marie-Laure (C.S)	PARASITOLOGIE
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S)	PEDIATRIE
DENIS François (C.S)	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DESCOTTES Bernard (C.S)	ANATOMIE
DUDOGNON Pierre (C.S)	REEDUCATION FONCTIONNELLE
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE
DUMAS Michel (C.S)	NEUROLOGIE
DUMONT Daniel	MEDECINE DU TRAVAIL
DUPUY Jean-Paul (C.S)	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
FEISS Pierre (C.S)	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
GAINANT Alain	CHIRURGIE DIGESTIVE
GAROUX Roger (C.S)	PEDOPSYCHIATRIE
GASTINNE Hervé (C.S)	REANIMATION MEDICALE
GAY Roger	REANIMATION MEDICALE
HUGON Jacques (C.S)	HISTOLOGIE-EMBRYOLOGIE-CYTOGENETIQUE
LABROUSSE Claude	REEDUCATION FONCTIONNELLE
LABROUSSE François (C.S)	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
LASKAR Marc (C.S)	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
LAUBIE Bernard (C.S)	ENDOCRINOLOGIE ET MALADIES METABOLIQUES
LEGER Jean-Marie (C.S)	PSYCHIATRIE D'ADULTES
LEROUX-ROBERT Claude (C.S)	NEPHROLOGIE
MABIT Christian	ANATOMIE-CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MENIER Robert (C.S)	PHYSIOLOGIE
MERLE Louis	PHARMACOLOGIE
MOREAU Jean-Jacques (C.S)	NEUROCHIRURGIE
MOULIES Dominique	CHIRURGIE INFANTILE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
PECOUT Claude (C.S)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
PERDRISOT Remy	BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
PILLEGAND Bernard (C.S)	HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE

PIVA Claude (C.S)
PRALORAN Vincent (C.S)
RAVON Robert (C.S)
RIGAUD Michel (C.S)
ROUSSEAU Jacques (C.S)
SALLE Jean-Yves
SAUTEREAU Denis
SAUVAGE Jean-Pierre (C.S)
TABASTE Jean-Louis
TREVES Richard (C.S)
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S)
VALLAT Jean-Michel
VALLEIX Denis
VANDROUX Jean-Claude (C.S)
VERGNENEGRE Alain
VIDAL Elisabeth (C.S)
VIGNON Philippe
WEINBRECK Pierre (C.S)

MEDECINE LEGALE
HEMATOLOGIE ET TRANSFUSION
NEUROCHIRURGIE
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
RHUMATOLOGIE
CANCEROLOGIE
NEUROLOGIE
ANATOMIE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE-PREVENTION
MEDECINE INTERNE
REANIMATION MEDICALE
MALADIES INFECTIEUSES

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

BUCHON Daniel

3ème CYCLE DE MEDECINE GENERALE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: acide désoxynucléique
ARN	: acide désoxyribonucléique
RNase	: désoxyribonucléase
ARNr	: ARN ribosomal
PCR	: polymerase chain reaction
RAPD	: random amplified polymorphic DNA
AP-PCR	: arbitrarily primer-polymerase chain reaction
dXTP	: désoxynucléosides triphosphate
A	: adénine
C	: cytosine
G	: guanine
T	: thymine
pb	: paires de bases
kb	: kilobase
EDTA	: acide éthylènediaminetétracétique
PM	: poids moléculaire
Tris	: trishydroxyméthylaminométhane
kda	: KiloDalton
HIV	: Human Immunodeficiency Virus

PLAN

INTRODUCTION GENERALE

GENERALITES

I - Caractéristiques microbiologiques des mycobactéries de la tuberculose

I.A - Morphologie

I.B - Culture

I.C - Identification biochimique

II - Pouvoir pathogène du bacille de Koch

II.A - Pouvoir pathogène chez l'animal

II.B - Pouvoir pathogène chez l'homme

III - Les différentes formes de la maladie tuberculeuse

III.A - Les formes pulmonaires

III.B - Les formes extra-pulmonaires

IV - Diagnostic bactériologique de la tuberculose

IV.A - Le diagnostic direct

IV.B - Le diagnostic indirect

V - Epidémiologie générale

V.A - La tuberculose dans le monde

V.B - La tuberculose aux Etats-Unis

V.C - La tuberculose en Europe

V.D - La tuberculose en France

VI - Les marqueurs moléculaires de l'épidémiologie

VI.A - Le génome de *M. tuberculosis*

VI.B - Les différentes techniques de marquage épidémiologique pour *M. tuberculosis*

VI.C - Place des marqueurs moléculaires dans l'épidémiologie

TRAVAIL PERSONNEL

A - Matériels et méthodes

I - Souches

II - Patients

IV - Extraction des ADN de *Mycobacterium tuberculosis*

IV.B - Extraction classique de l'ADN de mycobactéries à partir de tubes Löwenstein-Jensen

V - La technique RAPD

V.A - Amorces utilisées

V.B - Mélange réactionnel

V.C - Le cycle réactionnel

V.D - Analyse des produits d'amplification par électrophorèse

VI - Analyse du polymorphisme des fragments de restriction après hybridation par la sonde IS6110

VI.A - Digestion de l'ADN total de *M. tuberculosis* obtenu après extraction classique

VI.B - Migration de l'ADN digéré par électrophorèse

VI.C. - Transfert sur membrane du gel obtenu après électrophorèse (Southern blotting)

VI.D - Hybridation et révélation des fragments de restriction des ADN digérés

VI.E - Hybridation et révélation des marqueurs internes de poids moléculaire

VI.E.1 - "Stripping" de la membrane

VI.E.2 - Hybridation et révélation de la membrane

VII - Analyse et interprétation des données

B - Résultats

I - Technique RAPD

I.A - Amorce IS 986 BK

I.B - Amorce INS 2

I.C - Amorce CAR 2

I.D - Comparaison des amorces

II - Technique RFLP IS6110

II.A - Analyse du nombre de copies IS6110

II.B - Comparaison des profils après agrégation par la méthode simple linkage

II.C - Etude des relations phylogénétiques des souches après agrégation UPGMA

C - Discussion

CONCLUSION

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION GENERALE

Maladie à fort déterminant socio-économique, la tuberculose a longtemps été considérée comme un terrible fléau.

Il faudra attendre 1882 pour que le microbiologiste allemand Robert Koch isole le bacille responsable, *Mycobacterium tuberculosis*, et 1897 pour que le médecin allemand C. Flügge suspecte les gouttelettes produites lors de la toux d'être à l'origine de la contamination. La découverte d'un vaccin en 1921 par Calmette et Guérin et de la streptomycine par Waksman en 1944 a fait naître beaucoup d'espoir quant à la maîtrise de la maladie. Dès lors, la tuberculose suscitera un gros effort de recherche. Mais dès le début des années 1970, le succès de l'antibiothérapie conduit à l'abandon quasi total de ces recherches et certains parlent même d'une éradication de la maladie pour le début du XXI^e siècle. Pourtant, la menace d'un retour de la tuberculose se fait jour depuis les années 1980 et cette recrudescence de la maladie s'accompagne, surtout aux Etats-Unis, d'une augmentation des souches résistantes aux antituberculeux.

Longtemps abandonnées, les recherches sur cette maladie ancienne reprennent avec les outils modernes de la biologie et notamment la biologie moléculaire.

Après avoir rappelé les caractéristiques du diagnostic bactériologique, du pouvoir pathogène et des principales formes cliniques des infections à *M. tuberculosis*, nous rappellerons les données actuelles épidémiologiques de la maladie ainsi que les différentes techniques de biologie moléculaire indispensables à une meilleure compréhension de la transmission de la tuberculose.

Par ailleurs, nous exposerons notre travail qui a consisté à typer 58 souches de *M. tuberculosis* isolées au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) Dupuytren de Limoges entre 1995 et 1997, à l'aide de deux techniques de biologie moléculaire : la technique Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) et l'analyse du polymorphisme de restriction après hybridation avec la sonde IS6110, (RFLP IS6110). Dans un premier temps, nous évaluerons la RAPD

comme technique rapide de détection d'isolats identiques (contaminations de laboratoire, souches responsables d'une épidémie) et dans un second temps, nous réaliserons une étude phylogénétique de notre population de souches à l'aide de la technique RFLP IS6110.

GENERALITES

Les mycobactéries constituent une vaste famille de bactéries, les *Mycobacteriaceae*, comportant un seul genre : le genre *Mycobacterium*.

Les tuberculoses observées chez l'homme peuvent, selon les régions et les circonstances épidémiologiques, être dues à plusieurs espèces du genre *Mycobacterium* : *M. tuberculosis*, *M. africanum* (retrouvé essentiellement chez les africains de l'ouest et du centre de l'Afrique) et *M. bovis*, devenu plus rare dans les pays développés depuis la pasteurisation du lait. *M. bovis* BCG est exceptionnellement responsable de complications vaccinales (bécégites) ou d'immunothérapies (infections vésicales). Il faut rappeler également l'importance encore considérable de la lèpre due à *M. leprae* et celle de l'augmentation des mycobactérioses dites atypiques (*M. avium-intracellulare*, *M. xenopi*, *M. kansasii*...) chez les patients immunodéprimés.

Nous allons rappeler les principales caractéristiques des mycobactéries de la tuberculose ainsi que les principes de leur diagnostic biologique qui a beaucoup progressé grâce aux applications de la biologie moléculaire.

I - Caractéristiques microbiologiques des mycobactéries de la tuberculose

I.A - Morphologie

M. tuberculosis se présente sous la forme d'un bacille légèrement incurvé, de 2 à 4 µm de long et de 0,2 à 0,5µm d'épaisseur. Ce bacille est immobile, non capsulé et non sporulé.

Dans les produits pathologiques, nous les retrouvons isolés ou regroupés en petits amas, alors que dans les milieux de culture solides ou liquides, ils ont tendance à former de longues cordes de bacilles (forme filamenteuse). Par ailleurs des colorations spécifiques (Ziehl-Neelsen, auramine) sont nécessaires pour mettre en évidence les mycobactéries. Ces affinités tinctoriales sont dues à la présence au

niveau de leur paroi, de composés lipidiques et d'acides mycoliques. Ces acides mycoliques retiennent les colorants après décoloration par un mélange acide-alcool. Cette propriété, rencontrée presque exclusivement chez les bactéries appartenant au genre *Mycobacterium*, est reprise dans le libellé du compte rendu d'un examen direct après ce type de coloration : présence ou absence de BAAR (bacilles acido-alcool-résistant). Après coloration de Ziehl-Neelsen, les mycobactéries apparaissent roses sur fond bleu en microscopie à l'immersion, tandis qu'après coloration à l'auramine, les bacilles présentent une teinte vert-jaune en microscopie à fluorescence.

I.B - Culture

Mycobacterium tuberculosis est une bactérie aérobie strict, de culture lente (4 à 6 semaines) sur milieu solide, présentant des colonies habituellement caractéristiques, rugueuses, en chou-fleur (eugoniques) et de couleur beige. Leur température optimale de croissance est de 35 à 37°C et leur culture requiert une atmosphère enrichie de 5 à 10% de CO₂ sur milieux gélosés. Le pH optimal des milieux est proche de la neutralité (6,8 à 7,0). La classification des différentes espèces de mycobactéries en croissance lente ou rapide, selon que les colonies sont observées en plus ou moins de sept jours, est corrélée au nombre de gènes codant pour l'ARN ribosomal. *Mycobacterium tuberculosis* (espèce à croissance lente) n'en possède qu'une copie alors que les mycobactéries à croissance rapide en possède deux [44].

Mycobacterium tuberculosis ne cultive pas sur les milieux ordinaires. En pratique courante, nous utilisons trois types de milieux :

- les milieux solides à l'oeuf coagulé,
- les milieux synthétiques gélosés,
- les milieux liquides.

Les milieux solides à l'oeuf coagulé contiennent du vert malachite à 0,025% pour inhiber la croissance des germes contaminants. Le milieu de Löwenstein-Jensen (L-J) est le milieu de référence pour la détermination de la morphologie (colonies

eugoniques ou dysgoniques). Le milieu de Coletsos permet d'obtenir une meilleure croissance. Le principal avantage de ces milieux est leur capacité à donner des colonies d'aspect caractéristique. Par contre, leur opacité rend impossible l'observation précoce de l'apparition des colonies.

Les milieux solides synthétiques les plus utilisés sont les milieux de Middelbrook 7H10 et 7H11. La culture sur ces milieux gélosés permet d'obtenir des cultures de *M. tuberculosis* en 3 à 4 semaines, soit un délai de culture plus court que les cultures sur milieu à l'oeuf. De plus, ces milieux transparents permettent la visualisation précoce des colonies de mycobactéries par microscopie à faible grossissement. Moins riches que les milieux solides à l'oeuf coagulé, leur sensibilité est bien moindre et leur contamination par des bactéries commensales est très fréquente parce qu'ils ne contiennent pas de substances inhibitrices.

Les principaux milieux liquides commercialisés comme le milieu de Sauton, le milieu de Dubos, le milieu de Youmans et le milieu Middlebrook 7H9 ne sont que très rarement utilisés en pratique courante parce qu'ils ne permettent pas de visualiser de colonies. Par contre, ils sont employés pour le repiquage des souches de mycobactéries.

Le milieu liquide 7H12 est le milieu utilisé dans la méthode Bactec radiométrique. Ce milieu est dérivé du milieu Middelbrook 7H9 dont la composition a été adaptée à la méthode de détection radiométrique (présence de palmitate marqué au C¹⁴). L'intérêt de ce milieu est sa très grande sensibilité. L'adjonction d'un mélange d'antibiotiques augmente la spécificité de ce milieu.

I.C - Identification biochimique

Les caractères biochimiques ont un très grand intérêt dans le diagnostic différentiel des espèces du complexe *tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. bovis* BCG) parce qu'aucune technique de biologie moléculaire ne

permet actuellement en routine de les distinguer entre elles. Par ailleurs, ils constituent la base de la classification des mycobactéries atypiques (classification de Runyon).

Des bandelettes réactives commercialisées par OSI (Difco Laboratories, Detroit, MI) permettent la recherche de production de niacine à partir d'une culture abondante de 4 semaines : *Mycobacterium tuberculosis* est pratiquement la seule espèce de mycobactéries de la tuberculose à produire et libérer dans le milieu de culture de l'acide nicotinique. Cette recherche s'effectue après 28 jours de culture parce qu'il faut une concentration d'acide nicotinique suffisamment importante dans le milieu de culture pour qu'il puisse être détecté.

La recherche d'une activité catalasique permet de distinguer les mycobactéries du groupe de la tuberculose, qui possèdent une activité catalasique thermolabile (22°C), de la plupart des mycobactéries atypiques dont la catalase est thermostable (68°C) (sauf pour *M. malmoense* et *M. gastri*).

La recherche de la nitrate réductase peut être également effectuée à partir de bandelettes réactives commercialisées (Difco Laboratories, Detroit, MI). La technique est analogue à celle utilisée pour la recherche de production de niacine. Parmi les mycobactéries tuberculeuses, *M. tuberculosis* possède une nitrate réductase, tandis que *M. bovis* et *M. africanum* ne présentent pas cette activité.

D'autres activités enzymatiques sont parfois nécessaires au diagnostic de souches présentant un profil atypique. Par exemple, pour les mycobactéries de la tuberculose, il est parfois nécessaire de détecter une activité uréasique, lipasique ou β -glucosidasique. *M. tuberculosis* possède ces trois activités. De la même manière, la détermination de la sensibilité ou de la résistance à certaines substances chimiques peut apporter une aide au diagnostic d'espèce. Ainsi *M. tuberculosis* est habituellement résistant à la TCH (hydrazide de l'acide thiophène 2-carboxylique) à 2

mg/l, mais sensible à la Tb1 (thiosemicarbazone) à 10 mg/l ainsi qu'au pyrazinamide à 400 mg/l et à l'INH (isoniazide) à 0,2 mg/l.

II - Pouvoir pathogène du bacille de Koch

II.A - Pouvoir pathogène chez l'animal

Le modèle expérimental de choix est le cobaye. L'inoculation sous-cutanée de *M. tuberculosis* dans l'aîne entraîne chez le cobaye l'apparition d'un nodule ulcératif qui se développe au point d'injection en 10 à 15 jours. Cet ulcère s'accompagne d'une adénopathie satellite qui s'étend à tous les ganglions et persiste jusqu'à la mort de l'animal qui survient dans les 4 à 6 semaines suivant l'inoculation. A l'autopsie des nodules blanchâtres sont observés dans la rate, le foie, et les poumons. Ces organes contiennent des bacilles tuberculeux et sont le siège de deux lésions histologiquement distinctes. La première est une lésion inflammatoire non spécifique et la seconde se caractérise par l'apparition de lésions granulomateuses, les follicules, qui constituent la lésion tuberculeuse élémentaire.

Koch a découvert que l'infection évolue différemment si l'animal est déjà tuberculeux. L'inoculation est alors suivie dans les deux jours de l'apparition d'un nodule ulcératif qui guérit spontanément, d'une manière rapide et définitive, sans dissémination au ganglion satellite. Ce phénomène, appelé phénomène de Koch, montre, chez l'animal tuberculeux, la présence de deux réactions de l'organisme : le phénomène de sensibilisation (ou allergie tuberculeuse) et le phénomène de résistance (correspondant à l'acquisition de l'immunité).

L'inoculation à l'animal n'est pratiquement plus utilisée pour faire le diagnostic de tuberculose parce que les méthodes actuelles développées in vitro sont suffisantes. Elle demeure cependant utile pour isoler, d'un produit pathologique, une mycobactérie de la tuberculose d'un mélange de mycobactéries.

II.B - Pouvoir pathogène chez l'homme

II.B.1 - La transmission de la tuberculose

La tuberculose est une maladie à transmission aérienne, et l'homme est le seul réservoir de *M. tuberculosis*. Des gouttelettes projetées lors d'un réflexe de toux peuvent contaminer l'air ainsi que les objets domestiques pendant de longues périodes. Les bacilles sont contenus dans ces gouttelettes de Flugge qui peuvent être inhalées par les sujets contacts. Ces gouttelettes peuvent contenir de 1 à 10 bacilles. La probabilité d'être infecté dépend de la richesse en bacilles des gouttelettes de Flugge. Lorsque ces bacilles parviennent jusqu'aux alvéoles pulmonaires, ils entraînent une tuberculose primaire.

II.B.2 - La tuberculose primaire

Les bacilles inhalés se déposent préférentiellement dans une alvéole pulmonaire bien ventilée, essentiellement dans le lobe moyen ou inférieur droit du poumon. Il se développe alors à ce niveau une inflammation non spécifique responsable des lésions initiales : c'est la phase exsudative de l'inflammation [6]. Généralement peu importantes, les lésions exsudatives sont constituées par des polynucléaires et des histiocytes. Les bacilles sont phagocytés par les macrophages alvéolaires dans lesquels ils se multiplient grâce à leur propriété d'inhiber la fusion lysosome-phagosome. Les bacilles libérés par la rupture du macrophage sont phagocytés par d'autres macrophages et ainsi de suite. A partir de cette lésion primaire, les bacilles sont véhiculés par les macrophages vers les ganglions lymphatiques régionaux où ils se multiplient et entraînent une augmentation de volume du ganglion. Par les lymphatiques efférents, les bacilles peuvent également gagner la circulation générale et atteindre tous les organes (dissémination hémotogène).

II.B.3 - Evolution de la tuberculose primaire

*Evolution vers la guérison

C'est le cas le plus fréquent (90% des cas). En effet, les bacilles véhiculés par les macrophages vers les ganglions lymphatiques vont déclencher une réponse immunitaire. Des monocytes et des lymphocytes T reconnaissant des antigènes de *M. tuberculosis* sont activés et se multiplient. A cette étape, les différents types de lymphocytes T sont impliqués, CD4+ (Th1 et Th2) et CD8+. C'est également à ce moment que se développe l'hypersensibilité à la tuberculine. Le nombre de bactéries qui croissait régulièrement est alors stationnaire ou commence à décroître. Parallèlement, apparaissent des modifications de la lésion primaire. En effet, c'est au moment où la réponse immunitaire se met en place que la nécrose caséuse apparaît. Les macrophages se différencient en cellules épithélioïdes ou en cellules multinuclées géantes, les cellules de Langhans (phase cellulaire) qui se disposent en follicules autour de la lésion. Ainsi se constitue la lésion histologiquement typique de la tuberculose, le tubercule, groupement de plusieurs follicules visible macroscopiquement. Enfin, la phase de réparation fait suite à la phase cellulaire et se caractérise par l'apparition d'une fibrose cicatricielle. Ce processus se déroule aussi bien dans le foyer primaire pulmonaire que dans les foyers métastatiques, et conduit à des conditions locales de faible oxygénation. Les bacilles sont alors soit détruits et c'est la guérison définitive, soit le plus souvent quiescents et aident alors à maintenir une population de lymphocytes T mémoire prévenant toute réinfection exogène. Cependant, en cas de diminution de l'immunité, ces bacilles peuvent être réactivés et donner lieu à une tuberculose maladie.

*Evolution vers la tuberculose maladie

Elle représente environ 10% des cas de primo-infection. Cette évolution peut se faire soit d'emblée après la primo-infection (5% des cas), soit plusieurs années après

(5% des cas) où elle peut être déclenchée par l'activation des bacilles quiescents (tuberculose par réactivation endogène), ou par une réinfection avec une nouvelle souche de *M. tuberculosis*. Les premières étapes de cette tuberculose maladie chronique sont les mêmes que celles précédemment décrites. Mais cette fois, la nécrose caséuse, qui était jusque là ferme et solide, se liquéfie par un mécanisme inconnu. Elle est alors éliminée par une bronche entraînant la formation d'une caverne tuberculeuse en relation directe avec l'air extérieur. Cette caverne sera le siège d'une prolifération intense des bacilles et la maladie qui été alors "immunologique" devient "bactériologique" [86]. C'est à partir de ce foyer que se produira la contamination d'autres sites pulmonaires ou extra pulmonaires. La caverne est la lésion clé expliquant le caractère contagieux de la maladie. Sur le plan immunologique, les macrophages activés libèrent de nombreuses cytokines inhibant la réponse immunitaire spécifique des lymphocytes T.

III - Les différentes formes de la maladie tuberculeuse

Nous pouvons classiquement les subdiviser en deux grands groupes, les formes pulmonaires et les formes extra-pulmonaires.

III.A - Les formes pulmonaires

Les formes pulmonaires sont de loin les plus fréquentes et représentent environ 90% des cas. La primo-infection latente caractérise la tuberculose infantile mais peut également se retrouver chez l'adulte. Elle est souvent peu symptomatique, se manifestant essentiellement par une hypersensibilité cutanée à la tuberculine. Il existe parfois quelques signes cliniques peu spécifiques à type d'altération de l'état général. L'examen radiologique met en évidence le foyer initial d'inoculation, situé habituellement à la partie inférieure ou moyenne du poumon droit, ainsi que le ou les ganglions satellites. Ces adénopathies évoluent parfois vers une fistulisation ganglio-

bronchique et une dissémination loco-régionale de l'infection. L'évolution spontanée ou après traitement de cette primo-infection est habituellement favorable avec involution et calcification des lésions pulmonaires [19]. Parfois, une résurgence de bacilles présents dans l'organisme depuis l'enfance (primo-infection méconnue ou mal traitée) entraîne l'apparition d'une tuberculose cavitaire des sommets (tuberculose apicale). Ce tableau peut également caractériser l'évolution d'un seul tenant d'une véritable primo-infection de l'adulte. Cette tuberculose cavitaire se manifeste cliniquement par une toux productive avec expectoration de plus en plus abondante (l'expectoration évolue parallèlement à l'augmentation de taille de la caverne pulmonaire). Une hémoptysie peut être présente et l'altération de l'état général est constante (amaigrissement, fébricule, asthénie). La dyspnée est fréquente pendant les périodes fébriles aiguës. L'examen radiologique permet de visualiser les lésions apicales mais les cavités sont mieux analysées en tomographies. Le diagnostic de certitude est apporté par l'examen bactériologique des sécrétions bronchiques (crachats, tubages gastriques, lavages broncho-alvéolaires) [44]. La tuberculose du sujet âgé diffère par certains aspects de la forme habituelle apicale de l'adulte. Souvent les sujets de plus de 65 ans ont une réaction à la tuberculine négative, soit parce qu'ils n'ont jamais été contaminés, soit, plus fréquemment, parce que leur hypersensibilité à la tuberculine ou leur immunité cellulaire a disparu. L'infection de ces sujets provoque souvent une véritable primo-infection se manifestant par une bronchopneumonie atypique du lobe inférieur ou moyen, difficile à diagnostiquer. En effet, le nombre de bacilles présents dans le lobe inférieur du poumon est relativement faible comparativement au lobe supérieur. En général, cette infection s'accompagne d'une réapparition d'une hypersensibilité à la tuberculine.

III.B - Les formes extra-pulmonaires

Le bacille de la tuberculose peut coloniser pratiquement tous les organes soit par dissémination lympho-hématogène, soit par passage de sécrétions contaminées

par le tractus gastro-intestinal, soit enfin par extension direct au tissu contigu. La tuberculose miliaire généralisée par dissémination lympho-hématogène est une forme rare mais très sévère qui se caractérise par une forte hyperthermie, un état infectieux toxique, et par l'existence de multiples foyers de très petite taille disséminés dans les poumons, le foie, la rate, la moëlle osseuse, les reins, la choroïde, les séreuses et en particulier les méninges. Il s'agit d'une véritable septicémie tuberculeuse [43]. Ces formes se rencontrent notamment chez les nouveaux-nés ainsi que chez les sujets co-infectés par le VIH. L'analyse de l'expectoration étant le plus souvent négative à l'examen direct, il faut bien souvent recourir à l'examen bactériologique de ponctions de moëlle osseuse, de biopsies médullaires, hépatiques ou pulmonaires (biopsies transbronchiques par fibroscopie) pour poser le diagnostic. La mise en évidence d'une atteinte méningée, localisation fréquente dans la miliaire généralisée, est une préoccupation constante entraînant la réalisation d'une ponction lombaire systématique. Mais une méningite tuberculeuse peut également être diagnostiquée en dehors de toute tuberculose miliaire. En général, elle fait suite à la rupture d'un foyer de tuberculose sous épendymaire dans l'espace sous arachnoïdien [19]. Son incidence est maximale chez les jeunes enfants mais peut se déclarer à tout âge. Les symptômes peuvent être aigus et rappeler ceux d'une méningite bactérienne, ou bien être chroniques et se manifester par des céphalées et des troubles du comportement. Habituellement, une altération de la conscience allant de la somnolence au coma est présente. L'analyse du liquide céphalo-rachidien montre une hyperprotéinorachie, une hypochlororachie, et une hyperleucorachie modérée à prédominance de cellules mononuclées (les polynucléaires peuvent prédominer au début de l'évolution de la maladie). Le diagnostic de certitude est apporté par la mise en culture du liquide céphalo-rachidien.

En dehors de ces deux urgences thérapeutiques que constituent la miliaire généralisée et la méningite, d'autres localisations extra-pulmonaires peuvent être

diagnostiquées. Parmi elles la tuberculose pleurale est une des plus fréquente [16]. Généralement, elle se manifeste par deux tableaux cliniques différents. La pleurésie séro-fibrineuse primaire avec épanchement apparait le plus souvent après une primo-infection, mais peut s'observer à tout moment de l'évolution d'une tuberculose pulmonaire. Elle est liée à la rupture d'un foyer sous pleural dans la cavité pleurale avec formation d'un épanchement pleural riche en cellules mononuclées, en protéines (>30 g/l) et en LDH [43]. La symptomatologie est très variable et le diagnostic est souvent évoqué devant une douleur de la base thoracique, une toux sèche à l'inspiration et une dyspnée en cas d'épanchement abondant. L'examen direct du liquide pleural retrouve rarement de bacilles tuberculeux. Le diagnostic est confirmé par la mise en culture de ponctions biopsies pleurales et l'examen anatomo-pathologique des échantillons biopsiques à la recherche de signes histologiques de granulomatose s'observant chez la plupart des patients. La seconde forme de pleurésie tuberculeuse est représentée par l'empyème ou pleurésie purulente tuberculeuse. Elle est habituellement une complication chronique et généralement évolutive d'un foyer de tuberculose pulmonaire chronique. Le liquide pleural est franchement purulent et l'épanchement est souvent cloisonné.

La tuberculose ganglionnaire et la tuberculose rénale sont également relativement fréquentes. La tuberculose ganglionnaire, notamment médiastinale, touche plus souvent des sujets de race jaune et noire que blanche. Elle est particulièrement fréquente chez le sujet co-infecté par le VIH. Le tableau clinique est généralement celui d'adénopathies chroniques inflammatoires associées à un certain fléchissement de l'état général. Le diagnostic de certitude est réalisé par mise en culture du produit de ponction ou du fragment de biopsie. Dans la tuberculose rénale, l'atteinte des deux reins est quasi constante. Les symptômes locaux peuvent être discrets ou absents bien que souvent, le sujet présente un amaigrissement, une hyperthermie et une hématurie. L'atteinte des organes uro-génitaux (uretères, vessie,

vésicules séminales, prostate) par propagation canalaire à partir des reins, se manifeste souvent par une pyurie aseptique. Chez l'homme, la tuberculose génitale est en général secondaire à une atteinte rénale, alors que chez la femme, la salpingite tuberculeuse est la conséquence directe d'une dissémination hématogène et apparaît souvent isolée.

D'autres formes de tuberculose extra-pulmonaire existent mais sont plus rares. Nous pouvons citer la spondylite tuberculeuse ou mal de Pott qui est la localisation la plus grave des tuberculoses osseuses de par ses complications neurologiques comme la compression médullaire. La tuberculose gastro-intestinale, quant à elle, se manifeste par un syndrome de malabsorption, une occlusion ou une hémorragie digestive avec diarrhée. La péricardite tuberculeuse évolue parfois vers une fibrose constrictive qui retentit sur les fonctions hémodynamiques de l'organisme. Enfin, la tuberculose des surrénales provoque généralement une insuffisance corticosurrénalienne (maladie d'Addison). Toutes ces formes cliniques sont de diagnostic difficile et requièrent souvent la pratique de ponctions biopsies avec mise en culture à la recherche de mycobactéries.

IV - Le diagnostic bactériologique de la tuberculose

Le diagnostic bactériologique de la tuberculose est avant tout un diagnostic direct. En effet, le manque de sensibilité et de spécificité de la sérologie exclue ce moyen diagnostique de la pratique médicale. Les différentes étapes du diagnostic des mycobactéries est présenté figure 1 page 17.

Etapes du traitement des produits pathologiques en vue de la recherche des mycobactéries

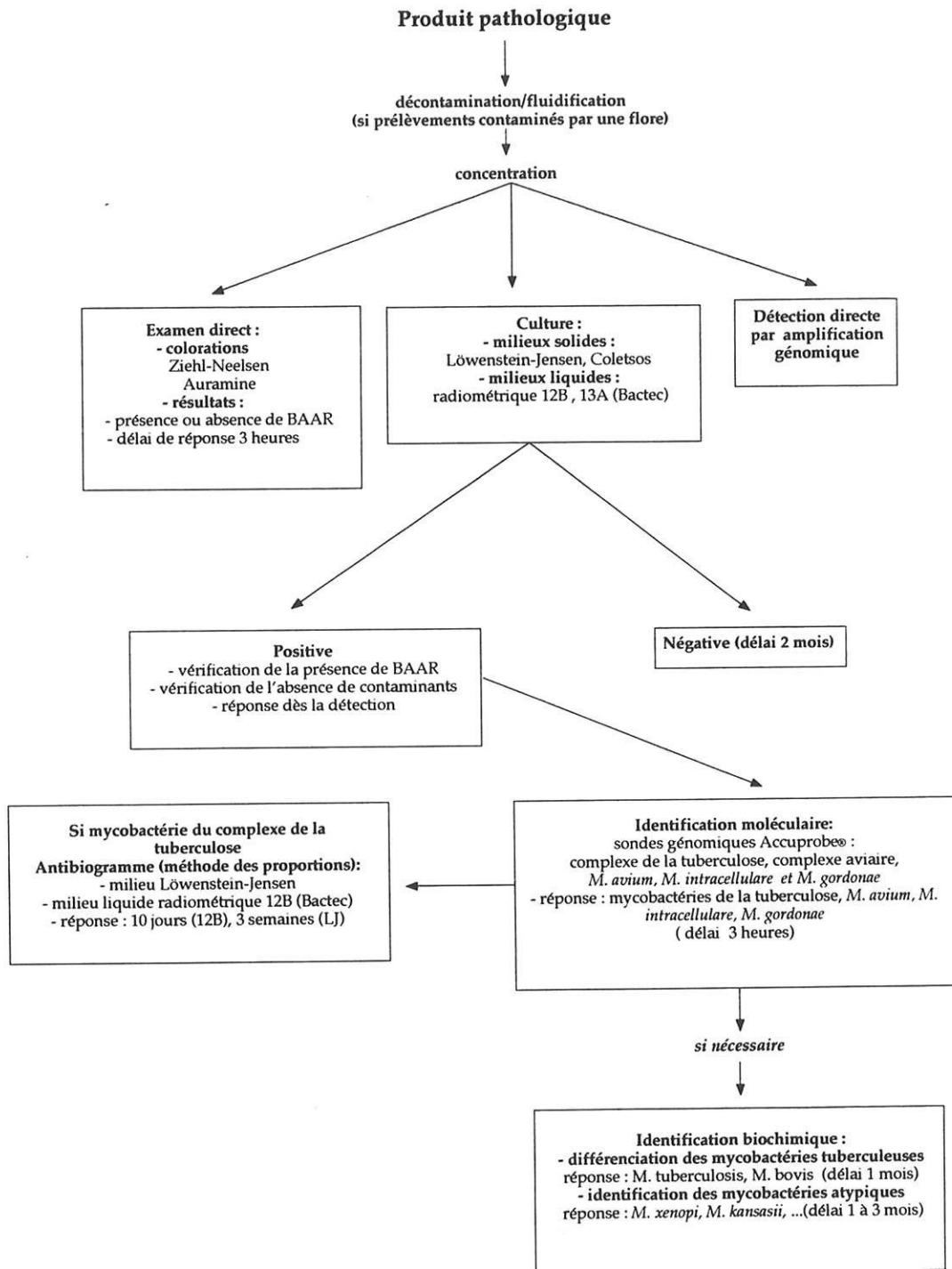


Figure 1 : Principales étapes du diagnostic bactériologique des infections à mycobactéries.

IV.A - Le diagnostic direct

Le diagnostic de tuberculose est un diagnostic clinique et biologique. Le diagnostic de certitude requiert l'isolement et l'identification de l'espèce responsable à partir de prélèvements effectués chez des malades. La recherche de bacilles acido-alcoolo-résistants par microscopie, la mise en culture sur milieu de Löwenstein-Jensen et l'identification biochimique, constituent les méthodes de référence. Mais ces analyses demandent plusieurs semaines car la multiplication des mycobactéries de la tuberculose en culture est très lente. Aujourd'hui, les techniques de respirométrie radiométrique, d'hybridation moléculaire et de PCR (Polymerase Chain Reaction) offrent la possibilité d'un diagnostic beaucoup plus rapide.

IV.A.1 - Les prélèvements et leur traitement

Les émissions de bacilles de la tuberculose étant souvent discontinues, il est recommandé d'effectuer l'examen de prélèvements collectés sur trois jours successifs et avant toute antibiothérapie anti-tuberculeuse.

Au niveau pulmonaire, les expectorations sont les prélèvements de choix, qu'elles soient spontanées ou induites après aérosol de sérum salé hypertonique. Elles sont recueillies après un effort de toux, le matin au lever après rinçage de la bouche à l'eau stérile. S'il est impossible d'obtenir des expectorations, on exploitera les tubages gastriques, recueillis le matin au réveil et à jeun (ils correspondent à des crachats déglutis durant la nuit). Par ailleurs, il est parfois nécessaire d'avoir recours à des prélèvements plus invasifs (aspirations bronchiques et lavages broncho-alvéolaires) réalisés à l'aide d'un fibroscope. En aucun cas les prélèvements salivaires ne peuvent convenir.

Après restriction hydrique la veille du prélèvement, l'urine doit être recueillie en milieu de jet, le matin, dans un pot stérile.

Le sang doit être recueilli soit dans un tube contenant de la saponine (système Du Pont Isolator) afin de libérer les mycobactéries des phagocytes, soit dans un tube avec anticoagulant (polyanéthol sulfonate de sodium) si on utilise le système de culture radiométrique.

Les ponctions, biopsies et prélèvements opératoires sont déposés dans un pot stérile contenant un peu d'eau stérile. Il est recommandé de les conserver à +4°C, surtout si l'envoi au laboratoire doit être différé.

Les produits stériles liquides (LCR, sang, ponctions) seront concentrés par centrifugation, et les biopsies seront broyées et centrifugées avant d'êtreensemencées.

Compte tenu du caractère polymicrobien des prélèvements pulmonaires, cutanés et urinaires, une décontamination est effectuée avant de les ensemen- cer. Plusieurs méthodes de décontamination peuvent être utilisées. Pour les prélèvements pulmonaires, la grande majorité des laboratoires utilise une solution alcaline de citrate de sodium (NaOH 4%, citrate de sodium 2,9%) additionnée de N-acétyl-cystéine, réalisant ainsi une décontamination fluidification en une seule étape. Après neutralisation, les prélèvements seront concentrés par centrifugation et les culots obtenus utilisés pour la confection de frottis en vue de l'examen direct et de l'ensemencement. Les urines seront concentrées par centrifugation et le culot sera décontaminé soit comme un crachat, soit par l'acide sulfurique pendant 15 minutes et neutralisé.

IV.A.2 - L'examen direct

L'examen direct au microscope permet dans 30 à 50% des cas de tuberculose pulmonaire, selon l'incidence de la maladie, de mettre en évidence des bacilles acido-alcool-résistants [43]. Il n'en est pas de même pour les prélèvements issus de tuberculose extra-pulmonaire où seulement 10% d'entre eux présenteront un examen

direct positif. Deux méthodes sont utilisées en pratique quotidienne : la méthode de Ziehl-Neelsen et la coloration à l'auramine. Ces méthodes comportent plusieurs temps :

.Coloration de Ziehl-Neelsen:

- coloration des bacilles en rose-rouge par la fuschine phéniquée,
- décoloration du fond de la préparation par un mélange acide-alcool,
- contre-coloration du fond de la préparation par le bleu de méthylène colorant les bactéries commensales.

.Coloration à l'auramine:

- coloration du bacille en jaune-vert par l'auramine O,
- décoloration du fond de la préparation par un mélange acide-alcool,
- contre-coloration du fond de la préparation par le rouge thiazine faisant apparaître les autres éléments en rouge fluorescent.

Après examen microscopique, un frottis est considéré comme négatif au bout de 15 minutes par la méthode de Ziehl-Neelsen et 5 minutes par la méthode à l'auramine qui permet donc d'éliminer rapidement les frottis négatifs. Chaque frottis positif pour la coloration à l'auramine pourra être contrôlé en recolorant la lame par la méthode de Ziehl-Neelsen.

L'examen microscopique a une spécificité très élevée, voisine de 100% [145]. Des faux positifs peuvent être exceptionnellement observés si les réactifs utilisés ont été préparés avec l'eau du robinet, et ce, en raison de la présence possible de mycobactéries saprophytes. Mais si la spécificité est excellente, il n'en n'est pas de même pour la sensibilité qui est relativement faible : le seuil de détection est de 10^4 BAAR/ml (bacilles acido-alcool-résistants) et le prélèvement doit contenir 10^5 BARR/ml pour que la probabilité d'examen positif soit supérieure à 95% [145]. Malgré cela, l'examen microscopique reste une étape incontournable dans le diagnostic d'une infection tuberculeuse.

IV.A.3 - Isolement par culture

Les cultures doivent être effectuées dans tous les cas, quel que soit le résultat de l'examen direct et, le cas échéant, de la PCR. C'est la méthode de référence pour établir le diagnostic de tuberculose. La culture a une sensibilité environ dix fois supérieure à celle de l'examen direct (seuil de détection de 10^2 BARR/ml) et une très bonne spécificité [43, 145]. Pour augmenter sa sensibilité, il faut répéter les prélèvements. En effet, il a été démontré, dans les atteintes pulmonaires, qu'un deuxième prélèvement faisait accroître de plus de 25% la sensibilité de la méthode.

Les différents milieux dont nous disposons ont été décrits précédemment. L'ensemencement des prélèvements sur milieu à l'oeuf coagulé de Löwenstein-Jensen est pratiqué par la majorité des laboratoires de bactériologie. Habituellement, on ensemence plusieurs tubes avec le même prélèvement. Les tubes doivent être examinés dès le quatrième jour (pour déceler une contamination éventuelle par une bactérie commensale ou pour observer la présence d'une mycobactérie à croissance rapide), puis une fois par semaine pendant huit semaines avant que les tubes ne soient éliminés. Les cultures des mycobactéries du complexe *tuberculosis* se positivent généralement au bout de trois à six semaines. L'inconvénient majeur de l'isolement par culture sur milieux solides réside donc dans la lenteur de croissance du bacille tuberculeux.

Pour réduire ce délai de croissance, de nombreuses équipes utilisent, parallèlement à l'ensemencement des milieux L-J, une méthode rapide de primoculture en milieu liquide, la respirométrie radiométrique ou une méthode non radiométrique. La respirométrie radiométrique est basée sur la mesure du CO_2 marqué au carbone 14 qui est libéré au cours de la multiplication des bactéries dans un milieu liquide (flacon 12B) contenant du palmitate marqué au carbone 14 comme seule source de carbone. Un automate (Bactec 460) réalise la détection du CO_2 marqué et le traduit sous forme numérique (index de croissance ou G.I.) proportionnel au nombre

de bactéries et à leur taux de croissance. Les flacons sont soumis à 4 détections en 3 semaines, une cinquième détection est effectuée pendant la cinquième semaine. La dernière lecture est réalisée lors de la 7^{ème} semaine avant que les flacons ne soient éliminés. Lorsque l'indice de croissance d'un flacon dépasse une valeur de croissance de 10, le flacon est soumis à une détection quotidienne. Cette méthode permet la détection d'un bacille tuberculeux en 8 jours si l'examen direct était positif, et en 14 jours s'il était négatif. Sa sensibilité est supérieure à 96% et sa spécificité très élevée est assurée par un mélange d'antibiotiques PANTA (pipéracilline, azlocilline, acide nalidixique, triméthoprim, amphotéricine). L'ensemencement d'une gélose au sang cuit, à la recherche d'une éventuelle contamination bactérienne, pour tout flacon détecté positif complète la spécificité de cette méthode.

IV.A.4 - Identification

Lorsque l'indice de croissance atteint un niveau de 200-300, un étalement sur lame avec coloration de Ziehl-Neelsen est réalisé sur le culot de culture pour confirmer la présence de B.A.A.R. Ceci permettra de s'assurer que la positivité des flacons 12B est bien due à la présence de mycobactéries et non à celle de bactéries contaminantes dans le milieu de culture.

Des sondes nucléiques sont actuellement commercialisées (AccuProbe[®], Gen-Probe) et permettent, à partir de cultures positives en milieu liquide 12B ou sur milieu solide, de faire le diagnostic de tuberculose. Le principe de cette méthode repose sur l'hybridation d'une séquence oligonucléotidique d'ADN codant pour un fragment d'ARN 16S. Cette séquence est couplée à un marqueur chimioluminescent (ester d'acridinium) pour permettre la visualisation de la réaction. Ce système d'identification rapide a été évalué et a montré une très haute spécificité (99,5%) ainsi qu'une excellente sensibilité (>95%) [55, 82]. Des coffrets d'identification sont actuellement disponibles pour l'identification des espèces du complexe *tuberculosis*, du complexe *M. avium-intra cellulare*, de *M. gordonae* et de *M. kansasii*.

Cependant, cette technique ne permet pas de différencier les espèces au sein du groupe *tuberculosis*. Pour les différencier, une identification biochimique complémentaire est donc indispensable. La réalisation d'un test à la niacine est essentielle pour identifier *Mycobacterium tuberculosis* puisque la présence d'acide nicotinique est un caractère constant de cette espèce (seul *M. africanum* donne également une réaction positive mais faible). Par ailleurs, la recherche d'une uréase, d'une nitrate réductase, de la sensibilité ou de la résistance à certaines substances chimiques permettra de réaliser le diagnostic différentiel des mycobactéries du complexe *tuberculosis* (voir tableau I page 24). Pour l'identification des mycobactéries atypiques, en dehors des sondes nucléiques commercialisées, il est nécessaire de réaliser des galeries d'identification en tube qui reprennent les différents éléments du tableau II page 25.

IV.A.5 - Détection directe des mycobactéries par amplification génique

Dans certaines circonstances cliniques, il serait souhaitable de pouvoir détecter et identifier rapidement les bacilles de la tuberculose et les mycobactéries opportunistes sans passer par l'étape de culture bactérienne. Aujourd'hui, les techniques d'amplification génique nous permettent d'identifier les mycobactéries directement dans le prélèvement pathologique.

La technique PCR est une des méthodes d'amplification génique les plus utilisées en biologie moléculaire. Elle permet l'amplification rapide d'un fragment d'ADN spécifique, par des amorces oligonucléotidiques de synthèse, grâce à une enzyme thermorésistante, la *Taq* polymérase. La détection du produit de PCR est réalisée par hybridation avec une sonde spécifique marquée. C'est une méthode rapide, très sensible et donc directement utilisable sur des produits pathologiques.

Tableau I : Caractères différentiels des mycobactéries du complexe *tuberculosis*.

	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. africanum</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i> BCG
Culture L-J.	Eugonique rugueuse beige puis chamois	Dysgonique rugueuse plate beige	Dysgonique lisse cire de bougie	Eugonique rugueuse beige
Culture en milieu liquide	se dissocie mal	se dissocie mal	se dissocie bien	se dissocie mal
Morphologie en milieu liquide	fins corde moustache	fins corde moustache	courts	longs
Croissance en présence de pyruvate	+	++	++	+
Niacine	+	+/-	-	-
Catalase 68°C	-	-	-	-
Nitrates	+	+/-	-	-
INH* 0,2 mg/l	S	S	S	S
PAS* 1 mg/l	S	S	S	S
TCH* 2 mg/l	R	S	S	S
Tb 1* 10 mg/l	S	S	S	R
Pyrazinamide 400 mg/l	S	S	R	R
Cycloserine 20 mg/l	S	S	S	R

R : résistant

S : sensible

* : les abréviations correspondent à celles utilisées dans le texte.

Tableau II : PROPRIETES ' DES MYCOBACTERIES LES PLUS FREQUEMMENT RENCONTREES DANS LES LABORATOIRES CLINIQUES

Mycobacterium sp.	Pigment	Relations thermiques	Temps (jours)	Croissance en présence de																			
				OBS	LUM	30°C	37°C	42°C	-7	+10	PYR	PNB	TCH	HYD	PZA	DCS	Tb1	GEL	MC	NaC	CAP	EMB	LEV
<i>tuberculosis</i> ²	-	[+]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>bovis</i>	-	[+]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>africanum</i>	-	[+]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BCG	-	[+]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>kansasii</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>marinum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>szulgai</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>gordonae</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>xenopi</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>flavescens</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>avium intracellulare</i> ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>scrofulaceum</i> ¹	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>malmoense</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>simiae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>asiaticum</i>	-	[+]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>terracae</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>terrae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>gastri</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>triviale</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>nonchromogenicum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>fortuitum</i> ¹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>peregrinum</i> ¹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cheloniae</i> ¹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>abscessus</i> ¹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>fallax</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>vacciae</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>senegalense</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>thermorestibile</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>phlei</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>smegmatis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ulcerans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>leprae</i> ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>paratuberculosis</i> ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>haemophilum</i> ¹	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Signes : + = résultat positif ; - = résultat négatif ; [+] = résultat tardif ou faible ; x = résultat très variable.
 Abréviations utilisées : OBS : pigmentation à l'obscurité ; LUM : pigmentation à la lumière ; PYR : stimulation de la croissance par le pyruvate, 4,8 g/l ; PNB : p-nitrobenzoate, 500 µg/ml ; TCH : hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique, 2 µg/ml ; HYD : hydroxylamine, 250 µg/ml ; PZA : pyrazinamide, 100 µg/ml ; DCS : D-cyclosérine, 30 µg/ml ; Tb1 : thiosemicarbazone, 10 µg/ml ; GEL : gélose ordinaire ; MC : milieu de MacConkey ; NaC : chlorure de sodium, 5 % ; CAP : caprômycine 40 µg/ml ; EMB : éthambutol, 2 µg/ml ; LEV : lévulose comme unique source de carbone ; NIA : production de niacine ; NIT : nitrate réductase ; TL : catalase à la température du laboratoire ; 68 °C : catalase à 68 °C ; GLU : β-glucosidase ; T 80 : hydrolyse du Tween 80 à 10 jours ; URE : uréase en 18 h ; ARY : arylsulfatase en 3 jours ; FER : oxydation du citrate de fer ammoniacal ; PEN : pénicilline ; TRE : tréhalase.
 Les détails concernant la réalisation de ces tests sont indiqués dans le texte.

Mycobacterium sp.	Propriétés biochimiques										Composition en acides mycoliques						
	NIA	NIT	TL	68°C	GLU	T 80	URE	ARY	FER	PEN	TRE	I	II	III	IV	V	VI
<i>tuberculosis</i> ²	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>bovis</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>africanum</i>	x	x	+	-	x	x	x	x	-	-	+	+	+	+	+	+	+
BCG	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>kansasii</i>	x	-	+	x	+	x	x	x	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>marinum</i>	x	-	+	[+]	x	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>szulgai</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>gordonae</i>	-	-	+	-	-	x	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>xenopi</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>flavescens</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>avium intracellulare</i> ¹	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>scrofulaceum</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>malmoense</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>simiae</i>	x	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>asiaticum</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>terracae</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>gastri</i>	-	x	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>triviale</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>nonchromogenicum</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>fortuitum</i> ¹	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>peregrinum</i> ¹	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>cheloniae</i> ¹	x	-	+	[+]	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>abscessus</i> ¹	x	-	+	[+]	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>fallax</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>vacciae</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>senegalense</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>thermorestibile</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>phlei</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>smegmatis</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>ulcerans</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>leprae</i> ¹	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>paratuberculosis</i> ¹	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>haemophilum</i> ¹	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

1 Le tableau ne montre que les caractères utiles pour le diagnostic différentiel.
 2 *M. tuberculosis* mycobactérie de croissance lente (4-6 semaines) non chromogène, formant des colonies eugoniques (rugueuses en "chou fleur"), inhibée par le PNB et l'HYD, niacine positive, nitrate réductase positive, catalase faible et thermolabile.
 3 Complexe MAIS (*M. avium-intracellulare-scrofulaceum*).
 4 Complexe *fortuitum*.
 5 Complexe *cheloniae*.
 6 *M. leprae* ne pousse pas sur milieux artificiels.
 7 *M. paratuberculosis* ne pousse que sur milieux contenant de la mycobactine.
 8 *M. haemophilum* ne pousse que sur des milieux au sang ou contenant du citrate de fer ammoniacal.

Pour améliorer la sensibilité et la spécificité de la méthode, il est nécessaire d'utiliser des contrôles internes positifs et négatifs. Les faux négatifs peuvent être dus à un manque de sensibilité de la technique dans son application mycobactérienne, mais aussi, à la présence dans le prélèvement d'inhibiteurs du processus enzymatique d'amplification. Actuellement des coffrets sont commercialisés pour la recherche des mycobactéries tuberculeuses dans les prélèvements pathologiques. Ainsi le test Amplicor MTB Assay (Roche Diagnostic System, Inc, Somerville, NJ) a été développé pour la détection des mycobactéries du complexe *tuberculosis* dans les prélèvements respiratoires. Les amorces oligonucléotidiques ont pour cible un fragment de 584 pb situé dans la région conservée du gène de l'ARN 16S. La détection se fait à l'aide d'une sonde marquée au dinitrophényl (DNP) et la révélation par colorimétrie. De nombreuses études [12, 15, 18 42, 96, 150] ont été publiées démontrant une bonne sensibilité (90%) ainsi qu'une excellente spécificité (proche de 100%).

D'autres méthodes d'amplification génique sont actuellement disponibles. Parmi elles, le test "Amplified *M. tuberculosis* Direct Test" (AMTDT, Gen-Probe, bioMérieux) permet, à partir de prélèvements respiratoires, d'amplifier l'ARN ribosomal 16S des mycobactéries du groupe *tuberculosis* par la méthode d'amplification transcriptionnelle. Cette méthode associe l'utilisation d'une transcriptase inverse à celle d'une ARN polymérase. La détection est réalisée avec une sonde marquée à l'ester d'acridinium et la lecture s'effectue sur un luminomètre [78]. Cette méthode possède une sensibilité et une spécificité identiques à celle de l'Amplicor de Roche [146].

La méthode de ligation-amplification ou Ligase Chain Reaction (LCR) permet elle aussi la détection directe des mycobactéries tuberculeuses (Abbot LCx Probe System). Elle utilise une paire d'amorces oligonucléotidiques qui s'hybrident à la séquence complémentaire du gène codant pour la protéine de 38-kDa et utilise dans

un second temps l'action d'une polymérase et d'une ligase. Cette technique est très sensible (94%) et très spécifique (proche de 100%) [83].

D'autres techniques de biologie moléculaire appliquées à la détection des mycobactéries dans les prélèvements pathologiques existent mais aucun coffret n'est encore commercialisé. Il s'agit des techniques de SDA (Strand Displacement Amplification), basée sur l'amplification des séquences d'insertion *IS6110* du génome des mycobactéries du groupe tuberculosis, et de la technique PRA (PCR-Restriction Enzyme Analysis). Cette dernière technique est basée sur l'amplification du gène *hsp 65* commun à toutes les mycobactéries. Le produit d'amplification est ensuite digéré par deux enzymes différentes (*BstEII* et *HaeIII*). Après migration par électrophorèse en gel d'agarose des produits de digestion, le profil de bandes obtenu est caractéristique pour chaque espèce de mycobactéries mais ne permet pas de différencier les espèces du groupe *tuberculosis* entre elles. Cette technique a l'avantage d'être "universelle" et de permettre donc, l'identification de l'ensemble des mycobactéries.

IV.A.6 - Sensibilité de *M. tuberculosis* aux agents antituberculeux

Avant la découverte de la streptomycine en 1944 [7], on ne disposait d'aucun traitement efficace pour combattre la tuberculose. Initialement utilisée en monothérapie, la streptomycine a, dès 1952, était associée à l'isoniazide et au PAS (acide para-aminosalicylique). Actuellement, le traitement de la tuberculose fait appel à au moins trois antibiotiques actifs contre *M. tuberculosis*. Ces antibiotiques sont l'isoniazide, la rifampicine, le pyrazinamide et l'éthambutol. De nombreux auteurs [8, 23, 127] ont constaté l'émergence de souches mono ou multi-résistantes aux agents anti-tuberculeux, principalement chez les patients co-infectés par le VIH et par *M. tuberculosis*. Mais ce phénomène reste encore relativement rare en France (0,5% des cas de tuberculose en 1992).

*Détermination de la sensibilité aux antituberculeux

En 1961, Canetti et Grosset [27] ont démontré que chaque population de *M. tuberculosis* sauvage contenait un faible pourcentage de mutants résistant aux antibiotiques. L'antibiogramme effectué pour déterminer la sensibilité de *M. tuberculosis* aux agents antituberculeux doit tenir compte de ce fait. La méthode recommandée est la méthode des proportions réalisée en milieu solide. Elle consiste à ensemencer un volume défini de différentes dilutions d'une suspension de bacilles de richesse étalonnée sur des milieux solides avec et sans antibiotiques (la concentration d'antibiotiques, appelée concentration critique, varie selon l'antibiotique utilisé). Résistance ou sensibilité sont déterminées en comparant le nombre de colonies qui poussent sur des milieux contenant l'antibiotique et sur les milieux témoins ne contenant pas d'antibiotique. Cette résistance est exprimée en pourcentage. Ce pourcentage est comparé à un nombre appelé proportion critique qui diffère selon les antibiotiques (tableau III, ci-dessous). Une population bacillaire dans laquelle le pourcentage des mutants résistants est supérieur à la proportion critique est considérée comme résistante à l'antibiotique testé, sinon elle est considérée comme sensible.

Tableau III : Concentrations critiques des agents antituberculeux en fonction des milieux utilisés et proportion critique des mutants résistants.

Antibiotique	concentration critique(mg/l) sur milieu:			Proportion critique
	7H10	L-J	Bactec TM	
Isoniazide	0,2	0,2	0,1	1%
Rifampicine	1	40	2	1%
Pyrazinamide	25	200	100	10%
Ethambutol	2	2	2,5	1%
Ethionamide	5	20	5	10%
Streptomycine	2	4	2	1%

La mesure de la sensibilité aux antituberculeux peut également être effectuée par la méthode radiométrique. La suspension mycobactérienne est ensemencée dans un flacon témoin ne contenant pas d'antituberculeux et dans des flacons contenant des

concentrations critiques d'antibiotiques. L'inoculum ensemencé dans le flacon témoin est cent fois moins important que celui utilisé pour les flacons contenant un antibiotique. Une souche est considérée comme sensible si sa croissance dans le flacon contenant l'antibiotique est inhibée de plus de 99% par rapport à celle observée dans le flacon sans antibiotique.

Enfin, la détection de résistance vis à vis de certains antibiotiques peut être effectuée par la méthode PCR-SSCP (PCR-single strand conformational polymorphism). Elle repose sur l'amplification des régions des gènes cibles de la rifampicine (*rpoB*), de la streptomycine (*rpsL* ou *rrs*), ou des fluoroquinolones (*gyrA*) qui sont connues comme étant les sites des modifications conférant la résistance à ces antibiotiques. Les mutations au niveau de ces sites, présentes chez les souches résistantes, seront mises en évidence par l'altération de la mobilité électrophorétique en gel de polyacrilamide de l'ADN de ces souches ou par séquençage direct [95]. Cette méthode a été appliquée pour la détermination de la résistance de *M. tuberculosis* à la rifampicine [133], à la streptomycine [71] et aux fluoroquinolones [132]. C'est une technique simple et rapide et il est possible d'obtenir le résultat en 24 à 48 heures à partir de cultures de *M. tuberculosis*.

*Les mécanismes de résistance aux antituberculeux

- Résistance à la streptomycine

Elle peut résulter de trois mécanismes différents. Dans le premier, des mutations faux-sens dans le gène *rpsL*, codant pour la protéine S12 confèrent la résistance chez *M. tuberculosis* [71]. Le deuxième mécanisme concerne des mutations du gène *rrs* codant pour l'ARNr 16S responsable de la liaison de la streptomycine [71]. Enfin, le troisième mécanisme semble mettre en cause la perméabilité de la paroi mycobactérienne qui empêcherait la pénétration de la streptomycine dans la bactérie.

-Résistance à l'isoniazide

L'action de l'isoniazide sur *M. tuberculosis* est rendue possible grâce à l'action d'une catalase-péroxydase qui oxyde cet antituberculeux, le transformant en un dérivé plus actif qui entraîne la mort de la bactérie. Certaines équipes ont décelé des mutations faux-sens du gène *katG*, codant pour cette catalase péroxydase, chez les souches résistantes à l'isoniazide et des délétions de ce gène pour les souches à haut niveau de résistance [153]. Par ailleurs, des mutations et une surexpression du gène *inhA*, responsable de la synthèse des acides mycoliques et du métabolisme du NAD, sont également incriminées dans la résistance à l'isoniazide ainsi que dans la résistance à l'ethionamide.

-Résistance à la rifampicine

Elle est consécutive à des modifications dans la structure du gène *rpoB*, codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase. La plupart de ces modifications sont dues à des mutations faux-sens, mais des insertions ou des délétions ont également été observées [133]. La rifampicine, en se liant à la sous-unité β de l'ARN polymérase, va inhiber l'action de cette ARN polymérase, enzyme indispensable à la vie de la mycobactérie. Les modifications du gène *rpoB* suppriment l'inhibition de l'ARN polymérase par la rifampicine, qui ne peut alors plus remplir son rôle bactéricide.

-Résistance au pyrazinamide

Le pyrazinamide fait actuellement partie de la polychimiothérapie de première intention, mais son mode d'action et ses mécanismes de résistance sont encore mal connus. Konno *et al.* [81] ont identifié une pyrazinamidase dans les souches de *M. tuberculosis* sensibles au pyrazinamide. Cette enzyme convertit le pyrazinamide en acide pyrazinoïque, mais n'est pas active dans les souches résistantes.

-Résistance aux fluoroquinolones

Il semble aujourd'hui que l'ofloxacin et la ciprofloxacine soient les deux fluoroquinolones les mieux indiquées dans le traitement des souches de *M. tuberculosis* multi-résistantes. La cible primordiale des fluoroquinolones est l'ADN gyrase qui est composée de deux sous-unités A et B, codées respectivement par les gènes *gyrA* et *gyrB*. Des mutations dans une région de *gyrA* qui code pour la partie responsable de la fixation de la fluoroquinolone ont été identifiées et sont suspectées de conférer une résistance de haut niveau aux fluoroquinolones chez *M. tuberculosis* [132]. Quant aux mutations du gène *gyrB*, qui sont responsables d'une résistance à bas niveau des fluoroquinolones, elles sont plus rares.

IV.B- Le diagnostic indirect

Si de nombreuses méthodes de diagnostic direct sont à la disposition du biologiste pour confirmer le diagnostic de tuberculose, il n'en est pas de même pour le diagnostic indirect de la tuberculose.

L'examen anatomopathologique avec la mise en évidence de l'association d'une réaction épithélio-gigantocellulaire et de nécrose caséuse, lésion spécifique de la tuberculose, semble être un bon moyen de diagnostic indirect de la tuberculose. De plus, ce diagnostic est confirmé par la présence de bacilles acido-alcool-résistants visibles sur les coupes histologiques.

Quant au diagnostic sérologique, les tests actuellement commercialisés manquent de spécificité et de sensibilité car ils utilisent des antigènes non spécifiques des mycobactéries. De plus, il n'est pas encore démontré qu'ils représentent un bon marqueur d'infection ou d'efficacité d'un traitement antituberculeux.

V - Epidémiologie générale

La tuberculose est une des maladies infectieuses les plus répandues dans le monde. Elle a cependant connu un déclin régulier dès la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle dans les pays industrialisés. Ce déclin était si sensible que certains envisageaient même l'éradication de la maladie pour les premières décennies du XXI^{ème} siècle. Alors que l'optimisme était de mise, nous avons assisté dans le milieu des années 80 à une stabilisation puis une augmentation du nombre de cas de tuberculose chaque année dans le monde.

V.A - La tuberculose dans le monde

L'appréciation de l'incidence de la tuberculose au niveau mondial est difficile. En effet, elle est régulièrement sous-estimée compte tenu de l'absence de programmes internationaux cohérents et correctement appliqués. En 1993, on évaluait à un milliard sept cent millions le nombre d'individus infectés par *Mycobacterium tuberculosis* dans le monde, soit plus de 30% de la population du globe tous âges confondus. La distribution varie évidemment selon les régions, avec un énorme réservoir asiatique et africain. On estimait également que plus de 15 millions d'êtres humains étaient atteints de tuberculose chronique c'est à dire d'une maladie active [36]. Par ailleurs, on évaluait à 8 millions le nombre de nouveaux cas de tuberculose dans le monde chaque année dont 95% survenaient dans les pays en voie de développement et 5% dans les pays développés. C'est en Afrique que l'incidence de la maladie tuberculeuse reste la plus élevée avec 272 cas pour 100 000 habitants [130]. Dans les pays en voie de développement, 80% des cas de tuberculose surviennent chez des sujets âgés de 15 à 60 ans. Le haut risque annuel d'infection tuberculeuse dans ces pays est lié au bas niveau de revenu, à la faible efficacité des systèmes de soins, et à la co-infection par le VIH. En effet, l'apparition de l'infection par le VIH s'est accompagnée d'une augmentation de l'incidence de pathologies infectieuses dites opportunistes, liées à l'immunodépression. Parmi elles, la

tuberculose apparaît comme un problème majeur de santé publique. Selon les estimations de l’OMS, il y avait, en 1992, 10 à 12 millions de personnes infectées par le VIH dans le monde dont 4 millions co-infectées par le bacille de Koch [109]. En l’absence d’intervention thérapeutique, environ 10% des sujets infectés développent une tuberculose maladie, et parmi les malades non traités près de 50% vont décéder de tuberculose après avoir contaminé de nombreuses personnes. En 1993, la mortalité mondiale annuelle par tuberculose était estimée entre 2 et 3 millions de décès avec une grande prévalence pour les pays en voie de développement. Il convient donc de séparer assez nettement à l’heure actuelle les pays à haute prévalence de tuberculose (pays en voie de développement), des pays à basse prévalence (pays industrialisés). En effet, dans les premiers, le recensement et le traitement des sujets sont difficiles et l’objectif principal est d’identifier et de traiter les sujets contagieux ayant un examen direct positif, donc qui disséminent la maladie. En revanche, dans les pays à basse prévalence, l’éradication de la tuberculose constitue un objectif prioritaire [36].

V.B - La tuberculose aux Etats-unis

Aux Etats-unis, la tendance régulière à la diminution de l’incidence de la tuberculose a brusquement cessé en 1985. Jusqu’en 1992, le nombre de cas déclarés annuellement a augmenté de 20%. Cette inversion de tendance a affecté préférentiellement certaines régions (grandes métropoles) en particulier sous forme de foyers épidémiques : augmentation de 84,4% dans l’état de New-York, de 54,2% en Californie et de 32,7% au Texas. Les populations les plus exposées étaient les personnes de moins de 45 ans, les noirs non hispaniques et les migrants en provenance d’Asie et du Pacifique. Par ailleurs, par rapport à 1985, le nombre de cas rapporté a augmenté dans tous les groupes d’âge, sauf dans les tranches de plus de 65 ans. La plus forte augmentation est observée dans le groupe 25-44 ans (38%) (Tableau IV page 34).

Tableau IV : Taux d'incidence pour 100 000 habitants par âge et par ethnie des cas déclarés de tuberculose aux Etats-Unis en 1985 et 1992 [33].

Caractéristiques démographiques	Incidence		Augmentation relative (%)
	1985	1992	
Tranches d'âge (ans)			
0-4	4,4	5,5	+ 25
5-14	1,4	1,7	+ 21
15-24	4,2	5,5	+ 31
25-44	9,2	12,7	+ 38
45-64	13,7	13,4	- 2
≥ 65	22,3	18,7	-16
Race/Ethnie			
Blanc, non hispanique	4,5	4,0	- 11
Noir, non hispanique	23,0	31,7	+ 38
Hispanique	21,4	22,4	+ 5
Asie/Pacifique	41,6	46,6	+ 12
Indiens, Alaska	18,9	16,3	- 13
Ensemble des cas	9,3	10,5	+ 13

Cet accroissement a été attribué à de nombreux facteurs, parmi lesquels la dégradation des conditions socio-économiques, la politique de santé restrictive à l'égard de la lutte antituberculeuse (annulation en 1980 par l'administration Reagan de tout support financier), la multiplication des échanges et des mouvements de populations avec des pays à haute prévalence, l'apparition de l'infection VIH et de la multi-résistance aux antituberculeux de *M. tuberculosis*. En effet, parmi l'augmentation des cas de tuberculose relevés entre 1985 et 1992, 60% concernaient des patients nés à l'étranger et 50 à 57% touchaient des personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine [28]. Lors d'une enquête nationale réalisée en 1991 [22], la résistance à au moins un antituberculeux était de 14,2%. La résistance à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine était présente pour 3,5% des souches. Cependant, l'analyse de la résistance à New York [56] a permis de constater que 23%

des souches étaient résistantes à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine; la résistance secondaire à ces deux antituberculeux était de 30% et la résistance primaire de 7%. Cette dernière était de 3% en 1984, d'où une progression statistiquement significative de 4% qui reflète l'augmentation de la transmission des souches multi-résistantes touchant principalement les patients infectés par le VIH et les toxicomanes [14].

Par ailleurs, cette évolution inquiétante de la tuberculose s'est accompagnée d'une augmentation des décès, observée essentiellement chez les adultes jeunes (20 à 49 ans) et d'une manière prédominante dans les régions à incidence élevée de SIDA [25].

A partir de 1993, l'augmentation de l'incidence de la tuberculose s'est interrompue et une diminution du nombre de cas déclarés annuellement est constatée depuis 1994, parallèlement à l'amélioration des conditions socio-économiques et à une meilleure prise en charge sociale, sanitaire et thérapeutique des malades.

V.C - La tuberculose en Europe

Avant 1996, les différences de définition des cas, de systèmes de déclaration et de collecte des informations entre les différents pays européens rendaient difficiles les comparaisons et gênaient l'analyse des tendances dans le temps. Une étude réalisée en 1992 par l'OMS montrait qu'entre 1974 et 1990, l'incidence de la tuberculose baissait dans 4 pays (Allemagne, Belgique, Espagne, Finlande), se stabilisait dans 3 pays (Royaume-Uni, Suède et France) et augmentait dans 7 pays (Autriche, Danemark, Irlande, Italie, Norvège, Pays-Bas et Suisse) [110].

En 1996, la création du projet Euro TB pour la surveillance de la tuberculose a permis de recueillir et d'analyser des données sur les cas de tuberculose déclarés dans la région Europe de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

En 1996, 315 892 cas de tuberculose ont été déclarés dans 50 pays européens, soit la totalité des pays de la région Europe de l'OMS à l'exception de la Turquie. Ainsi, 21 pays à faible incidence (inférieur à 20 cas pour 100 000 habitants) ont été

définis, tous situés en Europe de l'ouest sauf la république Tchèque et Israël. Par ailleurs, vingt-neuf pays à haute incidence ont été identifiés, tous situés en Europe de l'est à l'exception de l'Espagne et du Portugal. Entre 1995 et 1996, l'incidence de la tuberculose a baissé dans 18 pays (essentiellement les pays d'Europe de l'ouest et du nord), s'est stabilisée dans 5 pays (Grèce, Hongrie, Israël, Italie, Royaume-Uni) et a augmenté dans 24 pays (Danemark, Luxembourg, Pays-Bas, républiques de l'ancienne URSS). En 1996, l'incidence de la tuberculose par âge et sexe était plus élevée chez les hommes ou les femmes âgés de 65 ans et plus dans les pays à faible incidence, et chez les hommes âgés de 35 à 54 ans et les femmes âgées de 25 à 34 ans dans les pays à haute incidence [3, 120].

L'augmentation importante des taux de tuberculose dans certains pays (notamment les républiques de l'ancienne URSS) est liée à l'aggravation de leur situation économique et politique entraînant une détérioration de la lutte antituberculeuse et une prévalence élevée de multi-résistance aux antituberculeux [99.]. Par ailleurs, Les migrations en provenance de pays à haute prévalence ont influencé la situation épidémiologique de certains pays d'Europe occidentale. En effet, aux Pays-Bas où l'incidence de la tuberculose était en hausse en 1996, les patients d'origine étrangère regroupaient 49% des cas. Ce pourcentage était de 58% au Danemark et de 64% au Luxembourg.

V.D - La tuberculose en France

Pour évaluer l'incidence de la tuberculose en France, la direction générale de la santé dispose depuis 1964 de la déclaration obligatoire (DO) que doivent effectuer les médecins qui ont porté le diagnostic de tuberculose chez un patient. Il s'agit de données brutes, non validées, dont la qualité et la sous-déclaration sont probablement variables selon les départements. Toutefois, ces données sont considérées comme un bon indicateur de tendance.

V.D.1 - Evolution entre 1970 et 1989

L'évolution du nombre de déclarations de tuberculose entre 1970 et 1989 montrait une diminution annuelle de l'incidence de la maladie de l'ordre de 4% (31248 cas en 1970 contre 8953 cas en 1989). L'incidence de la tuberculose en 1989 était de 15 pour 100 000 habitants (figure 2). Par ailleurs, le nombre de décès par tuberculose reculait dans les mêmes proportions (4044 décès en 1970 contre 1024 en 1989) [107] (figure 2). Mais cette évolution n'était pas homogène selon les régions. En Ile de France, après une diminution régulière jusqu'en 1988, l'incidence de la tuberculose est brutalement remontée en 1989 à un taux supérieur à celui de 1986. Cette augmentation touchait principalement les hommes jeunes de 25 à 44 ans et l'épidémie de SIDA en a été considérée comme le principal facteur [107]. En 1989, les 3/5 des cas de tuberculose concernaient le sexe masculin et on notait une plus forte incidence de la maladie chez les étrangers (60,4 pour 100 000 habitants) que chez les français (11,4 pour 100 000 habitants) [72].

V.D.2 - Evolution entre 1990 et 1993

Entre 1990 et 1991, l'incidence de la tuberculose s'est stabilisée à 15 pour 100.000 habitants alors qu'elle diminuait de façon régulière depuis de nombreuses années [74]. Le nombre de cas a brusquement augmenté de 6,6% en 1992 et de 8,3% en 1993, l'incidence de la maladie passant ainsi de 15,9 en 1992 à 17 pour 100 000 habitants en 1993 [68, 75] (figure 2 page 38). Contrairement au taux d'incidence, le taux de mortalité tous âges confondus poursuit une décroissance régulière (figure 2 page 38). Pourtant, en 1992, une tendance à la hausse des décès par tuberculose est apparue chez les hommes de moins de 40 ans, en rapport certainement avec l'épidémie de SIDA et avec l'augmentation du chômage touchant principalement cette tranche d'âge [24, 73]. Mais si elle semble s'inverser dans l'ensemble du territoire national, l'évolution de l'incidence de la tuberculose au niveau régional est très variable (figure 3, page 38).

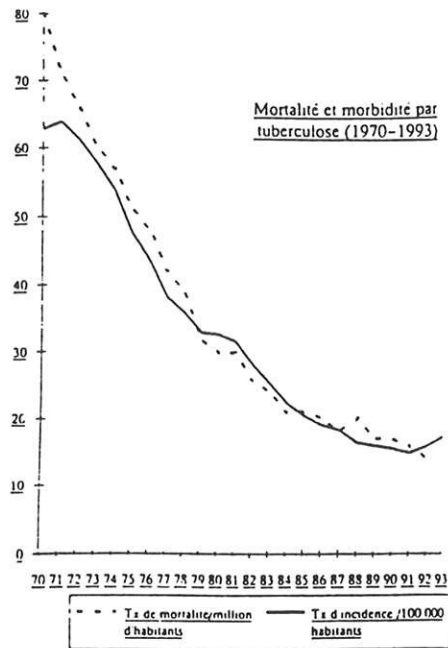


Figure 2 : Mortalité et morbidité par tuberculose de 1970 à 1993 [68].

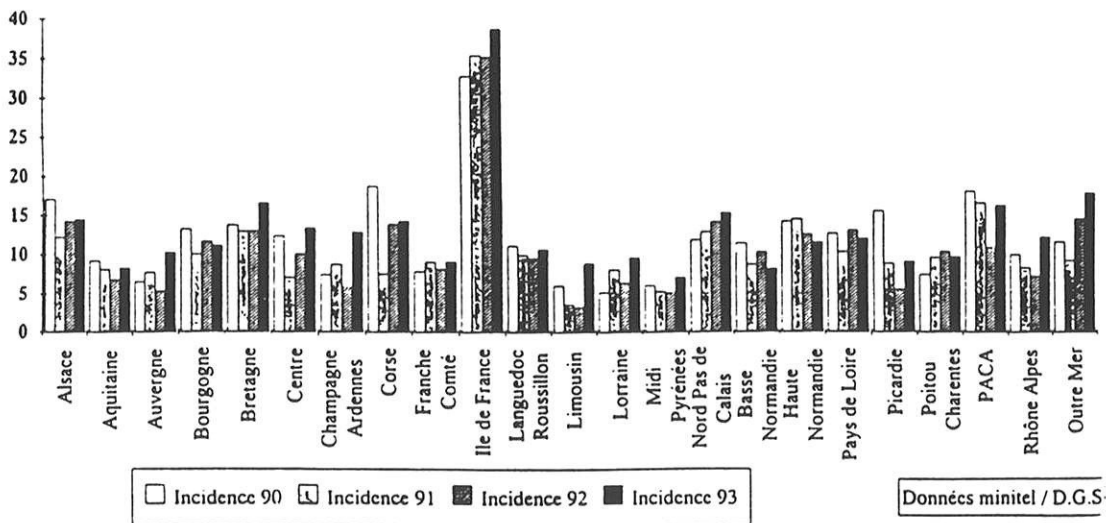


Figure 3 : Evolution des taux d'incidence régionaux de la tuberculose entre 1990 et 1993 [68].

Ainsi certaines régions sont en augmentation depuis 1990 (Ile-de-France, Nord pas de Calais, Poitou-Charentes et Outre-Mer), alors que d'autres voient leur taux régulièrement diminuer (Picardie, Rhône-Alpes, Aquitaine) [75]. Par ailleurs, le nombre de séropositifs pour le VIH parmi les cas déclarés est resté relativement stable entre 1992 et 1993 (environ 16%). Mais là encore, des variations régionales existent puisque les taux les plus forts se retrouvent en Ile-de-France, Provinces-Alpes-Côte d'Azur, Corse et départements d'Outre-Mer ce qui est cohérent avec la fréquence de SIDA dans ces régions [24, 68]. En 1992, Schwoebel V. et al. [119] ont publié une étude sur l'incidence de la tuberculose à bacilles multi-résistants. Les résultats de ce travail ont montré que le taux de multi-résistance en France est faible (0,5%) sans variation régionale importante. Les auteurs ont noté une résistance à d'autres antibiotiques que l'isoniazide et la rifampicine dans près des 2/3 des cas, principalement à la streptomycine (60% des cas) ou à l'éthambutol (35%). Par ailleurs, les cas de multi-résistance secondaire, c'est à dire acquise après un ou plusieurs traitements antituberculeux, sont en cause dans 77% des cas. Enfin, le fait que plus d'1/3 des malades porteurs de multi-résistances primaires soient séropositifs souligne la très grande réceptivité de ces sujets vis à vis des bacilles multi-résistants ou un développement plus fréquent de résistance sur ce terrain.

V.D.3 - Evolution depuis 1994

A partir de 1994, les cas de tuberculose en France ont à nouveau diminué avec un taux d'incidence de la maladie de 16,8 en 1994, 14,6 en 1995 et 13,1 pour 100 000 habitants en 1996 [45, 72]. Le taux de mortalité a, quant à lui, poursuivi sa baisse pour se situer en 1996 au environ 12 pour 1 million d'habitants. Par ailleurs et pour la première fois, le taux d'incidence de la maladie a également diminué dans les régions où il était en constante augmentation depuis 1990. Ainsi, la région Ile-de-France a vu son taux d'incidence passé de 38 pour 100 000 en 1993 à 31,7 pour 100 000 habitants en 1996. Cette baisse est également sensible chez les patients séropositifs pour le VIH

puisqu'en 1996, la séroprévalence du VIH parmi les cas de tuberculose déclarés était de 5,7%, ce pourcentage étant de 10% en 1994 et 1995 [45, 72]. Ceci semble être en partie lié aux progrès des thérapeutiques et de la prise en charge des patients infectés par le VIH.

V.D.4 - Evolution dans le Limousin

L'incidence de la tuberculose dans le Limousin a toujours été parmi une des plus faibles de France. En 1990, le taux de tuberculose déclaré était d'environ 6,0 pour 100 000 habitants alors qu'il était de 15 pour 100 000 habitants au niveau national. Par ailleurs, l'évolution de l'incidence de la maladie depuis 1990 n'a pas suivi la tendance nationale. En effet, alors qu'en France, 1992 se caractérisait par une sensible augmentation des cas de tuberculose, le Limousin connaissait son plus faible taux depuis deux ans (environ 4 pour 100 000 habitants) [72] (figure 3, page 38). Ce n'est qu'en 1993 que la région a connu une brusque augmentation de l'incidence de la maladie avec un taux à 9,0 pour 100 000 habitants. Depuis, le taux s'est stabilisé aux environs de 8,0 pour 100 000 habitants [45]. Dans le même temps, contrairement au Limousin, on notait au niveau national une diminution très sensible de l'incidence de la tuberculose.

VI - Les marqueurs moléculaires de l'épidémiologie

VI.A - Le génome de *M. tuberculosis*

Récemment, Cole et al. [38] ont séquencé la totalité du génome de la souche de référence *M. tuberculosis* H37Rv. Ce génome est constitué de 4.411.529 paires de bases et de 3.924 gènes. Ils ont par ailleurs trouvé un pourcentage élevé en bases GC (65,6%).

Ces auteurs ont identifié 50 gènes codant pour des molécules d'ARN : 45 pour des ARNt, 1 pour un ARN 10S, 1 pour une RNase P et 3 pour l'unique opéron d'ARN ribosomal que possède cette souche. Aucun ARN 4,5S n'a été retrouvé.

Par ailleurs, ce génome possède de nombreuses séquences d'insertion. Seize copies de la séquence IS6110 ont été identifiées ainsi que 6 copies de IS1081 dont une tronquée. De plus, 32 autres séquences d'insertion différentes ont été décrites, dont certaines étaient jusqu'alors inconnues, ainsi qu'un ensemble de séquences répétitives (13E12) représentant des éléments mobiles du génome. Les nouvelles séquences d'insertion appartiennent majoritairement aux familles IS3 et IS256. Seules 6 d'entre elles définissent un nouveau groupe. La plupart des séquences d'insertion de *M. tuberculosis* H37Rv sont situées entre les gènes ou dans des régions non codantes, souvent près des gènes codant pour les ARNt. Les auteurs ont remarqué que les séquences d'insertion sont fréquemment localisées dans une région contenant des DR (direct repeat) suggérant que cette région constitue un site préférentiel d'intégration des séquences d'insertion. Deux prophages de 10 kb de longueur ont été décelés dans ce génome, ϕ Rv1 et ϕ Rv2. Le site d'insertion de ϕ Rv1 est intégré dans une région correspondant à la localisation des séquences répétitives 13E12.

Par ailleurs, Cole et al. [38] ont constaté qu'une majeure partie du génome est dédiée à la production d'enzymes intervenant dans la lipogénèse et la lipolyse. Dix pour cent de la capacité de codage du génome concernent à deux familles de protéines riches en glycine, les familles PE et PPE, constituées de multiples copies de séquences répétitives de bases : ce sont les séquences PGRS (polymorphic GC rich sequences) pour la famille PE et les séquences MPTR (major polymorphic tandem repeats) pour la famille PPE. Les membres de la famille PE possèdent une séquence très conservée de 110 acides aminés en position N-terminale, riche en motifs Pro-Glu à l'origine du nom de cette famille. L'extrémité N-terminale est suivie d'une extrémité C-terminale très variable en taille et nombre de copies de séquence PGRS. Ceux de la famille PPE sont caractérisés par une extrémité N-terminale très conservée de 180 acides aminés, riche en motifs Pro-Pro-Glu à l'origine du nom de cette famille. L'extrémité N-terminale est suivie d'une extrémité C-terminale elle aussi variable en

nombre de copies de séquences MPTR. Ces deux familles représentent donc une source importante de variation antigénique.

VI.B - Les différentes techniques de marquage épidémiologique pour

M. tuberculosis

Par définition, le marquage épidémiologique est l'étude des caractéristiques variables à l'intérieur d'une même espèce. Jusqu'au début des années 90, la plupart des travaux épidémiologiques étaient basés sur des marqueurs phénotypiques. L'épidémiologie moléculaire était réservée à de rares laboratoires spécialisés, autour d'une seule espèce ou d'une seule technique. Grâce à la recherche et aux progrès considérables réalisés dans le domaine de la biologie moléculaire, la plupart des laboratoires de bactériologie ont appliqué ces méthodes aux études épidémiologiques. En effet, avant d'utiliser une technique de marquage épidémiologique, il est nécessaire d'apprécier le polymorphisme génétique de l'espèce bactérienne considérée. Si celui-ci est suffisamment important par cette technique, il est alors possible de l'utiliser pour détecter la présence d'une souche épidémique et mettre en évidence le réservoir de micro-organismes. De même, il sera possible de vérifier l'identité de souches isolées de patients différents ou d'un même patient mais à des sites ou des moments différents.

Dans ce chapitre, nous passerons en revue les différentes techniques applicables, dans un laboratoire de bactériologie clinique, à l'étude épidémiologique des mycobactéries de la tuberculose. Nous distinguerons classiquement les marqueurs phénotypiques des marqueurs génotypiques.

VI.B.1 - Les marqueurs phénotypiques :

Les marqueurs phénotypiques ont permis de réaliser les premières études épidémiologiques des infections à mycobactéries. Des mycobactériophages ont été utilisés pour typer les espèces du groupe *tuberculosis*. Ces mycobactériophages sont des virus capables de se fixer sur des récepteurs spécifiques, puis d'injecter leur ADN

à l'intérieur des mycobactéries qui vont ensuite synthétiser de multiples copies de ces mêmes virus. La multiplication du bactériophage va entraîner la lyse de la bactérie. On peut ainsi classer les différentes souches de *M. tuberculosis* par leur sensibilité ou leur résistance aux mycobactériophages. Cette classification s'appelle la lysotypie. Le premier système proposé par Bates et Fitzhugh [9] distinguait 3 lysotypes, A, B et C. Ultérieurement, Bates et Mitchinson [10] discernaient dans le lysotype A un lysotype intermédiaire I. Plus récemment, l'adjonction de nouveaux bactériophages a permis d'établir des subdivisions et de définir de nouveaux types. L'étude réalisée par Clavel-Sérès S. et Clément F. en 1984 [37] sur 422 souches de *M. tuberculosis*, isolées chez des malades d'origines géographiques différentes, a montré qu'il était possible d'utiliser cette technique pour détecter la propagation de la tuberculose d'un type de population à un autre. Ainsi, ils ont montré que les bacilles isolés chez des immigrants atteints de tuberculose présentaient le plus souvent la répartition lysotypique des souches de leur pays d'origine.

Un autre marqueur phénotypique consiste à étudier les profils de sensibilité de *M. tuberculosis* aux agents antituberculeux. Comme nous l'avons vu précédemment, des mutations du génome du bacille de Koch ont entraîné l'apparition de résistances à un ou plusieurs antibiotiques. Il a donc été possible de classer les différentes souches de *M. tuberculosis* suivant leur sensibilité ou leur résistance aux différents agents antituberculeux ainsi que par rapport à leur niveau de résistance à ces mêmes agents.

Mais ces marqueurs phénotypiques présentent comme principal défaut d'être fortement influencés par les facteurs environnementaux qui exercent sur eux une pression sélective. Ainsi, certains caractères sont exprimés ou non en fonction du milieu de culture sur lequel la mycobactérie s'est développée. De la même façon, la résistance aux antituberculeux est largement influencée par la présence des antibiotiques dans le milieu où vit la bactérie. Ainsi les souches épidémiques

hospitalières qui ont subi la pression de sélection ont tendance à être plus résistantes que le clone à l'origine de l'épidémie. Des souches provenant pourtant d'un même clone de départ peuvent développer des profils antibiotiques différents. De la même façon, des souches différentes à l'origine peuvent développer des profils antibiotiques identiques.

Les résultats des études épidémiologiques basées sur les marqueurs phénotypiques sont donc très aléatoires. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'analyser le génome des mycobactéries et de développer des techniques épidémiologiques utilisant des marqueurs génotypiques sujet à moins de pression de sélection.

VI.B.2 - Les marqueurs génotypiques

Les méthodes utilisant ces marqueurs sont basées sur l'analyse de l'ADN total chromosomique ou extra-chromosomique. Initialement utilisées dans les laboratoires de recherche, ces techniques sont de plus en plus exploitées en routine [39, 87].

Un des marqueurs génotypiques couramment utilisé pour les études épidémiologiques de certaines bactéries (entérobactéries, *Pseudomonas*, vibrions, *Staphylococcus*) est le profil plasmidique. Il permet de mettre en évidence le nombre de plasmides hébergés par la bactérie ainsi que leur taille. *M. tuberculosis* ne possédant aucun plasmide dans son génome, ce marqueur ne sera d'aucune utilité dans les études épidémiologiques des mycobactéries de la tuberculose.

- L'analyse de restriction par des endonucléases

L'analyse de restriction par des endonucléases (REA) a été une des premières méthodes de typage moléculaire utilisée sur les mycobactéries. Le principe repose sur l'utilisation d'endonucléases aux sites de restriction relativement fréquents, qui génèrent des centaines de fragments de 0,5 à 50 kb séparés par électrophorèse en gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium. Chaque souche de mycobactérie possède un profil de bandes qui lui est propre. Ainsi la composition des profils

obtenus permet de comparer les différentes souches entre elles. Mais l'importance du nombre de fragments obtenus rend la lecture et l'interprétation des profils après restriction très complexe. De plus, certaines bandes peuvent se chevaucher, rendant impossible une comparaison objective des profils étudiés [39, 87].

- L'électrophorèse en champ pulsé

Pour limiter le nombre de fragments et optimiser la lecture des profils, il est possible de réaliser une digestion avec des endonucléases coupant peu l'ADN, puis d'effectuer une électrophorèse en champ pulsé (PGFE) permettant de séparer les fragments de grande taille obtenus après digestion. Cette technique a d'abord été mise au point pour l'étude des génomes eucaryotes. L'ADN à étudier doit être indemne de toute coupure physique ou enzymatique avant la digestion par l'enzyme de restriction. L'extraction est une étape délicate puisqu'il est nécessaire d'inclure les bactéries dans des petits blocs d'agarose avant de procéder à leur lyse et à l'extraction de l'ADN. Les enzymes de restriction sont choisies de manière à effectuer un nombre limité de coupures. La grande taille des fragments obtenus après restriction nécessite une technique spécifique de migration. En effet, une électrophorèse standard en gel d'agarose ne pourrait séparer ces grands fragments d'ADN. Pour palier à ce manque de résolution, on utilise un champ électrique variable (pulse). Il existe différentes techniques d'électrophorèse en champ pulsé dont les plus utilisées sont la "field inverted gel electrophoresis" (FIGE) et la "contour-clamped homogeneous electric field" (CHEF). L'ensemble des bandes obtenu pour une souche est appelé pulsotype. Les critères d'interprétation des profils classent les souches en 4 catégories : indistinguables, très relevées, relevées et différentes en fonction du nombre de fragments qui diffère du profil de la souche de référence ou de la souche épidémique.

Cette technique, considérée comme très discriminante, est utilisée pour étudier de très nombreuses espèces bactériennes [5, 11, 118]. Elle a également été utilisée dans l'étude des espèces du genre *Mycobacterium*, notamment *M. tuberculosis* [154].

- Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction

En dehors du champ pulsé, l'autre méthode permettant une réduction du nombre de fragments d'ADN visualisés après restriction, consiste à étudier le polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP) après hybridation. La technique RFLP est réalisée à l'aide d'une digestion de l'ADN par une enzyme de restriction suivie d'une électrophorèse en gel d'agarose du produit de digestion. Les profils de restriction sont ensuite transférés sur une membrane de nylon par la méthode de Southern puis la membrane est hybridée avec une sonde dirigée contre des séquences du génome de *M. tuberculosis* présentant une certaine variabilité. Après autoradiographie des membranes, un profil de bandes caractéristique de l'ADN étudié est obtenu (figure 4, page 47). L'utilisation de logiciels sophistiqués permet ensuite d'étudier la structure génétique de la population bactérienne et la distance génétique existant entre les différentes souches. Une liaison épidémiologique peut ainsi être établie entre certaines souches de la population étudiée.

La ribotypie est une méthode de typage de souches bactériennes qui consiste en l'étude des fragments de restriction d'ADN génomique codant pour les ARN ribosomiaux (ARNr) 16S et 23S. Il existe de nombreuses portions d'ARNr dont la séquence est identique chez tous les êtres vivants et, plus encore, à toutes les bactéries. La conséquence est qu'un ARN 16S ou 23S d'une bactérie pourra s'hybrider avec le gène correspondant (après dénaturation de l'ADN) de n'importe quelle bactérie même phlogénétiquement éloignée[63]. Chez les bactéries les gènes codant pour les ARNr sont organisés en opérons (*rrn*). Mais les bactéries appartenant au genre *Mycobacterium* ne possèdent qu'un ou deux opérons, rendant le pouvoir discriminant de cette méthode très faible. Le ribotypage ne peut donc pas être utilisé dans les études épidémiologiques des souches de *Mycobacterium tuberculosis* [17].

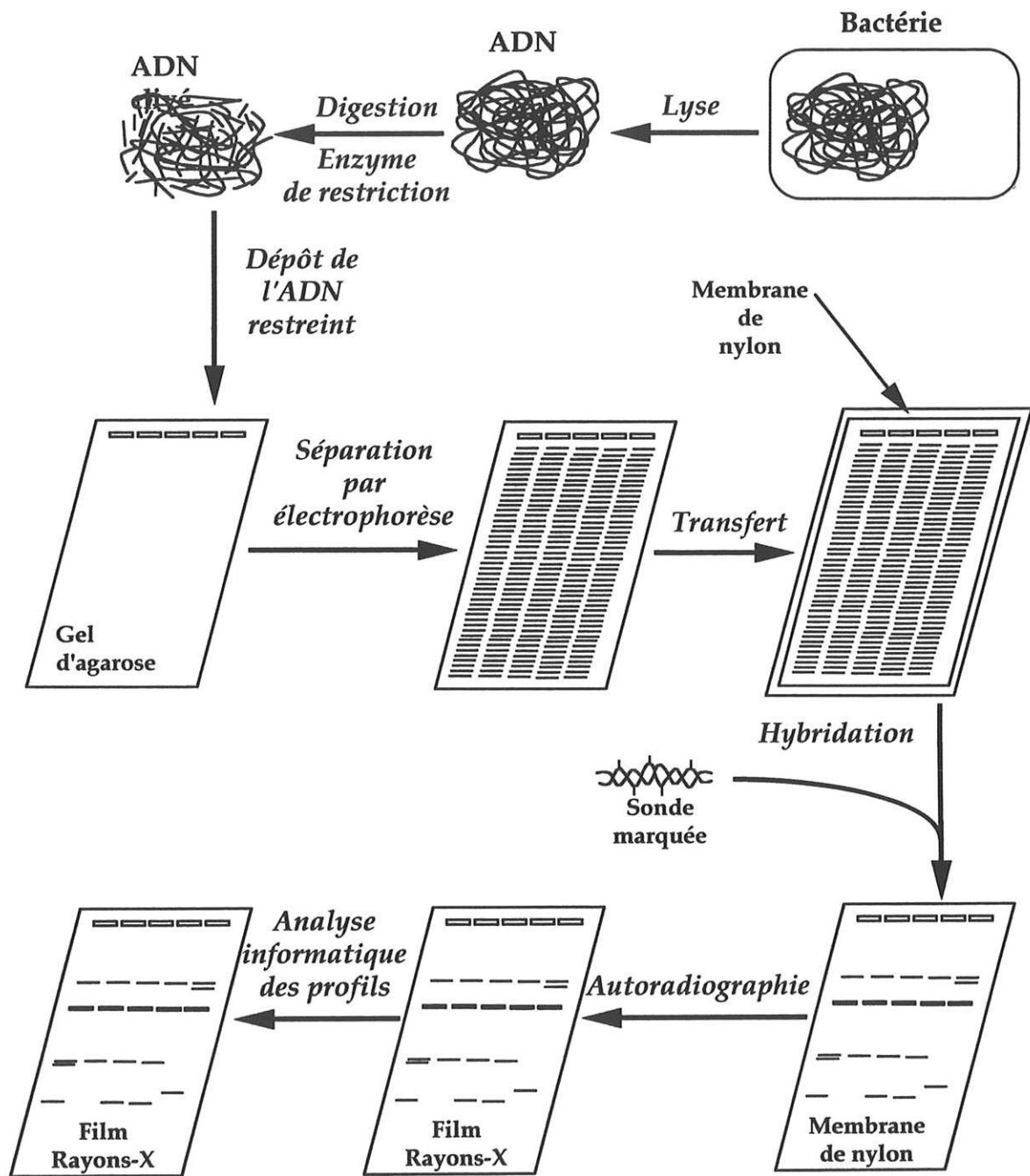


Figure 4 : Principe général des méthodes d'étude du polymorphisme de restriction après hybridation avec une sonde.

Deux types de séquences génomiques permettent de visualiser en RFLP le polymorphisme des souches de *M. tuberculosis* : les séquences d'insertion (IS) [90, 134.] et des séquences d'ADN répétitives courtes [69].

La mise en évidence de polymorphisme de restriction en utilisant la séquence d'insertion IS6110 est la méthode de référence pour le marquage épidémiologique de *M. tuberculosis*. IS6110 appartient à la famille IS3 des séquences d'insertion découverte à l'origine dans le génome d'*Escherichia coli* et de *Shigella*. IS6110 est une séquence d'insertion de 1355 pb de long et est spécifique du complexe *M. tuberculosis* [134, 135]. La séquence IS1081 de 1324 pb de long a été découverte par Collins et Stephens [40] et a été également utilisée pour le marquage épidémiologique des mycobactéries du complexe *tuberculosis*.

En dehors des séquences d'insertion, il existe, chez les mycobactéries du groupe *tuberculosis*, une autre famille d'éléments répétitifs permettant la différenciation par RFLP de plusieurs souches. Il s'agit de courtes séquences d'ADN répétées de 3 à 36 pb. Parmi elles, les séquences DR (direct repeat) de 36 pb, sont disposées en tandem en nombre de 10 à 50 et séparées par des séquences non répétitives de 36 à 41 bp appelées "spacer" dont la composition varie selon les souches [69]. Cette région est donc très polymorphique en taille et en composition parmi les espèces du complexe *tuberculosis* [64].

Il existe également des séquences répétées riches en bases GC, présentes en de multiples copies sur le chromosome de *M. tuberculosis* et d'autres espèces de mycobactéries (*M. kansasii*, *M. gastri*, *M. szulgae*) : ce sont les PGRS (polymorphic GC rich sequences) présentes dans le plasmide recombinant pTBN12 décrit par Ross et al. [114]. La séquence PGRS a également été utilisée dans les études épidémiologiques sur les mycobactéries [105, 114]. Par ailleurs, Dorant et al [48] ont décrit dans le génome des mycobactéries du groupe *tuberculosis*, des séquences MPTR (major polymorphic tandem repeats) constituées de multiples répétitions de 10

pb (5' - GCC GGT GTT G - 3') séparées par des séquences non répétitives de 5 paires de bases. L'organisation des séquences MPTR n'est donc pas sans rappeler celle des séquences PGRS. Par ailleurs, ces deux éléments répétitifs sont présents dans le génome des mycobactéries du groupe *tuberculosis*. Il a ainsi été suggéré [123, 138] qu'une même famille de séquences répétitives a été à l'origine de ces deux éléments.

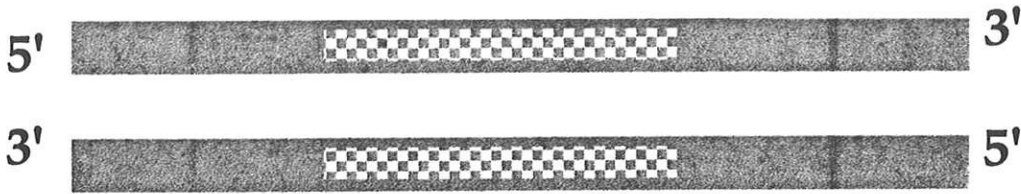
Enfin, il existe des petits polynucléotides répétés, (GTG)₅, présents en un grand nombre de copies dans le génome des mycobactéries. Ces polynucléotides ont été également utilisés comme marqueur génétique pour les mycobactéries du groupe *tuberculosis* [148].

- Méthodes de typage basées sur la PCR



La PCR a été décrite par Saïki et al. [115]. Cette méthode repose sur la synthèse d'ADN par une enzyme, la *Taq* polymérase, à partir d'amorces oligonucléotidiques hybridant avec les extrémités opposées des deux brins du fragment d'ADN à amplifier. La PCR consiste en la réalisation de plusieurs cycles comportant chacun une étape de dénaturation de l'ADN, une étape d'hybridation des amorces et une étape d'extension des amorces par la *Taq* polymérase. En fin de réaction, une amplification des séquences oligonucléotidiques situées entre les deux amorces est réalisée (figure 5, page 50).

Cible 

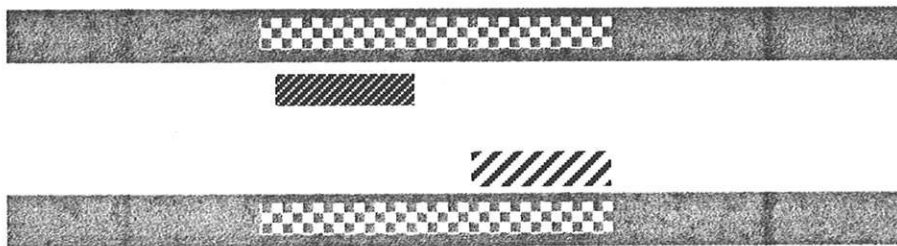
1- Dénaturation



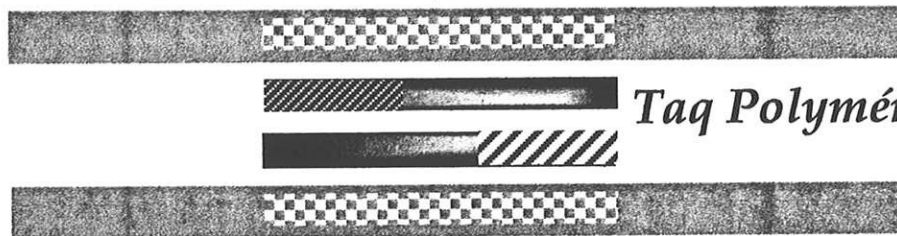
2- Hybridation

A₁   A₂

2 amorces



3- Elongation des amorces



30 À 35 CYCLES

Figure 5 : Représentation schématique d'un cycle d'amplification lors de la réaction de PCR.

De nombreuses méthodes basées sur l'amplification par PCR de séquence d'ADN ont été décrites pour typer les mycobactéries. Parmi elles, des techniques d'amplification aléatoire comme la méthode Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) [149.], Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR) [147] ou DNA Amplification Fingerprinting (DAF) [26] ont été utilisées dans le marquage épidémiologique des mycobactéries. Ces techniques ont en commun l'utilisation d'une seule amorce oligonucléotidique choisie arbitrairement. A température suffisamment basse, l'amorce peut s'apparier de façon plus ou moins spécifique en différents endroits des deux brins d'ADN. Plus la température d'hybridation est basse et plus le nombre d'appariements non spécifiques (misappariements) est important. Seules les amorces situées sur des brins opposés et suffisamment proches (moins de 5000 bases) donneront un produit d'amplification. Finalement, nous obtenons des produits d'amplification de longueur variable qui, après séparation électrophorétique, donnent des profils de bandes caractéristiques de la souche. Contrairement aux autres bactéries, l'application de la technique RAPD aux mycobactéries n'utilise pas d'amorces prises totalement au hasard. Ainsi, parmi les amorces utilisées dans la littérature [85], INS 2 correspond à la séquence comprise entre la 856^{ème} et la 875^{ème} base [69] de la séquence répétitive IS986 décrite par Mc Adam et al. [90]. L'amorce IS 986 BK a également été identifiée au sein de la séquence répétitive IS986 [69]. Cette séquence répétitive diffère de quelques paires de bases de la séquence IS6110 et Van Embden J.D.A. [138] considère ces deux éléments comme identiques. Par ailleurs, CAR 2 correspond aux deux séquences inverses des extrémités 3' et 5' de l'élément répétitif IS6110 [98].

Des méthodes PCR faisant également intervenir des éléments répétitifs du génome des mycobactéries ont été décrites. Ross et Dwyer [113] ont utilisé des amorces complémentaires des extrémités de IS6110 et ont ainsi amplifié les séquences situées entre IS6110 et des sites non spécifiques du génome (rep-PCR pour repetitive sequence based PCR). D'autres ont utilisé deux amorces spécifiques

d'éléments répétitifs du génome des mycobactéries. C'est le cas de Friedman et al. [57] qui emploient une amorce correspondant à IS6110 et une correspondant à PGRS (DRE-PCR pour double repetitive element PCR), de Sechi et al. [121] faisant intervenir IS6110 et (GTG)₅ de Plikaytis et al. [104] avec IS6110 et MPTR (IS6110-ampli-printing) et de Patel et al. [101] avec des amorces internes à la séquence IS6110.

D'autres méthodes plus complexes ont été développées comme la Mixed-Linker PCR [67.] et la ligation-mediated PCR (LMPCR) dans laquelle ce sont les séquences comprises entre IS6110 et un site de restriction qui sont amplifiées [100, 106]. Enfin, Groenen et al. [64] ont défini la DVR-PCR (direct variable repeat PCR). Cette méthode est basée sur l'amplification par PCR des séquences DVR (séquence DR associée à ses "spacers" adjacents) du locus DR des mycobactéries du groupe *tuberculosis*. Ce locus est unique dans le génome de ces mycobactéries et est constitué, de séquences DR identiques séparées par des "spacers". Chaque "spacer" inter-DR a une composition unique en paires de bases. Les loci DR de plusieurs souches ont été comparés et il a été observé que l'ordre des "spacers" était conservé d'une souche à l'autre. Le polymorphisme du locus DR est associé à des délétions ou des insertions d'une ou plusieurs séquences DR et de ses "spacers" adjacents (séquence DVR). La DVR-PCR utilise 4 amorces avec une base supplémentaire (A, C, G ou T) à leur extrémité 3'. Ces amorces correspondent à la séquence DR et la base supplémentaire est complémentaire de l'extrémité 5' du "spacer" adjacent. Ainsi, à l'aide de la DVR-PCR, les différentes séquences DVR du locus DR seront amplifiées et les profils de bandes obtenus permettront de comparer les souches bactériennes.

Une dernière méthode de typage, proche de la DVR-PCR, permet la différenciation des souches de mycobactéries du groupe *tuberculosis* : le spoligotypage.

- Typage par oligonucléotides spécifiques de séquence
(spoligotypage)

Cette méthode, développée par Kamerbeek et al. [79] est basée sur l'amplification par PCR du locus DR des mycobactéries du groupe *tuberculosis*. Cette amplification est réalisée à l'aide de deux amorces a et b spécifiques des deux extrémités des séquences DR (Figure 6, ci-dessous). Les produits de PCR obtenus sont de longueur variable. Ces produits sont alors déposés sur une membrane sur laquelle ont été préalablement fixés 43 oligonucléotides de synthèse spécifiques de 37 séquences inter-DR de *M. tuberculosis* H37Rv et de 6 séquences inter-DR de *M. bovis* BCG. Ainsi, par la méthode de spoligotypage, la présence ou l'absence dans le locus DR de 43 inter-DR de séquence connue peut être détectée par hybridation des séquences inter-DR amplifiées par PCR avec les oligonucléotides fixés sur la membrane. Cette hybridation sera visualisée par autoradiographie.

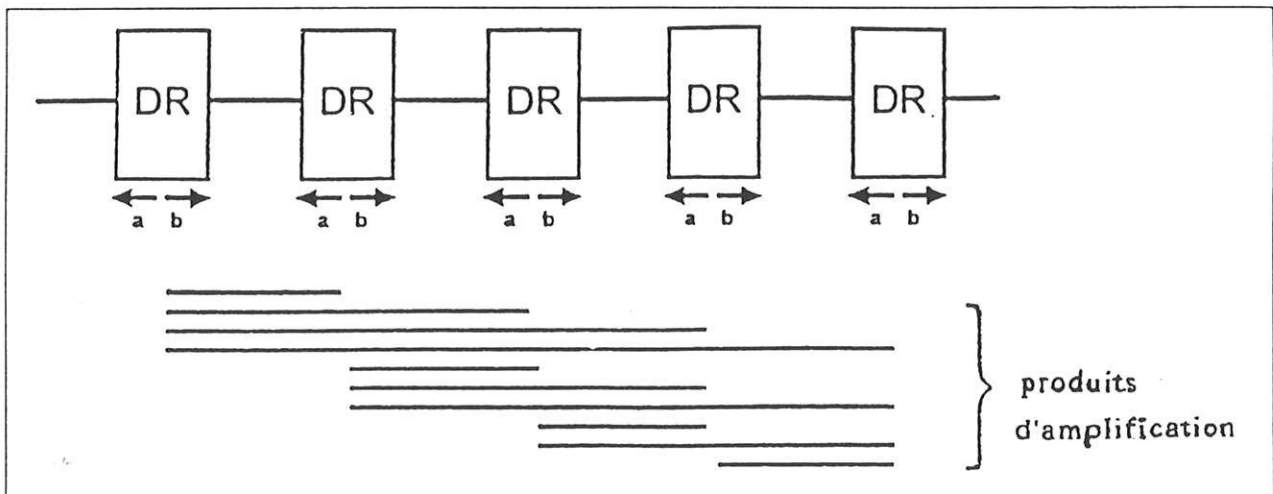


Figure 6 : Principe de l'amplification de 5 séquences DR contigües par les amorces a et b [46].

reste cependant très stable au sein d'une même souche. En effet, Van Soolingen et al. [142] ont repiqué des souches de *M. tuberculosis* durant 6 mois et ont démontré que ces repiquages n'altéraient en rien leur profils de bandes. De même, Cave et al [30] sont arrivés à la même conclusion après avoir repiqué des souches de *M. tuberculosis* H37Ra sur plusieurs décennies. Ces souches n'ont présenté qu'une modification d'une seule bande sur les neuf existantes à l'origine. Ceci suppose donc une très faible fréquence de mutation d'IS6110 au sein d'une même souche et fait de cette séquence d'insertion un bon marqueur épidémiologique pour *M. tuberculosis*. Certains auteurs ont voulu savoir s'il y avait une relation entre le nombre ou la localisation des copies d'IS6110 et les profils de résistance. L'étude de Rigouts et Portaels [112] a été menée sur 12 souches multi-résistantes et 10 souches résistantes à un seul antituberculeux par RFLP IS6110 après restriction par *PvuII*. Tous les isolats ont donné des profils distincts. De plus, il n'y a pas de différences de profils avant et après acquisition de la résistance à un ou plusieurs antibiotiques. Ces résultats confirment bien le caractère stable de IS6110 ainsi que le grand polymorphisme des profils obtenus. Une étude plus récente a montré avec cette technique que les souches multi-résistantes isolées en Ecosse étaient génétiquement éloignées [52].

La méthode RFLP IS6110, dont la réalisation a été standardisée par Van Embden J.D.A. et al. [138] et les résultats ont été validés [30, 51, 70, 88, 142] permet la comparaison de souches isolées dans différents laboratoires. Elle constitue donc la méthode de référence dans l'étude épidémiologique de la tuberculose. En effet, de nombreux auteurs ont démontré sa capacité à mettre en évidence la diversité génétique d'une population. En 1995, Torrea et al. ont typé par RFLP IS6110 64 souches de *M. tuberculosis* isolées entre 1991 et 1992 en Polynésie française [136] et ont ainsi mis en évidence 38 profils présentant des bandes différentes (59,4%). De la même façon, Van Soolingen et al. [140] ont retrouvé 41 profils de bandes différents sur 63 souches indiennes typées par RFLP IS6110 (65,1%) et Chevrel-Dellagi et al. [35] ont identifié 67 profils différents sur 73 souches tunisiennes (91,8%). Enfin, Otal I. et al. [98] ont mis en évidence 72 profils différents sur 85 souches d'origines diverses (84,7%).

Par cette méthode, il est également possible de mettre en évidence la circulation de souches mycobactériennes au sein d'une population. Ainsi, plusieurs auteurs ont identifié par RFLP IS6110 une ou plusieurs souches clonales de *M. tuberculosis* responsable d'une transmission de la tuberculose entre voisins africains [61], entre détenus d'une prison [32], entre patients ayant consulté dans une clinique [70] et entre patients hospitalisés [13, 29, 31, 47, 50, 54, 77]. La RFLP IS6110 après restriction par *PvuII* a permis de démontrer qu'à San Francisco, un seul sujet était responsable de 6% des cas identifiés dans cette étude. La mise en évidence de ces infections communautaires et nosocomiales a permis la mise en place de mesures de lutte contre la transmission de la tuberculose plus efficaces. Par ailleurs, en typant par RFLP IS6110 des souches de *M. tuberculosis* isolées chez plusieurs patients séropositifs, Tabet et al. [131] ont découvert 6 patients contaminés par une souche présentant le même profil de bandes. De même, Dwyer et al. [49] et Van Soolingen et al. [141] ont montré que des souches identiques étaient retrouvées dans une population de sans domicile fixe de Melbourne et d'Amsterdam respectivement. Plus récemment, cette technique a été utilisée pour décrire l'épidémiologie de la tuberculose dans deux villes des Etats-Unis : San Francisco [124] et New York [2]. Dans les deux études, on note une diversité génétique remarquable parmi les isolats de *M. tuberculosis*, suggérant que la majorité des cas de tuberculose active provient de la réactivation d'une infection ancienne (324 souches distinctes sur 473 à San Francisco et 77 sur 104 à New York). Cependant, 26 à 31% des patients ont des profils de bandes identiques, suggérant que ces patients ont été récemment infectés et près des 2/3 des patients séropositifs ou sidéens appartiennent au groupe des malades ayant des souches communes de *M. tuberculosis*. Ainsi, chez ces patients, la tuberculose pourrait être plus souvent due à une nouvelle contamination qu'à la réactivation d'une infection lointaine et indiquerait une plus grande sensibilité de ces sujets à l'infection par le bacille de Koch.

La distinction entre réactivations et nouvelles infections peut être appréciée par l'étude du degré de polymorphisme. Dans le cas de nouvelles infections résultant d'une transmission en cours, les profils de bandes mis en évidence par la RFLP IS6110 seront peu différents alors que la réactivation d'infections latentes produira un

polymorphisme beaucoup plus important. Ainsi, Small et al. [126] ont comparé les profils de bandes obtenus dans deux populations différentes : des jeunes américains nés au sein de minorités ethniques et des immigrants âgés arrivant de pays à haute prévalence de tuberculose. Chez les premiers, qui ont un risque important d'avoir une infection récente, les souches de *M. tuberculosis* typées par RFLP IS6110 ont montré un faible polymorphisme de bandes, alors que chez les seconds, qui sont à haut risque de réactivation d'infection latente, le polymorphisme des souches était très important. De la même façon, Van Soolingen et al. [143] ont mis en évidence un clone chinois de *M. tuberculosis* originaire de la région de Pekin. Ce clone chinois présentait un nombre élevé de copies d'IS6110 (entre 15 et 20 copies). Ce clone a également été retrouvé dans des régions proches de la Chine (Mongolie, Corée du Sud et Thaïlande). Pour expliquer l'émergence récente de ce clone, Van Soolingen [143] suggère que l'introduction de la vaccination antituberculeuse en Asie du Sud-Est a pu favoriser la sélection de souches de *M. tuberculosis* qui résisteraient à l'immunité induite par la vaccination. Cette vaccination a eu pour conséquence la diminution du nombre de clones existant et donc une diminution du polymorphisme des souches. Nous comprenons alors mieux comment, un tel clone résistant à la vaccination, a pu émerger et se répandre aux régions voisines de la Chine.

La RFLP IS6110 a également été utilisée pour mettre en évidence des contaminations de laboratoire [125]. Ces contaminations peuvent être le fait de mélanges accidentels d'échantillons cliniques durant leur manipulation. Certains auteurs ont également rapporté des cas de contamination lors de l'utilisation de l'appareil Bactec 460 utilisé dans la détection de cultures mycobactériennes en milieu liquide [125, 144]. Cet appareil ayant recours à la même aiguille pour déceler le "growth indice" de différents flacons 12B, des contaminations peuvent se produire lors du transfert de l'innoculum d'une culture au flacon suivant.

Aujourd'hui les connaissances sur l'utilisation d'IS6110 comme marqueur se sont élargies, faisant apparaître certaines limites. Ainsi, certaines souches de *M. tuberculosis* dépourvues d'IS6110 ou avec une seule copie ont été trouvées parmi des patients vietnamiens [59, 91, 152] ce qui restreint l'utilisation de ce marqueur pour les populations asiatiques. Deux paramètres ont été invoqués comme limites de cette

technique, la localisation des copies sur le génome ne serait pas aléatoire [91] contrairement à ce qu' avait publié Mendiola [93], et la spécificité de cette méthode serait remise en question [80, 92]. En effet, la séquence IS6110 est fréquemment localisée dans une région préférentielle [53] contenant des séquences répétées DR. Un autre locus préférentiel d'insertion (*ipl*) a été rapporté plus récemment et suggère que la position des bandes n'est pas attribuée au hasard et ce fait peut avoir un impact sur l'interprétation des études moléculaires. En ce qui concerne la spécificité, des travaux [80, 92] ont montré qu'une séquence de 181 pb contenue dans IS6110 hybridait avec des souches de mycobactéries non tuberculeuses. Les résultats de ces travaux ont été remis en cause récemment par Githui et al. [60] qui ont attribué ces résultats à des conditions d'hybridation (température, stringence) inappropriées et ont ainsi confirmé la validité de cette méthode.

Pour les souches présentant un faible nombre de bandes en RFLP IS6110 après restriction par *PvuII*, plusieurs auteurs ont proposé comme alternative à l'utilisation de la séquence IS6110, l'emploi d'autres éléments répétitifs du génome des mycobactéries du groupe *tuberculosis*. Il a ainsi été proposé d'associer à la RFLP IS6110 une technique similaire utilisant les séquences DR [66, 122, 136, 140]. Ainsi, Torrea et al. [136] ont typé 64 souches de *M. tuberculosis* par RFLP en utilisant pour chaque souche la séquence d'insertion IS6110 et la séquence répétitive DR. Deux souches provenant de Guadeloupe et de Tahiti présentaient le même profil de quatre bandes en RFLP IS6110 après restriction par *PvuII* et seule la DR RFLP après restriction par *AluI* a permis de générer des profils différents. De la même façon, il est possible de différencier des souches possédant peu de copies de la séquence IS6110 par une RFLP basée sur les séquences PGRS [34, 140, 151] ou (GTG)₅ [148]. D'autres ont proposé d'associer à la RFLP IS6110, une technique différente, le spoligotypage [4].

Le second intérêt d'associer deux techniques, si possible complémentaires, est d'affiner les résultats obtenus avec la technique RFLP IS6110. Ainsi, Van Soolingen et al. [140] ont effectué la comparaison du pouvoir discriminant de 5 éléments

génétiqes sur 63 souches de *M. tuberculosis* d'origine géographique différente : IS6110, IS1081, la séquence PGRS insérée dans le plasmide pTBN12, MPTR et la séquence DR. MPTR et IS1081 ont montré un pouvoir discriminant plus faible que les trois autres éléments car ces deux séquences présentent un faible polymorphisme de longueur des fragments de restriction [140].

Si la RFLP reste la méthode de référence pour typer les différentes souches du complexe *tuberculosis*, la complexité de cette méthode qui nécessite la réalisation de nombreuses étapes sur plusieurs jours a conduit de nombreux auteurs à utiliser d'autres techniques plus rapides de marquage moléculaire basées notamment sur l'amplification génique [62, 65, 79, 108, 129, 137]. Les résultats de la rep-PCR ont montré que les profils des isolats de patients liés épidémiologiquement sont identiques. De plus, les souches à faible nombre de copies de IS6110 ont également produit un profil de bandes. Cette méthode est conseillée, comme la technique RAPD, pour le typage d'un petit nombre de souches et est indicatrice comme étape préliminaire à une étude en RFLP car la comparaison d'un grand nombre de souches peut se révéler difficile [137]. Une autre technique semble prometteuse, il s'agit de l'analyse des profils obtenus par spoligotypage. Cette technique est simple puisqu'elle est rapidement définie par la présence ou l'absence de la séquence inter-DR. De plus, elle ne nécessite pas de logiciels sophistiqués comme la RFLP. Goyal et al. [62] ont typé des isolats cliniques de *M. tuberculosis* par RFLP IS6110 après restriction par *PvuII* et par spoligotypage. Leurs résultats ainsi que ceux publiés par Kamerbeek et al. [79] ont montré qu'en comparaison à la technique RFLP IS6110, le pouvoir discriminant du spoligotypage est plus faible pour les souches avec un grand nombre de copies de la séquence IS6110 mais plus élevé pour les souches ayant moins de 5 copies. Dans tous les cas, la combinaison des 2 méthodes résulte en un pouvoir discriminant élevé. L'association de ces deux techniques a été utilisée très récemment pour la mise en évidence d'une série importante de contaminations croisées dans un

laboratoire de référence [108]. Par ailleurs, l'utilisation de la technique de spoligotypage associée à d'autres techniques de biologie moléculaire a permis très récemment d'effectuer une réinvestigation d'une épidémie due à une souche de *M. bovis* multi-résistante [65] chez des sujets HIV+. La comparaison des caractères phénotypiques (morphologie des colonies, niacine, résistance à la pyrazinamidase) et génotypiques (séquence *mpt40*, *pncA*, *oxyR*, IS6110, spoligotyping) a permis de montrer que cette souche épidémique était en fait une souche de *M. tuberculosis*. L'étude par spoligotyping a bien montré la présence des "spacers" 40 à 43 qui sont toujours absents chez *M. bovis*. Dans une autre étude effectuée sur 100 souches, Sola et al. [129] ont confirmé que l'association de deux techniques rapides basées sur l'amplification génique telles que le spoligotypage et la DRE-PCR, constitue une stratégie aussi fiable que l'utilisation plus contraignante de la méthode de référence RFLP IS6110.

Des travaux de typage par amplification aléatoire de mycobactéries du groupe *tuberculosis* ont été réalisés par plusieurs équipes [85, 111]. Linton et al. ont testé 40 amorces de taille différente générant des profils de bandes en RAPD pour les souches de *M. tuberculosis* [85]. Ils ont ainsi montré que les conditions expérimentales (quantité et qualité d'ADN à amplifier, concentration en amorce, *Taq* polymérase et thermocycleur utilisé) jouent un rôle important sur les résultats obtenus (richesse des profils, reproductibilité, intensité des bandes). Leur étude a également montré que les profils de bandes obtenus avec des amorces de 20 nucléotides de long sont plus discriminants. De plus, la reproductibilité des profils est meilleure lorsque l'amplification de l'ADN est obtenue lors d'une même série de PCR. Aussi, Linton et al. [85] recommandent d'utiliser la RAPD pour un petit nombre de souches pouvant ainsi être amplifiées lors d'une même série de PCR. Par ailleurs, ils ont montré qu'en amplifiant séparément chaque souche avec plusieurs amorces, les différents profils générés permettaient une meilleure différenciation des souches entre elles. Mais la

supériorité de cette méthode par rapport à celles existantes n'a pas encore été démontrée.

L'utilisation des techniques de typage moléculaire, associée aux enquêtes épidémiologiques classiques, permet donc d'accroître les connaissances sur l'épidémiologie de la tuberculose. C'est une meilleure compréhension de la transmission et de la distribution de la maladie parmi les populations qui permettra de définir de manière efficace les stratégies de lutte et de contrôle de la maladie.

**TRAVAIL
PERSONNEL**

A - MATERIELS ET METHODES

I - Souches

Notre étude a porté sur 58 souches de *Mycobacterium tuberculosis* identifiées au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges entre le 21 avril 1995 et le 12 octobre 1997.

Quarante cinq souches provenaient d'isolements cliniques, dont 43 du CHU Dupuytren de Limoges (74,1%), 1 du Centre Hospitalier de Saint-Yrieix (1,7%) et 1 du Centre Hospitalier de Saint Leonard de Noblat (1,7%). Treize souches ont été isolées dans des laboratoires d'analyses médicales privés (22,5%) et envoyées au CHU pour identification.

La synthèse de la sonde de 245 paires de bases, utilisée dans l'étude du polymorphisme de restriction, a été réalisée à partir de l'ADN d'un isolat clinique de *Mycobacterium bovis* BCG après digestion par *PvuII*.

La souche de *Mycobacterium tuberculosis* (Mt 14323) a été utilisée comme contrôle externe pour chaque migration.

II - Patients

Les cinquante-huit souches de *M. tuberculosis* ont été isolées chez 55 patients. Quarante trois patients ont été hospitalisés et 12 autres ont eu des prélèvements traités par des laboratoires d'analyses de biologie médicale. Les services d'origine et les sites de prélèvement des 43 patients hospitalisés sont représentés tableau V page 64.

Un seul patient était co-infecté par le virus de l'immunodéficience acquise. Ce patient, âgé de 51 ans était hospitalisé dans le service de Médecine Interne du CHU de Limoges et la souche de BK dont il était porteur provenait d'un tubage gastrique.

L'âge des patients variait de 19 à 92 ans avec une moyenne de 62,5 ans et une médiane de 64 ans.

Tableau V : Services d'origine et sites de prélèvement des différents patients hospitalisés de notre étude.

Localisation	Pneumologie	Neurologie	Médecine Interne	Gériatrie	ORL	Chirurgie	Saint-Léonard	Saint-Yrieix
Tubage gastrique	14	2	1	3				
Crachats	2		1				1	
Aspiration bronchique	2							1
Lavage broncho-alvéolaire	5		1					
Liquide pleural	1							
Urine	1					1		
Ganglion	1				2			
Pus divers				1	1			
Liquide articulaire								
Biospie laryngée	1							
Nodule kystique						1		

III - Milieux et conditions de culture

Au départ de l'étude, les différentes souches étaient conservées sur milieu de Löwenstein-Jensen (L-J) à température ambiante. Chaque souche a été repiquée sur milieu liquide Bactec 12 B afin d'obtenir rapidement des subcultures sur trois milieux solides (L-J). Les flacons 12 B dont l'indice de croissance ("growth indice" ou GI) été supérieur ou égal à 999 ont été repiqués sur milieu L-J, incubés à 37°C sous 5 à 10% de CO₂. Une culture bactérienne est obtenue en moyenne au bout de deux à trois semaines.

IV - Extraction des ADN de *Mycobacterium tuberculosis*

Deux types d'extraction ont été réalisés:

- une rapide pour la RAPD
- une classique pour la RFLP IS6110

IV.A - Extraction rapide de l'ADN de mycobactérie à partir de tubes Löwenstein-Jensen

Cette extraction rapide a été effectuée en vue de réaliser la technique de typage RAPD. A l'aide d'une öse de 10 µl, une culture sur milieu L-J a été prélevée et dissociée dans 1 ml de tampon TE (Tris-base 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8,0). Après homogénéisation, la suspension a été centrifugée à 3000 RPM à température ambiante. Le culot a été repris dans 500 µl de tampon TE additionné de 1% de triton X 100 (Sigma, St Louis, MI). Après homogénéisation, la suspension a été chauffée 30 minutes à 90°C puis placée 10 minutes dans la glace. L'échantillon a été conservé à +4°C.

IV.B - Extraction classique de l'ADN de mycobactérie à partir de tubes Löwenstein-Jensen

L'extraction classique permet d'obtenir un ADN purifié nécessaire à la bonne activité des enzymes de restriction et à l'obtention d'une migration correcte des produits de digestion.

IV.B.1 - Lyse bactérienne

La lyse a nécessité l'action conjuguée du lysosyme et de la protéinase K.

A l'aide d'une pipette stérile, 5 ml de bouillon 7H9 + ADC (Difco Laboratories, Detroit, MI) ont été déposés sur une culture en milieu L-J. Les colonies ont alors été dissociées de la gélose à l'aide d'une öse de 10 µl et la suspension bactérienne obtenue a été transférée dans un tube en verre stérile. Après addition de

300 µl de D-Cyclosérine à 10 mg/ml (Sigma) dans le tube, la solution a été incubée 24 heures à 37°C dans une étuve.

Après centrifugation du tube à 3500 RPM pendant 10 minutes, le surnageant a été éliminé de façon incomplète et le culot homogénéisé puis transféré dans un tube Eppendorf. La suspension a alors été chauffée 20 minutes à 80°C dans un bain-marie à sec puis centrifugée à 10000 RPM pendant 5 minutes. Le culot a été remis en suspension dans 500 µl de tampon TE additionné de 50 µl d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml (Sigma) et a été incubé une nuit à 37°C dans un bain-marie.

Après avoir ajouté 75 µl de dodecylsulfate sodium à 20% (SDS) (Serva, Boehringer, Ingelheim) et 50 µl de protéinase K (Sigma) à 10 mg/ml, le mélange a été incubé une nuit à 55°C dans un bain-marie. Afin d'augmenter sa salinité et d'obtenir ainsi une précipitation optimale, 100 µl de NaCl 5M ont été ajoutés au mélange.

IV.B.2 - Déprotéinisation

Afin de séparer les acides nucléiques (ADN et ARN), deux extractions volume à volume par un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1) suivies chacune d'une centrifugation à 4000 RPM à 20°C pendant 10 minutes ont été effectuées. Après centrifugation, 3 phases ont été obtenues :

- une phase inférieure constituée par le mélange de solvants organiques,
- une phase intermédiaire représentée par un anneau plus ou moins épais de protéines précipitées,
- une phase aqueuse supérieure contenant les acides nucléiques.

La phase aqueuse supérieure a été recueillie dans un tube Eppendorf et une nouvelle extraction, réalisée dans les mêmes conditions, par un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1) a été effectuée. Le surnageant a été de nouveau recueilli dans un tube Eppendorf et les acides nucléiques précipités par l'addition de 50 µl d'acétate de sodium 3M (Sigma) et de 1ml d'éthanol absolu à 80°C.

La précipitation des acides nucléiques a été prolongée une nuit à -20°C ou 1 heure à -80°C. L'ADN précipité a été centrifugé à 10000 RPM à 0°C pendant une heure. Le culot d'ADN a alors été remis en suspension dans 1 ml d'éthanol à 70% glacial puis centrifugé à 10000 RPM à 0°C pendant 10 minutes.

Enfin, le culot d'ADN a été séché (Speed Vac concentrator, Savant) pendant 20 minutes et remis en suspension dans 50 à 100 µl d'eau distillée stérile (selon l'importance du culot d'ADN).

V - La technique RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

V.A - Amorces utilisées

Nous avons utilisé séparément trois amorces oligonucléotidiques d'une longueur de 20 mers chacune (Eurobio, les Ulis, France), à la concentration de 0,4 µM et dont les séquences étaient les suivantes:

- CAR2: 5'- GAC I I I CCG GGG GCG GTT CA-3'
- INS2: 5'- GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3'
- IS986FP: 5'- ACG CTC AAC GCC AGA GAC CA-3'

V.B - Mélange réactionnel

Le mélange réactionnel a été préparé dans un microtube de 0,2 ml à bouchon bombé, sous une hôte à flux vertical. Son volume final a été de 50 µl. Pour sa réalisation, nous avons ajouté à 5 µl de tampon 10 X (200 mM Tris-HCl ; pH 8,4, 500 mM KCl), 75 µM de MgCl₂ (1,5 µl), 200 µM de désoxynucléoside triphosphate (dNTP) (4 µl), 1,5 µl de 1% de détergent W-1, 0,4 µM d'amorce (1 µl) et 1 unité de *Taq* polymérase (0,2 µl) (Gibco, MD, USA). Trente nanogrammes d'ADN (5 µl) ont finalement été rajoutés ainsi que de l'eau distillée stérile afin d'obtenir un volume final de 50 µl. Les microtubes ont été ensuite placés dans un thermocycleur pour y subir le cycle réactionnel.

V.C- Le cycle réactionnel

La réaction d'amplification a été réalisée dans un appareil Perkin elmer 2400. Une dénaturation initiale pendant 3 minutes à 94°C a été effectuée, puis 40 cycles comportant trois étapes chacun ont été réalisés :

- une dénaturation pendant 20 secondes à 94°C,
- une hybridation pendant 1 minute à 36°C pour INS 2 et IS 986 BK et à 62°C pour CAR 2,
- une élongation pendant 1 minute à 72°C

Enfin, une élongation finale s'est déroulée pendant 7 minutes à 72°C et les microtubes ont été maintenus à +4°C.

V.D - Analyse des produits d'amplification par électrophorèse

L'électrophorèse des produits de PCR en gel d'agarose (Agarose ultra pure, Gibco BRL, Paisley, Scotland) a permis de séparer et de vérifier la taille des fragments d'ADN amplifiés. Ces fragments d'ADN ont été mis en évidence dans le gel après coloration par le bromure d'éthidium (agent intercalant et fluorescent). La distance de migration des fragments d'ADN est inversement proportionnelle au \log_{10} de leur taille. En se référant à des marqueurs de taille connue, il est possible de déterminer la taille de ces fragments.

L'analyse des produits d'amplification a été effectuée par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% en tampon Tris-Borate-EDTA (Tris-base 45 mM, acide borique 45 mM, EDTA 1,25 mM ; pH 8,6) 0,5 X, après avoir incorporé dans le gel 7 μ l de bromure d'éthidium à 10 mg/ml (Sigma). Le gel a été ensuite placé dans une cuve d'électrophorèse (Bio-Rad Subcell GT, Richmond, CA) et nous avons déposé dans chaque puits 10 μ l de produit d'amplification et 2 μ l de bleu de migration (bromophénol 0,25%, xylène-cyanol 0,25%, glycérol 30%).

Un marqueur de poids moléculaire a été disposé dans chaque migration, le marqueur ADN 123 pb (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France) pour visualiser la taille

des différents produits d'amplification. La migration a été réalisée à 150 volts pendant 2 heures à l'aide d'un générateur de champ électrique (Bio-Rad[®], Power pac). Le gel a ensuite été placé sur une table ultra-violet puis a été photographié avec un film 667 Iso3000 (Polaroid).

VI - Analyse du polymorphisme des fragments de restriction après hybridation par la sonde IS6110 (RFLP IS 6110)

Pour sa réalisation, nous avons utilisé la méthode standardisée de RFLP IS6110 [138]

VI.A - Digestion de l'ADN total de *M. tuberculosis* obtenu après extraction classique

La digestion de l'ADN consiste à faire agir des endonucléases de restriction sur un extrait d'ADN.

Les endonucléases de restriction sont des enzymes capables de couper l'ADN à un endroit déterminé appelé site de restriction. Cette coupure est conditionnée par la reconnaissance d'une séquence de bases spécifique de chaque enzyme. La plupart des travaux utilisant la technique RFLP IS6110 utilisent *PvuII* comme enzyme de restriction. *PvuII* clive la séquence IS6110 seulement une fois [138]. La séquence reconnue par *PvuII* est la suivante :

- 5'- CAG \square CTG -3'

VI.A.1 - Evaluation de la quantité d'ADN à digérer

Dans un premier temps, nous avons préparé une solution tampon appelée tampon échantillon ADN 5 X additionnée de RNase. Cette solution se compose de 50 % de glycérol (Difco), 50 mM de Tris-HCl ; pH 7,5, 5 mM d'EDTA, 0,05% de bleu de bromophénol (Prolabo, Paris, France) et de 30 μ g/ml de RNase (Eurogentec, Seraing, Belgique).

Cette solution a été incubée 15 minutes dans un bain-marie à 100°C puis conservée à température ambiante. Elle a ensuite été diluée au 1/5 en eau distillée stérile afin d'obtenir le tampon d'échantillon ADN 1 X additionné de RNase que nous avons utilisé pour évaluer la quantité d'ADN à digérer.

La quantité d'ADN à digérer a été estimée par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8%, en tampon TBE 1 X contenant 7 µl de bromure d'éthidium, des solutions d'acides nucléiques extraits par phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Dans chaque puits, nous avons déposé 1 µl de solution bactérienne et 9 µl de tampon échantillon ADN 1 X additionné de RNase. La RNase a permis d'éliminer l'ARN contenu dans la solution d'acide nucléique. La migration s'est déroulée à 100 Volts pendant 30 minutes. Le gel a ensuite été photographié sur une table ultra-violet à l'aide d'un film Polaroid 667 Iso 3000. L'intensité des bandes d'ADN total obtenues a alors été comparée à celle d'une gamme étalon (figure 7, ci-dessous). Cette comparaison nous a permis de déterminer le volume de la solution contenant 4,5 µg d'ADN.

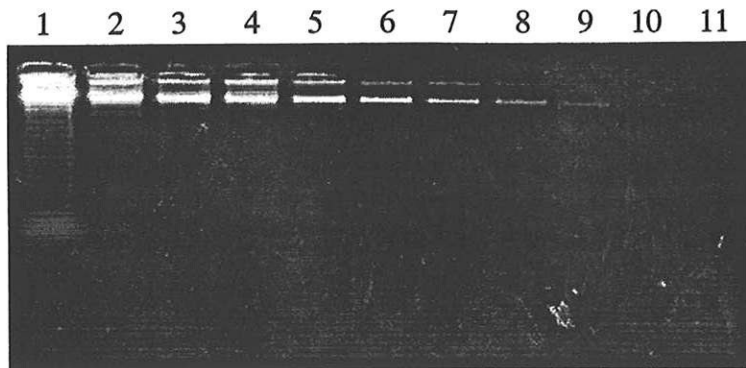


Figure 7 : Estimation du volume d'ADN à digérer. Respectivement, les lignes 1 à 8 contiennent environ 2.25, 0.90, 0.55, 0.45, 0.40, 0.30 et 0.25 µg d'ADN. Afin de digérer 4.5 µg d'ADN, les volumes correspondant de chaque échantillon sont 2, 5, 8, 8, 10, 12, 15 et 18 µl d'ADN [138].

VI.A.2 - Digestion de l'ADN total par *Pvu* II

Pour chaque ADN extrait, nous avons mélangé, dans un tube Eppendorf, 2 µl d'eau distillée stérile, 2 µl de tampon de digestion 10 X Boehringer (2 mM de 2-mercaptoéthanol, 20 mM Tris-HCl ; pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,01% Triton X 100, 50 % glycérol), 1 µl de *Pvu*II à 10 U/µl, le volume d'ADN évalué précédemment et le volume d'eau distillée stérile nécessaire à l'obtention d'un volume final de 20 µl. Après centrifugation à 3000 RPM à température ambiante, ce mélange a été incubé une nuit dans un bain-marie à 37°C.

VI.B - Migration de l'ADN digéré par électrophorèse

VI.B.1 - Préparation du Supercoiled DNA ladder-*Pvu* II

Quarante microlitres de Supercoiled DNA ladder (Gibco BRL) ont été précipités dans 160 µl de TE 1 X additionné de 500 µl d'éthanol absolu à -20°C et de 25 µl de NaCl 5M. Ce mélange a été incubé 30 minutes à -20°C puis centrifugé à 4000 RPM à 20°C pendant 15 minutes. Le culot a été séché pendant 20 minutes puis remis en suspension dans 58 µl de TE 0,1 X. Il a ensuite été digéré par 5 µl de *Pvu*II et 7 µl de tampon de digestion 10 X puis incubé une nuit dans un bain-marie à 37°C. Après avoir ajouté 330 µl de tampon TE 1 X une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique a été ensuite réalisée en ajoutant 400 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Après centrifugation à 4000 RPM à 20°C pendant 15 minutes, la phase aqueuse supérieure a été reprise dans 1ml d'éthanol absolu à -20°C et incubée 30 minutes à -20°C. Après centrifugation à 4000 RPM pendant 15 minutes à 20°C, le culot a été alors séché pendant 20 minutes et remis en suspension dans 40 µl de TE 1 X.

VI.B.2 - Evaluation du volume d'ADN digéré à faire migrer

Une solution tampon appelée tampon échantillon ADN 5 X contenant de la RNase et des marqueurs de poids moléculaire a été réalisée en mélangeant les solutions suivantes:

- 0,5 ng/ μ l de ϕ X174-*Hae*III (marqueur IX, Boehringer Mannheim),
- 1,5 ng/ μ l de supercoiled DNA ladder-*Pvu*II,
- tampon échantillon ADN 5 X additionné de RNase.

Dans chaque tube Eppendorf contenant 20 μ l d'ADN digéré, ont été ajoutés 5 μ l de ce mélange à des fins de marqueur de poids moléculaire. Pour visualiser ce marqueur, la membrane sera réhybridée avec un mélange de Supercoiled DNA ladder non digéré et de ϕ X174-*Hae*III puis à nouveau autoradiographiée, obtenant ainsi un profil de bandes dont le poids moléculaire de chacune est connu. Nous pourrions ainsi estimer précisément le poids moléculaire de chaque bande contenue dans les profils de restriction des ADN digérés en superposant l'autoradiographie des marqueurs internes de poids moléculaire à celle des profils de restriction des ADN digérés par *Pvu* II.

L'évaluation du volume d'ADN digéré nécessaire pour faire migrer 2,5 μ g d'ADN digéré a été réalisée par la même technique que celle décrite pour estimer l'ADN à digérer, à l'exception des points suivants :

- La quantité de mélange déposé dans les puits qui a été de 5 μ l.
- La gamme étalon avec laquelle nous avons comparé l'intensité des fragments de restriction de l'ADN qui est représentée figure 8 page 73.

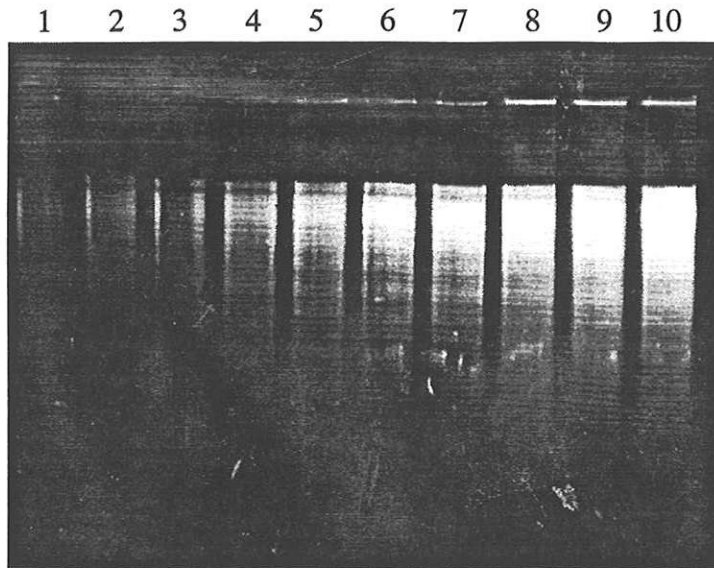


Figure 8 : Estimation du volume d'ADN digéré à utiliser pour la réalisation du gel de migration à transférer. Respectivement, les lignes 1 à 10 contiennent environ 0.5, 1.55, 0.65, 0.85, 1.0, 1.25, 1.45, 1.65, 2.0 et 2.5 μg d'ADN digéré. Afin de faire migrer 2 μg d'ADN digéré, les volumes correspondant de chaque échantillon sont 20, 18, 15, 12, 10, 8, 7, 6, 5, et 4 μl d'ADN digéré [138].

VI.B.3 - Migration par électrophorèse de 2,5 μg d'ADN digéré

Cette migration a permis d'obtenir des profils de restriction des ADN digérés par *PvuII* qui ont été ensuite transférés sur une membrane de nylon puis hybridés.

Avant d'effectuer cette électrophorèse, nous avons réalisé un mélange λ -*HindIII*/ ϕ X174-*HaeIII* de la manière suivante :

- 32 μl de λ -*HindIII*(marqueur II Boehringer à 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
concentration final de 40 $\text{ng}/\mu\text{l}$
- 40 μl de ϕ X174-*HaeIII*(marqueur IX Boehringer à 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
concentration final de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
- 88 μl de TE 1 X
- 40 μl de tampon échantillon ADN 5 X additionné de RNase

Un gel d'agarose a été ensuite préparé à 0,8% en tampon TBE 1 X contenant 7 µl de bromure d'éthidium puis, après solidification, placé dans une cuve à électrophorèse (Maxicell EC 360M, Bio-Rad). Les deux puits externes du gel n'ont pas été utilisés et, afin de pouvoir superposer et comparer très précisément les différents profils de restriction obtenus après autoradiographie, 5 µl de λ -HindIII/ ϕ 174-HaeIII ont été déposés dans le premier et le dernier puits du gel. Deux µg et demi d'ADN de la souche de référence Mt.14323 digérée par PvuII ont été disposés dans l'avant dernier puits pour chaque électrophorèse d'ADN digéré de cette étude (tableau VI). Dans les autres puits, nous avons déposés 2,5 µg d'ADN digéré des différentes souches à tester. La migration a été effectuée à 100 volts pendant 10 minutes, puis à 25 volts pendant toute la nuit. La migration a été arrêtée lorsque la bande de 2kb de λ -HindIII se situait à une distance de 7cm (+/- 0,4cm) des puits. Le gel a alors été placé sur une table ultra-violettes puis photographié avec un film Polaroid 667 Iso 3000.

Tableau VI : Taille des différentes bandes des marqueurs de poids moléculaire utilisés dans la technique RFLP IS6110 [138]

λ -HindIII (pb)	ϕ X174-HaeIII (pb)	Supercoiled DNA ladder-PvuII (pb)	Souche Mt. 14323 après hybridation avec IS6110 (pb)
23.130	1353	16.210	14.100
9.419	1078	14.174	7.100
6.557	872	12.138	7.000
4.371	603	10.098	4.300
2.322	310	8.066	3.600
2.028	281/271	7.048	3.000
0.564	234	6.030	2.300
0.125	194	5.012	2.000
	118	3.990	1.800
	72	2.972	1.500
		2.067	1.400
			1.000

VI.C - Transfert sur membrane du gel obtenu après électrophorèse (Southern blotting)

Le gel d'agarose ayant servi de support à la migration électrophorétique est fragile et ne peut être conservé. Aussi, l'hybridation ultérieure de l'ADN restreint avec la sonde IS6110 nécessite le transfert de l'ADN sur un autre support. Ce support doit présenter plusieurs qualités : maniabilité, résistance, possibilité de conservation.

Pour la réalisation de ce travail, nous avons choisis une membrane de nylon chargée positivement sur ses deux faces (Boehringer Mannheim), l'ADN sous sa forme extraite étant chargé négativement.

VI.C.1 - Traitement du gel avant transfert

Après avoir placé le gel sous une source de rayons ultra-violet pendant 5 minutes, 500 ml de solution de dépurination (HCl 0,25M) ont été déposés sur le gel et laissés en contact pendant 10 minutes. Cette opération optimise le transfert en cassant les fragments d'ADN de haut poids moléculaire.

La solution de dépurination a ensuite été éliminée, puis le gel a été rincé pendant 10 secondes à l'eau distillée stérile et recouvert de 500 ml d'une solution de dénaturation (NaOH 0,4M) pendant 2 fois 20 minutes. Cette étape permet la dissociation des doubles brins d'ADN.

VI.C.2 - Transfert du gel sur membrane

Avant de réaliser le transfert, nous avons placé aux quatre coins de la membrane des codes (identiques à chaque transfert) nous permettant d'identifier le numéro de transfert et le sens de la membrane. Une solution de "mélange de marquage" a été appliquée sur ces codes afin de les visualiser après hybridation et autoradiographie. Cette solution a été préparée en mélangeant 40 µl (10 volumes) des échantillons d'ADN digérés précédemment, avec 8 µl (2 volumes) de NaOH 4M et 4 µl (1 volume) d'ADN total non digéré de la souche de référence Mt.14323.

Avant d'être utilisé, ce mélange a été incubé à +4°C pendant une nuit puis sept

microlitres ont été déposés dans le deuxième et l'avant dernier puits du gel afin de faciliter la superposition des autoradiographies.

Le transfert a été réalisé avec 500 ml de solution de transfert ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M, NaCl 1,8 M, EDTA 10 mM, pH 7,4) conservée à température ambiante, à l'aide d'un appareil à transfert sous vide (Bio-Rad Vacuum Blotter 785, Richmond, CA 94804). La pompe à vide créant une dépression de 5 et 6 mm de mercure. Le transfert a duré 2 heures et demi.

La membrane a ensuite été exposée 5 minutes aux ultra-violets afin d'obtenir une fixation irréversible de l'ADN, puis conservée entre deux feuilles de papier à température ambiante.

VI.D - Hybridation et révélation des fragments de restriction des ADN digérés

VI.D.1 - Préparation de la sonde IS6110 par PCR

La sonde IS6110 a été préparée à partir de l'ADN d'une souche de *M. bovis* BCG extraite par la méthode rapide décrite précédemment.

Nous avons utilisé comme première amorce INS1 (5'- CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC -3'), et comme seconde amorce INS2. La technique d'amplification par PCR utilisée a déjà été décrite pour la technique RAPD, le seul paramètre différent est la température d'hybridation (65°C).

La taille du produit de PCR a été ensuite vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% en tampon TBE 0,5 X contenant 7 µl de bromure d'éthidium à 10 mg/ml. Comme prévu, nous avons visualisé une bande unique de 245 paires de bases.

Le produit de PCR a été purifié à l'aide d'une microcolonne (Microspin Column HR 400, Pharmacia). Après avoir saturé la colonne, celle-ci a été centrifugée à 3200 RPM pendant une minute à température ambiante. Le produit d'amplification a ensuite été déposé dans la colonne et après une nouvelle centrifugation à 3200 RPM

pendant 2 minutes à température ambiante, la sonde a été récupérée dans un tube Eppendorf et conservée à -20°C.

VI.D.2 - Hybridation et révélation de la membrane

Nous avons utilisé un coffret d'hybridation et de détection (ECL, RPN 3001, Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, England) basé sur le marquage de la sonde par une peroxydase végétale complexée à un polymère chargé positivement. L'addition de glutaraldéhyde entraîne une liaison covalente entre la sonde chargée négativement et la peroxydase chargée positivement. En présence de peroxyde d'hydrogène, la peroxydase oxydera le luminol qui émettra un signal lumineux.

VI.D.2.a - Préparation de la solution de préhybridation

Après avoir déposé dans un Erlen 0,125 ml de tampon d'hybridation par cm² de membrane (50 ml pour notre membrane de 19x22 cm), du NaCl 0,5M (1g) et 5% d'agent bloquant (2,5g) ont été ajoutés en pluie fine. Cette solution a alors été placée sur un agitateur pendant une heure à température ambiante, puis incubée 30 minutes à 1 heure dans un bain-marie à 42°C en agitant de temps en temps.

VI.D.2.b - Hybridation de la membrane

La membrane a tout d'abord été incubée dans une solution de SSC 5 X (NaCl 750 mM, citrate de sodium 75 mM ; pH 7,0) puis disposée entre deux voiles de nylon (Boehringer Mannheim) avant d'être préhybridée avec la solution de préhybridation dans un four à hybrider (Hybaid Micro-4, Teddington, MI) pendant 15 minutes à 42°C.

Pendant ce temps, nous avons réalisé le marquage de la sonde IS6110. Cent nanogrammes d'ADN (10 µl de la sonde) ont été dénaturés par chauffage à 100°C pendant 5 minutes puis refroidis dans la glace durant le même délai. Après avoir vortexé brièvement cette solution d'ADN, 10 µl de réactif de marquage et 10 µl de glutaraldéhyde ont été ajoutés en mélangeant soigneusement et doucement à l'aide

d'une pipette. Ce mélange a été incubé 20 minutes dans un bain-marie à 37°C. Si la sonde n'était pas utilisée immédiatement, il était possible de la conserver 15 minutes dans de la glace ou 1 mois à -20°C dans 50% de glycérol.

La membrane a ensuite été hybridée en introduisant la sonde marquée dans la solution de préhybridation et incubée une nuit à 42°C dans le four à hybrider.

VI.D.2.c - Lavage de la membrane

La solution d'hybridation a été éliminée et la membrane lavée avec des solutions salines dans des conditions de plus en plus "stringentes":

- une fois pendant 10 minutes à 55°C avec une solution de SSC 5 X,
- une fois pendant 10 minutes et deux fois pendant 5 minutes à 55°C avec une solution de SSC 2 X, SDS 10%,
- deux fois pendant 5 minutes à température ambiante avec une solution de SSC 20 X.

La membrane a été ensuite placée entre deux feuilles de papier sans la sécher entièrement, et révélée dans une chambre noire.

VI.D.2.d - Révélation autoradiographique du transfert

Cette étape doit être réalisée le plus rapidement possible car les réactifs de révélation sont très instables.

A l'obscurité, nous avons préparés la solution de révélation en mélangeant volume à volume (25 ml/25 ml) les deux réactifs de révélation dans un bac.

Après y avoir déposé la membrane, celle-ci a été incubée 1 minute exactement avec la solution de révélation. Elle a ensuite été séchée sur un buvard, placée dans un film plastique, puis exposée dans une cassette contenant un film Kodak O Mat AR (Kodak, Rochester, NY) qui a été développé après deux heures d'exposition à température ambiante.

VI.E - Hybridation et révélation des marqueurs internes

de poids moléculaire

VI.E.1 - "Stripping" de la membrane

En anglais, "stripping" signifie déshabillage. Cette opération consiste, sous l'effet de la chaleur, à rompre les liaisons covalentes entre la peroxydase et la sonde IS6110, la peroxydase restant liée à cette sonde par des liaisons électrostatiques non covalentes. Ainsi en présence des deux réactifs de révélation du kit ECL, la peroxydase liée à la sonde IS6110 n'entraînera plus d'oxydation du luminol et ne produira plus de rayonnement lumineux. Seul le rayonnement consécutif à la liaison peroxydase-sonde du mélange de marqueurs internes de poids moléculaire sera visible après autoradiographie.

Le "déshabillage" de la membrane a été réalisé en la plaçant dans une solution (SSC 0,1 X, SDS 0,1 %) préchauffée dans un bain-marie à 65°C, et en l'incubant dans un four à hybrider à 65°C pendant 30 minutes.

VI.E.2 - Hybridation et révélation de la membrane

La technique utilisée a été analogue à celle décrite pour l'hybridation de la membrane avec la sonde IS6110, à l'exception de la préparation de la sonde qui a été réalisée en mélangeant, volume à volume, du Supercoiled DNA ladder non digéré par *Pvu* II et du ϕ X174-*Hae*III. Un microlitre de chaque marqueur a été ajouté à 48 μ l d'eau distillée stérile de façon à obtenir une concentration finale de 10 ng d'ADN/ μ l.

VII - Analyse et interprétation des données

L'analyse et l'interprétation des profils de restriction de l'ADN par *Pvu*II et hybridation avec la sonde IS6110 ont été effectuées à l'aide des logiciels RestrictoScan[®], RestrictoTyper[®], Adanson[®] et Dendrograf[®] de la suite de programmes Taxotron[®] (Taxolab, Institut Pasteur, Paris, France) sur un microordinateur Power Mac Intosh G3 (Apple Computers, Cupertino, CA).

Pour mettre en évidence les distances taxonomiques existant entre tous les patients de notre étude, ces programmes informatiques utilisent la classification hiérarchique ascendante qui procède par agrégations successives en regroupant d'abord les souches les plus semblables c'est à dire, présentant entre elles la plus petite distance. Puis, pas à pas, les groupes et les souches isolés sont agrégés en grappes de niveaux hiérarchiques supérieurs.

Deux méthodes d'agrégation ont été utilisées. La méthode d'agrégation par le diamètre minimal (Single Linkage, SL) des grappes qui considère que la distance entre une souche isolée et un groupe est la distance séparant cette souche de la souche de la grappe qui en est la plus proche. Cette méthode est préférentiellement utilisée pour mettre en évidence des souches identiques entre elles. La méthode du diamètre moyen des grappes (unweighted pair group method with averages, UGPMA) est plus appropriée pour l'étude phylogénétique de souches c'est à dire, pour quantifier les relations existant entre différentes souches non identiques. Dans cette technique, une souche est agrégée à un groupe au niveau taxonomique correspondant à sa distance moyenne par rapport à tous les individus qui constituent le groupe.

La représentation schématique des résultats obtenus a été faite sous la forme d'un dendrogramme qui a montré l'emboîtement successif des grappes et donne une idée de l'affinité des groupes discernés.

Pour déterminer la taille des fragments, les photographies (support Polaroid) des profils obtenus après la technique RAPD et les autoradiographies (RFLP *IS6110*) ont été digitalisées à l'aide d'un scanner HP 6100C (Hewlett-Packard Compagny, Palo Alto, CA) pour obtenir une image au format TIFF (tagged image file format). A partir de cette image, les lignes (souches) et les bandes (fragments) ont été caractérisés par Restricto Scan[®] qui a généré un dossier "Mig file". Pour chaque ligne "standard de poids moléculaire", une fonction reliant la taille moléculaire (L) à la mobilité, établie selon l'algorithme de Schaffer et Sedevoff [117], a été exécutée

par le programme Restricto Typer[®]. La formule corrigée est $L - L_0 = a / (M - M_0)$ où L_0 et M_0 sont des facteurs de correction de la taille des fragments et de la mobilité. La taille des fragments a été interpolée à partir des données de migration par Restricto Typer[®]. Le standard pour effectuer l'interpolation de la taille des fragments est le mélange λ -HindIII/ ϕ X174-HaeIII décrit précédemment. Un dossier "MW file" contenant les données de la taille des fragments correspondant aux données de migration dans "Mig file" a été généré par Restricto Typer[®].

L'ensemble des données des différentes migrations a été rassemblé dans un seul dossier avant d'être traitées pour obtenir une représentation schématique (RAPD et RFLP IS6110) et une analyse de similarité et de regroupement (RFLP IS6110). Une représentation schématique a été générée à partir du logiciel Restricto Typer[®].

La probabilité pour que deux fragments aient la même taille est très faible. La connaissance de l'erreur dans la détermination de la taille des fragments est un paramètre important pour décider quels fragments sont identiques. Nous avons fixé l'erreur à 5,0% après avoir analysé la variation de la taille des fragments sur une souche type. Deux profils ont été considérés identiques lorsqu'ils ont présenté le même nombre de bandes, et lorsque, pour tous les fragments, la différence de taille des fragments homologues restait dans les limites de l'erreur tolérée (5,0%).

Les données de migration de chaque gel ont été regroupées dans une seule table de données. Le regroupement des isolats a été effectué en utilisant le programme Adanson[®] par la méthode UPGMA [128]. A partir de cette matrice de distance, un dendrogramme a été tracé par le programme Dendrograf[®].

L'ensemble des données analysées par Adanson[®] a été sauvegardée dans une banque de données pour permettre ultérieurement l'identification automatique de nouveaux profils.

B - RESULTATS

La technique RAPD, basée sur l'utilisation d'amorces de séquences arbitraires, présente l'avantage par rapport à la PCR classique de ne nécessiter aucune information préalable sur la séquence de l'ADN étudiée. Cette technique a ainsi été utilisée avec succès pour typer des microorganismes comme *Staphylococcus aureus* [116], *Listeria monocytogenes* [89], *Proteus mirabilis* [20], *Streptococcus uberis* [76], *Escherichia coli* [21], *Helicobacter pylori* [1], ainsi que les levures comme *Candida albicans* [84]. Cette méthode de typage moléculaire étant normalement applicable à tout organisme contenant de l'ADN, nous avons voulu l'évaluer sur notre population de souches de *M. tuberculosis*.

Dans un premier temps, nous exposerons les résultats obtenus avec la technique RAPD et dans un second temps, ceux obtenus par la méthode RFLP IS6110 qui reste, pour de nombreux auteurs, la méthode de référence pour l'étude épidémiologique des mycobactéries.

I - Technique RAPD

Dans notre étude, 58 souches ont été analysées à l'aide de la technique RAPD en utilisant 3 amorces différentes pour chaque souche : IS 986 BK, INS 2 et CAR2.

I.A - Amorce IS 986 BK

Avec cette amorce, nous avons obtenu des profils de bandes contenant entre 0 et 10 bandes (figure 9, page 83).

La souche n° 29 (1,7%) ne possédait aucune bande et 9 profils (15,5%) ne contenaient qu'une seule bande avec parmi eux, 8 profils présentant une bande de haut poids moléculaire (>1000 pb) et un profil possédant une bande de bas poids moléculaire (220 pb). Parmi ces 9 profils, deux groupes de deux souches présentaient une bande de poids moléculaire proche : les souches 2 et 38 avec une bande d'environ 1200 pb, et les souches 40 et 50 présentant une bande aux environ de 1600 pb.

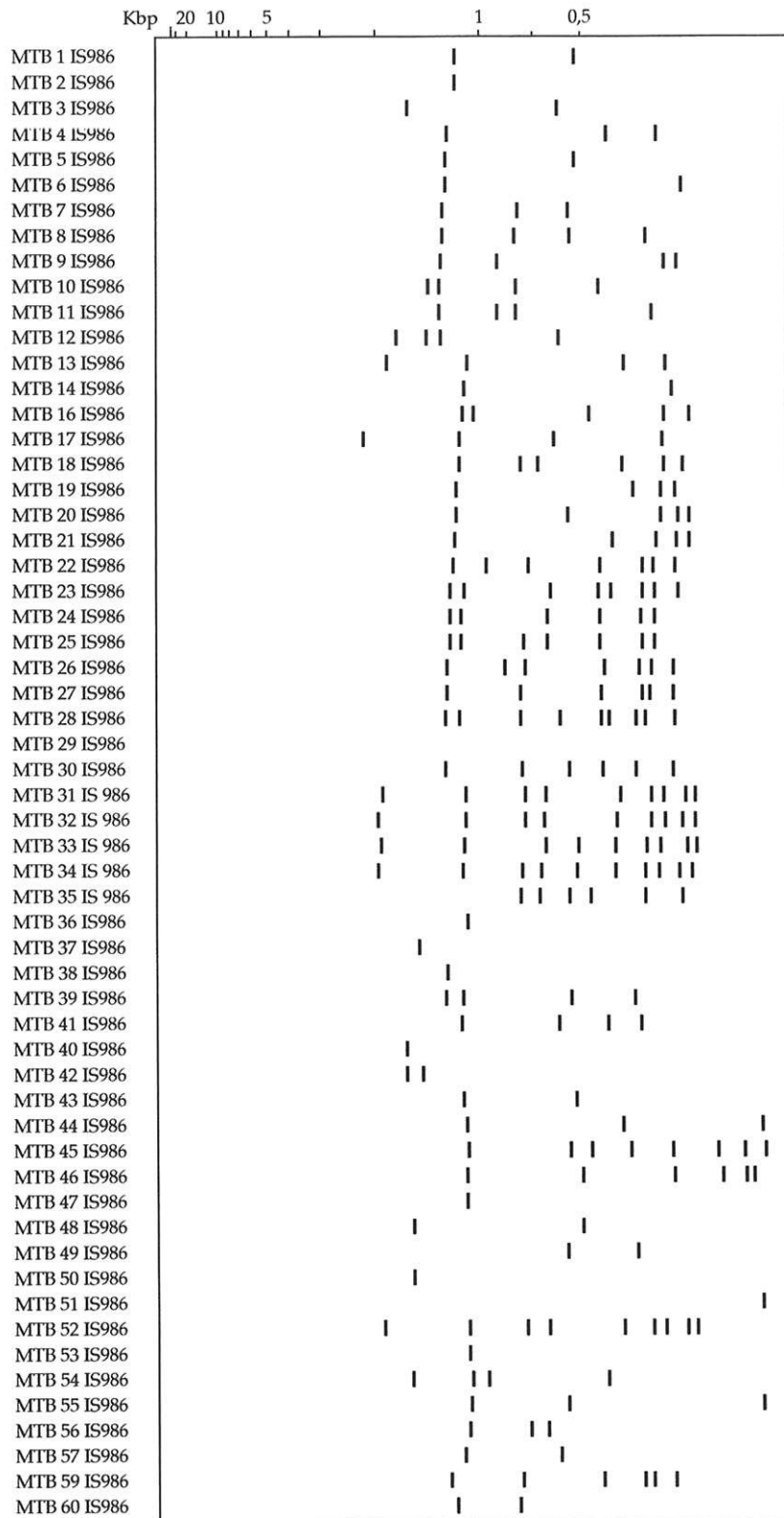


Figure 9 : Représentation schématique générée par le logiciel Restrictotyper (Institut Pasteur) des profils obtenus par la technique RAPD avec l'amorce IS986 sur les 58 souches de mycobactéries de la tuberculose

Onze souches (19%) possédaient un profil de deux bandes, tous différents. Néanmoins, 3 souches (1, 5 et 43) présentaient une bande commune de 530 pb et ne se différenciaient que par leur bande de haut poids moléculaire.

Cinq profils (8,6%) possédaient 3 bandes, tous différents, et 32 souches (55,2%) présentaient un minimum de 4 bandes, avec 4 profils identiques entre eux contenant 9 bandes différentes (souches n° 31, 32, 34) et une souche (n° 52) se distinguant des 3 profils précédents par l'absence d'une seule bande de haut poids moléculaire (figure 10, page 86). Par ailleurs, deux profils de 6 bandes sont identiques (souches n° 27 et 59) (figure 10). Les 26 souches restantes possédaient des profils différents de 4 à 9 bandes.

I.B - Amorce INS 2

Avec cette amorce, nous avons obtenu un minimum de 0 bande et un maximum de 7 bandes par profil.

Sept profils (12,1%) ne possédaient aucune bande. Par ailleurs, 14 profils (24,1%) ne contenaient qu'une seule bande avec parmi eux, 13 souches présentant la même bande de 500 pb (souches 3, 5, 8, 12, 16, 23, 24, 33, 40, 42, 45, 46, 50). Seule la souche 54 possédait une bande de haut poids moléculaire (1350 pb)

Huit profils (13,8%) possédaient deux bandes dans leur profil parmi lesquels, nous avons pu distinguer un groupe de 3 souches (7, 9 et 10) identiques présentant les mêmes bandes de 500 pb et 980 pb environ. Quinze souches (25,9%) étaient caractérisées par un profil de 3 bandes, parmi lesquelles nous avons pu distinguer trois groupes de souches à profil proche mais non identique. Un groupe de 4 souches (18, 21, 22 et 26) présentait des bandes d'environ 500pb, 750pb et 980pb, un autre de 3 souches (43, 47 et 49) possédait trois bandes de 500pb, 750pb et 900pb, et un dernier groupe de 2 souches (56 et 57) contenaient des bandes de 500pb, 860pb et 980pb. Les 6 souches restantes présentaient des profils à 3 bandes différents.

Quatorze profils (24,1%) présentaient 4 bandes ou plus parmi lesquels, 4 souches se caractérisaient par un profil de 5 bandes identiques (souches n°31, 32, 34, 52) et 2 souches (n°27, 59) présentaient des profils de 5 et 6 bandes qui ne différaient que d'une bande située à un poids moléculaire de 500 pb environ (figure 10).

I.C - Amorce CAR 2

Avec cette amorce, les différentes souches testées ont produit des profils contenant entre 0 et 6 bandes.

Six profils (10,3%) se sont révélés être dépourvus de bande et 10 souches (17,3%) présentaient des profils d'une bande. Parmi celles-ci, 5 souches (36, 42, 50, 54, 60) possédaient le même profil avec une bande de 500 pb environ.

Nous avons également observé 28 souches (48,3%) possédant deux bandes. Parmi ces souches, 4 présentaient un profil identique (31, 32, 34, 52) avec deux bandes à 500 pb et 1250 pb environ (Fig. 10). Par ailleurs, 4 autres souches (7, 9, 18 et 19) présentaient les mêmes bandes de 615 et 1353 pb.

Neuf profils (15,5%) de trois bandes ont également été retrouvés, tous différents.

Enfin, 5 souches (8,6%) ont présenté des profils d'au moins 4 bandes parmi lesquelles deux souches (27 et 59) de 5 et 6 bandes ne se différenciaient que par une seule bande de haut poids moléculaire (figure 10).

I.D - Comparaison des amorces

La technique RAPD utilisant une amorce donnée sera d'autant plus discriminante que les profils obtenus possèdent un grand nombre de bandes et que le pourcentage de profils riches en bandes est important.

Au vu des résultats décrits précédemment, il apparait donc que l'amorce IS 986 BK soit la plus appropriée pour comparer les souches de notre population. En effet, l'utilisation d'IS 986 BK a généré un seul profil dépourvu de bande alors que 6 et 7 profils de ce type ont été retrouvés avec respectivement CAR 2 et INS 2.

Par ailleurs, IS 986 BK a permis de distinguer 11 souches présentant des profils de 7 à 10 bandes alors que nous avons constaté un maximum de 7 bandes (une souche) avec INS 2 et de 6 bandes (une souche) avec CAR 2. Enfin, 55,2% des souches présentaient un minimum de 4 bandes avec IS 986 BK alors que ce pourcentage tombait à 24,1% et 8,6% pour respectivement INS 2 et CAR 2.

Par ailleurs, les souches 31, 32, 34 et 52 d'une part et 27 et 59 d'autre part, se sont révélées avoir des profils de bandes identiques ou presque, quelque soit l'amorce utilisée (figure 10). Ces souches étaient le résultat de 2 épisodes de contaminations de laboratoire.

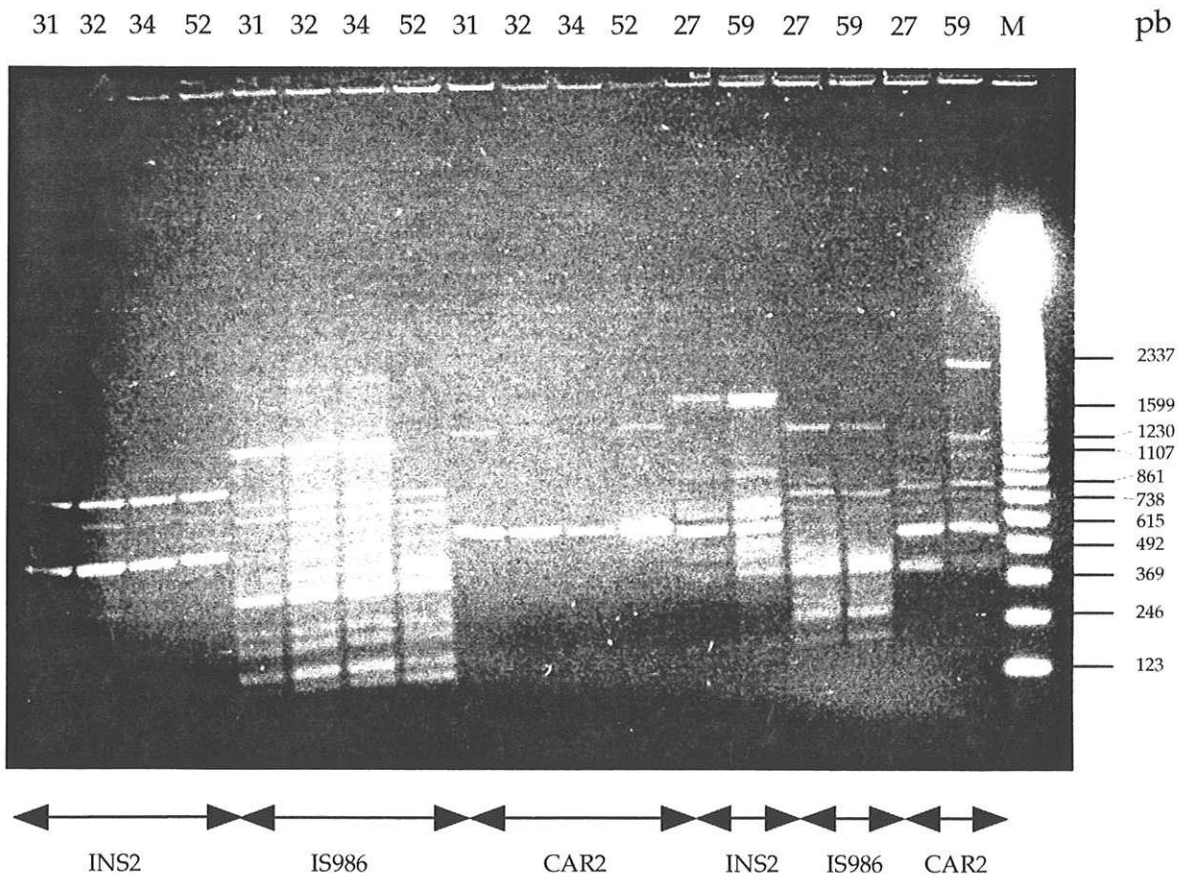


Figure 10 : Profils obtenus par RAPD avec les amorces INS2, IS986, CAR2 des 2 séries de souches (N°31, 32, 34 et 52 ; 27 et 59) issues de 2 épisodes de contaminations de laboratoire.

II - RFLP IS6110 :

Parmi notre population de 58 souches de *M. tuberculosis*, la souche n° 29 n'a pu être analysée par la RFLP IS6110 car il n'a pas été possible d'en obtenir une subculture après repiquage en flacon 12B du milieu Löwenstein-Jensen.

Un total de 57 souches de *M. tuberculosis* ont donc été typées par la technique RFLP IS6110 après restriction par *PvuII*. Pour l'analyse des résultats de cette technique, nous avons utilisé deux méthodes d'agrégation, Simple Linkage et UPGMA. La méthode d'agrégation Simple Linkage nous a permis dans un premier temps de comparer les profils afin de détecter des profils semblables. Dans un second temps, la méthode UPGMA nous a permis d'apprécier la diversité génétique de notre population.

II.A - Analyse du nombre de copies IS6110

Chaque bande présente dans un profil a représenté une copie de la séquence IS6110. Les différents profils de bandes ont généré un nombre variable de copies de cette séquence.

Les souches contenaient en moyenne 9,0 bandes (+/- 2,9) avec des valeurs extrêmes de 1 et 16 bandes (figure 11, page 88). La majorité des souches, 47 sur 57 (82%), ont généré des profils de 6 à 12 bandes et 89,5% des souches possèdent plus de 5 copies de la séquence IS6110. Seule deux souches (27 et 59) possédaient une unique copie.

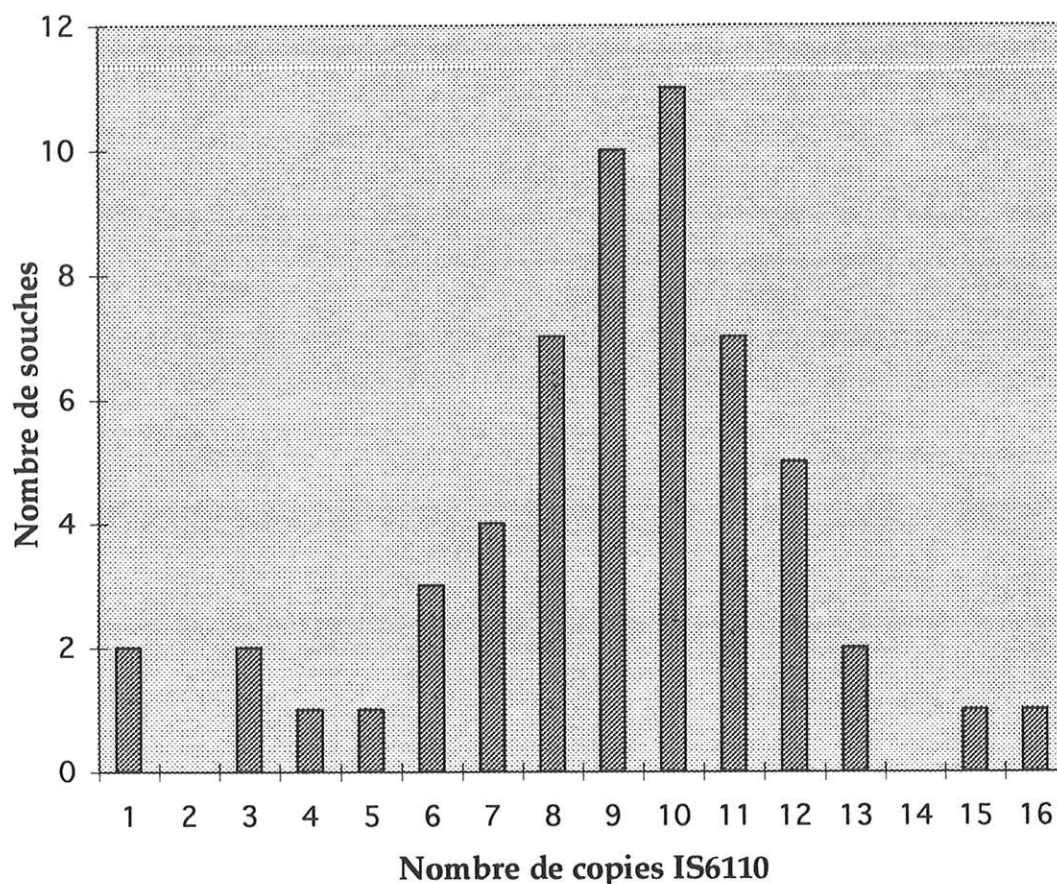


Figure 11 : Répartition du nombre de copies de la séquence IS6110 parmi les 57 souches de mycobactéries de la tuberculose étudiées

II.B - Comparaison des profils après agrégation par la méthode simple linkage

Trois groupes de deux souches (6/60, 13/31 et 14/53) étaient issus de mêmes patients prélevés le même jour. Le dendrogramme obtenu (figure 12, page 89) nous a confirmé l'identité de ces souches puisque les profils de bandes des souches 14 et 53 d'une part, et 13 et 31 d'autre part ne montraient qu'une différence d'une bande. Ceux des souches 6 et 60 différaient par seulement deux bandes. Pour l'étude du polymorphisme génétique de notre population, les souches 13, 53 et 60 ont été éliminées.

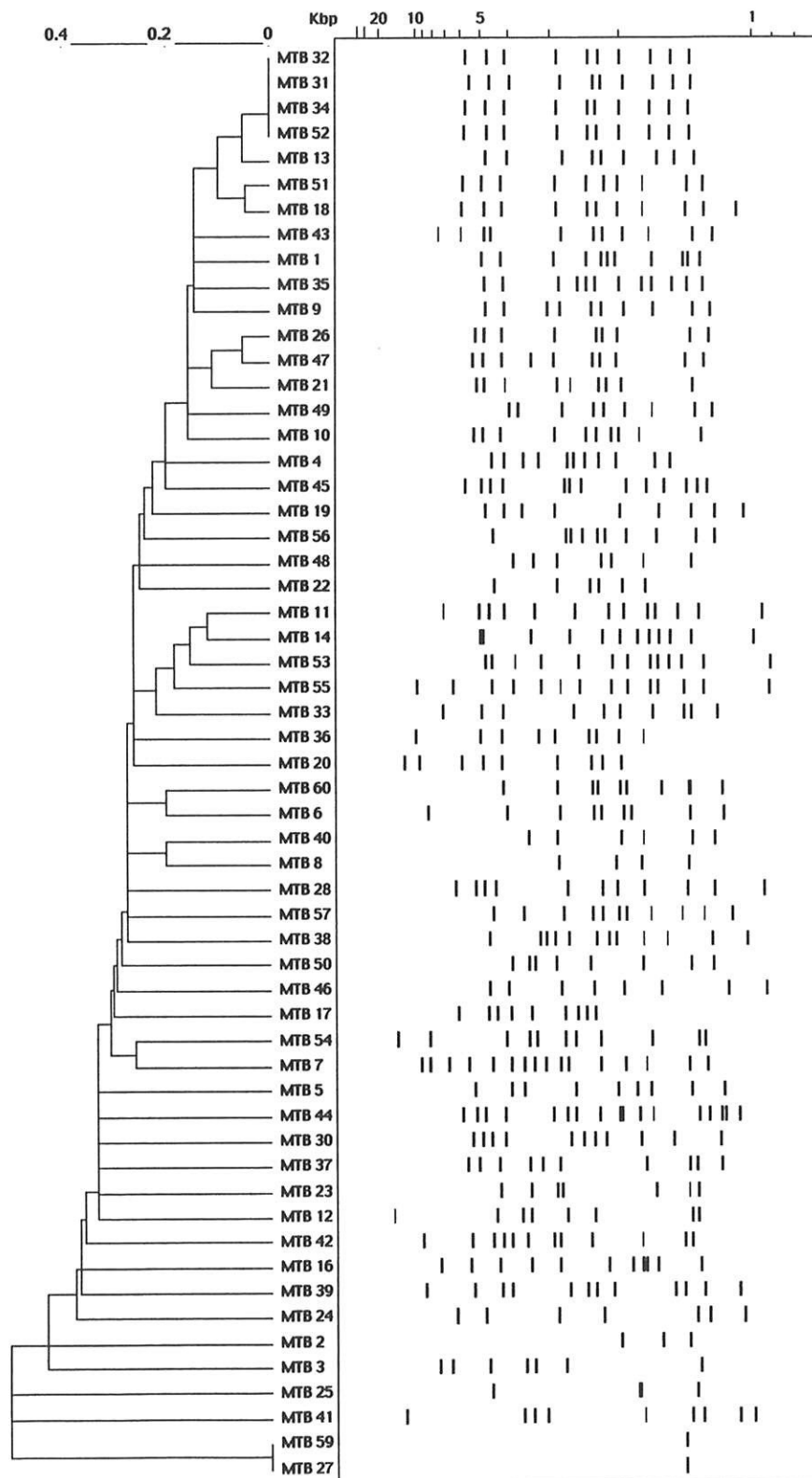


Figure 12 : Dendrogramme généré à partir d'une matrice des distances génétiques (index de Dice et méthode single linkage) représentant les 57 souches de mycobactéries de la tuberculose analysées par la méthode RFLP IS6110

Quatre souches de notre étude ont été le résultat de deux séries de contaminations de laboratoire. En effet, ces souches provenaient de prélèvements cliniques dont l'examen direct était négatif. Par ailleurs, dans les deux séries de contamination, les échantillons cliniques avaient été techniqués en même temps qu'un prélèvement dont l'examen direct était positif. La première série était composée de 4 souches (souches n° 31, 32, 34 et 52) et la seconde de 2 souches (souches n° 27 et 59). Les souches 31 et 27 représentaient les souches à examen direct positif, considérées à l'origine des contaminations. En analysant l'autoradiographie de ces souches (figure 13, page 91), nous avons constaté que les souches 31, 32, 34 et 52 présentaient le même profil de 10 bandes dont les poids moléculaires sont respectivement d'environ 5660, 4790, 4110, 2870, 2385, 2175, 1982, 1695, 1508 et 1392 pb. De la même façon, les souches 27 et 59 se sont révélées posséder le même profil d'une bande de 1392 pb environ. La souche 27, à l'origine de la contamination, provenait d'un tubage gastrique réalisé dans le service de Pathologie respiratoire 3^{ème} niveau chez un patient de 27 ans d'origine asiatique. Seules les souches n° 31 et 27 ont été retenues pour l'étude de la diversité génétique de notre population de souches qui a donc porté sur un total de 50 souches.

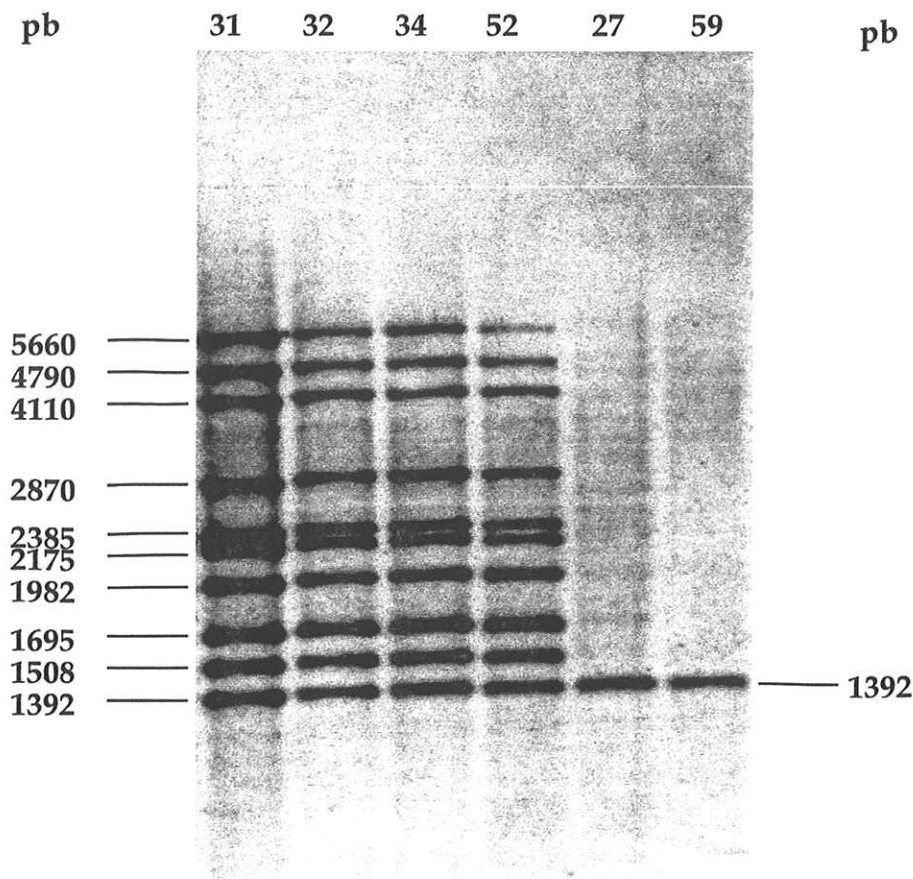


Figure 13 : Autoradiographie après RFLP IS6110 représentant les 2 séries de contamination de laboratoire (souches 31, 32, 34 et 52 ; souches 27 et 59). La taille des fragments est indiqué en paire de base (pb).

II.C -Etude des relations phylogénétiques des souches après agrégation UPGMA

II.C1 - Analyse du polymorphisme des souches de *M. tuberculosis*

Cette analyse a été rendue possible par l'obtention d'une matrice de distance schématisée sous la forme d'un dendrogramme représenté figure 14, page 92. Les différentes souches de *M. tuberculosis* ont pu ainsi être classées en trois grands groupes A, B et C dont la division phylogénétique se situait à une distance génétique de 0,8. Ces trois groupes avaient un effectif respectivement 3 (25, 2 et 27), 7 (3, 24, 41, 12, 42, 37 et 23) et 40 souches.

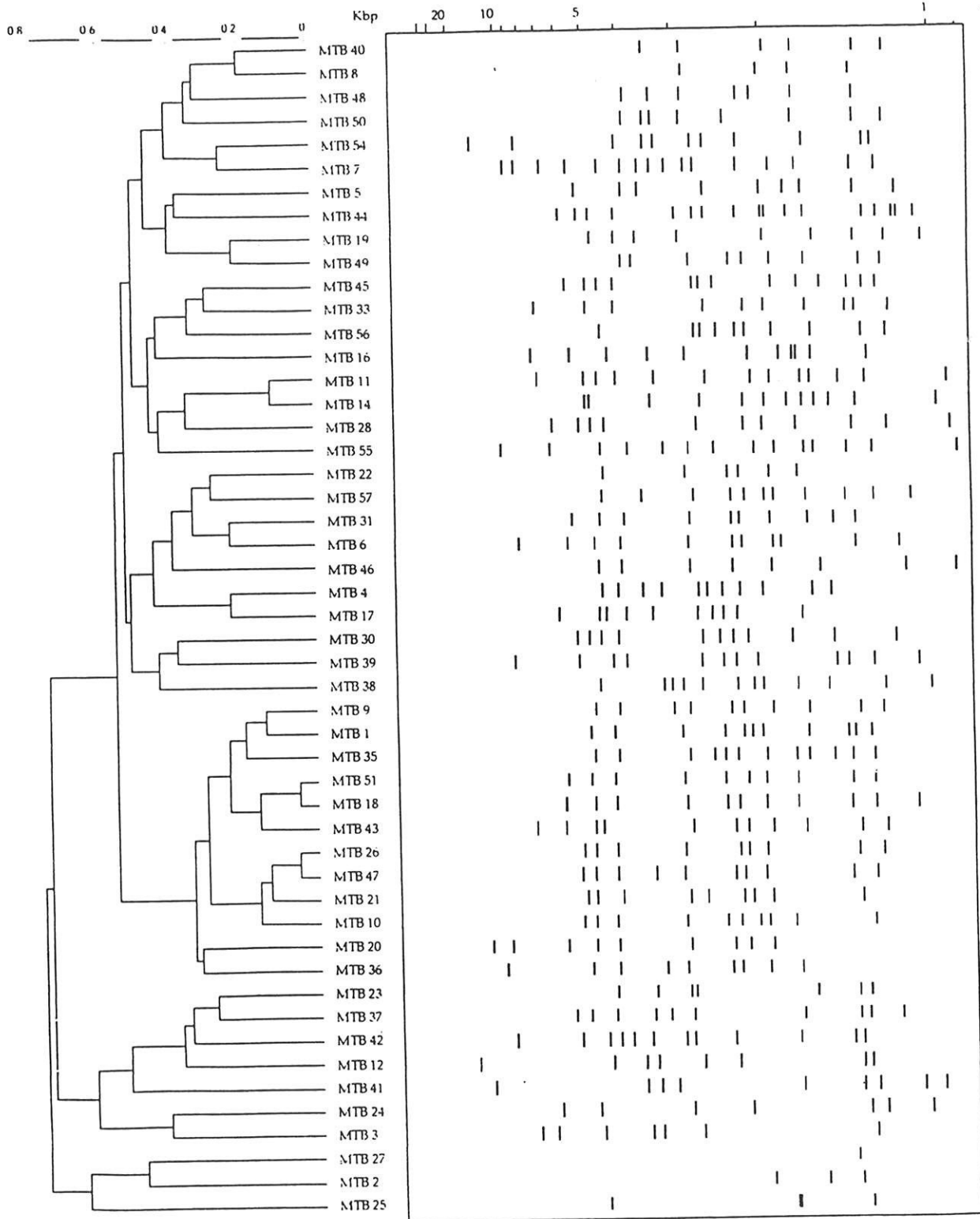


Figure 14 : Dendrogramme généré à partir d'une matrice des distances génétiques (index de Dice et méthode UPGMA) représentant les 50 souches de mycobactéries de la tuberculose analysées par la méthode RFLP IS6110

Le groupe A était composé des souches présentant les plus faibles nombres de copies de la séquence IS6110 (1 à 3 copies) rencontrés dans notre étude, et le groupe B regroupait des souches possédant de 6 à 11 copies. A l'intérieur de ces deux groupes, les souches étaient relativement éloignées phylogénétiquement les unes des autres puisque la majorité se situait à une distance génétique de 0,4.

L'analyse du groupe C a permis d'individualiser 4 sous-groupes C₁, C₂, C₃ et C₄ regroupant respectivement 12 souches (36, 20, 10, 21, 47, 26, 43, 18, 51, 35, 1 et 9) possédant entre 7 et 12 copies d'IS6110, 10 souches (38, 39, 30, 17, 4, 46, 6, 31, 57 et 22) entre 6 et 11 copies, 8 souches (55, 28, 14, 11, 16, 56, 33 et 45) entre 10 et 13 copies et 10 souches (49, 19, 44, 5, 7, 54, 50, 48, 8 et 40) entre 4 et 16 copies. Le sous-groupe C₁ a présenté la particularité, par rapport aux autres sous-groupes, de rassembler les souches les plus proches phylogénétiquement de notre étude. En effet, la plus grande distance génétique entre deux souches était à 0,35, alors que celle des trois autres sous-groupes été située à 0,5 environ. Une analyse plus fine de ces sous-groupes a permis de distinguer 4 ensembles (K₁, K₂, K₃ et K₄) composés chacun de souches très proches phylogénétiquement.

K₁ et K₂ étaient constitués respectivement des souches 21, 26, 47 et 18, 43, 51 dont la distance génétique était inférieur à 0,15 pour K₁ et 0,2 pour K₂. K₃ et K₄ regroupaient quant à eux respectivement les souches 1, 9, 35 et 11, 14 à une distance génétique située entre 0,1 et 0,2 environ.

II.C.2 - Etude des patients composant les ensembles K₁, K₂ K₃ et K₄

Afin de mettre en évidence d'éventuels liens épidémiologiques entre les patients des ensembles K₁, K₂, K₃ et K₄, nous avons été consultés leurs dossiers cliniques. Pour 5 d'entre eux, dont les prélèvements nous avaient été envoyés par des

laboratoires d'analyses médicales, il nous a pas été possible d'obtenir de renseignements supplémentaires.

Deux patients, dont les souches (21 et 47) faisaient partie de l'ensemble K_1 , avaient été hospitalisés à un an d'intervalle dans le service de pathologie respiratoire 3^{ème} niveau (PR3) et avaient bénéficié de prélèvements respiratoires (tubage gastrique et aspiration bronchique). Ces deux patients âgés de 86 et 68 ans, vivaient à domicile dans 2 départements différents (Haute-Vienne et Corrèze) et aucun antécédent de tuberculose ni de cas dans leur entourage n'ont pu être retrouvé.

Deux patients dont les souches avaient été répertoriées dans l'ensemble K_3 (1 et 35), avaient été hospitalisés à un mois d'intervalle dans le service de PR2 et PR3 où ils avaient bénéficié également de prélèvements respiratoires (tubage gastrique et crachat). Là encore, il n'a pas été mis en évidence de lieu de vie commun, d'antécédents de tuberculose ou de cas dans leur entourage.

En ce qui concerne les deux derniers patients, nous n'avons pas eu plus de succès dans nos recherches. En effet, ils avaient été hospitalisés dans 2 services différents (PR2 et ORL) et, comme pour les autres patients, il n'a pas été mis en évidence de lieu de vie commun ni d'antécédents de tuberculose ou de cas dans leur entourage. Ces 2 patients étaient porteurs des souches 43 et 51 qui ont été répertoriées dans l'ensemble K_2 .

Au total, nous avons pu mettre en évidence, par les techniques RAPD et RFLP IS6110, les souches de *M. tuberculosis* issues de deux séries de contamination. L'étude de la diversité génétique de notre population n'a pas fait apparaître de profils évoquant des transmissions de souches entre les différents patients inclus dans notre étude. En effet, il n'a pas été mis en évidence de clone dominant.

C- DISCUSSION

Depuis le milieu des années 1980, la tuberculose a connu un nouvel essor dans les pays développés et en voie de développement. La dégradation des conditions socio-économiques, l'apparition de l'épidémie de SIDA et la mauvaise compliance des patients aux traitements ont été, en partie, rendues responsables de cette augmentation de l'incidence de la maladie. Par ailleurs, la mauvaise compliance au traitement antituberculeux a entraîné l'augmentation du nombre d'isolements de souches résistantes à un ou plusieurs antibiotiques. En France, l'isolement de telles souches reste encore relativement rare puisqu'en 1992, il était évalué à 0,5% des cas de tuberculose.

Le problème de santé publique, que représente la tuberculose, a suscité un grand intérêt de recherche. Les applications de la biologie moléculaire nous ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur le génome des mycobactéries de la tuberculose, facilitant ainsi la mise en évidence de souches épidémiques [69, 142] et l'étude de la dynamique de transmission de la maladie [35, 41, 58].

Pour notre part, nous avons décidé d'associer deux méthodes d'épidémiologie moléculaire différentes, la technique RAPD et la méthode RFLP IS6110 pour étudier épidémiologiquement, 58 souches de *M. tuberculosis* isolées au laboratoire de bactériologie du C.H.U. de Limoges entre 1995 et 1997. Si de nombreux auteurs ont étudié séparément ces deux techniques, aucune étude ne les a, à notre connaissance, associées. Cette association est apparue intéressante à réaliser parce que ces deux méthodes apparaissent complémentaires.

Après avoir analysé les 178 profils de bandes générés par la méthode RAPD nous avons constaté que plusieurs souches possédaient le même profil avec une amorce. Seule l'utilisation des deux autres amorces a permis de les différencier. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés C.J. Linton et al. [85], à savoir que l'utilisation de plusieurs amorces renforce la sensibilité et le pouvoir discriminant de

la technique RAPD. Dans notre étude, quatre-vingt dix sept profils (54,5%) présentaient un maximum de 2 bandes ce qui nous semble insuffisant pour pouvoir apprécier la diversité génétique d'une population. Cette observation est en désaccord avec des résultats publiés [85, 111] qui décrivent un pouvoir discriminant suffisant de la technique RAPD pour envisager de l'utiliser dans l'étude de la diversité génétique d'une population de souches. Cette différence d'analyse peut s'expliquer tout d'abord par le nombre de souches que nous avons à typer. En effet, nous avons du avoir recours à plusieurs séries de manipulations pour amplifier notre population de 58 souches. Or, pour améliorer le pouvoir discriminant de la technique RAPD, Linton et al. [] préconisaient l'utilisation de cette méthode pour le typage d'un petit nombre de souches dont l'amplification pouvait ainsi être réalisée dans la même série de manipulation. La différence de méthode d'extraction utilisée, paramètre intervenant dans le pouvoir discriminant de la technique RAPD [85.], peut également expliquer la différence de nos résultats. En effet, Linton et al. [85] se sont servis, pour extraire l'ADN de leur souches, de coffrets d'extraction commercialisés (GeneReleaser[®], Cambio).

Par contre, par la méthode RAPD, nous avons pu mettre en évidence des profils similaires, quelque soit l'amorce utilisée, pour les souches provenant de deux séries de contaminations dans notre laboratoire comme cela a été décrit par Linton C.J. et al. [85]. Ces contaminations peuvent avoir de lourdes conséquences sur la prise en charge clinique du patient. En effet, même si l'éventualité d'une contamination est en règle générale rapidement suspectée par le laboratoire, le patient fera l'objet de consultations, radiographies et prélèvements biologiques supplémentaires. De plus, un traitement antituberculeux lui sera administré en attendant la confirmation de la contamination. La mise en évidence rapide de ces réactions croisées permettrait donc d'éviter au patient tous ces examens inutiles. La technique RAPD a permis la comparaison des profils des souches de notre population

6 heures environ après l'obtention d'une culture sur L-J. La technique RAPD, par sa rapidité d'exécution, nous apparaît donc très intéressante pour mettre en évidence des souches identiques provenant de contaminations de laboratoire ou d'infections croisées.

L'analyse du polymorphisme des fragments de restriction après hybridation par la sonde *IS6110* nous a permis de confirmer les résultats obtenus par la méthode RAPD, à savoir l'identification des souches issues de contamination de laboratoire. Pour y parvenir, nous avons utilisé la méthode d'agrégation simple linkage qui permet une meilleure comparaison des profils semblables. L'analyse de notre population par la technique RFLP *IS6110* n'a pas montré l'existence de clone dominant, contrairement à de nombreux travaux publiés avec cette méthode [13, 29, 31, 32, 47, 49, 50, 54, 61, 70,77, 131, 141]. A l'aide de cette méthode, nous n'avons pas pu individualiser de groupe de souches dont l'homogénéité était élevée. En effet, les profils qui se sont dégagés présentaient entre 1 et 16 copies d'*IS6110* et la majorité d'entre eux possédaient entre 6 et 12 bandes avec 89,5% des souches qui généraient plus de 5 copies. Ces résultats sont comparables à ceux publiés par Chevrel-Dellagi et al. [35] qui ont identifié entre 1 et 14 copies par profil avec 95% des 201 souches étudiées qui possédaient plus de 6 copies. Van Soolingen et al. [142] ont pour leur part retrouvé entre 1 et 19 copies d'*IS6110* parmi 222 souches testées et la majorité des profils générés présentaient entre 6 et 15 copies. Enfin, Torrea G. et al. [136] ont retrouvé entre 4 et 21 copies parmi 64 souches étudiées avec une majorité des profils qui contenaient entre 4 et 13 copies. Par ailleurs, contrairement à la technique RAPD, l'application de la méthode RFLP *IS6110* nous a permis d'étudier la diversité des souches de notre population. Pour ce faire, nous avons eu recours à la méthode d'agrégation UPGMA qui permet de mieux apprécier la diversité génétique d'une population. La diversité génétique de la population de souches de mycobactéries de la tuberculose que nous avons étudiée témoigne probablement d'un processus de

réactivation dans une population âgée (62 ans de moyenne). Pour les souches génétiquement proches, nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien épidémiologique évident chez les patients dont ces souches étaient issues.

Dans notre étude, nous avons retrouvé 4 souches générant moins de 5 bandes. Une souche présentait 4 bandes d'environ 2800, 2000, 1800 et 1400 pb. Deux autres souches présentaient 3 bandes respectivement de 2000, 1600, 1400 et 4600, 1800, 1300 pb. Enfin, une souche ne présentait qu'une seule copie d'IS6110 de 1400 pb environ. Cette souche a été isolée d'un tubage gastrique réalisé chez un patient de 27 ans d'origine asiatique. Elle a pour origine probable le clone vietnamien de *M. tuberculosis* ne présentant qu'une seule copie de la séquence IS6110 décrit récemment [140, 152].

L'utilisation de logiciels informatiques est d'un grand intérêt, non seulement pour apprécier la diversité génétique d'une population, mais aussi pour la création d'une banque de données qui permettrait de comparer les profils de nouvelles souches isolées et éventuellement de détecter l'émergence d'un nouveau clone épidémique. L'établissement d'un tel système est non seulement souhaitable mais également réalisable puisqu'actuellement, il existe une méthode standardisée [138] de la RFLP IS6110 assurant la reproductibilité des résultats entre laboratoires. Cette méthode nécessite, pour obtenir des données de poids moléculaire, la superposition de deux autoradiographies, la première représentant les profils de chaque souche et la seconde représentant le profil du mélange de marqueurs moléculaires internes (ϕ X174-HaeIII et supercoiled DNA). Dans la pratique, il n'est pas facile de réaliser la superposition de ces autoradiographies. Il nous semblerait plus judicieux d'inclure dans chaque gel (dans 4 puits par exemple) le produit de restriction d'une souche, ou d'un mélange de souches digérées par *PvuII*, contenant entre autre un fragment de très haut poids moléculaire et un fragment de très bas poids moléculaire. De plus, ce système plus simple ne nécessiterait qu'une seule étape d'hybridation. Par ailleurs, l'utilisation de

supercoiled DNA restreint par *PvuII*, contenu dans le mélange de marqueurs, peut présenter des profils différents sur un même gel. Ces différences dans un même gel sont dues à la présence soit de fragments incomplètement digérés, soit de formes superenroulées (figure 15, page 100). L'analyse des fragments se trouve ainsi perturbée et ce second inconvénient plaide en faveur de l'utilisation d'un marqueur externe présent sur plusieurs pistes du gel.

La méthode standardisée préconise l'utilisation du logiciel Gelcompare[®] (Applied-Maths, Kortrijk, Belgium). La détection des bandes avec ce logiciel est basée sur la mesure de l'intensité de la bande et sa mobilité par rapport au marqueur interne, et non sur la position exacte de celle-ci, contrairement aux logiciels Taxotron[®] que nous avons utilisé. Le principe de la détection des bandes avec ces logiciels est le suivant. Le logiciel RestrictoScan[®] détecte la position des bandes et la converti en pixels. A partir des données de migration, le logiciel Restrictotyper[®] va extrapoler ces données en taille à partir des valeurs du marqueur de poids moléculaire. L'utilisation du logiciel Taxotron[®], en respectant le principe de l'inclusion de 4 marqueurs externes pour un gel de 20 puits, permettrait une détermination plus précise des bandes et une comparaison des profils plus fidèle, notamment lorsque les profils ont été obtenus à partir de différents gels. Dans le système Gelcompare[®], l'extrapolation finale de la taille des bandes d'un profil est effectuée par rapport au marqueur interne introduit dans le même puits. Des variations de migration dues notamment, comme nous l'avons déjà précisé, à une digestion incomplète du marqueur ou à la présence de formes superenroulées, entraîne des variations qui nuisent à la comparaison des profils qui ont migré dans le même gel.

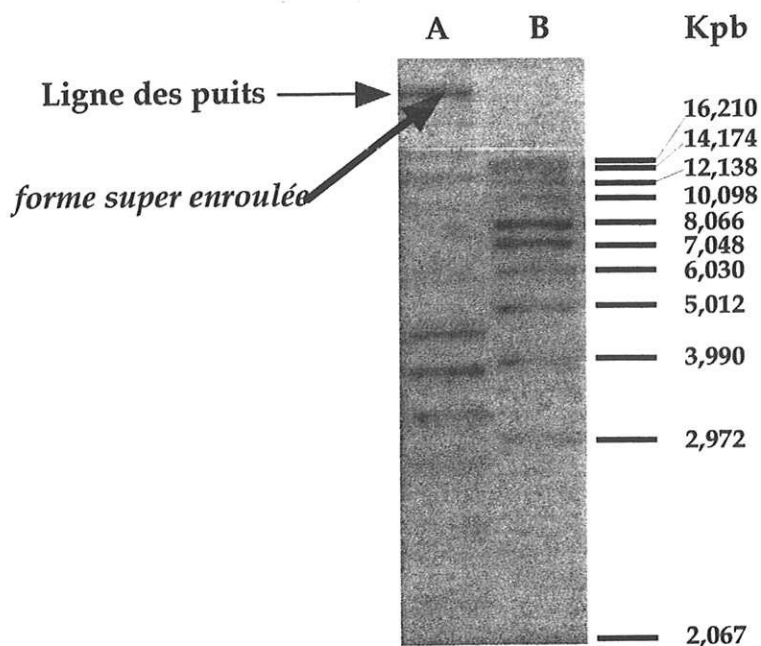


Figure 15 : Dissociation de profils obtenus avec le marqueur supercoiled DNA restreint par *PvuII*. Le profil A présente la forme super enroulée non restreinte de ce marqueur au niveau du puits. Le profil B représente la migration correcte du marqueur.

Au total, nous avons étudié des souches dont le polymorphisme génétique est élevé, et nous n'avons pas mis en évidence de clone dominant. La plupart des souches provenaient de patients nés en France et vivant en Limousin, région à faible incidence de tuberculose. Il n'est donc pas étonnant d'avoir mis en évidence un tel polymorphisme de souches qui témoigne probablement d'un processus de réactivation.

Notre travail mérite d'être poursuivi. En effet, il serait intéressant d'élargir notre population aux souches isolées depuis le début de l'année 1998, et de les étudier avec les mêmes techniques en y apportant les améliorations techniques décrites précédemment. Par ailleurs, il faudrait compléter l'étude des souches présentant peu de copies de la séquence *IS6110* en utilisant des sondes composées d'autres éléments répétitifs du génome des mycobactéries du groupe *tuberculosis* (DR, PGRS, (GTG)₅) ou en utilisant la technique de spoligotypage.

CONCLUSION

Durant de nombreuses années, les enquêtes épidémiologiques concernant les mycobactéries de la tuberculose ont utilisé des techniques peu discriminantes. L'avènement de la biologie moléculaire a permis de développer des méthodes épidémiologiques modernes améliorant nos connaissances sur la dynamique de transmission de la tuberculose.

Nous avons utilisé deux techniques d'épidémiologie moléculaire, la technique RAPD et la méthode RFLP IS6110, pour typer des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges.

La technique RAPD, méthode rapide et facile à mettre en place, constitue une bonne approche pour identifier des contaminations de laboratoire. Par contre, le pouvoir discriminant de cette technique est apparu insuffisant pour étudier la diversité génique de souches de *M. tuberculosis*.

La technique RFLP IS6110, méthode de référence dans l'étude épidémiologique de la tuberculose, a démontré dans notre étude un pouvoir discriminant très satisfaisant et l'utilisation de logiciels informatiques nous a permis de révéler une grande diversité génique parmi les souches de notre population. L'utilisation à l'échelle nationale ou internationale de tels logiciels permettrait la mise en évidence rapide de clones épidémiques, et à partir d'une structure d'alerte, des mesures pourraient alors être prises pour enrayer la propagation de ce clone.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de clone épidémique dans notre population mais quatre souches ont présenté des profils à faible nombre de copies IS6110. Sachant que ce type de souches représente une limite de la technique RFLP IS6110, il serait intéressant, pour les étudier, d'avoir recours à une technique RFLP utilisant comme sonde, d'autres éléments répétitifs du génome des mycobactéries du groupe *tuberculosis* comme les séquences DR, PGRS ou (GTG)₅, ou bien d'avoir recours à une autre méthode de typage des mycobactéries comme le spoligotypage.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

1. **Akopyanz N., Bukanov N.O., Westblom T.U. et al.** DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1992; **20** : 6221-6225.
2. **Alland D., Kalkut G.E., Moss A.R. et al.** Transmission of tuberculosis in New York city. *N. Engl. J. Med.* 1994; **330** : 1710-1716.
3. **Antoine D., Schwoebel V., Veen J. et al.** Surveillance de la tuberculose dans la région Europe de l'OMS, 1995-1996. *Eurosurveillance.* 1998; **3** : 103-107.
4. **Aranaz A., Liebana E., Mateos A. et al.** Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals : a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1996; **34** : 2734-2740.
5. **Arbeit R.D., Arthur M., Dunn R. et al.** Resolution of recent evolutionary divergence among *Escherichia coli* from related lineages : the application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. *J. Infect. Dis.* 1990; **161** : 230-235.
6. **Audoin J., Capron F.** Notion d'inflammation spécifique : la tuberculose ganglionnaire. *Rev. Prat.* 1993; **43** : 1851-1855.
7. **Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H.** Bactériologie clinique. Deuxième édition. Paris, Ellipses, 1992. p. 389-409.
8. **Barnes P.F., Bloch A.B., Davidson P.T. et al.** Tuberculosis in patients with Human Immunodeficiency Virus infection. *New Engl. J. Med.* 1991; **324** : 1644-1650.
9. **Bates J.H., Fitzhugh J.K.** Subdivision of the species *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacteriophages typing. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1967; **96** : 7-10.
10. **Bates J.H., Mitchinson D.A.** Geographic distribution of bacteriophage types of *Mycobacterium tuberculosis*. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 1969; **100** : 189-193.
11. **Bautsch W., Grothues D. et Tümmler B.** Genome fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* by two dimensional field inversion gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 1988; **52** : 255-258.
12. **Beavis K.G., Lichty M.B., Jungkind D.L. et al.** Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1995; **33** : 2582-2586.
13. **Beck-Sagué C., Dooley S.W., Hutton M.D. et al.** Hospital outbreak of multidrug-resistant *M. tuberculosis* infections. *JAMA.* 1992; **268** : 1280-1286.
14. **Bellin E.** Failure for tuberculosis control : a prescription for change. *JAMA.* 1994; **271** : 708-709.
15. **Bennedsen J., Thomsen V.O., Pfyffer G.E. et al.** Utility of PCR in diagnosis pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1996; **34** : 1407-1444.
16. **Berche P., Gaillard J.L.** De la biologie à la clinique - Les bactéries des infections humaines. Paris, Médecine-Sciences, Flammarion, 1988. p. 407-422.
17. **Bercovier H., Kafri O., Sella S. et al.** Mycobacteria possess surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986; **136** : 1136-1144

18. **Bergmann J.S., Woods G.L.** Clinical evaluation of the Roche Amplicor PCR *Mycobacterium tuberculosis* test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1996; **34** : 1083-1085.
19. **Berkow R., Fletcher A.J.** Manuel Merck de diagnostic et de thérapeutique. Deuxième édition. Paris, Sidem-T.M., 1988. p. 118-132.
20. **Bingen E., Boissinot C., Desjardins P. et al.** Arbitrarily primed polymerase chain reaction provides rapid differentiation of *Proteus mirabilis* isolates from a pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 1993a; **31** : 1055-1059.
21. **Bingen E., Cave H., Aujard Y. et al.** Molecular analysis of multiply recurrent meningitidis due to *Escherichia coli* K 1 in an infant. *Clin. Infect. Dis.* 1993b; **16** : 82-85.
22. **Bloch A.B., Cauthen G.M., Onorato I.M. et al.** Nationwide survey of drug-resistant tuberculosis in the United States. *JAMA.* 1991; **271** : 665-671.
23. **Bloom B.R., Murray J.L.** Tuberculosis : commentary on a reemergent killer. *Science.* 1992; **257** : 1055-1064.
24. **Bouvet E.** Epidemiologie de la tuberculose en France. *Med. Mal. Infect.* 1994; **24** : 557-561.
25. **Braun M.M., Coté T.R., Rabkin C.S.** Trend in deaths with tuberculosis during the AIDS era. *JAMA.* 1993; **269** : 2865-2868.
26. **Caetano-Anolles G., Bassam B.J., Gresshof P.M.** DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotides primers. *Biotechnology.* 1991; **9** : 553-557.
27. **Canetti G., Grosset J.** Teneur des souches sauvages de *Mycobacterium tuberculosis* en variants résistants à l'isoniazide et en variant résistant à la streptomycine sur milieu de Löwenstein-Jensen. *Ann. Inst. Pasteur.* 1961; **101** : 28.
28. **Cantwell M.F., Snider D.E., Cauthen G.M. et al.** Epidemiology of tuberculosis in the United States, 1985 though 1992. *JAMA.* 1994; **272** : 535-539.
29. **Castel O., Burucoa C., Antoniotti B. et al.** Analyse d'une épidémie de tuberculose en 1992 dans le service de Pneumo-Phtisiologie du CHU de Poitiers. *B.E.H.* 36/1994. p. 61-63.
30. **Cave M.D., Eisenach K.D., Mc Dermott P.F. et al.** IS6110 : conservation of the sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol. Cell. Probes.* 1991; **5** : 73-80.
31. **Centers for disease control.** Nosocomial transmission of multidrug-resistant tuberculosis among HIV-infected persons, Florida and New York, 1988-1991. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 1991; **10** : 585-591.
32. **Centers for disease control.** Transmission of multidrug-resistant tuberculosis among immuno-compromised persons in a correctionnal system. New York 1991. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 1992; **41** : 507-509.
33. **Centers for disease control.** Tuberculosis morbidity - United States, 1992. *MMWR.* 1993; **42** : 696-704.

34. **Chaves F., Yang Z., Hajj H.E. et al.** Usefulness of the secondary probe pTBN12 in DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1996; **34** : 1118-1123.
35. **Chevrel-Dellagi D., Abderrahman A., Haltiti R. et al.** Large-scale DNA fingerprinting of *M. tuberculosis* strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1993; **31** : 2446-2450.
36. **Chretien J.** Le BCG, vaccin du passé ou du futur. Med. et Hyg. 1992; **50** : 1056-1062.
37. **Clavel-Serres S., Clement F.** Distribution of lysotypes of *Mycobacterium* in relation to the country of origine of the patient. Ann. Microbiol. 1984; **135 B (1)** : 35-44.
38. **Cole S.T., Brosch R., Parkhill J. et al.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998; **393** : 537-544.
39. **Collins D.M., De Lisle G.W.** DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. J. Gen. Microbiol. 1984; **130** : 1019-1021.
40. **Collins D.M., Stephens D.M.** Identification of insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. FEMS Letters. 1991; **83** : 11-16.
41. **Coronado V.G., Beck-Sague C.M, Hutton M.D. et al.** Transmission of multidrug - resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with Human Immunodeficiency Virus Infection in a urban Hospital : epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. J. Infect. Dis. 1993; **168** : 1052-1055.
42. **D'Amato R.F., Wallman A.A., Hochstein L.H. et al.** Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. J. Clin. Microbiol. 1995; **33** : 1832-1834.
43. **Dautzenberg B.** Aspects diagnostiques actuels de la tuberculose. Médecine thérapeutique. 1995; **1** : 47-55.
44. **David H.L., Vincent V.** Traité de microbiologie clinique. A. Eyquem, J. Alouf et L. Montagnier. Padoue, Ed. Piccin Nuova Libreria, 1998. p. 669-688.
45. **Decludt B., Pocquet K.** Les cas de tuberculose déclarés en France en 1996. B.E.H. 1998; N° spécial : 51-52.
46. **Devallois A., Horgen L., Sola C. et al.** Le typage moléculaire des mycobactéries. Path. Biol. 1998; **46**, n°8 : 625-636.
47. **Dooley S.W., Villarino M.E., Lawrence M. et al.** Nosocomial transmission of tuberculosis in a hospital unit for HIV-infected patient. JAMA. 1992; **267** : 2632-2634.
48. **Dorant T.J., Hodgson A.L.M., Davies J.K. et al.** Characterization of a novel repetitive DNA sequence from *Mycobacterium bovis*. FEMS Microbiol. Lett. 1992; **96** : 179-186.
49. **Dwyer B., Jackson K., Raios K. et al.** DNA restriction fragment analysis to define an extented cluster of tuberculosis in homeless men and their associates. J. Infect. Dis. 1993; **167** : 490-494.
50. **Edlin B.R., Tokars J.I., Grieco M.H. et al.** An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 1992; **326** : 1514-1521.

51. **Eisenach K.D., Crawford J.T., Bates J.H.** Repetitive DNA sequences as probes for *M. tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 1988; **26** : 2240-2245.
52. **Fang Z., Doig C., Rayner A. et al.** Molecular evidence for heterogeneity of the multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* population in Scotland (1990 to 1997). *J. Clin. Microbiol.* 1999; **37** : 998-1003.
53. **Fang Z., Forbes K.J.** A *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 preferential locus (*ipl*) for insertion into the genome. *J. Clin. Microbiol.* 1997; **35** : 479-501.
54. **Fischl M.A., Uttamchandani R.B., Daikos G.L. et al.** An outbreak of tuberculosis caused by multiple-drug resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. *Ann. Intern. Med.* 1992; **117** : 177-183.
55. **Freney J., Lasne Y., Meugnier H. et al.** Identification rapide de cultures de mycobactéries appartenant au complexe *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium avium* à l'aide de sondes d'ADN. *Rev. Fr. Lab.* 1989; **189** : 33-36.
56. **Frieden T.R., Sterling T., Pablos-Mendez A. et al.** The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York city. *New Engl. J. Med.* 1993; **328** : 521-526.
57. **Friedman C.R., Stoeckle M.Y., Johnson W.D.J. et al.** Double- repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1995; **33** : 1383-1384.
58. **Genewein A., Telenti A., Bernasconi C. et al.** Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. *Lancet.* 1993; **342** : 841-844.
59. **Gillepsie S.H., Kennedy N., Ngowi F.I. et al.** Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Northern Tanzania. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 1995; **89** : 335-338.
60. **Githui W.A., Wilson S.M., Drobniewski F.A.** Specificity of IS6110-based DNA fingerprinting and diagnosis techniques for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 1999; **37** : 1224-1226.
61. **Godfrey-Faussett P., Stoker N.G.** Aspects of tuberculosis in Africa. 3. Genetic fingerprinting for clues to the pathogenesis of tuberculosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med.* 1992; **86** : 472-475.
62. **Goyal M., Saunders N.A., Van Embden J.D.A. et al.** Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 1997; **35** : 647-649.
63. **Grimont F. and Grimont P.A.D.** Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Res. Microbiol.* 1986; **137 B** : 165-175.
64. **Groenen P.M.A., Bunschoten A.E., Van Soolingen D. et al.** Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis* ; Application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.* 1993; **10** : 1057-1065.
65. **Gutiérrez M.C., Galan J.C., Blazquez J. et al.** Molecular markers demonstrate that the first described multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* outbreak was due to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 1999; **37** : 971-975.

66. **Gutiérrez M.C., Vincent V., Aubert D. et al.** Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J. Clin. Microbiol.* 1998; **36** : 486-492.
67. **Haas W.H., Butler W.R., Woodley C.L. et al.** Mixed-linker Polymerase Chain Reaction : a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 1993; **31** : 1293-1298.
68. **Haury B., Salomon J.** Les cas de tuberculose déclarés en France en 1993. *B.E.H.* 44/1994. p. 203-205.
69. **Hermans P.W.M., Van Soolingen D., Bick E.M. et al.** Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* 1991; **59** : 2695-2705.
70. **Hermans P.W.M., Van Soolingen D., Dale J.W.** Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis* : a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1990; **28** : 2051-2058.
71. **Honoré N., Cole S.T.** Streptomycin resistance in mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; **38** : 238-242.
72. **Hubert B., Decludt B., Vaillant V. et al.** Analyse critique de la situation épidémiologique de la tuberculose en France et propositions. Conférence d'experts sous l'égide de la SPLF et de la SPILF : la tuberculose en France : comment arrêter l'épidémie actuelle? 15 décembre 1994.
73. **Hubert B., Desenclos J.C., Schwoebel V.** Epidémiologie actuelle de la tuberculose. *Med. Ther.* 1995; **1** : 7-16.
74. **Hubert B., Pelletier A.** les cas déclarés de tuberculose en France en 1990. *B.E.H.* 48/1991. p. 214-215.
75. **Huret B., Haury B., Moyse C.** Les cas de tuberculose déclarés en France en 1992. *B.E.H.* 52/1993. p. 243-245.
76. **Jayaro B.M., Bassam B.J., Caetano-anolles G. et al.** Subtyping of *Streptococcus uberis* by DNA amplification fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* 1992; **30** : 1347-1350.
77. **Jereb J.A., Burwen D.R., Dooley S.W. et al.** Nosocomial outbreak of tuberculosis in a renal transplant unit : application of a new technique for restriction fragment length polymorphism analysis of *M. tuberculosis* isolates. *J. Infect. Dis.* 1993; **168** : 1219-1224.
78. **Jonas V., Alden M.T., Curry J.L. et al.** Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 1993; **31** : 2410-2416.
79. **Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A. et al.** Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1997; **35** : 907-914.
80. **Kent L., MC Hugh T.M., Billington O. et al.** Demonstration of homology between IS6110 of *Mycobacterium tuberculosis* and dans of other *Mycobacterium* spp. *J. Clin. Microbiol.* 1995; **33** : 22290-22293.

81. **Konno K., Feldman F.M., Mc Dermott W., et al.** Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1995, **67** : 461- 469.
82. **Lebrun I., Espinasse F., Poveda J.D. et al.** Evaluation of non radioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1992; **30** : 2476-2478.
83. **Leckie G., Alcalde X.** Clinical performance of the LCX *Mycobacterium tuberculosis* assay in a multi-center study. Proceeding of the 18th annual congress of the European Society of Mycobacteriologie. *Span. J. Chemother (Quimioterapia)*. 1997; **10** (supp. 2) : 5.
84. **Lehmann P.F., Lin D., Lasker B.A.** Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *J. Clin. Microbiol.* 1992; **30** : 3249-3254.
85. **Linton C.J., Jalal H., Leeming J.P. et al.** Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by Random Amplified Polymorphism DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1994; **32** : 2169-2174.
86. **Marchal G.** La réponse immunitaire au cours de la tuberculose. *Ann. Inst. Pasteur/ actualités.* 1993, **4** : 216-224.
87. **Maslow J.N., Mulligan M.E., Arbeit R.D.** Molecular epidemiology : application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin. Infect. Dis.* 1993; **17** : 153-164.
88. **Mazurek G.H., Cave M.D., Eisenach K.D. et al.** Chromosomal DNA fingerprint produced with IS6110 as strain specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991; **29** : 2030-2033.
89. **Mazurier S.I., Wernars K.** Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. *Res. Microbiol.* 1992; **143** : 499-505.
90. **Mc Adam R.A., Hermans P.W.M., Van Soolingen D. et al.** Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol. Microbiol.* 1990; **4** : 1607-16113.
91. **Mc Hugh T.D., Gillepsie S.H.** Nonrandom association of IS6110 and *Mycobacterium tuberculosis* : implications for molecular epidemiological studies. *J. Clin. Microbiol.* 1998; **36** : 1410-1413.
92. **Mc Hugh T.D., Newport L.E., Gillepsie S.H.** IS6110 homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1997; **35** : 1769-1771.
93. **Mendiola M.V., Martin C., Otal I. et al.** Analysis of the regions responsible for IS6110 RFLP in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Res. Microbiol.* 1992; **143** : 767-772.
94. **Miller J.M.** Molecular technology for hospital epidemiology. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; **16** : 153-157.
95. **Mohabeer A.J., Hiti A.L., Martin W.J.** Non-radioactive Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) using the Pharmacia "Phast System". *Nucl. Acids Res.* 1991; **19** : 3154.

96. **Moore D.F., Curry J.I.** Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1995; **33** : 2686-2691.
97. **Otal I., Martin C., Vincent-Levy-Frebault V. et al.** Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 1991; **29** : 1252-1254.
98. **Otal I., Samper S., Asensio M.P. et al.** Use of a PCR method based on IS6110 polymorphism for typing *Mycobacterium tuberculosis* strains from BACTEC cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1997; **35** : 273-277.
99. **Pablos-Mendez A., Raviglione M.C., Laszlo A. et al.** Global surveillance for anti tuberculosis drug-resistance, 1994-1997. *N. Engl. J. Med.* 1998; **338** : 1641-1649.
100. **Palittapongarnpim P., Chomyc S., Fanning A. et al.** DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 1993; **21** : 671-672.
101. **Patel S., Wall S., Saunders N.A.** Heminested Inverse PCR for IS6110 Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* Strains. *J. Clin. Microbiol.* 1996; **34** : 1686-1690.
102. **Peterson L.R., Petzel R.A., Clabots C.R. et al.** Medical technologists using molecular epidemiology as part of the infection control team. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; **16** : 303-311.
103. **Philip W.J., Poulet S., Eiglmeier K. et al.** An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and comparison with *Mycobacterium leprae*. *Proc. Natl. Sci. USA.* 1996; **93** : 3132-3137.
104. **Plikaytis B.B., Crawford J.T., Woodley C.L. et al.** Rapid amplification based fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Gen. Microbiol.* 1993; **139** : 1537-1542.
105. **Poulet S., Cole S.T.** Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Microbiol.* 1995; **163** : 87-95.
106. **Prod'hom G., Guilhot C., Gutierrez M.C. et al.** Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by ligation-mediated PCR fingerprinting analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1997; **35** : 3331-3334.
107. **Quenum B., Hubert B., Grosset J.** La tuberculose en France de 1970 à 1989. *B.E.H.* 1990; **3** : 11.
108. **Ramos M.C., Soini H., Roscanni G.C. et al.** Extensive cross-contamination of specimens with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 1999; **37** : 916-919.
109. **Raviglione M.C., Narain J.P., Kochi A.** HIV associated tuberculosis in developing countries : clinical features, diagnosis and treatment. *Bull. WHO.* 1992; **70** : 515-526.
110. **Raviglione M.C., Sudre P., Rieder H.L. et al.** Secular trends of tuberculosis in Western Europe : epidemiological situation in 14 countries. *Rapport WHO/TB 92.* 1992. 170. Genève : OMS, 29 p.

111. **Richner S.M., Meiring J., Kirby R.** A study of the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients in the eastern province of South Africa using random amplified polymorphic DNA profiling. *Electrophoresis*. 1997; **18** : 1570-1576.
112. **Rigouts L., Portaels F.** DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* do not change during the development of resistance to various antituberculous drugs. *Tubercle Lung Dis*. 1994; **75** : 160.
113. **Ross B.C., Dwyer B.** Rapid simple method for typing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993; **31** : 329-334.
114. **Ross B.C., Raios K., Jackson K. et al.** Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.* 1992; **30** : 942-946.
115. **Saiki R.K., Scharf S., Faloona F. et al.** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science*. 1985; **230**: 1350-1354.
116. **Saulnier P., Bourneix C., Prevost G. et al.** Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 1993; **31** : 982-985.
117. **Schaffer H.E. and Sedevoff R.R.** Improved estimation of DNA fragments lengths from agarose gel. *Analyt. Biochem.* 1981; **115** : 113-122.
118. **Schlichting C., Branger C., Fournier J.M. et al.** Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing : resolution of clonal relationships. *J. Clin. Microbiol.* 1993; **31** : 227-232.
119. **Schwobel V., Papillon F., Haeghebaert S. et al.** Surveillance de la tuberculose à bacilles multi-résistants en 1992. *B.E.H.* 1992. **50** : 235-236.
120. **Schwobel V., Antoine D., Veen J. et al.** Surveillance of tuberculosis in Europe- Report on tuberculosis cases notified in 1996. *Euro TB*. 1998 : 95 p.
121. **Sechi L.A., Zanetti S., Delogu G. et al.** Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from different regions of Italy and Pakistan. *J. Clin. Microbiol.* 1996; **34** : 1825-1828.
122. **Skuce R.A., Brittain D., Hughes M.S. et al.** Genomic fingerprinting of *Mycobacterium bovis* from cattle by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1994; **32** : 2387-2392.
123. **Small P.M. and Van Embden J.D.A.** Molecular epidemiology of tuberculosis. *In* : BLOOM B.R. (ed.) - *Tuberculosis : Pathogenesis, Protection, and Control*. ASM Press, Washington, DC, USA, 1994. p. 569-582.
124. **Small P.M., Hopewell P.C., Singh S.P. et al.** The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *N. Engl. J. Med.* 1994; **330** : 1703-1709.
125. **Small P.M., Mc Clenny N., Singh S.P. et al.** Molecular strain typing of *M. tuberculosis* to confirm cross contamination in the mycobacteriology laboratory and modification of procedures to minimize occurrence of false-positive cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1993a; **31** : 1677-1682.

126. **Small P.M., Moss A.** Molecular epidemiology and the new tuberculosis. *Infect. Agents Dis.* 1993b; **2** : 132-138.
127. **Small P.M., Schecter G.F., Goodman P.C.** Treatment of tuberculosis in patients with advanced Human Immunodeficiency Virus infection. *N Engl. J. Med.* 1991; **324** : 289-294.
128. **Sneath P.H.A., Sokal R.R.** Numerical taxonomy W.H. Freeman, San Francisco, CA. 1973.
129. **Sola C., Legrand E., maisetti J. et al.** Epidémiologie moléculaire de la tuberculose dans le département de la Guadeloupe de 1994 à 1996. *B.E.H.* 2/1999.
130. **Sudre P., Dam G.T., Kochi A.** La tuberculose aujourd'hui dans le monde. *Bull. OMS.* 1992; **70** : 297-308.
131. **Tabet S.R., Goldbaum G.M., Hooton T.M. et al.** Restriction fragment length polymorphism analysis detecting a community-based tuberculosis outbreak among persons infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 1994; **169** : 189-192.
132. **Takiff H.E., Salazart, Guerrero C. et al.** Cloning and nucleotide sequence of the *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes, and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; **38** : 773-780.
133. **Telenti A., Imboden P., Marchesi F. et al.** Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 1993; **341** : 647-650.
134. **Thierry D., Brisson-Noël A., Vincent Levy-Frebault V. et al.** Characterization of a *mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 1990; **28** : 2668-2673.
135. **Thierry D., Cave M.D., Eisenach K.D. et al.** IS6110, an IS-like element of *mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucl. Acids Res.* 1990; **18** : 188.
136. **Torrea G., Levee G., Grimont P. et al.** Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive element DR as strain specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. *J. Clin. Microbiol.* 1995; **33** : 1899-1904.
137. **Torrea G., Offredo C., Simonet M. et al.** Evaluation of tuberculosis transmission in a community by one year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1996; **34** : 1043-1053.
138. **Van Embden J.D.A., Cave M.D., Crawford J.T. et al.** Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : recommandations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 1993; **31** : 406-409.
139. **Van Soolingen D. and Hermans P.W.M.** Epidemiology of tuberculosis by DNA fingerprinting. *Eur. respir. J.* 1995; **8** : 653-656.
140. **Van Soolingen D., De Haas P.E.W., Hermans P.W.M. et al.** Comparison of various repetitives DNA elements as genetic marker for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 1993; **31** : 1987-1995.

141. **Van Soolingen D., Hermans P.W.M, de Hass P.E.W. et al.** Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphism in *M. tuberculosis* complex species : a reliable tool for recognizing *M. bovis* BCG. J. Clin. Microbiol. 1992; **30** : 1772-1777.
142. **Van Soolingen D., Hermans P.W.M., De Haas P.E.W. et al.** Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains : evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1991; **29** : 2578-2586.
143. **Van Soolingen D., Qian L., de Hass P.E.W. et al.** Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. J. Clin. Microbiol. 1995; **33** : 3234-3238.
144. **Vannier A.N., Tarrand J.J., Murray P.R.** Mycobacterial cross contamination during radiometric culturing. J. Clin. Microbiol. 1988; **26** : 1867-1868.
145. **Vincent Levy-Frebault V.** Méthodes rapides de détection et de diagnostic des mycobactéries : actualité et perspectives. Med. Mal. infect. 1992 ; **22** : 391-406.
146. **Vuorinen P., Miettinen A., Vuento R. et al.** Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimen by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test and Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test. J. Clin. Microbiol. 1995; **33** : 1856-1859.
147. **Welsh J., Mc Clelland M.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 1990; **18** : 7213-7218.
148. **Wiid I.J.F., Werely C., Beyers N. et al.** Oligonucleotide (GTG)₅ as a marker for *Mycobacterium tuberculosis* strain identification. J. Clin. Microbiol. 1994; **32** : 1318-1321.
149. **Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J. et al.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers as useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 1990; **18** : 6531-6535.
150. **Wobeser W.L., Krajden M., Couley J. et al.** Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 1996; **34** : 134-139.
151. **Yang Z., Chaves F., Barnes P.F. et al.** Evaluation of method for secondary DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in epidemiologic study of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 1996; **34** : 3044-3048.
152. **Yuen L.K.W., Ross B.C., Jackson K.M. et al.** Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by southern blot hybridization. J. Clin. Microbiol. 1993; **31** : 1615-1618.
153. **Zhang Y., Heym B., Allen B. et al.** The catalase-peroxydase gene and isoniazid resistance of *M. tuberculosis*. Nature. 1992; **358** : 591-593.
154. **Zhang Y., Mazurek G.H., Cave M.D. et al.** DNA polymorphisms in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analysed by pulse-field gel electrophoresis : a tool of epidemiology. J. Clin. Microbiol. 1992; **30** : 1549-1556.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
GENERALITES	4
I - Caractéristiques microbiologiques des mycobactéries de la tuberculose	5
I.A - Morphologie	5
I.B - Culture	6
I.C - Identification biochimique	7
II - Pouvoir pathogène du bacille de Koch	9
II.A - Pouvoir pathogène chez l'animal	9
II.B - Pouvoir pathogène chez l'homme	10
II.B.1 - La transmission de la tuberculose	10
II.B.2 - La tuberculose primaire	10
II.B.3 - Evolution de la tuberculose primaire	11
III - Les différentes formes de la maladie tuberculeuse	12
III.A - Les formes pulmonaires	12
III.B - Les formes extra-pulmonaires	13
IV - Diagnostic bactériologique de la tuberculose	16
IV.A - Le diagnostic direct	18
IV.A.1 - Les prélèvements et leur traitement	18
IV.A.2 - L'examen direct	19
IV.A.3 - Isolement par culture	21
IV.A.4 - Identification	22
IV.A.5 - Détection direct des mycobactéries par amplification génique	23
IV.A.6 - Sensibilité de <i>M. tuberculosis</i> aux agents antituberculeux	27
IV.B - Le diagnostic indirect	31
V - Epidémiologie générale	32
V.A - La tuberculose dans le monde	32

V.B - La tuberculose aux Etats-Unis	33
V.C - La tuberculose en Europe	35
V.D - La tuberculose en France	36
V.D.1 - Evolution entre 1970 et 1989	37
V.D.2 - Evolution entre 1990 et 1993	37
V.D.3 - Evolution depuis 1994	39
V.D.4 - Evolution dans le limousin	40
VI - Les marqueurs moléculaires de l'épidémiologie	40
VI.A - Le génome de <i>M. tuberculosis</i>	40
VI.B - Les différentes techniques de marquage épidémiologique pour <i>M. tuberculosis</i>	42
VI.B.1 - Les marqueurs phénotypiques	42
VI.B.2 - Les marqueurs génotypiques	44
VI.C - Place des marqueurs moléculaires dans l'épidémiologie	54
 TRAVAIL PERSONNEL	62
A - Matériels et méthodes	63
I - Souches	63
II - Patients	63
III- Milieux et condition de culture	64
IV - Extraction des ADN de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	65
IV.A - Extraction rapide de l'ADN de mycobactéries à partir de tubes Löwenstein-Jensen	65
IV.B - Extraction classique de l'ADN de mycobactéries à partir de tubes Löwenstein-Jensen	65
IV.B.1 - Lyse bactérienne	65
IV.B.2 - Déprotéinisation	66
V - La technique RAPD	67
V.A - Amorces utilisées	67
V.B - Mélange réactionnel	67
V.C - Le cycle réactionnel	68

V.D - Analyse des produits d'amplification par électrophorèse	68
VI - Analyse du polymorphisme des fragments de restriction après hybridation par la sonde IS6110	69
VI.A - Digestion de l'ADN total de <i>M. tuberculosis</i> obtenu après extraction classique	69
VI.A.1 - Evaluation de la quantité d'ADN à digérer	69
VI.A.2 - Digestion de l'ADN total par <i>PvuII</i>	71
VI.B - Migration de l'ADN digéré par électrophorèse	71
VI.B.1 - Préparation du Supercoiled DNA ladder- <i>Pvu II</i>	71
VI.B.2 - Evaluation du volume d'ADN digéré à faire migrer	71
VI.B.3 - Migration par électrophorèse de 2,5 µg d'ADN digéré	73
VI.C. - Transfert sur membrane du gel obtenu après électrophorèse (Southern blotting)	75
VI.C.1 - Traitement du gel avant transfert	75
VI.C.2 - Transfert du gel sur membrane	75
VI.D - Hybridation et révélation des fragments de restriction des ADN digérés	76
VI.D.1 - Préparation de la sonde IS6110 par PCR	76
VI.D.2 - Hybridation et révélation de la membrane	77
VI.D.2.a - Préparation de la solution de préhybridation	77
VI.D.2.b - Hybridation de la membrane	77
VI.D.2.c - Lavage de la membrane	78
VI.D.2.d - Révélation autoradiographique du transfert	78
VI.E - Hybridation et révélation des marqueurs internes de poids moléculaire	79
VI.E.1 - "Stripping" de la membrane	79

VI.E.2 - Hybridation et révélation de la membrane	79
VII - Analyse et interprétation des données	79
B - Résultats	82
I - Technique RAPD	82
I.A - Amorce IS 986 BK	82
I.B - Amorce INS 2	84
I.C - Amorce CAR 2	85
I.D - Comparaison des amorces	85
II - Technique RFLP IS6110	87
II.A - Analyse du nombre de copies IS6110	87
II.B - Comparaison des profils après agrégation par la méthode simple linkage	88
II.C - Etude des relations phylogénétiques des souches après agrégation UPGMA	91
II.C.1 - Analyse du polymorphisme des souches de <i>M. tuberculosis</i>	91
II.C.2 - Etude des patients composant les ensembles K_1 , K_2 , K_3 et K_4	93
C - Discussion	95
CONCLUSION	101
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

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

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 25

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME

Même si l'incidence de la tuberculose a tendance actuellement à se stabiliser dans les pays développés, cette maladie reste de nos jours un véritable fléau responsable de 3 millions de décès chaque année dans le monde.

Le développement des techniques de biologie moléculaire appliquées à l'épidémiologie de la tuberculose a permis d'acquérir une meilleure compréhension de la transmission de cette maladie.

Nous avons utilisé deux techniques de biologie moléculaire, la RAPD et la RFLP IS6110, pour étudier sur un plan épidémiologique 58 souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées au laboratoire de Bactériologie du CHU de Limoges entre 1995 et 1997.

La RAPD, de part sa facilité d'utilisation et sa rapidité, est apparue intéressante dans la mise en évidence de souches issues de contaminations de laboratoire et la RFLP IS6110, quant à elle, a révélé une importante diversité génétique parmi notre population. Par ailleurs, il n'a pas été mis en évidence de clone dominant dans notre population.

L'utilisation généralisée de logiciels informatiques devrait favoriser la comparaison des profils de nouvelles souches isolées et détecter l'émergence éventuelle d'un clone épidémique.

MOTS-CLES : *Mycobacterium tuberculosis* - Marqueurs épidémiologiques - RAPD - RFLP IS6110.