

**UNIVERSITE DE LIMOGES**

**FACULTE DE PHARMACIE**

---

ANNEE 2010

THESE N°...

**Séquençage du gène *pncA* :**  
**Installation au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène**  
**du CHU de Limoges**  
**Application à quatre isolats résistants au pyrazinamide**

THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

---

présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2010

par

**Alisson VRAIN**

née le 26 avril 1982 à Doué la Fontaine (Maine et Loire)

EXAMINATEURS DE LA THESE

**Madame le Professeur Sylvie ROGEZ.....Présidente**  
**Monsieur le Professeur Jacques BUXERAUD.....Juge**  
**Monsieur le Professeur Gilles DREYFUSS.....Juge**  
**Mademoiselle le Professeur Marie-Cécile PLOY .....Juge**  
**Monsieur le Docteur Christian MARTIN.....Membre invité, Directeur de thèse**

## CORPS ENSEIGNANT

### DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur DUROUX Jean-Luc

### VICE-DOYEN

Monsieur BATTU Serge, Maître de Conférences

### VICE-DOYEN

Madame FAGNERE Catherine, Maître de Conférences

### PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis

BIOCHIMIE-BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE

BROSSARD Claude

PHARMACOTECHNIE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE-CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIME ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACOTECHNIE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE ET MINERALE

DESMOULIERE Alexis

PHYSIOLOGIE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE-MYCOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE

LOUDART Nicole

PHARMACOLOGIE

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES

#### PHARMACEUTIQUES

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT

ROGEZ Sylvie

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE

#### MAITRES DE CONFERENCES

BASLY Jean-Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

BATTU Serge

CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

BEAUBRUN-GIRY Karine

PHARMACIE GALENIQUE

BILLET Fabrice

PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude

BIOPHYSIQUE-MATHEMATIQUES-

INFORMATIQUE

|                          |  |
|--------------------------|--|
| CLEDAT Dominique         | CHIMIE ANALYTIQUE                                  |
| COMBY Francis            | CHIMIE THERAPEUTIQUE                               |
| DELEBASSEE Sylvie        | BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE                            |
| DEMIOT Claire-Elise      | PHARMACOLOGIE                                      |
| DREYFUSS Marie-Françoise | CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE                  |
| FAGNERE Catherine        | CHIMIE ORGANIQUE                                   |
| FROISSARD Didier         | BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE                           |
| JAMBUT Anne-Catherine    | CHIMIE THERAPEUTIQUE                               |
| LABROUSSE Pascal         | BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE                           |
| LEGER David              | BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE                  |
| LIAGRE Bertrand          | SCIENCES BIOLOGIQUES                               |
| LOTFI Hayat              | TOXICOLOGIE  |
| MARION-THORE Sandrine    | CHIMIE THERAPEUTIQUE                               |
| MARRE-FOURNIER Françoise | BIOCHIMIE  |
| MILLOT Marion            | PHARMACOGNOSIE                                     |
| MOREAU Jeanne            | IMMUNOLOGIE  |
| POUGET Christelle        | CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUEE A LA<br>THERAPEUTIQUE   |
| ROUSSEAU Annick          | BIOMATHEMATIQUES                                   |
| SIMON Alain              | CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE                 |
| TROUILLAS Patrick        | BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE<br>PHARMACEUTIQUE |
| VIANA Marylène           | PHARMACOTECHNIE                                    |
| VIGNOLES Philippe        | BIOMATHEMATIQUES                                   |

PROFESSEUR CERTIFIE

|                      |         |
|----------------------|---------|
| MARBOUYT Jean-Michel | ANGLAIS |
|----------------------|---------|

## REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Sylvie ROGEZ, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Praticien Hospitalier, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Mon passage dans le secteur de Virologie restera un excellent souvenir. Veuillez trouver ici l'expression de tout mon respect.

A Monsieur le Professeur BUXERAUD, Professeur des Universités de Chimie Organique-Chimie Thérapeutique, de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments respectueux.

A Monsieur le Professeur DREYFUSS, Professeur des Universités de Parasitologie-Mycologie, d'avoir accepté de juger ce travail. J'ai pu apprécier vos compétences lors de mon passage comme interne dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie. Veuillez trouver ici toute ma considération.

A Mademoiselle le Professeur Marie-Cécile PLOY, Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Praticien Hospitalier, d'avoir accepté de juger ce travail. Mon passage dans votre laboratoire a été un grand plaisir. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Christian MARTIN, Praticien Hospitalier, de m'avoir encadré dans la réalisation de ce travail. J'ai pu apprécié votre disponibilité et vos conseils. Veuillez trouver dans cette thèse l'expression de ma profonde considération.

Je remercie les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail

A Mademoiselle Marie-Claire BACLET, ingénieur de l'Unité de séquençage, pour son implication dans la mise au point de la technique de séquençage. Je te remercie vraiment pour ton aide, tant dans la compréhension des techniques de biologie moléculaire lorsque j'étais jeune interne, que pour la réalisation de ce travail. Trouve ici toute ma reconnaissance dans la disponibilité et le soutien que tu m'as apporté.

A Mademoiselle Nadège CALVO, technicienne au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, pour la remise à niveau de mes compétences en biologie moléculaire et pour ton enseignement sur la PCR en temps réel. Sois assurée de mon profond respect.

Aux techniciennes du secteur Mycobactériologie : Claudine ROCHET, Eve TEYSSIER RETIF et Jacky MALLON, qui ont contribué à la réalisation de ce travail. Je vous remercie pour votre formation, pour avoir surveillé mes cultures, pour votre aide dans la réalisation de l'étude phénotypique et surtout pour votre bonne humeur au quotidien. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous.

Je remercie également tous ceux qui ont contribué à ma formation au cours de mon internat

Les biologistes et techniciens des laboratoires de Biochimie, d'Hématologie, de Parasitologie-Mycologie, de Bactériologie-Virologie-Hygiène et d'Immunologie du CHU de Limoges ;  
Les biologistes et techniciens du laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU de Clermont-Ferrand.

Une pensée à mes co-internes actuels et passés, pour tous ces bons moments passés ensemble.

*A ma famille, à mes proches, avec toute mon affection*

*A maman, pour ton réconfort au quotidien*

*A Arnaud, pour ton soutien dans cette épreuve*

## TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| 1 INTRODUCTION.....  | 13        |
| 2 RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....  | 16        |
| <u>1.1 Epidémiologie.....</u>  | <u>17</u> |
| <u>1.1.1 Situation mondiale.....</u>   | <u>17</u> |
| <u>1.1.2 Région Europe de l’OMS.....</u>                                       | <u>21</u> |
| Région Europe en 2008 [12].....  | 23        |
| Pays de l’Union Européenne et de l’Espace Economique Européen en 2008 [12].... | 24        |
| <u>1.1.3 En France.....</u>  | <u>26</u> |
| Organisation de la surveillance.....   | 26        |
| Epidémiologie et caractéristiques des cas déclarés en 2007 et 2008 [4,17]..... | 28        |
| Evolution de l’incidence.....  | 30        |
| <u>1.2 Evolution de l’infection chez l’homme.....</u>                          | <u>31</u> |
| <u>1.3 Histoire naturelle de la maladie chez l’homme.....</u>                  | <u>32</u> |
| <u>1.3.1 Mode de contamination.....</u>  | <u>32</u> |
| <u>1.3.2 Primo-infection tuberculeuse [1,16,21].....</u>                       | <u>33</u> |
| <u>1.3.3 Evolution en tuberculose maladie [1,16,21].....</u>                   | <u>34</u> |
| <u>1.3.4 Acteurs cellulaires et mécanismes moléculaires [1,16,21].....</u>     | <u>35</u> |
| <u>1.4 Diagnostic clinique.....</u>  | <u>38</u> |
| <u>1.4.1 Aspects cliniques [16,20-22].....</u>                                 | <u>38</u> |
| Primo-infection tuberculeuse.....  | 38        |
| Infection tuberculeuse latente.....  | 38        |
| Tuberculose pulmonaire.....  | 38        |
| Tuberculose miliaire.....  | 39        |
| Formes extrapulmonaires.....   | 39        |
| <u>1.4.2 Examens complémentaires.....</u>                                      | <u>41</u> |
| Radiographie pulmonaire [16,20-22].....  | 41        |
| Apport de la biologie [20,21].....   | 43        |
| Aspect histologique.....   | 43        |
| <u>1.5 Diagnostic immunologique.....</u>                                       | <u>43</u> |
| <u>1.5.1 IDR à la tuberculine.....</u>   | <u>44</u> |

|  |           |
|--|-----------|
| Bases immunologiques du test [21,23].....  | 44        |
| Interprétation [3,23,25].....  | 44        |
| <u>1.5.2 Tests interféron <math>\gamma</math> : IGRAs.....</u>                       | <u>45</u> |
| Différentes générations de tests [3,26,27].....                                      | 45        |
| Sensibilité et spécificité.....  | 46        |
| Interprétation [3,26,27,32].....   | 48        |
| Indications validées en France [32].....   | 48        |
| <u>1.5.3 Sérologie.....</u>  | <u>49</u> |
| <u>1.6 Diagnostic microbiologique.....</u>   | <u>50</u> |
| Prélèvements [1,44,45].....  | 50        |
| Prétraitement de l'échantillon [1,44,45].....  | 52        |
| Examen microscopique [1,44,45].....  | 53        |
| Culture .....  | 55        |
| Détection génotypique [1,45,48].....   | 58        |
| Détection antigénique du « complexe tuberculosis » sur culture .....                 | 61        |
| Tests phénotypiques .....  | 62        |
| <u>1.7 Traitements antituberculeux.....</u>  | <u>63</u> |
| <u>1.7.1 Molécules utilisables.....</u>  | <u>63</u> |
| Les antituberculeux de première ligne.....   | 63        |
| Les antituberculeux de seconde ligne.....  | 69        |
| <u>1.7.2 Modalités thérapeutiques.....</u>   | <u>75</u> |
| Traitement de la primo-infection tuberculeuse symptomatique .....                    | 75        |
| Traitement de l'infection tuberculeuse latente .....                                 | 75        |
| Traitement de la tuberculose maladie.....  | 77        |
| <u>1.7.3 Mécanismes de résistance aux antituberculeux.....</u>                       | <u>79</u> |
| Résistance naturelle.....  | 79        |
| Résistance acquise.....  | 80        |
| <u>1.8 Méthodes d'étude de la sensibilité aux antituberculeux.....</u>               | <u>86</u> |
| <u>1.8.1 Méthodes phénotypiques.....</u>   | <u>86</u> |
| Méthode des proportions.....   | 86        |
| Détermination des CMI [96,97].....   | 88        |
| Détection de l'activité enzymatique impliquée dans l'efficacité de l'antituberculeux | 88        |
| Méthodes utilisant un indicateur de croissance.....                                  | 88        |
| <u>1.8.2 Méthodes moléculaires.....</u>  | <u>90</u> |



|   |            |
|---|------------|
| Hybridation moléculaire.....  | 90         |
| PCR en temps réel.....  | 91         |
| Polymorphisme de fragments de restriction RFLP.....   | 91         |
| Polymorphisme de conformation simple brin SSCP.....   | 92         |
| Denaturing High-Performance Liquid Chromatography dHPLC.....  | 92         |
| Séquençage.....   | 92         |
| <u>2 ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....</u>   | <u>94</u>  |
| <u>2.1 Introduction.....</u>  | <u>95</u>  |
| <u>2.2 Matériels et méthodes.....</u>   | <u>96</u>  |
| <u>2.2.1 Matériels : souches de mycobactéries.....</u>  | <u>96</u>  |
| Souches témoins.....  | 96         |
| Critères d'inclusion des souches cliniques.....   | 96         |
| Sensibilité aux antituberculeux des souches cliniques.....  | 97         |
| <u>2.2.2 Méthodes.....</u>  | <u>98</u>  |
| Les souches de mycobactéries.....   | 98         |
| Mise au point de la méthode d'amplification et de séquençage du gène pncA.....  | 99         |
| Concentration minimale inhibitrice du pyrazinamide.....   | 105        |
| <u>2.3 Résultats.....</u>   | <u>111</u> |
| <u>2.3.1 Mise au point de la méthode d'amplification et de séquençage du gène pncA codant pour la pyrazinamidase.....</u> | <u>111</u> |
| Amplification du gène pncA par PCR en point final.....  | 111        |
| Séquençage du gène pncA codant pour la pyrazinamidase.....  | 113        |
| <u>2.3.2 Etude de la sensibilité au pyrazinamide en milieu liquide.....</u>   | <u>114</u> |
| <u>2.3.3 Etude de la sensibilité au pyrazinamide en milieu solide.....</u>  | <u>114</u> |
| <u>2.4 Discussion.....</u>  | <u>116</u> |
| <u>2.5 Conclusion.....</u>  | <u>121</u> |
| <u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>   | <u>122</u> |

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique  
ARN : acide ribonucléique  
ARNr : ARN ribosomal  
BAAR : bacille acido-alcool résistant  
BCG : bacille de Calmette et Guérin  
CDC : Centers for Disease Control and Prevention  
CFP-10 : culture filtrate protein-10  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CMI : concentration minimale inhibitrice  
CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone  
dNTP : déoxynucléotide triphosphate  
DO : déclaration obligatoire  
DOT : directly observed treatment, traitement sous surveillance directe  
EEE : espace économique européen  
ECDC : European Center for Disease Prevention and Control  
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay  
ELISPOT : enzyme-linked immunospot assay  
EMB : éthambutol  
ESAT-6 : early secretory antigenic target-6  
g : gramme  
HAS : Haute Autorité de Santé  
HSR : hypersensibilité retardée  
IDR : intradermo réaction  
IFN $\gamma$  : interféron gamma  
IGRA : interferon gamma releasing test  
IL : interleukine  
INH : isoniazide  
kg : kilogramme  
L : litre  
LBA : lavage bronchoalvéolaire  
LCR : liquide céphalo-rachidien

M : molaire  
mg : milligramme  
MGIT : mycobacterial growth indicator tube  
MGIT PZA : BACTEC™ MGIT™ 960 PZA  
mL: millilitre  
mm : millimètre  
mM : millimolaire  
nmol : nanomole  
NK : natural killer  
O<sub>2</sub> : oxygène  
OADC : acide oléique, albumine, dextrose, catalase  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
pb : paire de bases  
PCR : polymerase chain reaction  
pmol : picomole  
PPD : purified protein derivate  
PZA : pyrazinamide  
PZase : pyrazinamidase  
RD1 : région de délétion 1  
RFB : rifabutine  
RFP : rifapentine  
RMP : rifampicine  
SFM : Société Française de Microbiologie  
SIDA : syndrome d'immunodéficience humaine  
SM : streptomycine  
T<sub>m</sub> : température de fusion  
TNF : tumor necrosis factor  
U : unité  
UE : Union Européenne  
UFC : unité formant colonie  
μL : microlitre  
μM : micromolaire  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine



# 1 INTRODUCTION

Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des Actinomycétales où la famille des *Mycobacteriaceae* ne comprend qu'un seul genre : le genre *Mycobacterium*. D'un point de vue clinique, on distingue 3 groupes. Le premier comprend les mycobactéries du complexe de la tuberculose responsables d'infections chez l'homme et les animaux : *M. tuberculosis*, *M. bovis* et le Bacille de Calmette et Guérin BCG, *M. africanum*, *M. canettii* et *M. microti*. Le deuxième groupe comprend les mycobactéries atypiques retrouvées dans l'environnement hydro-tellurique, parfois responsables de mycobactérioses. Le troisième groupe correspond à *M. leprae* dont l'hôte est exclusivement humain. La tuberculose est une pathologie reconnue depuis le néolithique. Son nom est issu de l'aspect macroscopique des lésions tissulaires retrouvées : « petits tubercules ». Chez l'homme, elle est très majoritairement provoquée par *M. tuberculosis*, espèce obtenue en culture pour la première fois par Robert Koch en 1882. Plus rarement, *M. bovis* et *M. africanum* sont retrouvées et leur symptomatologie est rigoureusement identique. Ces 3 espèces constituent ce qu'il a été convenu d'appeler le « complexe *tuberculosis* ». Le BCG, mutant avirulent de *M. bovis* peut, dans certaines conditions, manifester un pouvoir pathogène. Les espèces *M. canettii* et *M. microti* sont reconnues responsables de tuberculose chez l'homme mais ne sont isolées que très rarement [1,2].

La tuberculose reste aujourd'hui un problème majeur de santé publique. L'émergence de souches multi-résistantes et ultra-résistantes impose une étude systématique, pour toute souche nouvellement isolée, de la sensibilité aux antituberculeux de première ligne que sont l'isoniazide, la rifampicine, l'éthambutol, le pyrazinamide et la streptomycine. Les mycobactéries de la tuberculose sont exigeantes et leur croissance est lente. L'étude de leur sensibilité aux antituberculeux est délicate, surtout pour le pyrazinamide puisqu'elle nécessite des conditions de culture particulières en milieu acide. Le pH acide, qui doit être stabilisé pour permettre l'efficacité du pyrazinamide, rend la croissance des mycobactéries difficile. Ainsi, la découverte d'une résistance phénotypique au pyrazinamide nécessite souvent le contrôle de l'analyse.

Entre 2006 et 2009, au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU Dupuytren à Limoges, quatre souches cliniques de mycobactéries du complexe de la tuberculose ont été détectées résistantes au pyrazinamide par la méthode phénotypique habituelle du laboratoire qui utilise le test BACTEC™ MGIT™ 960 PZA. L'objectif principal de notre étude était d'installer une technique de séquençage du gène *pncA*. Cette méthode est capable de détecter rapidement une résistance au pyrazinamide et nous permet de nous affranchir des conditions de pH acide de l'étude phénotypique. Le second axe de notre étude a consisté à déterminer les

concentrations minimales inhibitrices au pyrazinamide des souches cliniques détectées résistantes afin d'estimer leur apport dans l'investigation de souches résistantes par la méthode BACTEC™ MGIT™.

## 2 RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES



## 1.1 Epidémiologie

A la fin du XXème siècle, l'amélioration des conditions de vie et l'arrivée de traitements antibiotiques efficaces a laissé espérer une éradication à court terme de la maladie. Or, la tuberculose reste aujourd'hui un problème mondial de santé publique et une cause importante de maladie et de décès. En effet, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'un tiers de la population mondiale est infecté par le bacille tuberculeux et qu'environ 2 millions de personnes meurent chaque année de tuberculose [3]. D'ailleurs, depuis les années 1990, l'incidence n'a cessé d'augmenter pour se stabiliser ces dernières années [4]. Cette augmentation des cas de tuberculose en France et dans le monde a été concomitante de l'épidémie de VIH et antérieure à l'arrivée sur le marché des anti-protéases [5]. La tuberculose figure parmi la liste des pathologies rencontrées au cours de la progression de l'infection par le VIH. Une tuberculose extrapulmonaire signifie que le patient est au stade SIDA [6].

L'arrêt de la progression et l'inversion de la tendance de l'incidence d'ici 2015 font partis des grands travaux de l'Objectif du Millénaire pour le développement des Nations Unies. L'OMS œuvre dans la lutte contre la tuberculose par la mise en place de programmes d'actions et de surveillance de la maladie. La stratégie « halte à la tuberculose », qui s'appuie sur le succès des traitements sous surveillance directe (DOTS), s'articule autour de six axes [7] :

- Poursuivre et renforcer la stratégie des DOTS ;
- Lutter contre la co-infection tuberculose/VIH et la pharmaco-résistance ;
- Contribuer au renforcement des systèmes de santé ;
- Impliquer tous les dispensateurs de soins ;
- Donner aux patients et aux communautés les moyens d'agir ;
- Promouvoir la recherche.

### 1.1.1 Situation mondiale

Chaque année, environ 9 millions de personnes développent une tuberculose maladie avec 80% d'entre-elles résidant en Afrique subsaharienne et en Asie [3].

En 2008, 9,4 millions de personnes ont été nouvellement infectées par la tuberculose et 1,8 million de personnes en sont décédées. L'OMS s'efforce d'obtenir une diminution de la charge de cette maladie en fixant des objectifs de lutte. D'ici à 2015, les objectifs principaux sont de diminuer l'incidence, de réduire de moitié les taux de prévalence et de mortalité par

rapport aux chiffres de 1990, de dépister au moins 70% des nouveaux cas (argumentés d'un examen microscopique positif), et d'obtenir un succès thérapeutique dans au moins 85% des cas [8].

Les données les plus récentes, issues des programmes DOTS, font état d'une diminution de l'incidence mondiale depuis 2004. Les taux de prévalence et de mortalité diminuent également.

En 2007, le nombre estimé de nouveaux cas de tuberculose était de 9,27 millions (contre 9,24 millions en 2006, 8,3 millions en 2000 et 6,6 millions en 1990) dont 1,37 million de personnes étaient VIH positifs. Parmi ces 9,27 millions de cas, 55% étaient enregistrés en Asie, 31% en Afrique, 6% dans la région OMS Méditerranée orientale, 5% dans la région européenne et 3% dans la région des Amériques. En ce qui concerne le nombre total de cas, les cinq pays les plus affectés étaient l'Inde avec 2 millions de tuberculeux, la Chine avec 1,3 million, l'Indonésie avec 530.000, le Nigéria et l'Afrique du Sud avec 460.000 malades. Parmi les nouveaux cas diagnostiqués, 15% étaient séropositifs pour le VIH et provenaient en quasi-totalité de la région africaine (79%) et de la région Asie du Sud-Est (11%). Bien que le nombre total de cas soit en constante augmentation, l'incidence tend à la baisse. En effet, à l'échelle mondiale, on enregistrerait 142 nouveaux cas/100.000 habitants en 2004 pour 139/100.000 en 2007. L'incidence a diminué dans toutes les régions OMS à l'exception de la région Europe où ce taux restait stable. En 2007, la prévalence était de 13,7 millions de cas soit 206/100.000 habitants contre 13,9 millions en 2006 soit 210/100.000 habitants. L'estimation du nombre de décès en 2007 par tuberculose faisait état de 1,32 million de morts chez les non VIH (20/100.000) et de 456.000 décès chez les patients VIH positifs (classés décès par VIH) soit 23% des 2 millions de décès estimés par VIH [8].

L'objectif du programme tenant à la réduction de la prévalence et de la mortalité d'ici 2015 devrait être atteint dans trois des six régions OMS (région des Amériques, région Asie du Sud-Est et région Méditerranée orientale). En 2006, le taux de succès thérapeutique atteignait déjà en moyenne 85% avec quelques disparités et seulement trois régions OMS ayant rempli cet objectif : la région Méditerranée orientale (86%), la région Pacifique occidental (92%) et la région Asie du Sud-Est (87%), tandis que les régions africaine et des Amériques rendaient compte de 75% de succès thérapeutique et la région européenne de 70%. Le taux de dépistage des nouveaux cas était évalué à 63% en 2007 alors que la cible était fixée à  $\geq 70\%$  (cible fixée initialement pour 2000 par l'Assemblée mondiale de la Santé en 1991 puis reportée à 2005). Cette cible a été atteinte par 74 pays et dans deux régions OMS : celle des Amériques et du Pacifique occidental [8].

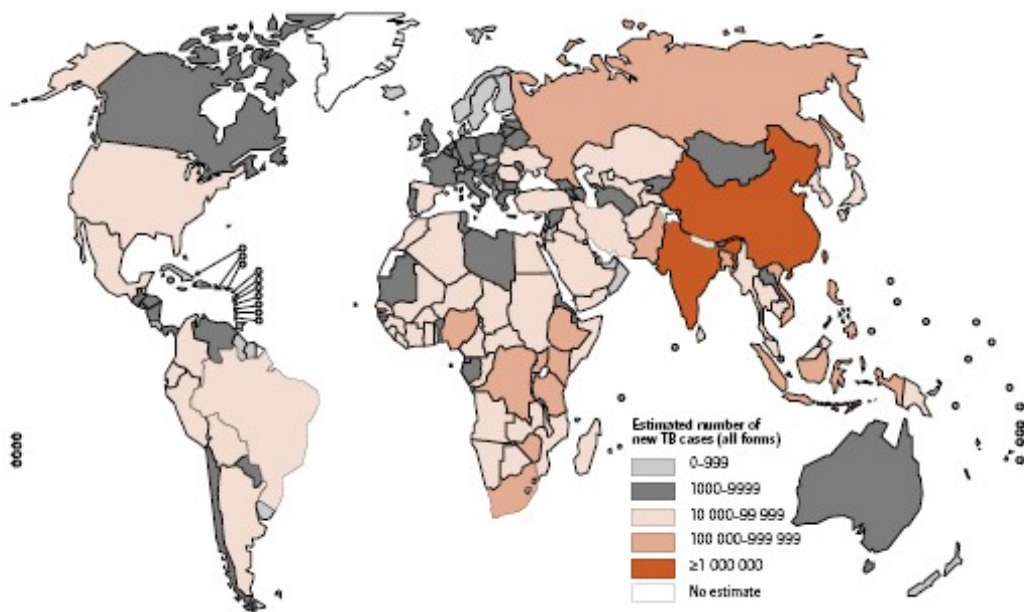


Figure 1 – Nombre estimé en 2007 des nouveaux cas de tuberculose par pays [8].

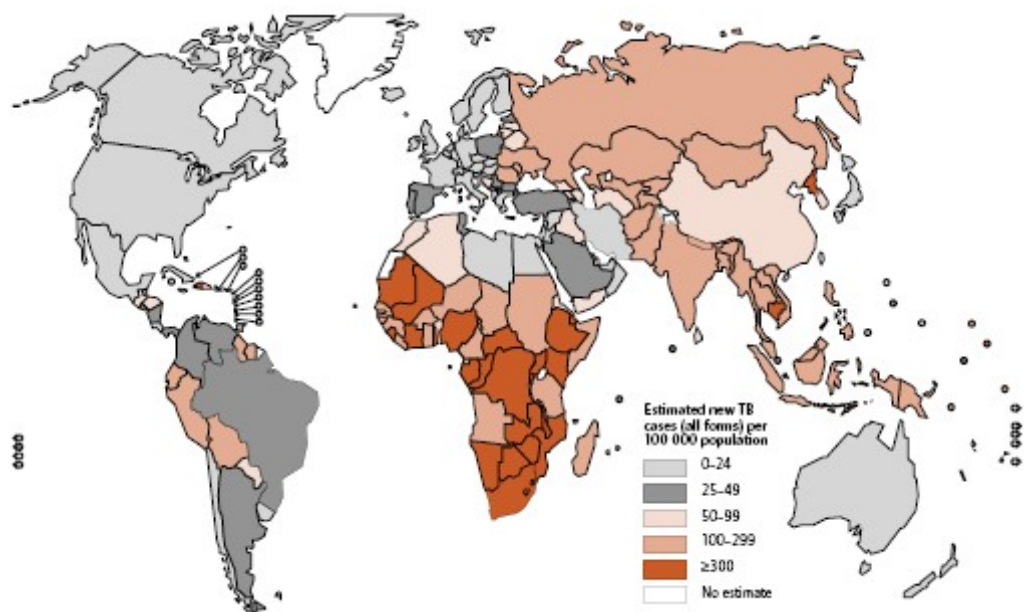


Figure 2 – Incidence estimée en 2007 de la tuberculose par pays [8].

La résistance des bacilles tuberculeux est également surveillée. La multi-résistance aux antituberculeux (souche MDR) se définit par une résistance à l'isoniazide et à la rifampicine, deux antituberculeux majeurs. Une ultra-résistance ou résistance étendue (souche XDR) correspond à une souche MDR ayant acquis en plus la résistance à un antituberculeux

injectable de seconde ligne (amikacine, kanamycine, capréomycine) et à une fluoroquinolone. En 2007, le nombre de cas de tuberculose à bacilles MDR était évalué à 500.000 dont 85% étaient enregistrés au sein de 27 pays parmi lesquels 15 sont situés en région Europe. Les cinq pays dénombrant le plus de cas de tuberculoses multi-résistantes sont l'Inde (131.000 cas), la Chine (112.000 cas), la Fédération de Russie (43.000 cas), l'Afrique du Sud (16.000 cas) et le Bangladesh (15.000 cas) [8]. En 2008, l'estimation du nombre de nouveaux cas de tuberculose à souche MDR était de 440.000 dont près de la moitié étaient retrouvés en Inde et en Chine. Ces souches MDR ont été rendues responsables d'environ 150.000 décès. Le pourcentage de souches XDR était évalué à 5,4% des souches MDR. Au total, au début de l'année 2010, 58 pays avaient signalé au moins un cas de tuberculose ultra-résistante et l'OMS estime à 25.000 le nombre de souches XDR émergeant chaque année [9].

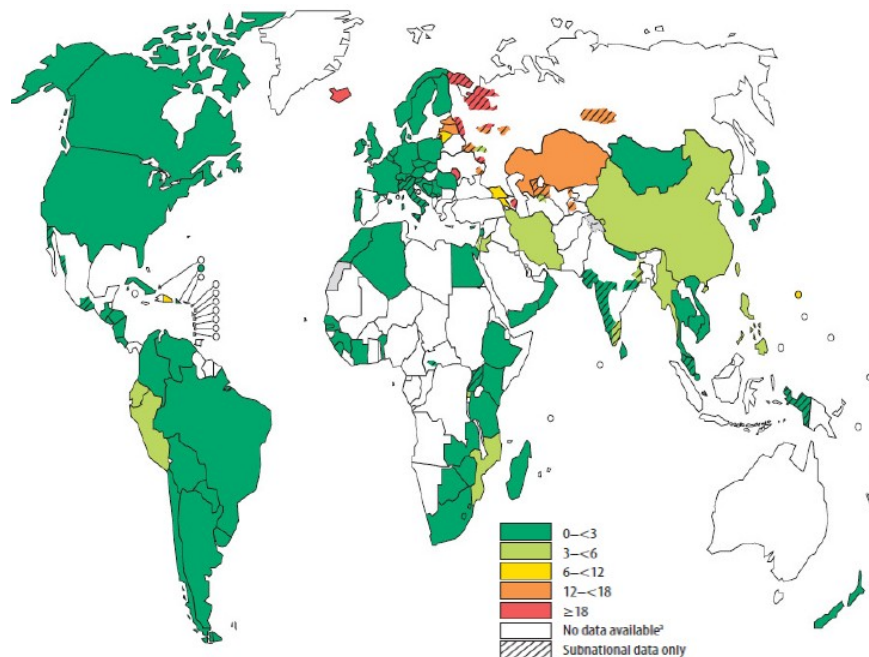


Figure 3 – Pourcentage de souches MDR parmi les nouveaux cas de tuberculose de 1994 à 2009 [9].

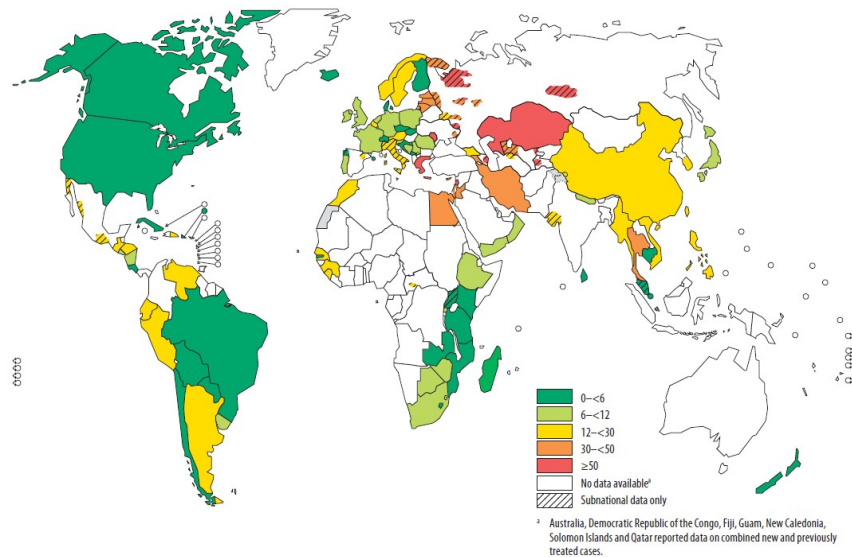


Figure 4 – Pourcentage de souches MDR parmi les cas de tuberculose déjà traités de 1994 à 2009 [9].

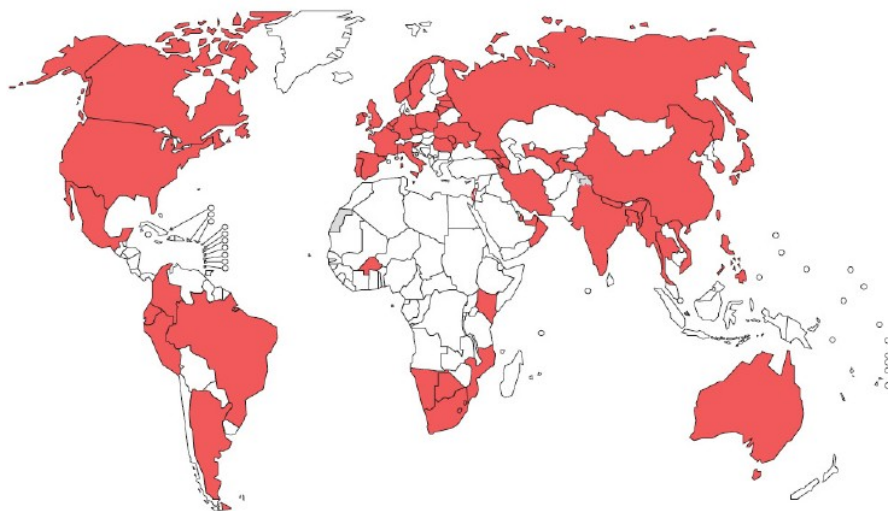


Figure 5 – Pays et territoires ayant rapporté un ou plusieurs cas de souches XDR avant janvier 2010 [9].

### 1.1.2 Région Europe de l'OMS

Au sein de la région européenne, la tuberculose représente également un problème important de santé publique. La lutte contre cette maladie constitue une urgence du fait de l'incidence élevée dans plusieurs pays, d'un niveau de pharmaco-résistance important, de l'importance de la maladie dans la population VIH positive et autres populations à risque (prisonniers et sans-abris), et du fait de la migration des populations.

De 1996 à 2007, le programme EuroTB a coordonné la surveillance de la tuberculose dans les 53 pays de la région. Cette surveillance s'organisait autour de trois aires géographiques : l'Union Européenne (UE) et autres pays d'Europe de l'Ouest (34 pays), les pays des Balkans (7 pays) et l'Europe de l'Est (12 pays). Depuis 2008, cette charge est revenue au Centre européen pour la prévention et le contrôle des maladies (ECDC) et le bureau régional de l'Europe de l'OMS.

La région Europe actuelle regroupe 54 pays. Ceux-ci ne sont plus regroupés en aires géographiques, on distingue : les pays de l'UE et de l'Espace Economique Européen (EEE), les pays non-UE/EEE, et 18 pays qualifiés de prioritaires dans le programme « plan to stop TB in 18 high priority countries 2007-2015 » [10]. Ces 18 pays sont : l'Arménie, l'Azerbaïdjan, la Biélorussie, la Bulgarie, l'Estonie, la Géorgie, le Kazakhstan, le Kirghizistan, la Lettonie, la Lituanie, la République de Moldavie, la Roumanie, la Fédération de Russie, le Tadjikistan, la Turquie, le Turkménistan, l'Ukraine et l'Ouzbékistan. Ce programme, établi pour la région européenne, a pour objectifs :

- Une amélioration de l'accès au diagnostic et au traitement ;
- Une diminution de la charge socio-économique associée à la tuberculose ;
- La protection des plus vulnérables ;
- Une promotion des nouveaux outils de diagnostic, de thérapeutique et de prévention.

Plusieurs cibles ont été formulées pour 2010 :

- Une couverture de la population par les DOTS supérieure à 90% ;
- Une détection d'au moins 73% des cas ;
- Un succès thérapeutique chez 85% des nouveaux cas ;
- Un traitement adapté pour les tuberculoses résistantes ;
- Une réduction de la prévalence à 188 cas/100.000 habitants ;
- Une diminution de la mortalité à 16/100.000.

Les axes de travail reprennent les stratégies mondiales avec un développement de DOTS nationaux adaptés aux caractéristiques des systèmes de santé de chaque pays [10,11].

Dans cette région, en moyenne 50 nouveaux cas et 8 décès liés à la tuberculose surviennent chaque heure. L'incidence varie énormément en fonction des pays et reflète les conditions socio-économiques et épidémiologiques. Il existe une grande disparité entre les pays de l'ouest et ceux de l'est. Pour exemple, l'incidence de la Norvège est de 5/100.000 habitants alors que celle du Tadjikistan est de 198/100.000 habitants. Des problèmes socio-économiques en Europe de l'Est et en Asie centrale, ayant pour conséquence une détérioration

des infrastructures médicales, ont contribué à la résurgence de la tuberculose. Un flux migratoire de l'est vers l'ouest compromet les efforts fournis par les pays de l'ouest [10].

Les deux principales organisations chargées de la veille sanitaire en Europe, l'ECDC et le bureau régional de l'Europe de l'OMS, ont récemment publié leur rapport concernant la surveillance de la tuberculose de la région Europe en 2008. Les données recueillies ont été analysées en fonction de déterminants épidémiologiques (localisation géographique, genre, âge) et de déterminants cliniques sélectionnés pour l'étude (localisation anatomique de la maladie, résultats du laboratoire, statut VIH) [12].

- [Région Europe en 2008 \[12\]](#)

Alors que le nombre de cas notifiés était en constante augmentation entre 2004 et 2007, une baisse de 2,6% a été observée en 2008 par rapport aux chiffres de 2007. Les nouveaux cas de tuberculose s'élevaient à 315.285 et le nombre de décès par tuberculose à 45.448. Le taux de notification est resté élevé puisque évalué à 461.645 cas (52,2 cas/100.000 habitants) soit 6% des cas mondiaux rapportés. La mortalité imputée à la tuberculose a diminué de 45% entre 2005 et 2007 passant ainsi de 9,0 à 5,0 pour 100.000 habitants. La notification et la mortalité augmentaient d'ouest en est. En ce qui concerne l'UE et l'EEE, les chiffres de 2008 faisaient état de 82.611 cas de tuberculose. Les 18 pays prioritaires de l'est regroupaient quant à eux 87,6% des cas, soit une incidence de 104,5/100.000 habitants (6 fois plus élevée que les pays de l'UE et de l'EEE), et portaient 93% des décès de la région : 11,7/100.000 (15 fois plus élevé que les pays de l'UE et de l'EEE).

Le taux de succès thérapeutique était en légère baisse : 70,7% contre 73,1% en 2006. Ce taux était évalué à 69,2% dans les 18 pays prioritaires. Dans l'UE et l'EEE confondus, seulement 51,8% des cas déjà traités et 79,5% des nouveaux cas avaient pu bénéficier d'une thérapeutique efficace. Un renforcement et une optimisation de la politique sont donc nécessaires dans cette région puisque, d'une part, le taux de succès thérapeutique est le plus bas au monde, et d'autre part, parce qu'elle porte le taux le plus élevé de tuberculose résistante.

Parmi les nouveaux cas diagnostiqués, la classe d'âge la plus affectée était les 25-44 ans (42% des cas). Venaient ensuite les 45-64 ans (26,5%) et les 15-24 ans (15,9%). La population masculine était deux fois plus représentée que la population féminine (sans abris, prisonniers, co-infectés VIH).

De 2006 à 2008, le nombre de cas rapportés co-infectés tuberculose/VIH a doublé, passant de 5.828 à 11.395. L'augmentation observée était en grande partie attribuable aux 18 pays prioritaires et liée, en partie, à une meilleure accessibilité aux soins des patients VIH positifs.

Au cours des dernières années, le taux de bacilles MDR n'a cessé d'augmenter pour atteindre 11,0% parmi les cas nouvellement diagnostiqués et 46,9% chez les tuberculeux déjà traités. Ces données sont à confronter à la mise en place de tests permettant de déterminer la sensibilité aux antituberculeux. Les chiffres les plus élevés concernaient les pays « prioritaires » pour lesquels 13,8% des nouveaux cas étaient infectés par des bacilles MDR et où ce pourcentage culminait à plus de 50% chez les cas déjà traités. Les plus hautes proportions de bacilles MDR étaient retrouvées dans les Etats Baltiques (15,6%-21,3%) et la Roumanie (14,7%).

En 2008, une résistance étendue était observée chez 1,5% des souches MDR.

- [Pays de l'Union Européenne et de l'Espace Economique Européen en 2008 \[12\]](#)

En 2008, 80% des 82.611 cas notifiés étaient regroupés dans 8 pays : la Bulgarie, la France, l'Allemagne, l'Italie, la Pologne, la Roumanie, l'Espagne et le Royaume-Uni. Le taux de notification était alors de 16,7/100.000 habitants.

En ce qui concerne l'origine géographique des cas notifiés, 22,4% des cas étaient d'origine étrangère (Afrique et Asie essentiellement) et représentaient, en fonction des pays, une proportion plus ou moins importante des cas déclarés (21,3% à 88%).

Le sexe ratio homme : femme était 2,1 : 1 mais ramené à 1,4 : 1 pour les cas d'origine étrangère.

Parmi les nouveaux cas de tuberculose, le groupe le plus représenté était également celui des 25-44 ans (36,4%), venaient ensuite les 45-64 ans (28,9%). Les cas diagnostiqués chez l'enfant de moins de 15 ans représentaient 4,2%. Une tuberculose pulmonaire a été retrouvée chez 78,7% des cas. Seulement 43,3% d'entre eux présentaient un examen microscopique positif sur expectoration. Dans 84,7% des cas de culture positive, l'espèce *M. tuberculosis* a été identifiée.

Une co-infection par le VIH était retrouvée dans 3,1% soit une légère augmentation par rapport aux chiffres de 2006, probablement le reflet d'un meilleur dépistage de l'infection et d'un meilleur recueil des données.



Le taux de tuberculose à bacilles MDR était évalué à 6,0% tous cas confondus, et à 2,8% chez les nouveaux cas. Une résistance étendue était retrouvée chez 7,3% des souches MDR. Un succès thérapeutique a pu être obtenu pour 79,5% des nouveaux cas.

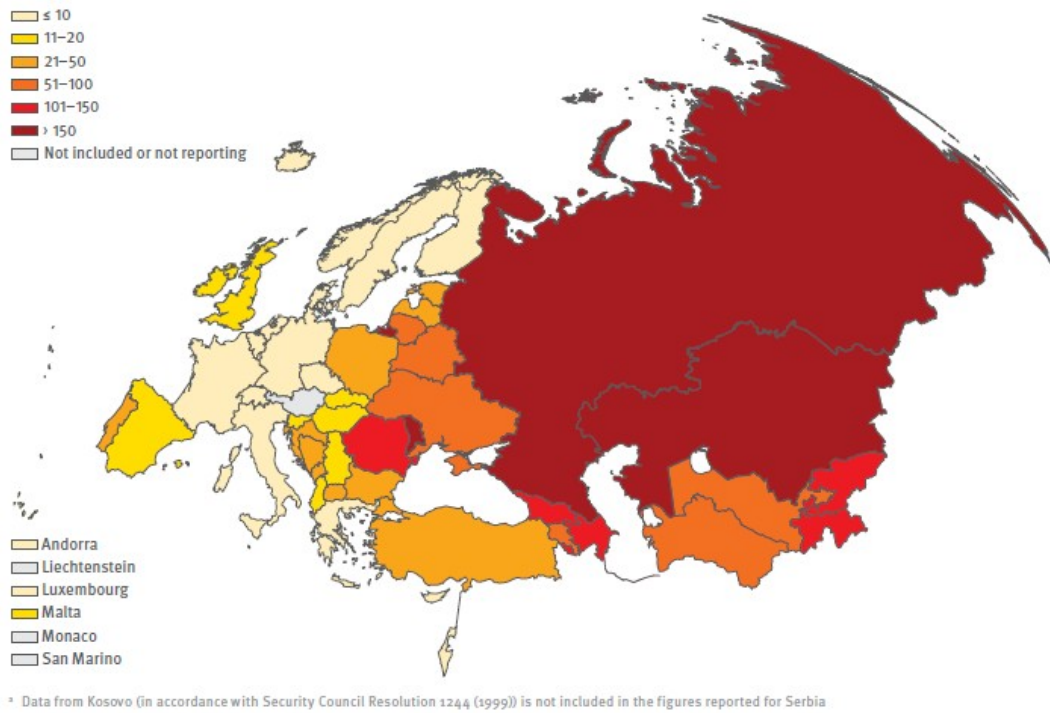


Figure 6 – Nombre total de notification pour 100.000 habitants en 2008 [12].

Tableau I – Données de 2008 issues de la surveillance dans la région Europe de l’OMS [12].

|   | Table showing data by country | Region <sup>a</sup> |              |                |              |                |              |                                  |              |
|---|-------------------------------|---------------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------------------------|--------------|
|   |                               | EU/EEA              |              | Non-EU/EEA     |              | Total          |              | 18 high priority countries (HPC) |              |
|   |                               | N <sup>b</sup>      |              | N <sup>b</sup> |              | N <sup>b</sup> |              | N <sup>b</sup>                   |              |
| <b>Total population (millions)</b>  | -                             | <b>28</b>           | <b>494.2</b> | <b>22</b>      | <b>389.3</b> | <b>50</b>      | <b>883.4</b> | <b>18</b>                        | <b>386.9</b> |
| <b>Demographic and clinical features of TB cases, 2008</b>                  |                               |                     |              |                |              |                |              |                                  |              |
| Total number of TB cases  | 1                             | 28                  | 82 611       | 22             | 379 034      | 50             | 461 645      | 18                               | 404 285      |
| TB cases per 100 000 population   | 1                             | 28                  | 16.7         | 22             | 97.5         | 50             | 52.2         | 18                               | 104.5        |
| Mean annual % change in notification rate (2004–2008)                       | 1                             | 28                  | -3.3%        | 22             | 4.5%         | 50             | 2.7%         | 18                               | 6.0%         |
| Foreign origin, percentage of all cases                                     | 2                             | 28                  | 22.4%        | 22             | 0.8%         | 50             | 4.8%         | 18                               | 1.0%         |
| Sex ratio (male to female) <sup>c</sup>                                     | 2                             | 28                  | 1.8          | 21             | 2.0          | 49             | 2.0          | 17                               | 1.5          |
| Percentage of pulmonary TB cases among all TB cases                         | 6                             | 27                  | 78.7%        | 22             | -            | 49             | -            | 18                               | 63.8%        |
| Pulmonary sputum smear-positive TB cases per 100 000 population             | 7                             | 27                  | 5.7          | 22             | 14.9         | 49             | 14.6         | 18                               | 30.1         |
| Percentage of new cases among all TB cases                                  | 8a                            | 27                  | 78.8%        | 22             | 66.0%        | 49             | 68.3%        | 18                               | 66.3%        |
| Percentage of culture-positive TB cases among all TB cases                  | 9                             | 27                  | 57.5%        | 16             | 21.5%        | 43             | 48.7%        | 13                               | 0.0%         |
| HIV infections, percentage of all TB cases                                  | 11                            | 15                  | 3.1%         | 17             | 3.0%         | 32             | 3.0%         | 13                               | 2.8%         |
| TB deaths per 100 000 population (median, latest available rates 2005–2008) | 26                            | 27                  | 1.0          | 19             | 10.8         | 46             | 1.4          | 16                               | 8.6          |
| <b>Multidrug resistance (MDR), 2008</b>                                     |                               |                     |              |                |              |                |              |                                  |              |
| Percentage of MDR TB among new TB cases                                     | 15                            | 25                  | 2.8%         | 15             | 14.2%        | 40             | 11.0%        | 13                               | 13.8%        |
| Percentage of MDR TB among all TB cases                                     | 17a                           | 24                  | 6.0%         | 17             | 18.0%        | 41             | 22.6%        | 13                               | 22.6%        |
| Percentage of XDR TB among all MDR TB cases                                 | 17b                           | 13                  | 7.3%         | 5              | 0.5%         | 18             | 1.5%         | 7                                | 1.4%         |
| <b>Treatment outcome, new laboratory-confirmed pulmonary cases, 2007</b>    |                               |                     |              |                |              |                |              |                                  |              |
| Success (cure or treatment completion)                                      | 21                            | 22                  | 79.5%        | 20             | 67.5%        | 42             | 70.7%        | 18                               | 69.2%        |
| Death   | 21                            | 22                  | 6.6%         | 20             | 9.1%         | 42             | 8.4%         | 18                               | 8.6%         |
| Failure   | 21                            | 22                  | 2.0%         | 20             | 11.5%        | 42             | 9.0%         | 18                               | 10.6%        |
| Default   | 21                            | 22                  | 5.1%         | 20             | 7.6%         | 42             | 6.9%         | 18                               | 7.5%         |
| Still on treatment  | 21                            | 22                  | 2.5%         | -              | -            | 22             | 0.7%         | 18                               | 0.3%         |
| Lost to follow-up (transfer, unknown)                                       | 21                            | 22                  | 4.4%         | 20             | 4.3%         | 42             | 4.3%         | 18                               | 3.8%         |
| Loss to follow-up (default, transfer, unknown)                              | 29                            | 21                  | 9%           | 23             | 9%           | 7              | 5%           | 12                               | 13%          |

<sup>a</sup> "European Region" comprises the 53 countries of the WHO European Region and Liechtenstein.

HPC: 18 high priority countries to STOP TB in the WHO European Region: Armenia, Azerbaijan, Belarus, Bulgaria, Estonia, Georgia, Kazakhstan, Latvia, Lithuania, Moldova, Romania, Russia, Tajikistan, Turkey, Turkmenistan, Ukraine, Uzbekistan.

<sup>b</sup> Mean value unless otherwise indicated; for definition of regions see Chapter 1 Background and Technical Note.

<sup>c</sup> Number of countries with available data and included in the statistics.

<sup>d</sup> For non-EU/EEA countries, these data are only available for new cases.

### 1.1.3 En France

La tuberculose fut dans le passé une cause majeure de morbidité et de mortalité. Son incidence n'a cessé de décroître depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle avec toutefois une recrudescence au cours des périodes de guerres mondiales. Dans les pays de l'Ouest européen, le taux de mortalité par tuberculose est passé de 200/100.000 habitants en 1885 à moins de 20/100.000 habitants à la fin des années 1980. Cette nette diminution est attribuée à une amélioration des conditions de vie et des modalités thérapeutiques. Toutefois, cette maladie reste un problème de santé publique majeur dans certaines populations et dans certaines zones géographiques [4].

- Organisation de la surveillance

Depuis 1964, la tuberculose figure parmi la liste des maladies à déclaration obligatoire (DO) et, depuis 2003, elle concerne également l'infection tuberculeuse latente de l'enfant de moins de 15 ans. Elle sollicite les médecins et les biologistes qui signalent puis notifient les cas sans délai à la Direction départementale des affaires sanitaires et sociales (DDASS, devenue délégation territoriale de l'Agence Régionale de Santé depuis le 1<sup>er</sup> avril 2010) de leur lieu d'exercice afin que celle-ci engage une intervention et envoie les données recueillies à

l'institut de veille sanitaire (InVS). La déclaration doit être réalisée lors du diagnostic de tuberculose maladie (cas confirmé et cas probable) et de la primo-infection tuberculeuse de l'enfant de moins de 15 ans. Un cas confirmé de tuberculose maladie est défini par l'obtention d'une mycobactérie du « complexe *tuberculosis* » en culture, un cas probable correspond à la présence de signes cliniques et/ou radiologiques évocateurs et pour lesquels le clinicien a décidé d'instaurer un traitement. Depuis 2007, la DO de la tuberculose a été modifiée. Ces modifications portent sur les éléments recueillis lors de la déclaration et sur la création d'une fiche concernant les issues de traitement pour les cas de tuberculose maladie. Cette nouvelle fiche est envoyée par la DDASS au déclarant 9 à 12 mois après réception de la déclaration afin de recueillir le devenir du patient et les résultats du traitement. Les données sont ensuite collectées par l'InVS (envoi en 2009 pour les cas de tuberculose maladie déclarés en 2007). L'objectif de la surveillance des issues de traitement est de fournir des indicateurs d'évaluation de lutte antituberculeuse [13-15].

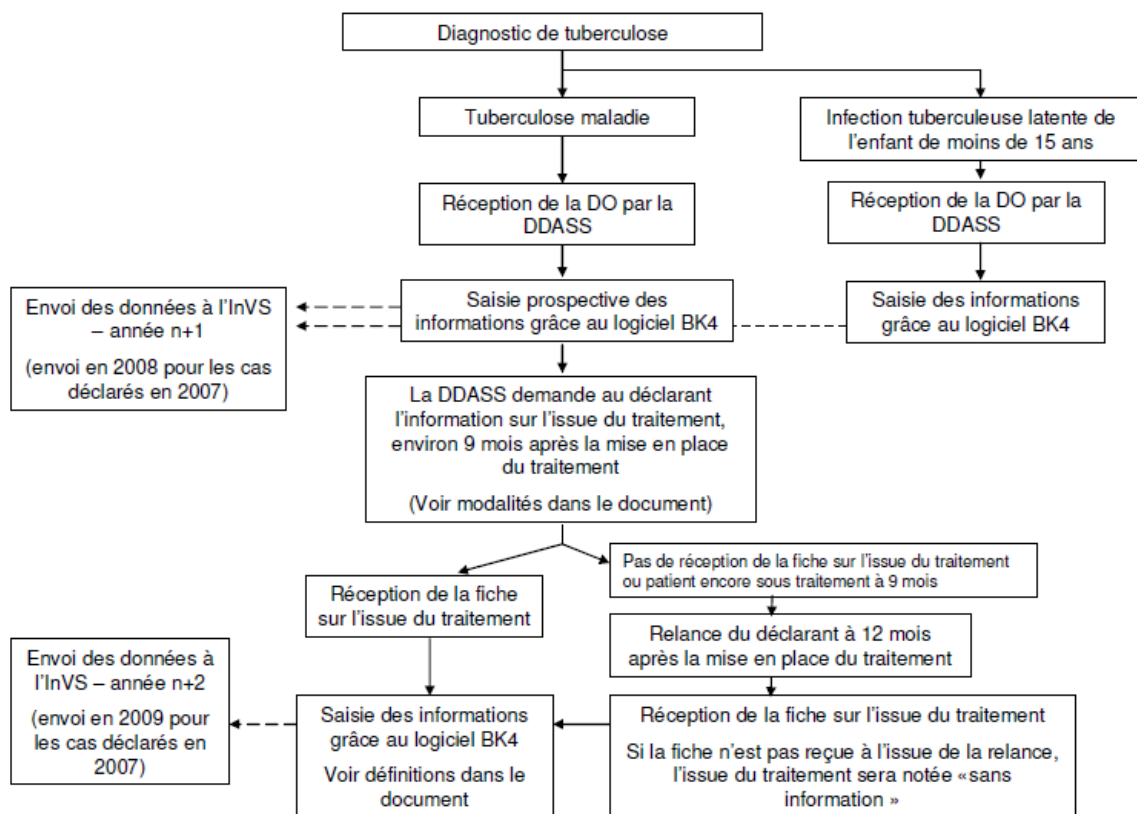


Figure 7 – Différentes étapes de la déclaration obligatoire depuis 2007 [15].

Etant donné la situation épidémiologique, la France a fait de la lutte contre la tuberculose un objectif de sa loi de santé publique en 2004. Un programme national a été élaboré et publié en 2007 à l'initiative du Ministère de la santé, de la jeunesse et des sports. Ce programme s'organise autour de 6 axes [3] :

- Assurer un diagnostic précoce et un traitement adapté ;
- Améliorer le dépistage ;
- Optimiser la stratégie vaccinale ;
- Maintenir à un taux faible la résistance aux antituberculeux ;
- Améliorer la surveillance épidémiologique et le pilotage de la lutte contre la tuberculose.

La France est l'un des premiers pays européens à se doter d'un plan basé sur les recommandations de l'OMS. La surveillance épidémiologique nationale relève des compétences de l'Etat, les investigations autour des cas et l'orientation des actions de lutte sont définies au niveau du département [16].

- [Epidémiologie et caractéristiques des cas déclarés en 2007 et 2008 \[4,17\]](#)

Ces données sont issues de la DO. Les cas notifiés correspondent aux personnes de tout âge pour lesquelles le diagnostic de tuberculose maladie a été posé et ayant bénéficié d'un traitement antituberculeux (au moins trois molécules) qu'il y ait eu ou non preuve bactériologique. Le recueil des données faisait état de 5.588 cas notifiés de tuberculose maladie en 2007, soit 8,9 cas/100.000 habitants, et de 5.758 cas en 2008, soit 9,0/100.000 habitants. L'augmentation du nombre de cas entre 2007 et 2008 était de 3,0% contre 4,7% entre 2006 et 2007. Une réelle augmentation du nombre de cas et/ou une amélioration de la détection et de la déclaration peuvent contribuer à cette hausse. La déclaration n'est cependant toujours pas exhaustive et était estimée à 65% sur le territoire entre 2000 et 2005.

- Caractéristiques sociodémographiques

La tuberculose était plus fréquente chez les hommes. Parmi les cas déclarés, 59% étaient des hommes en 2007 comme en 2008 avec un taux de déclaration à 10,8/100.000 en 2007 et 10,9/100.000 en 2008, contre 7,0/100.000 en 2007 et 7,2/100.000 en 2008 chez les femmes. En 2007, l'âge médian retenu était de 43 ans, 44 ans chez les hommes et 41 ans chez les

femmes. La classe d'âge la plus affectée était celle des 25-44 ans qui regroupait à elle seule 36% des cas, venaient ensuite les 45-64 (24%), les personnes âgées de 65 ans et plus (23%), puis les moins de 25 ans (17%). Les taux de déclaration chez les jeunes adultes et chez les personnes âgées de 75 ans et plus étaient respectivement 15,2/100.000 et 16,9/100.000.

En 2008, les taux de déclaration augmentaient avec l'âge, allant de moins de 5,0/100.000 chez les moins de 15 ans à 17,5/100.000 chez les plus de 75 ans avec un âge médian de 45 ans.

Concernant l'origine des patients, en 2007, 53% de ceux ayant mentionné leur origine géographique étaient nés en France, 17% en Afrique subsaharienne, 13% en Afrique du Nord, 7% en Asie et 5% dans un pays de l'UE. En métropole, le taux de déclaration était 8 fois plus élevé chez les personnes nées à l'étranger par rapport à celui des personnes nées en France. En 2008, ces taux variaient peu puisque 51,4% des personnes étaient nées en France et le rapport des taux de déclaration entre sujets nés à l'étranger et nés en France était globalement de 9. Les conditions de vie représentaient un critère important puisque 14% des cas déclarés en 2007 et 12,3% en 2008 résidaient en collectivité (centre d'hébergement, établissement pour personnes âgées, établissement pénitentiaire) et l'incidence estimée chez les sans domicile fixe s'élevait à 223,1/100.000 en 2007.

Le pourcentage de patients avec une tuberculose inaugurale de SIDA a fortement augmenté entre 1997 et 2003 puis s'est stabilisé à 20% en 2006-2007.

Même si l'incidence nationale est considérée comme faible sur le plan international, certaines populations restent plus affectées. En effet, les taux de déclaration les plus élevées étaient encore retrouvés en Ile-de-France et en Guyane, chez les sans domicile fixe, chez les personnes nées en Afrique subsaharienne et chez les étrangers dont l'arrivée en métropole était récente.

#### ○ Caractéristiques cliniques et bactériologiques

Les cas déclarés avec antécédent de tuberculose traitée était de 8,4% en 2007 et 10,2% en 2008, un chiffre qui restait stable et qui indiquait que, globalement, les malades tuberculeux étaient correctement pris en charge. Parmi les cas, 75% en 2007 et 72% en 2008 présentaient une forme pulmonaire ( $\pm$  autres localisations). En 2007, une méningite tuberculeuse a été retrouvée chez 85 cas et 3 formes sévères ont été documentées chez des enfants de moins de 5 ans (2 milliers, 1 méningite associée à 1 millier). En 2008, 92 méningites tuberculeuses et 124 milliers ont été rapportées.

Les tuberculoses pulmonaires à microscopie positive ou à culture positive sur prélèvement respiratoire (cas potentiellement contagieux) représentaient 77% des cas de tuberculose pulmonaire et 56% de l'ensemble des cas déclarés en 2007.

- Résistance aux antituberculeux

Les résultats concernant la sensibilité à l'isoniazide et à la rifampicine ont été obtenus pour 1.401 cas en 2007. La proportion des souches MDR était 2,2%. Ce pourcentage augmentait chez les patients déjà traités : 6,1% contre 1,6% en l'absence de thérapeutique précédente (traitement non adapté, mauvaise observance). En 2008, les chiffres étaient comparables avec une proportion de souches MDR de 1,8% (1,4% sans antécédent de traitement contre 6,8% chez les sujets déjà traités). Ces chiffres étaient comparables à ceux des autres pays de même incidence.

- Evolution de l'incidence

Depuis plusieurs décennies, une décroissance régulière de l'incidence globale a pu être observée. Dans le même temps, on a pu remarquer que les cas étaient regroupés dans des zones géographiques, et notamment les grandes villes, où résident les populations les plus à risque de tuberculose [18]. En France métropolitaine, l'incidence était de 60/100.000 habitants en 1972 contre 15/100.000 en 1991. Au début des années 1990, un renversement de situation a été observé avec une augmentation de 11% du nombre de cas déclarés entre 1991 et 1993 [16]. Cette période était concomitante de l'augmentation du nombre de cas de SIDA et précédait l'arrivée des associations antirétrovirales efficaces dans le traitement de l'infection VIH [5]. Depuis, l'incidence a eu de nouveau une tendance à la baisse jusqu'en 2005, s'est stabilisée en 2006, puis a connu une augmentation depuis 2007. L'évolution variait en fonction du lieu de naissance : chez les personnes nées en France, elle concernait surtout les jeunes enfants de moins de 5 ans et les jeunes adultes (20-29 ans) ; alors que pour les personnes nées à l'étranger, elle concernait surtout les 5-9 ans et les plus de 24 ans [4].

Depuis juillet 2007, l'obligation de vacciner tous les enfants par le BCG a été levée. Elle est remplacée par une recommandation chez les enfants à risque de tuberculose [19].

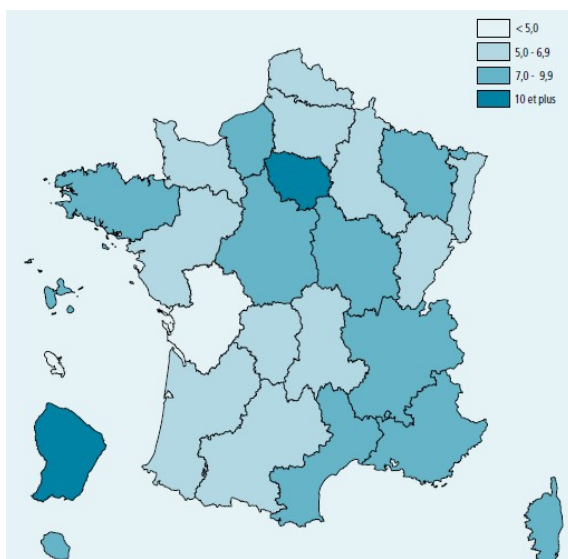


Figure 8 – Taux de déclaration (pour 100.000 habitants) de tuberculose maladie par région en 2008 [17].

## 1.2 Evolution de l'infection chez l'homme

Le risque d'infection et d'évolution vers la tuberculose maladie du sujet exposé au bacille tuberculeux dépend essentiellement de facteurs indépendants à l'hôte telles que la richesse en bacilles émis par le malade « cracheur », la proximité du contact, la durée de l'exposition et la virulence de la souche, mais également de facteurs inhérents à celui-ci tels qu'un âge extrême, une dénutrition ou une immunodépression.

Après introduction du bacille tuberculeux dans les alvéoles pulmonaires et rencontre avec les macrophages locaux, plusieurs éventualités sont susceptibles de se présenter. La primo-infection tuberculeuse est le plus souvent inapparente en clinique et résolutive spontanément grâce à une réaction immunitaire innée efficace suivie d'une réponse immunitaire adaptative spécifique si les mycobactéries ont été capables de survivre voire de se multiplier. Cette résolution spontanée se rencontre chez 90% des sujets infectés. Dans ce cas, la rencontre avec le bacille et le développement d'une réponse immunitaire spécifique a pour unique trace une réaction tuberculique positive ou un test sanguin évaluant la sécrétion d'interféron-gamma (IFN $\gamma$ ) positif. Cependant, une réactivation n'est pas à exclure chez ces sujets à l'occasion d'une baisse de l'immunité cellulaire : vieillissement, stress, malnutrition, mais surtout immunodépression (corticothérapie, chimiothérapie cytolytique, infection par le VIH, ...). L'évolution vers la tuberculose maladie peut suivre deux mécanismes distincts : soit une progression rapide (plus fréquente chez l'enfant, l'adolescent et la personne immunodéprimée), soit une progression plus lente, après une période de latence pouvant

atteindre plusieurs dizaines d'années (voire l'absence de tuberculose maladie du fait d'une phase latente infinie sans progression avec bacilles quiescents), situation fréquente chez l'adulte. Ainsi, 10% des adultes immunocompétents infectés développent la maladie au cours de leur vie avec un risque maximal dans les 2 ans qui suivent le contage (50% d'entre eux), risque diminuant avec le temps. Ce risque est en revanche plus élevé chez l'enfant avec une probabilité d'évolution à 45% pour les moins de 1 an, à 25% chez les moins de 5 ans et à 10-15% chez l'adolescent au cours des 2 années qui suivent la contamination. Ce risque est également plus élevé chez l'adulte immunodéprimé avec un chiffre à 30% dans l'année qui suit pour les sujets VIH positifs puis un risque évalué à 8-10% par an [3,16].

Non traitée, la tuberculose maladie conduit au décès dans 50% des cas, à une guérison spontanée dans 25% des cas et évolue de façon chronique chez les 25% restants. Ce mode d'évolution chronique est en grande partie responsable de la diffusion de la maladie. La guérison est obtenue dans quasiment 100% des cas si le patient bénéficie d'un traitement adapté. Chez le patient immunodéprimé, la rapidité de stérilisation est inversement proportionnelle au degré d'immunodépression. Le pronostic de la tuberculose maladie à bacilles MDR est beaucoup plus sombre chez l'immunodéprimé puisque le taux de décès atteint 80% [20].

A l'heure actuelle, nous ne disposons d'aucune donnée scientifique concernant la prédisposition à évoluer d'un seul tenant vers la tuberculose maladie. Les études épidémiologiques ont cependant permis de définir les groupes à risque d'évolution rapide après la primo-infection tuberculeuse. En effet, les enfants de moins de 4 ans et les adolescents âgés de 12 à 15 ans sont à risque d'évoluer rapidement vers la tuberculose maladie et de développer une forme compliquée (forme miliaire, forme méningée, atteintes lymphatiques) [16].

## 1.3 Histoire naturelle de la maladie chez l'homme

### 1.3.1 Mode de contamination

La transmission des mycobactéries de la tuberculose est essentiellement interhumaine par voie aérienne. Les bacilles sont transmis par l'intermédiaire des gouttelettes de sécrétions respiratoires (gouttelettes de Pflügge) émises par le patient bacillifère en toussant, en éternuant, en parlant ou lors d'un examen telle qu'une bronchoscopie [20]. Ces gouttelettes en suspension, très fines (1 à 5  $\mu\text{m}$ ), chargées en bacilles constituent un véhicule très efficace



puisqu'elles ne peuvent pas être capturées par le tapis muco-ciliaire et suivent donc le flux d'air respiratoire jusqu'aux alvéoles. Les tuberculoses sources de contamination sont les formes pulmonaires et exceptionnellement les formes laryngées. La tuberculose latente n'est pas contagieuse. Un malade « cracheur » émet au moins  $10^4$  bacilles/mL de crachat et on estime qu'il infecte 30% des sujets contacts, les 70% restants ne présentant pas de signes d'infection [1]. Le risque de transmission est nettement supérieur chez les tuberculeux dont l'examen microscopique, pratiqué sur prélèvement respiratoire ou sur tubage gastrique, est positif. Le nombre minimal de bacilles capables d'entraîner une infection est estimé à 100 mais peut varier en fonction du statut immunitaire des individus et de la virulence des souches (1 à 10 bacilles). Ces données concernant la transmissibilité sont issues des études épidémiologiques réalisées autour de cas de tuberculose active à expectoration positive [16].

### 1.3.2 Primo-infection tuberculeuse [1,16,21]

Lors du contagion, le bacille parvient jusqu'aux alvéoles pulmonaires en suivant la voie aérienne. A ce niveau, les mycobactéries sont phagocytées par les macrophages locaux. S'en suit une réaction inflammatoire locale et chronique définissant la lésion primaire ou chancre tuberculeux d'inoculation. Cette réaction immunitaire non spécifique fait intervenir les monocytes et les macrophages et peut suffire à contenir l'infection en détruisant les bacilles. Après multiplication intra-macrophagique, la réponse immune adaptative à médiation cellulaire prend le relais. Cette réponse n'est donc pas immédiate et nécessite plusieurs semaines. L'entité histologique typique est le granulome avec nécrose caséuse centrale, résultat de la cytolysse, que l'on retrouve au niveau des apex pulmonaires. Le tubercule est de taille plus ou moins importante, allant du grain de millet (forme miliaire) à plusieurs centimètres de diamètre (granulome avec caséification). Dans le granulome, les bacilles non détruits persistent à l'état quiescent avec une multiplication lente du fait d'une concentration en oxygène faible si le caséum est solide. A partir de cette lésion primaire, les macrophages infectés peuvent migrer vers les ganglions satellites conduisant alors au complexe gangliopulmonaire de la primo-infection tuberculeuse. Si le granulome est de petite taille et l'évolution favorable, s'en suit une calcification qui conduit le plus souvent à une guérison spontanée. Cette calcification est visible sur radiographie.

L'origine et l'importance des lésions tissulaires engendrées sont corrélées à la réponse immunopathologique de l'hôte. La pathogénicité dépend de l'immunité à médiation cellulaire. Cette immunité spécifique est obtenue 6 à 12 semaines après la contamination et se traduit par

une réaction cutanée à la tuberculine de type hypersensibilité retardée (HSR) de type 4 ou par un test biologique mesurant la sécrétion d'IFN $\gamma$  positif. L'HSR est d'intensité variable et n'exprime pas un état de protection acquis.

### 1.3.3 Evolution en tuberculose maladie [1,16,21]

En l'absence d'une réponse immunitaire innée efficace et si l'organisme ne parvient pas à mettre en place une réponse immunitaire cellulaire spécifique, l'évolution en tuberculose maladie peut faire suite à la primo-infection. La multiplication bactérienne, augmentant la charge antigénique, a pour conséquence un afflux des monocytes circulants. Les lymphocytes cytotoxiques : natural killer (NK) et T CD8, ainsi que les produits issus de la multiplication bactérienne intracellulaire, induisent la lyse des macrophages contribuant à la nécrose. Cette nécrose est contrôlée par l'afflux d'autres macrophages et de lymphocytes T helper. L'ensemble constitue le granulome avec au centre le caséum correspondant aux produits de nécrose. En présence d'une réaction cellulaire normale, le caséum est solide et n'autorise pas la multiplication bactérienne. En l'absence de réponse immune cellulaire, le granulome ne se forme pas et les macrophages infectés non activés sont lysés par les cellules NK et T CD8 et libèrent leur contenu ce qui contribue à la formation d'un caséum liquide. Ce milieu, contrairement au caséum solide, est oxygéné et favorable à la multiplication bactérienne. La nécrose se poursuit de proche en proche jusqu'à former une cavité : on parle de caverne tuberculeuse. Dans ces conditions, une caverne de taille moyenne peut contenir jusqu'à  $10^9$  bacilles. L'écoulement du caséum liquide par voie bronchique est possible : le tuberculeux est dit « cracheur » et est très contagieux.

Au cours de cette évolution, une multiplication bactérienne intracellulaire, dans les macrophages, et extracellulaire, dans les alvéoles, est active. Les macrophages peuvent rejoindre les ganglions régionaux. Une diffusion systémique fait suite, en empruntant la voie hématogène et/ou lymphatique, vers les tissus à concentration en oxygène plus élevée tels que les segments pulmonaires apicaux et dorsaux des lobes supérieurs, et les zones les plus vascularisées des organes cibles comme la moelle osseuse, le foie, la rate, le cortex rénal, les corps vertébraux, l'épiphyse des os longs, les méninges. La moelle osseuse, le foie et la rate ne constituent pas un environnement très favorable à la croissance des mycobactéries et leur multiplication y est exceptionnelle. En revanche, les voies aériennes supérieures, le rein, les os et les méninges constituent un environnement favorable à leur développement.

#### 1.3.4 Acteurs cellulaires et mécanismes moléculaires [1,16,21]

De nombreux acteurs cellulaires et mécanismes moléculaires interviennent dans ce processus. L'organisation du granulome tuberculeux est identique à celle des granulomes inflammatoires chroniques. Avant activation effective des macrophages, la multiplication bactérienne permet l'apparition en surface de structures associées aux molécules de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) reconnues par les cellules cytolytiques NK et T CD8 entraînant la lyse du macrophage et libération de son contenu. Ce début de nécrose entraîne un afflux majeur de cellules mononucléées qui s'organisent en couronnes successives. Au centre, on retrouve des macrophages plus ou moins activés, nécrosés voire apoptotiques contenant des bacilles. Des cellules épithélioïdes les entourent. On peut parfois observer des cellules de Langhans, cellules géantes multinucléées résultant de la fusion de plusieurs macrophages ou de division(s) sans cytotdiérèse(s). La couronne périphérique du granulome est constituée de fibroblastes globuleux et de cellules mononucléées. Des marquages immunohistochimiques permettent de mettre en évidence la présence de cellules dendritiques, de lymphocytes T, de lymphocytes B et de plasmocytes. Le fond est fait de fibrine et de collagène.

La formation du granulome est donc sous la dépendance de la réponse immunitaire innée et acquise, et de la composition pariétale de la mycobactérie. L'élément inducteur n'est autre que le contact, au niveau des alvéoles, de la bactérie avec le macrophage et/ou le monocyte. L'adhésion bactérie-macrophage alvéolaire fait intervenir les épitopes du bacille et des récepteurs spécifiques de la cellule. Une fois le bacille fixé à la membrane cellulaire, l'invagination de la mycobactérie puis la formation du phagosome font suite. Celui-ci s'entoure d'une protéine appelée T.A.C.O. (tryptophan aspartate-containing coat) responsable de l'absence de fusion phagosome-lysosome. L'activation du macrophage s'en suit. Dans le phagosome, *M. tuberculosis* contribue au maintien d'un pH élevé compatible avec sa multiplication. Au cours de sa croissance dans le phagosome, il y a libération d'enzymes lytiques qui dégradent cette enveloppe et permet aux mycobactéries de rejoindre le cytoplasme. Les bacilles sont capables de s'y multiplier ce qui entraîne une destruction du macrophage et leur relargage en milieu extracellulaire. Les mycobactéries libérées peuvent infecter de nouveaux macrophages, des pneumocytes ou être pris en charge par des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques capables de migrer vers les ganglions lymphatiques drainants font le lien avec la réponse immunitaire adaptative. La cellule phagocytaire infectée présente les antigènes mycobactériens à sa surface grâce aux molécules de CMH de classe I et II et sécrète de l'IL12. Cette chimiokine est indispensable au recrutement (migration, adhésion) des cellules mononucléées. L'IL12 permet également l'activation des lymphocytes

T. Leur activation entraîne la sécrétion d'IFN $\gamma$  et de tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  permettant l'activation des macrophages. Les lymphocytes T CD4 sécrètent de l'IL2 permettant une multiplication clonale des cellules T. Les lymphocytes T CD8 activés sécrètent du GM-CSF impliqué également dans l'activation du macrophage. Deux sous-populations de lymphocytes T CD4 sont distinguables par leur propriété de sécrétion : les Th1 (sécrétant l'IFN $\gamma$ , l'IL2 et le TNF $\alpha$ ) impliqué dans l'activation de la réponse immune à médiation cellulaire, et les Th2 (sécrétion d'IL4, d'IL5, d'IL10 et d'IL13) à effet freinateur sur la réponse immunitaire. Au cours de cette infection, la voie Th1 prédomine avec une activité pro-inflammatoire (dépendante de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\alpha$ ), une activité d'aide à la prolifération (par sécrétion d'IL2) et une fonction cytolytique. La réaction cellulaire pro-inflammatoire de type 1 est retrouvée au niveau des sites infectieux tandis que les cellules de type 2 prédominent dans le sang circulant.

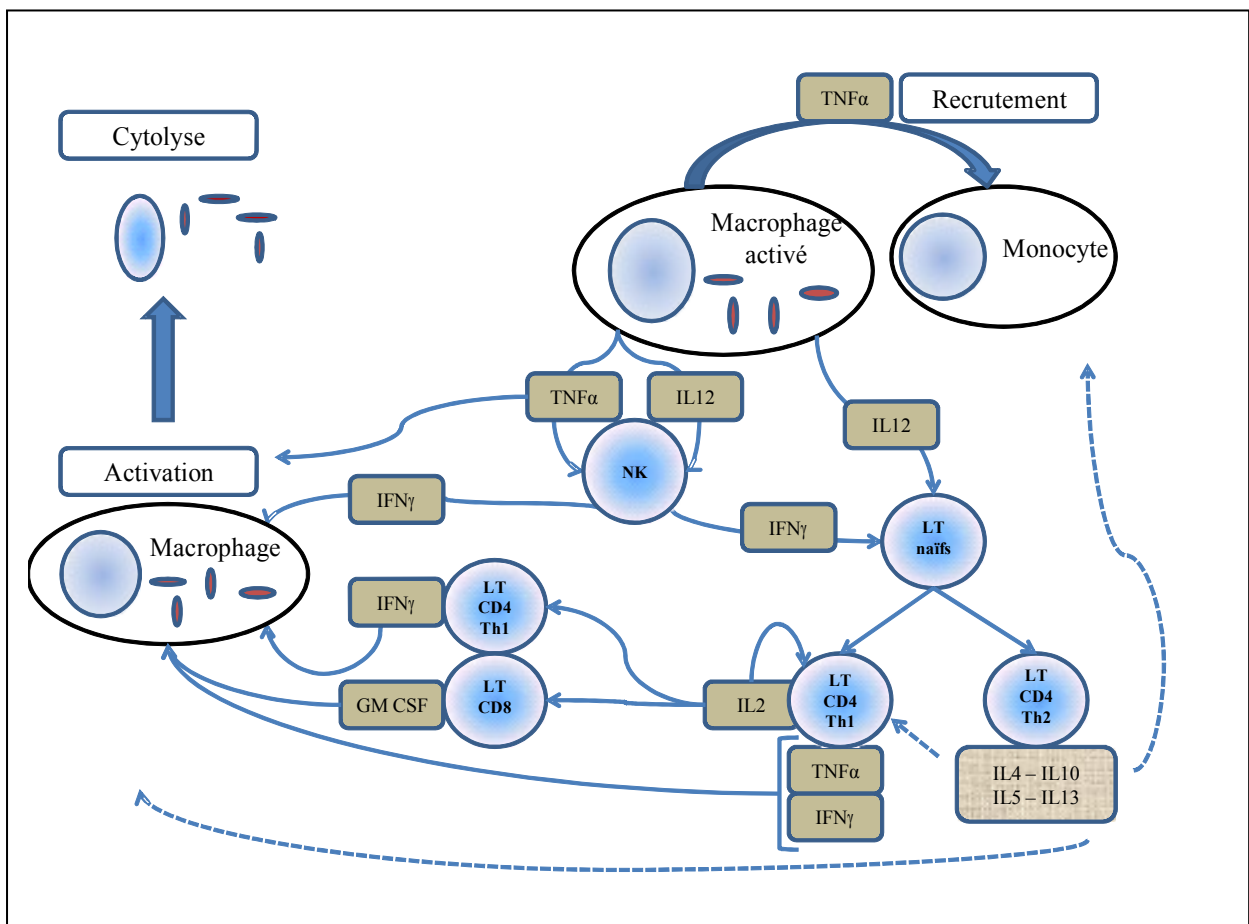


Figure 9 – Représentation schématique et simplifiée des phénomènes cellulaires et moléculaires d'après les informations du chapitre « Physiopathologie et immunité de l'infection tuberculeuse » de la référence [16].

Flèches pleines : effet activateur ; flèches en pointillé : effet freinateur.

*M. tuberculosis* est capable de résister aux mécanismes de défense innée habituellement suffisants pour les autres bactéries. L'inhibition de la croissance et la bactéricidie dans le macrophage activé reposent sur deux mécanismes. Le premier fait intervenir les dérivés toxiques du monoxyde d'azote, il s'agit du mécanisme principal. Le second fait appel à la voie des dérivés dépendants de l'explosion oxydative. Ce mécanisme est plus controversé.

Les cellules dendritiques occupent une place essentielle dans le lien réponse innée et adaptative. Elles sont en effet capables d'internaliser des mycobactéries vivantes et d'en restreindre la multiplication. Ces cellules, issues des monocytes, activées par des cytokines puis infectées, sont capables de lier spécifiquement et de phagocyter les mycobactéries. Les bacilles alors phagocytés sont incapables de se multiplier du fait d'une absence de relation entre vacuoles d'internalisation et circuits métaboliques intra-cytoplasmiques. Cependant, en l'absence de cytokines, les cellules dendritiques se comportent comme les macrophages sur les bacilles. Si elles sont infectées à l'état non activé, une multiplication bacillaire est possible et la dissémination vers les tissus lymphoïdes autorisée. Elles jouent également un rôle majeur dans la constitution de l'environnement cytokinique par sécrétion de médiateurs solubles indispensables à la réponse immunologique innée et intervenant dans la prolifération des cellules lymphoïdes naïves.

Les lésions tissulaires sont induites par la réponse inflammatoire. Il existe une relation inverse entre la réponse cellulaire T et l'importance des lésions. Dans une forme mineure ou une guérison spontanée, l'HSR à la tuberculine obtenue est intense et les lymphocytes T *in vitro* sont bons répondeurs aux antigènes spécifiques. Dans les formes disséminées, on n'observe pas de réponse cutanée à l'intradermo-réaction (IDR) et les lymphocytes T *in vitro* sont mauvais répondeurs. Dans l'immunodépression induite par l'infection VIH qui touche sélectivement les lymphocytes T CD4, la réactivation d'une tuberculose guérie et l'évolution vers la forme maladie sont fréquentes. Dans cette situation, le déficit en lymphocytes T empêche l'activation des macrophages et la formation du granulome, les bacilles peuvent alors être transportés dans la totalité de l'organisme, définissant une tuberculose généralisée.

Les connaissances tenant à l'immunologie de la physiopathologie, aux mécanismes de protection ne sont que partielles. En grande partie, elles sont issues de modèles expérimentaux et peu d'entre elles ont pu être confirmées chez l'homme. Chez le sujet immunocompétent, la réaction immunologique au cours de la primo-infection est plus ou moins intense en fonction des individus, de la souche, de la dose infectante, mais la réaction développée est capable de le protéger d'une nouvelle infection. En France et dans les pays industrialisés, 90% des sujets infectés sont immuns sans développement de la maladie malgré la persistance de bacilles

quiescents et de possibles périodes de réinfection. L'état d'équilibre est en faveur de l'hôte avec une guérison apparente, mais cet état peut être rompu si le système immunitaire est altéré par une thérapeutique immunosuppressive (corticoïdes, anti-TNF $\alpha$ , ...) ou par une pathologie acquise (silicose, diabète, VIH, ...). Des facteurs génétiques de l'hôte ont été identifiés et sont reconnus responsables d'une évolution défavorable de l'infection. Il s'agit de l'anomalie portant sur le récepteur de l'IFN $\gamma$  et du déficit portant sur le récepteur à l'IL2. De nombreux points restent à éclaircir en ce qui concerne la protection acquise à long terme.

## 1.4 Diagnostic clinique

### 1.4.1 Aspects cliniques [16,20-22]

- **Primo-infection tuberculeuse**

Elle est le plus souvent asymptomatique mais peut entraîner une discrète altération de l'état général avec asthénie et fièvre modérée. On observe plus rarement un érythème noueux, une kératoconjonctivite phlycténulaire ou une pleurésie sérofibrineuse si le chancre d'inoculation est sous-pleural. L'évolution est spontanément favorable dans 90% des cas en l'absence d'immunodépression. Les complications sont rares avec de possibles troubles ventilatoires ou des broncheectasies.

- **Infection tuberculeuse latente**

Elle est asymptomatique.

- **Tuberculose pulmonaire**

Elle est due à la dissémination du bacille par voie bronchique à partir du nodule de primo-infection, les régions atteintes étant les plus ventilées en raison du type respiratoire du bacille. La tuberculose pulmonaire commune atteint en priorité les sommets des lobes et les segments postérieurs du parenchyme pulmonaire. Les signes généraux retrouvés sont une altération de l'état général avec asthénie, un amaigrissement, une fièvre souvent vespérale et peu élevée, des sueurs nocturnes. La symptomatologie prédominante est respiratoire avec une toux prolongée mucopurulente pouvant être accompagnée d'hémoptysies, rarement de douleurs thoraciques voire d'une dyspnée évoquant une atteinte pleurale. En général, la toux survient précocement dans l'infection mais elle peut ne pas être productive.

Chez le sujet VIH positif, la symptomatologie peut être atypique et une fièvre prolongée inexplicquée doit initier la recherche de tuberculose.

- **Tuberculose miliaire**

Il s'agit d'une infection généralisée, faite de multiples granulomes de la taille d'un grain de mil. Elle survient classiquement peu de temps après la primo-infection ou au stade terminal d'évolution d'une tuberculose chronique non traitée. Les principaux symptômes retrouvés sont généraux (altération de l'état général marquée, fièvre) et respiratoires avec une dyspnée voire un syndrome de détresse respiratoire aiguë dans la forme suraiguë (miliaire asphyxiante). Des signes neuroméningés à type de céphalées, d'obnubilation voire de coma, des troubles psychiatriques et une atteinte des nerfs crâniens peuvent être présents chez l'adulte et sont souvent au premier plan chez le nourrisson.

- **Formes extrapulmonaires**

Elles surviennent surtout chez le sujet immunodéprimé et le nourrisson après dissémination du bacille par voie hématogène et/ou lymphatique. Elles représentent environ 25% des tuberculoses déclarées en France. Le diagnostic repose alors sur l'isolement du bacille ou sur les examens anatomopathologiques de la biopsie.

- Tuberculose ganglionnaire

Il s'agit de la forme extrapulmonaire la plus fréquente. La présentation clinique la plus commune est une adénopathie cervicale unilatérale et volumineuse. L'adénopathie peut fistuliser à la peau. Des adénopathies multiples ou de localisations différentes, voire profondes, sont possibles et correspondent à des tuberculoses plus importantes. Ces formes généralisées sont décrites au cours du SIDA. La biopsie exérèse du ganglion permet d'isoler la mycobactérie et son histologie est évocatrice.

- Tuberculose osseuse

La spondylodiscite tuberculeuse ou mal de Pott est l'atteinte osseuse la plus fréquente. Elle correspond à une atteinte vertébrale et discale avec formation d'abcès paravertébraux pouvant

entraîner des déformations rachidiennes et des tassements vertébraux ainsi que des complications neurologiques par compression. Elle affecte préférentiellement le rachis thoracique inférieur, plus rarement cervical ou lombaire.

Des ostéo-arthrites affectant les articulations périphériques sont décrites. Elles évoluent sur le mode chronique et touchent plus fréquemment la hanche et le genou. Cette localisation est plus fréquente chez l'enfant du fait d'une vascularisation plus importante des épiphyses. La biopsie osseuse est nécessaire au diagnostic en l'absence d'autre localisation.

- Formes neuroméningées

La méningite tuberculeuse est d'installation progressive. Les signes cliniques habituels sont retrouvés (céphalées, raideur de nuque, obnubilation). L'orientation diagnostique est fournie par l'étude du liquide céphalo-rachidien (LCR) présentant une cytologie à prédominance lymphocytaire ou panachée, une hypoglycorachie et une hyperprotéinorachie franche. L'isolement de la mycobactérie y est rare.

Des tuberculomes intracérébraux peuvent se développer. Les symptômes retrouvés sont une accentuation des troubles neurologiques et psychiatriques voire des crises convulsives. Ils peuvent conduire à une hydrocéphalie nécessitant le recours à une dérivation ventriculaire.

- Pleurésies et péricardites

Le bacille peut atteindre la plèvre au cours de la primo-infection ou la rejoindre après rupture d'une cavité ou fistule bronchopleurale.

Les symptômes de la tuberculose péricardique ne sont pas spécifiques. On retrouve les signes généraux d'infection associés à une toux, une dyspnée, une orthopnée et des douleurs thoraciques.

- Tuberculose urogénitale

L'atteinte du tractus urinaire peut survenir quelle que soit la forme de tuberculose. Dans ce contexte, le patient souffre de pyurie aseptique le plus souvent accompagnée de dysurie voire d'hématurie. L'urographie permet d'évaluer l'étendue des lésions.

Une atteinte génitale est souvent associée. Chez l'homme, des calcifications peuvent être retrouvées sur la prostate, les vésicules séminales, les épидидymes et les testicules. Chez la



femme, l'atteinte débute par une salpingite occasionnant des douleurs pelviennes. Elle peut ensuite s'étendre et être responsable de stérilité.

- Tuberculose surrénalienne

Dans ce cas, une hypertrophie des surrénales avec ou sans calcification est observée. Elle est responsable d'insuffisance surrénalienne.

- Tuberculose digestive

Le tube digestif est contaminé par déglutition des sécrétions respiratoires. L'infection peut intéresser son ensemble. Les lésions retrouvées sont des ulcérations ou des masses d'allure tumorale. Des complications telles qu'une hémorragie, une perforation, une obstruction ou une fistulisation peuvent survenir.

- Autres formes

La tuberculose laryngée, très contagieuse, se présente sous des formes variées : érythème, ulcération ou masse pseudotumorale.

Des otites, des atteintes oculaires et des formes cutanées ont été décrites.

## 1.4.2 Examens complémentaires

- Radiographie pulmonaire [16,20-22]

Les anomalies sont de morphologie et d'étendue variables en fonction du stade d'évolution de l'infection.

- La primo-infection

L'imagerie montre dans sa forme typique le complexe gangliopulmonaire correspondant à un petit nodule parenchymateux associé à une adénopathie médiastinale unilatérale. Le nodule, le plus souvent non visible, siège habituellement au niveau du lobe moyen. L'adénopathie peut

être hilare, interbronchique ou latérotrachéale. Rarement, on peut observer un épanchement pleural.

- L'infection tuberculeuse latente

L'imagerie montre les séquelles de la primo-infection : calcification du nodule et/ou de l'adénopathie.

- La tuberculose pulmonaire

La radiographie thoracique est en général évocatrice et montre des opacités infiltratives et nodulaires au niveau des sommets, uni- ou bilatérales asymétriques, parfois excavées. Il est possible d'observer un nodule isolé de forme pseudotumorale : le tuberculome, ou un aspect de pneumonie tuberculeuse (dissémination bronchique sous une adénopathie obstructive). Des adénopathies médiastinales satellites sont fréquentes.

Chez le sujet VIH positif, l'imagerie est souvent atypique. Les formes excavées sont rares, l'atteinte des lobes inférieurs est fréquente et la radiographie peut être normale en l'absence de réaction granulomateuse.

- La tuberculose miliaire

Les opacités micronodulaires diffuses, de 1 à 2 mm, sont évocatrices mais souvent à la limite du visible. En général, la radiographie est suffisante mais parfois la tomодensitométrie permet de mieux poser le diagnostic et de préciser le caractère excavé des lésions qui n'est pas toujours évident sur cliché de radiographie. La tomодensitométrie est utile dans les formes complexes : hémoptysie, caverne(s), atteinte pleurale, péricardique ou ganglionnaire. De plus, elle permet d'obtenir un document de référence pour les contrôles ultérieurs et est très utile à l'arrêt du traitement pour faire le bilan exact des séquelles (séquelles fibronodulaires, bronchectasies, cavités résiduelles).

- **Apport de la biologie [20,21]**

Un syndrome inflammatoire est souvent présent mais son absence n'élimine pas le diagnostic. Une hyponatrémie survient au cours de la méningite tuberculeuse par sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique.

Une cytolyse et une cholestase peuvent suggérer une localisation hépatique.

L'apport de la numération formule sanguine est faible. Elle peut mettre en évidence une hyperleucocytose avec augmentation des monocytes et des polynucléaires éosinophiles, et une anémie. On peut également retrouver une pancytopénie en raison d'un envahissement médullaire par le bacille.

Une leucocyturie aseptique doit encourager la recherche de bacilles dans les urines.

Une sérologie VIH doit être proposée systématiquement lors du diagnostic puisque cette pathologie peut survenir au cours de l'évolution de cette infection virale.

- **Aspect histologique**

La découverte d'un aspect granulomateux épithélioïde et géantocellulaire doit faire évoquer le diagnostic de tuberculose.

## 1.5 Diagnostic immunologique

L'objectif des tests disponibles est de pouvoir identifier les personnes infectées. Le dépistage à grande échelle de la tuberculose maladie est avant tout assuré par une radiographie pulmonaire proposée aux populations les plus à risque de tuberculose. Le dépistage des infections latentes n'a d'intérêt que s'il existe un bénéfice à traiter ces personnes. Le bénéfice du traitement de l'infection latente a été démontré chez les personnes ayant récemment contracté le bacille (enquête autour d'un cas), chez les enfants de moins de 15 ans et chez les immunodéprimés. Les tests de dépistage de l'infection tuberculeuse latente sont représentés par l'IDR à la tuberculine et par de nouveaux tests basés sur la mesure de la réponse immunitaire cellulaire *via* la production d'IFN $\gamma$  : IGRAs (interferon  $\gamma$  releasing assays). Ils s'adressent aux situations d'enquête autour d'un cas, à la vérification du statut de certains professionnels exposés (définis dans les articles R 3112-1 et 2 du code de la santé publique), à toute personne devant bénéficier d'un traitement par anti-TNF $\alpha$  et constitue une aide au diagnostic des tuberculoses extrapulmonaires [3].

### 1.5.1 IDR à la tuberculine

Durant plus d'un siècle, ce test a été utilisé comme moyen d'aide au diagnostic de la tuberculose maladie et de l'infection latente. Jusqu'en 2003, il constituait l'unique moyen de détecter une infection latente.

Le test de Mantoux consiste en l'injection de 0,1 mL de tuberculine en intradermique stricte sur la face antérieure de l'avant-bras. La réaction cutanée induite entraîne une élévation de la peau de 6 à 10 mm de diamètre [23].

- Bases immunologiques du test [21,23]

Les cellules T sensibilisées par l'infection tuberculeuse sont recrutées sur le site d'injection, y libèrent leurs cytokines et recrutent les cellules impliquées dans la réaction inflammatoire. S'en suit la réaction cutanée de type HSR avec induration, vasodilatation locale, œdème et dépôt de fibrine. Cette réaction débute 5-6 heures après l'injection et l'induration est maximale après 48-72 heures. Dans le contexte d'une immunodépression affectant les lymphocytes T CD4, une anergie cutanée est possible. En effet, chez le sujet immunodéprimé, (notamment chez le sujet VIH positif), la diminution de l'immunité cellulaire entraîne une disparition progressive de cette HSR.

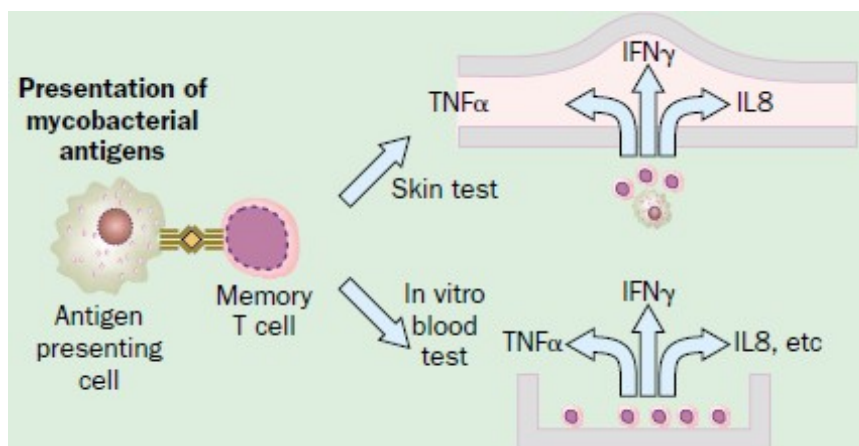


Figure 10 –Bases immunologiques de l'IDR à la tuberculine et des tests IGRA [24].

- Interprétation [3,23,25]

La sensibilité, la spécificité et la prévalence de l'infection au sein des différentes populations ont permis de déterminer des valeurs cibles pour l'interprétation du résultat en fonction du

groupe de personnes auquel le patient peut être rattaché. Ainsi, un résultat est considéré positif si le diamètre est supérieur ou égal :

- à 5 mm pour les sujets VIH positifs, les contacts récents, les transplantés d'organes, les immunodéprimés, et en présence d'une radiographie du thorax évocatrice de fibrose chez un patient ayant des antécédents de tuberculose ;
- à 10 mm pour les immigrants installés depuis moins de 5 ans et en provenance d'un pays de forte prévalence, pour les usagers de drogue injectable, pour le personnel de laboratoire de microbiologie, pour les enfants de moins de 4 ans, pour toute personne exposée à un risque ;
- à 15 mm pour toute personne y compris en l'absence de risque relevé.

Lorsque la valeur d'un test antérieur est disponible, un résultat est considéré positif si on peut observer une augmentation d'au moins 10 mm du diamètre de l'induration.

Ce test n'est pas spécifique de l'infection tuberculeuse. Un résultat positif peut être observé dans les infections à mycobactéries non tuberculeuses ou après vaccination par le BCG. Des résultats faussement négatifs sont obtenus lorsque le test est réalisé trop précocement dans l'histoire de l'infection (avant mise en place de la réponse immune cellulaire) ou trop tardivement (après plusieurs années), lorsque le patient a reçu un vaccin à virus vivant(s) ou s'il a eu une infection virale récente, et s'il est réalisé chez un nourrisson de moins de 6 mois.

Les résultats sont dépendants de la qualité de l'administration et de la lecture. Le patient doit venir en consultation deux fois : la première pour l'injection et la seconde pour la lecture qui doit être effectuée impérativement 3 jours après.

### 1.5.2 Tests interféron $\gamma$ : IGRAs

La reconnaissance du rôle majeur de l'IFN $\gamma$  dans la réponse immune à médiation cellulaire a permis la conception de ces nouveaux tests *in vitro*.

- **Différentes générations de tests [3,26,27]**

En 2003, le premier IGRA : QuantiFERON<sup>®</sup>-TB (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australie) a pu être utilisé. Il avait recours à une méthode ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) pour mesurer l'IFN $\gamma$  libéré en réponse à la PPD (purified protein derivative) tuberculine. Cependant les difficultés de réalisation du test et sa faible spécificité

(inférieure à l'IDR) l'ont éliminé du marché depuis 2005. Depuis, trois nouvelles générations de tests ont vu le jour.

En 2005, le test QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold a été mis sur le marché. Il permet de détecter la sécrétion d'IFN $\gamma$  sur sang total hépariné après incubation de 16-24 heures en présence de trois peptides synthétiques : ESAT-6 (early secretory antigenic target-6, protéine de 6 kDa), CFP-10 (culture filtrate protein-10, protéine de 10 kDa) et TB7.7 (Rv2654). Ces protéines sont codées par des gènes localisés sur la région de délétion 1 (RD1) retrouvée chez *M. tuberculosis*, *M. africanum* et chez les souches pathogènes de *M. bovis*. Cette RD1 est absente de la souche BCG et de la plupart des mycobactéries atypiques (à l'exception de *M. kansasii*, *M. szulgai* et de *M. marinum*). L'utilisation de ces protéines rend le test plus spécifique que celui utilisant la PPD tuberculine. Le délai avant mise en contact des peptides ne doit pas excéder 12 heures du fait d'un risque d'altération des cellules. Ce test repose sur une technique ELISA. Le témoin contrôle positif utilise un mitogène : la phytohémagglutinine et le témoin négatif est constitué d'une solution saline.

En 2007, le QuantiFERON<sup>®</sup>-TB Gold In Tube a amélioré la phase pré-analytique puisque les contrôles et le mélange antigénique ont été incorporés dans trois tubes différents utilisés pour le prélèvement. Le tube contrôle négatif contient de l'héparine, le tube contrôle positif de l'héparine, du dextrose et de la phytohémagglutinine, le tube test contient 14 peptides représentant les séquences complètes de ESAT-6 et de CFP-10 et une partie de TB7.7. Un recueil de 3×1 mL de sang est nécessaire. Après incubation de 16-24 heures et séparation du plasma, l'IFN $\gamma$  est quantifié par technique ELISA.

En 2008, le T-SPOT<sup>®</sup>-TB (Oxford Immunotec, Abingdon, UK) a été développé. Ce test permet une analyse sur les cellules mononucléées sanguines. La technique utilisée est différente de celle des tests précédents : ELISPOT (enzyme-linked immunospot assay) mais les peptides utilisés sont les mêmes. Cette technique a été étudiée par Jafari et *al.* [28] sur des cellules mononucléées de liquide bronchoalvéolaire (LBA). Ces auteurs rapportent des résultats concluants quant au diagnostic de tuberculose pulmonaire à examen microscopique négatif sur ce type de prélèvements.

- **Sensibilité et spécificité**

En l'absence de gold standard pour le diagnostic d'infection tuberculeuse latente, la sensibilité et la spécificité ne peuvent pas être correctement définies. La sensibilité correspond à la proportion de patients avec tuberculose active (confirmée par la culture) présentant un test

positif. La spécificité est évaluée chez des personnes ne présentant pas de risque de tuberculose. En 2004, Pai et *al.* [24] ont analysé différentes études reprenant les tests commercialisés et des essais « maison » afin d'évaluer les performances des protéines spécifiques et de la PPD tuberculine. La sensibilité et la spécificité des études variaient en fonction des populations étudiées, des protéines et des techniques utilisées. Ces auteurs ont démontré que globalement, la sensibilité de la PPD tuberculine est supérieure à un test IGRA n'utilisant qu'une seule protéine, mais l'IGRA utilisant au moins deux protéines présente une meilleure sensibilité que la PPD tuberculine. La spécificité de l'IGRA est supérieure à la PPD tuberculine. En 2006, plusieurs études ont été reprises par Pai et *al.* [29] afin d'estimer la sensibilité et la spécificité des tests commercialisés QuantiFERON®-TB Gold et T-SPOT®-TB et celles de l'IDR.

Tableau II – Comparaison de l'IDR à la tuberculine aux IGRAs commercialisés [29].

| Performances et caractéristiques  | IDR à la tuberculine   | IGRAs : QuantiFERON®-TB Gold et T-SPOT®-TB             |
|---|--|--|
| Sensibilité estimée (patients avec tuberculose active)  | 75-90% (plus faible chez les immunodéprimés)                   | 75-95% (données indisponibles chez les immunodéprimés) |
| Spécificité estimée (individus sains, absence d'antécédents de tuberculose maladie et d'exposition) | 70-95% (plus faible chez les populations vaccinées par le BCG) | 90-100% (y compris dans les populations vaccinées)     |
| Réaction croisée avec le BCG  | Oui  | Peu probable   |
| Réaction croisée avec les mycobactéries non tuberculeuses   | Oui  | Peu probable mais niveau de preuve limité              |
| Reproductibilité  | Modérée et variable  | Peu de données   |
| Amplification du résultat après répétition du test  | Oui  | Non  |
| Bénéfice à traiter les tests positifs (essais randomisés)   | Oui  | Absence de preuve                                      |

Ces deux analyses concluent à une meilleure sensibilité des IGRAs utilisant plusieurs protéines codées par des gènes de la RD1, à une meilleure corrélation avec l'exposition à *M. tuberculosis* et à une moindre réaction croisée avec la vaccination par le BCG et les infections à mycobactéries atypiques [24,29].

Tableau III – Caractéristiques des kits QuantiFERON®-TB Gold In Tube et T-SPOT®-TB commercialisés en France [30,31].

|  | QuantiFERON®-TB Gold In Tube | T-SPOT®-TB |
|--|------------------------------|------------|
|--|------------------------------|------------|

|             |     |       |
|-------------|-----|-------|
| Sensibilité | 89% | ≈95%  |
| Spécificité | 99% | ≈100% |

Comme tout test diagnostique, les valeurs prédictives positive et négative dépendent de la prévalence de l'infection dans la population étudiée.

- [Interprétation \[3,26,27,32\]](#)

Le résultat obtenu est qualitatif. Un résultat positif indique la présence d'une réaction immune due à la présence de la mycobactérie chez le patient. Le test ne peut pas être interprété lorsque le contrôle négatif présente un taux élevé d'IFN $\gamma$  et/ou lorsque le contrôle positif avec mitogène présente un taux faible. Dans ce cas, un nouveau prélèvement doit être effectué, ou une IDR, si le patient est à risque de tuberculose.

Ces tests ne permettent pas de différencier infection latente de maladie tuberculeuse. Le diagnostic d'infection latente ne peut être posé qu'après exclusion du diagnostic de maladie par évaluation médicale. Les performances n'ayant pas encore été déterminées chez les immunodéprimés et les enfants de moins de 5 ans, qui sont pourtant à risque accru d'évolution vers la maladie, des résultats négatifs ne permettent pas d'exclure la maladie à eux seuls. De ce fait, l'utilisation de ces tests n'est pas recommandée chez ces sujets.

Les avantages à utiliser un IGRA sont qu'ils autorisent une seule visite, qu'ils fournissent des résultats objectifs, rapides et reproductibles et permettent l'absence d'interférence avec le vaccin BCG. Les limites sont les délais de transport et d'incubation, l'exécution, l'interprétation du test, et le coût.

- [Indications validées en France \[32\]](#)

La Haute Autorité de Santé (HAS) a validé, en 2006, quatre indications quant à l'utilisation de ces tests sanguins pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente en remplacement de l'IDR :

- Enquête autour d'un cas, seulement chez les plus de 15 ans ;
- Dépistage à l'embauche des professionnels de santé et ceux travaillant dans un service à risque ;
- Aide au diagnostic des formes extrapulmonaires ;
- Avant traitement par un anti-TNF $\alpha$ .



La HAS indique qu'un traitement doit s'en suivre en fonction des autres données médicales disponibles.

D'autres indications seraient intéressantes mais ne sont pas encore validées :

- Le suivi de l'infection latente pour évaluer le risque d'évolution ;
- Utilisation chez le sujet VIH positif ;
- Utilisation chez les moins de 5 ans.

Le test de diagnostic indirect est choisi en fonction du contexte, de sa disponibilité et de son coût. Un test IGRA est utilisable dans les mêmes situations que l'IDR à condition qu'il s'adresse à des populations pour lesquelles ses performances ont été établies. Le test sanguin sera privilégié chez les patients peu compliants aux soins et chez les personnes vaccinées par le BCG. L'IDR à la tuberculine est préférée chez les enfants de moins de 5 ans. Il est possible de réaliser les deux méthodes pour confirmer un diagnostic si le résultat obtenu avec l'une est indéterminé ou discordant avec la situation clinique et/ou épidémiologique, ou s'il s'agit de convaincre le patient d'avoir recours à une thérapeutique.

Si la maladie est suspectée, quel que soit le test utilisé, il ne suffit pas à lui seul pour poser le diagnostic, l'évaluation supplémentaire doit comporter une radiographie du thorax, une étude bactériologique, une sérologie VIH et d'autres examens en fonction de la clinique.

### 1.5.3 Sérologie

Le diagnostic bactériologique de tuberculose restant délicat du fait de la sensibilité de l'examen microscopique et de la lenteur de la culture, de nombreuses équipes ont tenté de mettre au point un sérodiagnostic par mise en évidence d'anticorps voire d'antigènes sériques. Un test sérologique fiable pourrait en effet apporter au clinicien une aide diagnostique rapide. Les intérêts recherchés sont multiples. En établissant une corrélation entre le taux d'anticorps et le stade de l'infection tuberculeuse, il serait possible de diagnostiquer une tuberculose active (y compris les formes paucibacillaires et extrapulmonaires), d'en suivre le traitement et de différencier une infection tuberculeuse latente d'une tuberculose maladie. Grâce à la spécificité des antigènes, il serait possible de distinguer les sujets contacts des sujets vaccinés par le BCG. Les différentes études se sont portées sur l'utilisation de complexes antigéniques plus ou moins purifiés, de protéines ou de glycolipides isolés plus ou moins spécifiques de genre et d'espèces [33-41]. Quelques kits sont commercialisés. Le PATHOZYME® TB COMPLEX PLUS (Omega Diagnostics LTD.) permet la détection d'IgG développées en

réponse à l'infection par une mycobactérie du complexe de la tuberculose. Le PATHOZYME® MYCO IgG / IgA / IgM (Omega Diagnostics LTD.) permet la détection d'IgG, d'IgA et d'IgM développées en réponse à l'infection par une mycobactérie. Les kits Anda-TB (ANDA Biologicals S.A., Strasbourg) utilisent le complexe antigénique A60 (issu de *M. bovis*) pour le diagnostic d'infection à mycobactéries. Toutes les études de mise au point de méthode et les évaluations de kits commerciaux indiquent un manque de sensibilité de la sérologie qui peut être améliorée par la combinaison de plusieurs antigènes protéiques ou lipidiques [42,43]. Les obstacles tenant à leur faible sensibilité et à la variabilité de leur spécificité font qu'actuellement ces tests de sérologie n'ont pas leur place en routine. Toutefois, ils semblent utiles lors de campagnes de dépistage dans les zones de forte endémicité du fait de leur faible coût [33].

## 1.6 Diagnostic microbiologique

Le diagnostic de certitude de la tuberculose repose sur la mise en évidence de bacilles acido-alcoolo résistants (BAAR) à l'examen microscopique et l'obtention de la mycobactérie en culture. L'obtention de la mycobactérie en culture permet d'identifier l'espèce, d'étudier sa sensibilité aux antituberculeux et d'enrichir les enquêtes épidémiologiques. Quelle que soit la mycobactérie impliquée, elle requiert un milieu enrichi, et du fait de sa croissance lente, une décontamination du prélèvement est un préalable indispensable si le site comporte une flore commensale.

- **Prélèvements** [1,44,45]

Idéalement, les prélèvements doivent être réalisés avant le début du traitement. Leur nature dépend du site suspect d'infection. Dans tous les cas, des mesures de sécurité à l'égard des personnels les manipulant doivent être assurées du fait de la pathogénicité de *M. tuberculosis* et de sa capacité à se propager dans l'air. Les prélèvements doivent être recueillis dans des pots ou tubes stériles hermétiques, et être rapidement acheminés au laboratoire. Si l'analyse a besoin d'être différée, la conservation s'effectue à 4°C afin de limiter la croissance de la flore commensale d'accompagnement. Du fait de leur faible richesse en bacilles, après décontamination et fluidification si besoin, une centrifugation est indispensable à la concentration de l'échantillon bactérien. Le culot obtenu permet la réalisation des frottis, l'ensemencement des milieux de culture et est éventuellement utilisé en vue d'une amplification génique. Historiquement, ce culot était inoculé au cobaye.

- Tuberculose pulmonaire

Les prélèvements respiratoires recueillis doivent subir une fluidification et une décontamination. Les crachats doivent être recueillis après effort de toux le matin au réveil pour ramener les sécrétions bronchiques accumulées durant la nuit. Si le volume est insuffisant ou si le prélèvement a un aspect salivaire, il doit être rejeté. Chez les enfants qui ne savent pas cracher et les patients qui ne veulent pas cracher, un tubage gastrique peut remplacer l'expectoration. Après alitement, les sécrétions bronchiques dégluties sont récupérées. Dans ce cas, si l'acheminement au laboratoire est différé, l'acidité du milieu doit être neutralisée.

Du fait de la présence discontinue du bacille dans les sécrétions respiratoires, l'examen doit être répété trois jours de suite. Lorsqu'il existe une forte présomption diagnostique et que les trois examens successifs reviennent négatifs, le prélèvement peut être effectué au cours d'une fibroscopie bronchique avec aspiration des sécrétions bronchiques distales ou LBA qui augmente la sensibilité de l'examen du fait de l'irritation bronchique provoquée. Les expectorations post-fibroscopie doivent également être analysés.

- Formes extrapulmonaires

Dans le cadre d'une suspicion de tuberculose rénale, les urines du matin sont recueillies après restriction hydrique depuis la veille au soir. Elles sont décontaminées avant centrifugation. L'examen est également renouvelé trois jours de suite.

La suspicion de méningite tuberculeuse doit amener le clinicien à réaliser une ponction lombaire.

D'autres localisations peuvent être investiguées suivant la clinique : liquides d'épanchements (pleural, ascite, articulaire) mais aussi abcès, lésions cutanées et autres tissus.

En cas de tuberculose disséminée, des hémocultures et une myéloculture peuvent être envisagées. Les prélèvements de sang et de moelle osseuse doivent être recueillis dans des flacons spécifiques.

Le recueil et l'étude microbiologique des selles lors de la tuberculose digestive ne sont pas recommandés du fait de la richesse de la flore commensale. Il est préférable d'effectuer une biopsie colique.

- [Prétraitement de l'échantillon \[1,44,45\]](#)

- Fluidification – décontamination

L'objectif de la fluidification du prélèvement est de libérer les bactéries contenues dans le mucus, le pus ou les cellules. Cette opération est réalisée à l'aide d'un agent fluidifiant : la N-acétyl-L-cystéine ou le laurylsulfate de sodium.

La décontamination contribue à l'élimination des micro-organismes présents dans les flores commensales. Elle utilise de la soude ou un acide dilué. La concentration du détergent utilisé et le temps de contact doivent être définis au laboratoire et être respectés car les mycobactéries ne sont pas totalement insensibles à ce traitement. La maîtrise de la technique est acquise lorsque le taux de cultures souillées est compris entre 2 et 5%. Il faut en effet optimiser le diagnostic en éliminant la flore commensale et en limitant l'effet bactéricide sur les mycobactéries.

Les prélèvements issus de sites normalement stériles ne sont pas décontaminés (LCR, liquides pleural, péricardique, articulaire, moelle osseuse, sang).

Différentes méthodes de décontamination sont utilisables. Celles à base de soude sont les méthodes de Tacquet-Tison (laurylsulfate de sodium), de Kubica (N-acétyl-L-cystéine sodique) et de Petroff (soude 4%). Les techniques à base d'acide disponibles sont : la méthode à l'acide sulfurique 4%, la méthode au chlorure de benzalkonium, la méthode à l'acide oxalique et la méthode au chlorure de cétyle pyridinium et chlorure de sodium. La technique recommandée est celle de Kubica car elle permet l'inoculation de tous les milieux de culture (liquide et solide), elle est validée pour les méthodes de détection automatisée et n'a pas d'effet inhibiteur sur l'amplification génique. Pour les prélèvements très contaminés et susceptibles de contenir des germes résistants à la technique standard (les *Pseudomonas* par exemple), il est possible d'appliquer successivement deux techniques : méthodes Kubica et à l'acide oxalique par exemple.

Tableau IV – Méthode initiale de Kubica [46].

| Technique de fluidification – décontamination de Kubica |  |
|---|--|
| Prélèvement   | Dans un pot conique transférer 2,0-2,5 mL de prélèvement   |
| Fluidification et décontamination                       | Ajouter la préparation : soude à 2% en tampon citrate de sodium et N-Acétyl-L-Cystéine à 0,5% (volume équivalent à celui du prélèvement)<br>Vortexer<br>Agiter à température ambiante sur agitateur de Kahn pendant 15 minutes |
| Neutralisation  | Ajouter du tampon phosphate  |
| Centrifugation  | Centrifuger 15 minutes à 3000 tours/minute   |

|   |   |
|---|---|
| Décanner et vortexer                                  |   |
| Effectuer un étalement sur lames pour l'examen direct |   |
| Ensemencement   | Reprendre le culot avec 2 ml d'albumine bovine à 0,2% ajustée à pH 6,8<br>(volume pouvant varier en fonction du nombre de tubes à ensemenecer)<br>Ensemencer 0,5 ml par milieu de culture |

○ Concentration

Une centrifugation est effectuée afin d'augmenter la sensibilité de l'examen microscopique, de la culture et de l'amplification génique.

• **Examen microscopique [1,44,45]**

Il s'agit de la première étape du diagnostic bactériologique et parfois l'unique méthode disponible dans les pays en voie de développement.

La propriété tinctoriale du genre *Mycobacterium*, l'acido-alcool résistance, est mise à profit. En effet, la richesse en lipides de leur paroi les rend imperméable aux colorants habituels, mais leur paroi fixe intensément la fuchsine phéniquée et n'autorise pas une décoloration par l'acide et l'alcool.

Deux techniques bien codifiées ont fait leur preuve : la méthode de Ziehl-Neelsen et ses variantes, et les méthodes utilisant un agent fluorescent (auramine ou acridine orange). Avec la méthode de Ziehl-Neelsen, les bacilles apparaissent rouge sur fond bleu. Utilisée à chaud, elle constitue la méthode de référence puisqu'elle est simple, reproductible et ne nécessite pas d'équipement particulier en dehors d'un microscope avec objectif à immersion.

Tableau V – Différentes étapes de la coloration de Ziehl-Neelsen [47].

| Technique de coloration de Ziehl-Neelsen à chaud   |  |             |
|--|--|-------------|
| Coloration   | Recouvrir la lame de fuschine              | 10 minutes  |
| Chauffer 3 fois jusqu'à émission de vapeur blanche |  |             |
| Rinçage  | Eau distillée stérile                      |             |
| Décoloration                                       | Recouvrir la lame d'acide sulfurique dilué | 3 minutes   |
| Rinçage  | Eau distillée stérile                      |             |
| Décoloration                                       | Recouvrir la lame d'alcool absolu          | 5 minutes   |
| Rinçage  | Eau distillée stérile                      |             |
| Contre-coloration                                  | Recouvrir la lame de bleu de méthylène     | 30 secondes |
| Rinçage  | Eau distillée stérile                      |             |
| Séchage  | Air libre ou étuve                         |             |
| Lecture  |  |             |



Figure 11 –BAAR après coloration de Ziehl-Neelsen [53].

Par technique de fluorescence, les BAAR apparaissent jaunes sur fond rouge avec l'auramine et oranges avec l'acridine. Cette méthode présente l'avantage d'une plus grande rapidité de lecture des frottis puisque les mycobactéries sont visibles au grossissement  $\times 250$ . Cependant, le laboratoire doit être équipé d'un microscope à fluorescence.

Tableau VI – Différentes étapes de la coloration à l'auramine [47].

| Technique de coloration à l'auramine (méthode de Degommier) |  |            |
|---|--|------------|
| Recouvrir la lame de méthanol                               |  | 2 minutes  |
| Rinçage   | Eau distillée stérile                  |            |
| Coloration  | Recouvrir la lame d'auramine           | 15 minutes |
| Rinçage   | Eau distillée stérile                  |            |
| Décoloration  | Recouvrir la lame d'alcool acide       | 5 minutes  |
| Rinçage   | Eau distillée stérile                  |            |
| Contre-coloration   | Recouvrir la lame de rouge de thiazine | 1,5 minute |
| Rinçage   | Eau distillée stérile                  |            |
| Décoloration  | Recouvrir la lame d'alcool acide       | 3 minutes  |
| Rinçage   | Eau distillée stérile                  |            |
| Séchage   | Air libre ou étuve                     |            |
| Lecture   |  |            |

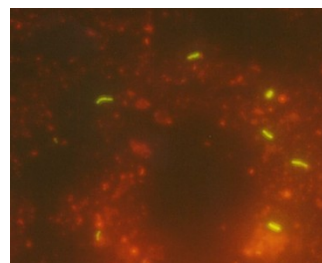


Figure 12 –BAAR après coloration à l'auramine .

Aucune de ces deux méthodes ne permet un diagnostic d'espèce.

Le résultat ne peut être rendu qu'après lecture de la totalité du frottis. Des modalités de réponse standardisée existent pour les deux méthodes. Les résultats positifs sont exprimés qualitativement lorsque le nombre de BAAR est très faible et nécessite un contrôle, et quantitativement de 1+ à 4+ lorsque la quantité le permet. Cette quantification est indispensable au suivi de l'efficacité thérapeutique. La méthode standardisée utilisée dans le monde a été développée par la collaboration de plusieurs organisations dont l'OMS et le Centers for Disease Control and Prevention CDC [44].

Tableau VII – Evaluation semi-quantitative des examens microscopiques positifs en fonction de la méthode utilisée [48].

|         | Nombre de BAAR observés                   |                                      |                |
|---------|---|--------------------------------------|----------------|
|         | Coloration de Ziehl-Neelsen $\times 1000$ | Coloration utilisant un fluorochrome |                |
|         |   | $\times 250$                         | $\times 400$   |
| Absence | 0   | 0                                    | 0              |
| Douteux | 1-2/300 champs                            | 1-10/30 champs                       | 1-2/70 champs  |
| 1+      | 1-10/100 champs                           | 1-10/10 champs                       | 2-20/50 champs |
| 2+      | 1-10/10 champs                            | 1-10/champ                           | 4-40/10 champs |
| 3+      | 1-10/champ                                | 10-100/champ                         | 4-40/champ     |

|    |           |            |           |
|----|-----------|------------|-----------|
| 4+ | >10/champ | >100/champ | >40/champ |
|----|-----------|------------|-----------|

L'examen microscopique reste cependant peu sensible et il faut au moins  $10^4$  BAAR/mL de prélèvement pour que la probabilité d'en voir un soit de 95%. Les prélèvements d'origine extrapulmonaire sont rarement positifs et, en moyenne seulement 50% des nouveaux cas de tuberculose pulmonaire sont détectés par l'examen direct [49]. Toutefois, une étude a rapporté que plus de 90% des crachats de tuberculose pulmonaire active étaient positifs lorsque le frottis était confectionné à partir de 5 mL d'expectoration [50].

- Culture

La culture est la méthode la plus sensible pour porter le diagnostic de tuberculose. Seuls 10 à 100 bacilles viables/mL suffisent pour obtenir la mycobactérie en culture. Dans le cadre de tuberculose active, sa sensibilité est de 81% et sa spécificité de 98,5% [50]. De plus, elle permet l'identification de la mycobactérie en cause, l'étude de sa sensibilité aux antituberculeux et une étude épidémiologique.

Différents milieux solides et liquides sont disponibles. Il est indispensable d'ensemencer le prélèvement sur différents milieux. Le référentiel Rémic [45] édité par la Société Française de Microbiologie (SFM) recommande l'emploi de trois milieux différents dont au moins un liquide. Les mycobactéries sont des bactéries exigeantes, aérobies avec une croissance lente pour les espèces du « complexe *tuberculosis* » (temps de division d'environ 20 heures). Les milieux de culture doivent tenir compte de ces considérations. L'isolement de mycobactéries de la tuberculose, même en nombre limité, signe habituellement la maladie. Il faut tout de même s'assurer de la cohérence avec les données cliniques et radiographiques puisque les risques de contamination au laboratoire existent du fait de la propagation aisée d'aérosols.

- Milieux solides [1,45,48]

- Milieux à l'œuf de Löwenstein-Jensen et Coletsos

Ces milieux sont contenus en tubes à bouchon vissé ou fermés par du coton et obturés par une capsule de plastique. Ils sont formulés à base d'œuf. Le milieu de Löwenstein-Jensen est le plus utilisé du fait de sa bonne sensibilité et de l'aspect caractéristique des colonies de *M. tuberculosis* en « chou-fleur ». Le milieu de Coletsos est enrichi en pyruvate de sodium et indiqué pour la croissance des mycobactéries exigeantes comme *M. bovis* et *M. africanum*.

Les milieux doivent être inoculés avec le culot de centrifugation et incubés en atmosphère aérobie à 37°C durant 8 semaines au moins. D'autres températures d'incubation sont à prévoir pour les prélèvements cutanés et ostéo-articulaires puisque des espèces différentes peuvent être impliquées (*M. marinum* et *M. chelonae* : croissance à 30°C et *M. xenopi* : croissance à 42°C). Une observation des cultures au cours de la première semaine est souhaitable pour détecter d'une part la présence d'une mycobactérie à croissance rapide, et d'autre part, pour détecter une contamination et manipuler le prélèvement de nouveau au plus tôt. Sur milieu de Löwenstein-Jensen, les colonies de *M. tuberculosis* apparaissent en général au bout de 2 à 3 semaines d'incubation. *M. bovis* et *M. africanum* étant de croissance plus lente, leurs colonies apparaissent après 3 à 6 semaines.

- Milieux gélosés semi-synthétiques 7H Middlebrook : 7H10 et 7H11 (Becton Dickinson)

Ces milieux transparents sont à base de sels minéraux et de pyruvate de sodium. Ils doivent être supplémentés en OADC (acide oléique, albumine, dextrose, catalase). Le milieu 7H11 contient en plus un hydrolysate de caséine. La croissance de *M. tuberculosis* y est plus précoce mais l'observation des colonies plus difficile.

Ces cultures en milieux solides autorisent un résultat quantitatif, important pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique.

- Milieux liquides [1,45,48]

Ces milieux ont été développés pour pallier à la lenteur de croissance en milieu solide. Les milieux liquides sont ensemencés à la pipette ou à la seringue. Un délai minimum de 6 semaines est requis avant de déclarer une culture négative. La détection de la croissance bactérienne est plus rapide qu'en milieu solide. En moyenne, *M. tuberculosis* est obtenue en 1 à 2 semaines.

- Système Bactec™ 460 TB (Becton Dickinson)

Cette méthode radiométrique n'est plus commercialisée à ce jour mais a longtemps constitué le gold standard pour la culture et pour l'étude de la sensibilité aux antituberculeux. Il



s'agissait d'une technique de respirométrie radiométrique décrite par Middlebrook. Le principe reposait sur la mesure de  $^{14}\text{CO}_2$  libéré au cours de la croissance bactérienne dans le flacon contenant du milieu 7H12 enrichi en acide palmitique marqué au  $^{14}\text{C}$ . Le  $^{14}\text{CO}_2$  libéré était mesuré par l'automate et le résultat exprimé en GI (Growth Index) avec GI=0 : absence de croissance et GI=999 : croissance maximale. Sa sensibilité était supérieure à celle des méthodes utilisant un milieu solide. En moyenne, *M. tuberculosis* était détectée au bout de 10-15 jours si l'examen direct était positif, en 20 jours si l'échantillon était paucibacillaire avec un examen direct négatif. Cette méthode imposant l'utilisation d'aiguilles et des contraintes de manipulation, de stockage et d'élimination de déchets radioactifs n'est plus d'actualité.

- Milieux liquides non radiométriques

Ils sont fabriqués, pour la plupart, sur la base d'un bouillon Middlebrook 7H9 supplémenté en facteurs de croissance et en antibiotiques pour augmenter leur spécificité. Le mélange d'antibiotiques est indispensable pour les prélèvements provenant de sites accompagnés d'une flore commensale.

- Méthodes manuelles

La première technique utilise le tube BBL<sup>®</sup> MGIT<sup>™</sup> (Mycobacterial growth indicator tube, Becton Dickinson). Ce milieu MGIT<sup>™</sup> est formulé sur la base d'un bouillon Middlebrook 7H9 supplémenté en OADC qui peut être rendu sélectif par ajout d'un mélange d'antibiotiques PANTA (polymyxine B, amphotéricine B, acide nalidixique, triméthoprime, azlocilline). Le fond du tube est imprégné d'un sel de ruthénium émettant une fluorescence à 365 nm lorsque la pression partielle en  $\text{O}_2$  diminue. Cette fluorescence est visible à l'œil nu et détectable par l'automate. La lecture est facile et le délai d'incubation habituelle est de 6 semaines.

La deuxième technique utilise le milieu liquide chromogène Bio FM (Bio-Rad) formulé sur la base d'un bouillon 7H9. Il permet la croissance et la détection des mycobactéries. Ce milieu peut être rendu sélectif par inhibition de la flore associée en utilisant le milieu Bio FM V.C.A (vancomycine, colistine, amphotéricine B).

- Méthodes automatisées

Les systèmes Bactec™ 9000 et 9050 et Bactec™ MGIT™ 960 et 320 (Becton Dickinson) sont conçus sur la même technologie que celle du tube BBL® MGIT™. Les systèmes Bactec™ 9000 et 9050 permettent la recherche des mycobactéries dans le sang avec le flacon Bactec™ Myco/F-lytic (Becton Dickinson) et dans les autres prélèvements avec le flacon Bactec™ Myco/F-sputa (Becton Dickinson).

Le système BacT/Alert 3D™ (bioMérieux) utilise les flacons BacT/Alert MP Mycobacteria Process et BacT/Alert MB Mycobacteria Blood (bioMérieux) qui contiennent un indicateur colorimétrique sensible à l'augmentation du pH induite par la production de CO<sub>2</sub>. Le virage de couleur est détecté par l'automate.

Les flacons appliqués aux hémocultures (Bactec™ Myco/F-lytic et BacT/Alert MB) contiennent de la saponine qui lyse les cellules et un anticoagulant.

- **Détection génotypique [1,45,48]**

Les techniques d'amplification génique sont basées sur la détection de l'ADN des mycobactéries. L'appartenance au « complexe *tuberculosis* » peut être déterminée à l'aide de sondes nucléiques applicables directement sur le culot de centrifugation du produit pathologique mais ne permettent pas de différencier les espèces *M. tuberculosis*, *M. bovis* et *M. africanum*. L'étape cruciale consiste en l'extraction de l'ADN des mycobactéries. Plusieurs trousseaux d'extraction sont commercialisés. Elles font appel à des procédés chimiques ou physiques permettant une désorganisation de la paroi. L'amplification génique a pour but d'augmenter le nombre de copies d'un fragment d'acide nucléique pour en permettre la détection. La méthode originale avait pour cible la séquence d'insertion IS6110 spécifique du « complexe *tuberculosis* ». Depuis, des kits commerciaux permettant l'amplification de séquences d'ADN ou d'ARN spécifiques sont disponibles, y compris pour les mycobactéries atypiques. Cependant, quelle que soit la méthode employée, la sensibilité reste inférieure à celle de la culture. Elle atteint 95-100% lorsque l'examen microscopique est positif, mais n'est en revanche que de 50-70% pour les prélèvements respiratoires lorsque l'examen microscopique est négatif voire < 10% pour le LCR. Pour être reproductible, le prélèvement doit contenir entre 20 et 40 bacilles/mL. Sa spécificité est en revanche excellente, proche de 100%. Le principal risque reste une contamination inter-échantillons.

- Techniques utilisables sur prélèvement

- AMPLIFIED MTD® (*Mycobacterium tuberculosis* direct) test (Gen-Probe)

Ce test est basé sur l'amplification du gène de l'ARNr 16S. Il permet la détection du « complexe *tuberculosis* ». La technique utilisée est la TMA (Transcription Mediated Amplification) suivie d'une hybridation des produits amplifiés à des sondes marquées. Ce test est validé pour les prélèvements respiratoires.

- BD ProbeTec™ ET Mycobacterial Assay (Becton Dickinson)

Ce test moléculaire utilise la méthode SDA (Strand Displacement Amplification). Il s'agit d'une technique d'amplification isotherme basée sur le déplacement d'un brin d'ADN. Elle met en jeu deux enzymes : une enzyme de restriction et une ADN polymérase.

- GeneXpert® MTB/RIF (Cepheid)

Ce test de PCR en temps réel sur GeneXpert® System (Cepheid) est basé sur l'amplification d'une région spécifique du « complexe *tuberculosis* » du gène *rpoB*. Une PCR semi-nichée complète cette identification par la détection, à l'aide de sondes, des mutations les plus fréquemment retrouvées chez les souches résistantes à la rifampicine.

- GenoType® Mycobacteria Direct (Hain Lifescience)

Ce test est basé sur les technologies NASBA et DNA-STRIP®. Il permet la détection, à partir d'échantillons respiratoires décontaminés, des espèces *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense* et des mycobactéries du complexe de la tuberculose.

Une extraction de l'ARN par capture à l'aide de billes magnétiques est suivie d'une amplification par la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification). Une hybridation inverse des amplicons aux sondes ADN immobilisées sur bandelette permet l'identification de l'espèce.

- GenoQuick® MTB (Hain Lifescience)

Ce test est arrivé sur le marché en 2010. Il permet de détecter les souches appartenant au complexe de la tuberculose sur les prélèvements respiratoires et les urines. Sa technologie repose sur l'amplification et la détection d'une région spécifique hautement conservée du « complexe *tuberculosis* ». Cette cible n'est pas spécifiée par le fabricant. L'amplicon

s'hybride ensuite avec une sonde spécifique. L'hybride établit une liaison avec de l'or colloïdal puis migre le long d'une bandelette jusqu'à son site de liaison spécifique.

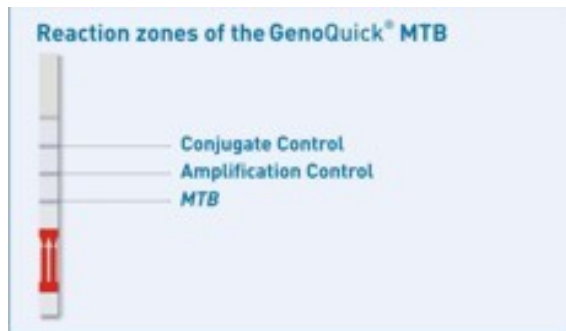


Figure 13 – Bandelette GenoQuick® MTB permettant l'identification du « complexe *tuberculosis* ».

○ Identification du « complexe *tuberculosis* » à partir de la culture

La première étape est de vérifier l'appartenance au genre *Mycobacterium* sur frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen. La morphologie des BAAR constitue une aide diagnostique (un aspect « en corde » est caractéristique des bacilles tuberculeux).

▪ Techniques d'hybridation moléculaire

• Accuprobe® Culture Identification Tests (Gen-Probe)

Des sondes d'ADN complémentaires de l'ARNr 16S marquées sont mises en présence du lysat de culture. L'hybridation est détectée par chimiluminescence à l'aide d'un luminomètre. La sensibilité et la spécificité sont proches de 100%. Bien que permettant l'identification du « complexe *tuberculosis* », la fonction principale de ce test est d'identifier les souches de mycobactéries atypiques.

• INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics)

Ce test permet la détection du genre *Mycobacterium* et l'identification du « complexe *tuberculosis* » en plus de 16 espèces de mycobactéries atypiques. Il est basé sur la détection de variations nucléotidiques sur la région située entre l'ARNr 16S et 23S. Il est principalement utilisé pour l'identification de mycobactéries atypiques.

○ Différenciation des espèces du « complexe *tuberculosis* » à partir de la culture

▪ GénoType® MTBC (Hain Lifescience)

Ce test est basé sur la détection du polymorphisme du gène *gyrB*. Il repose sur la technologie DNA-STRIP®. Après amplification multiplex à l'aide d'amorces biotinylées, une hybridation des amplicons simples brins aux sondes pré-immobilisées sur la membrane permet l'identification de l'espèce.

• Détection antigénique du « complexe *tuberculosis* » sur culture

Deux tests sont actuellement commercialisés en France pour la détection par immunochromatographie de la protéine MPT64 : SD BIOLINE TB Ag MPT64 (distribué par Eurobio) et BD MGIT™ TBc ID Test (Becton Dickinson). La protéine MPT64, sécrétée dans le milieu de culture, est spécifique du « complexe *tuberculosis* ». Ces tests rapides permettent d'obtenir un résultat en 15 minutes.

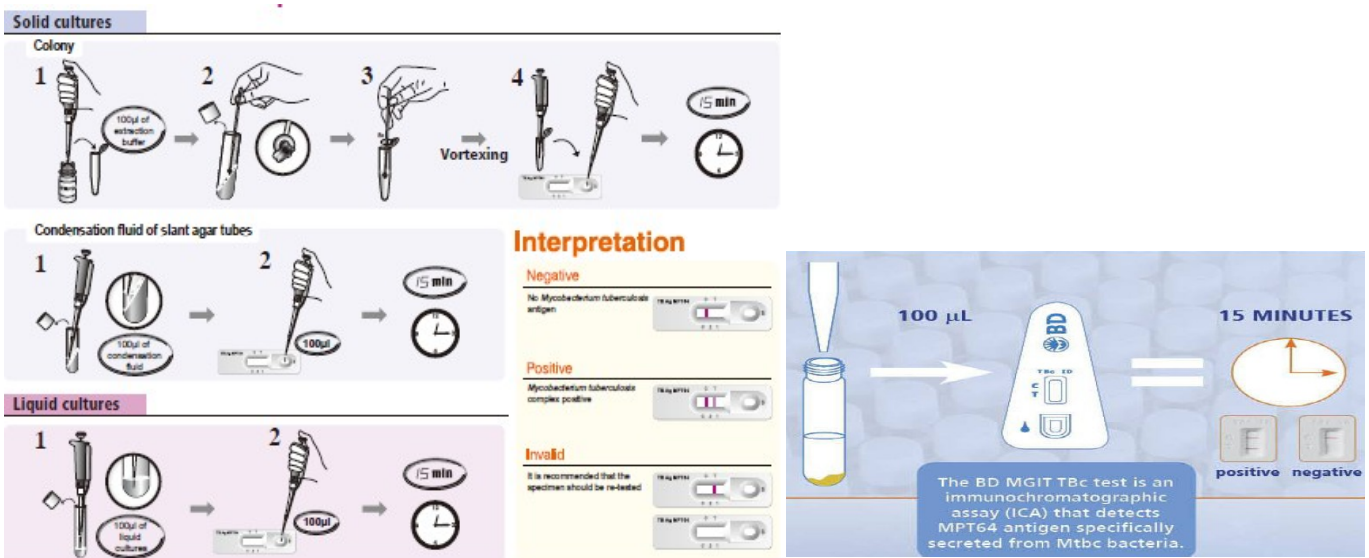


Figure 14 – Réalisation et interprétation des tests SD BIOLINE TB Ag MPT64 (à gauche) et BD MGIT™ TBc ID Test (à droite).

- Tests phénotypiques

Ils participent à la confirmation de l'identification de l'espèce réalisée à partir de la culture en milieu liquide en raison de sa rapidité par rapport au milieu solide.

Plusieurs caractéristiques peuvent être étudiées :

- Morphologie des colonies et délai de croissance ;
- Production de niacine ;
- Sensibilité ou résistance au TCH (acide 2-thiphène carboxylique) à 2 mg/L sur milieu Löwenstein-Jensen ;
- Croissance en présence de 30 mg/mL de D-Cyclosérine sur milieu Löwenstein-Jensen.

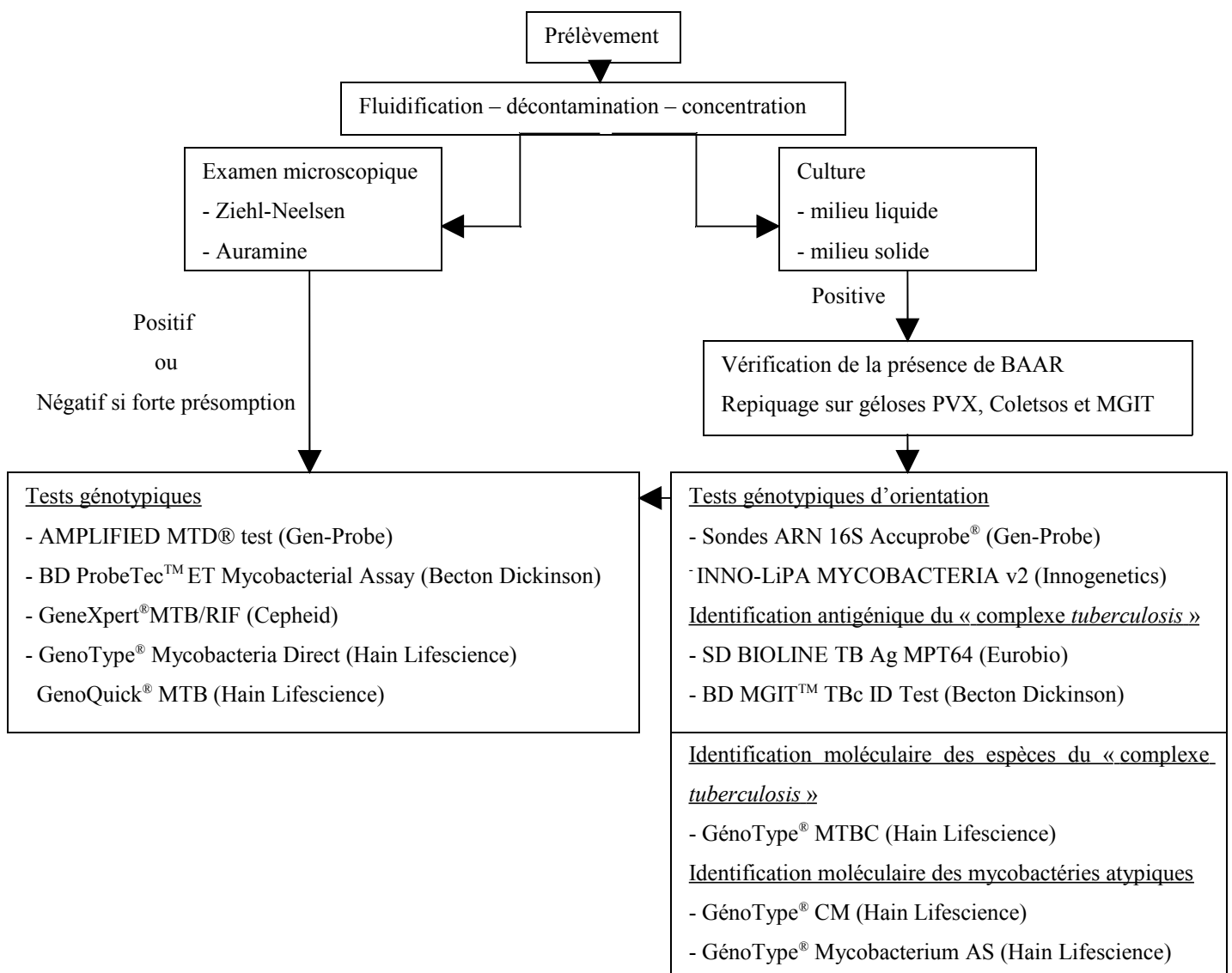


Figure 15 – Principales étapes du diagnostic d'infection à mycobactéries.

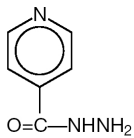
## 1.7 Traitements antituberculeux

Les objectifs de traitement sont doubles. Il s'agit d'une part de permettre la guérison ou d'éviter la progression d'une infection latente en maladie ; et d'autre part, d'éviter la diffusion de la mycobactérie dans la population.

### 1.7.1 Molécules utilisables

- Les antituberculeux de première ligne

- Isoniazide INH



Ce médicament est largement utilisé en thérapeutique antituberculeuse depuis la découverte de son activité en 1952. Il s'agit d'un dérivé de l'acide isonicotinique : l'isonicotinyl hydrazine.

Cet antituberculeux majeur est bactéricide avec une bonne pénétration intracellulaire et une excellente biodisponibilité. La posologie chez l'adulte est de 5 mg/kg/jour, elle est portée à 10 mg/kg/jour chez l'enfant et à 15 mg/kg/jour chez le nourrisson [53]. Son mécanisme d'action réside en l'inhibition de la synthèse de l'acide mycolique : constituant majeur de la paroi mycobactérienne. Pour être efficace, l'INH doit être métabolisé par une enzyme retrouvée chez la mycobactérie : une catalase-peroxydase KatG, codée par le gène *katG*. Ce métabolisme génère un radical isonicotinoyl qui se lie de façon non-enzymatique aux coenzymes  $\text{NAD}^+$  et  $\text{NADP}^+$  de la cellule. Les dérivés actifs : INH-NAD et INH-NADP ont ensuite la capacité d'inhiber l'énoyl acyl carrier protein (ACP) réductase InhA, codée par le gène *inhA*, en formant un complexe InhA-INH-NAD<sup>+</sup> et InhA-INH-NADP<sup>+</sup> [51]. Le radical actif peut également inhiber la dihydrofolate réductase (DHFR) entre autres protéines [52]. L'impact exact de l'INH sur la cellule n'a pas encore été clairement établi.

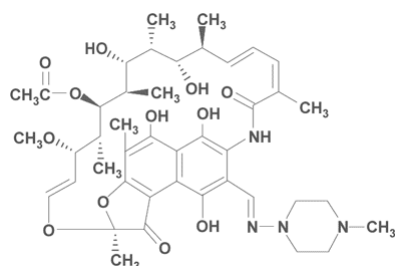
Le métabolisme de l'INH est hépatique avec formation d'un dérivé acétylé responsable de son hépatotoxicité. Cet effet indésirable est favorisée par l'association à la rifampicine (RMP) et au pyrazinamide (PZA). Des cas de neuropathies périphériques sont rapportés et liés à une carence en pyridoxine occasionnée par ce médicament [53].

Cette molécule a une excellente activité bactéricide immédiate. En effet, durant les 2 premiers jours de traitement, 95% de la destruction de l'inoculum mycobactérien lui reviennent [54]. Ce rôle bactéricide est ensuite suppléé par la RMP et le PZA au cours du traitement standard. De toutes les molécules disponibles pour le traitement de la tuberculose, l'INH est celui ayant le plus grand pouvoir stérilisant [54]. En revanche, il n'est pas actif sur les bacilles quiescents. Cette particularité pourrait être expliquée par les modifications du métabolisme de la mycobactérie et de sa structure au cours de la dormance, *a priori* incompatibles avec les modalités de pénétration et d'activation de cet antituberculeux [55].

- Rifamycines

Le mécanisme d'action, commun à toutes les molécules, repose sur l'inhibition de synthèse de l'ARN par liaison à la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase ADN dépendante.

- Rifampicine RMP



Cet antituberculeux est considéré comme une pierre angulaire du traitement standard actuel de la tuberculose maladie. Il s'agit d'une rifamycine également active sur certaines mycobactéries atypiques.

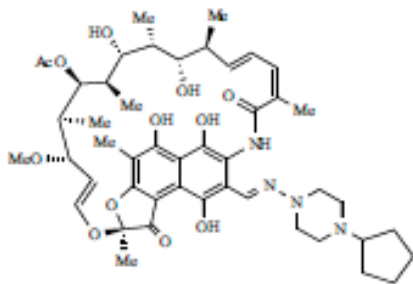
La posologie journalière est fixée à 10 mg/kg et peut être portée à 20 mg/kg chez l'enfant. Il est bactéricide à diffusion intra- et extracellulaire [53]. Après résorption digestive quasiment totale, la RMP subit un métabolisme hépatique avec induction enzymatique (CYP450) et auto-induction impliquant notamment une interaction médicamenteuse avec les antirétroviraux de type anti-protéases et inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase reverse. La pénétration méningée est faible mais acceptable en cas d'inflammation [25].

Les effets indésirables rapportés aux doses habituelles sont surtout digestifs, des manifestations cutanées et une hépatotoxicité sont également rapportés [25,53]. Aux doses plus élevées, un syndrome pseudo-grippal et une hépatotoxicité sont fréquemment rapportés [56]. Les données disponibles issues d'études et de cohortes suggèrent une augmentation de la posologie journalière de la RMP. En effet, une étude concernant l'effet bactéricide précoce indique que la posologie utilisée est juste suffisante pour assurer un effet optimal [57]. Une



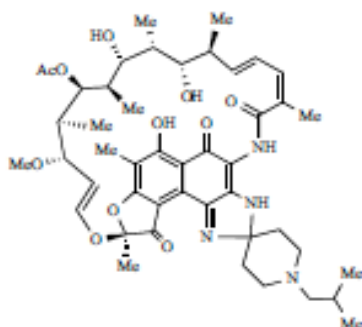
augmentation de 30% de sa posologie permet d'élever le pic sérique de 50% ce qui procure une augmentation de 65% de l'aire sous la courbe, paramètre important pour un antibiotique concentration-dépendant telle que la RMP. Une autre étude réalisée chez la souris a rapporté qu'une augmentation de 50% de la posologie permettrait de réduire d'un tiers le délai du traitement [58].

- Rifapentine RFP



Ayant une demi-vie plus longue que la RMP, elle autorise une prise hebdomadaire [59] ce qui facilite l'observance. En raison du fort taux de résistance aux rifamycines observé chez les patients VIH positifs après traitement par RFP et INH, cette molécule bactéricide doit être réservée au traitement de la tuberculose pulmonaire des patients non-VIH en l'absence de cavitation et après vérification d'un examen microscopique sur crachat négatif (après traitement intensif). Une étude de phase III explore son intérêt dans le traitement de l'infection tuberculeuse latente [56].

- Rifabutine RFB

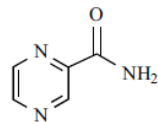


Cet antibiotique bactériostatique est actif sur *M. tuberculosis* et sur certaines mycobactéries atypiques. Après résorption digestive rapide, il diffuse largement dans l'organisme à l'exception des méninges. Son métabolisme hépatique implique également une interaction avec les anti-protéases mais qui est moindre devant celle de la RMP.

Le CDC la recommande aux Etats-Unis dans la quadrithérapie de l'infection non compliquée chez le sujet VIH positif. Sa demi-vie est longue et autorise une prise bihebdomadaire [59].

Cet antituberculeux est avant tout utilisé en France dans la prévention et le traitement des infections disséminées dues au complexe aviaire [56].

○ Pyrazinamide PZA



Cet antituberculeux est remarquable par son histoire. En effet, en 1945, Chorine a d'abord découvert que le nicotinamide avait une activité inhibitrice sur *M. tuberculosis*. En 1952, des études ont démontré que le PZA était l'analogue synthétique du nicotinamide ayant la plus grande activité sur un modèle murin de tuberculose. Les tests, effectués d'emblée *in vivo* chez la souris, ont pu démontrer son efficacité. Le PZA a ensuite été testé chez l'homme dans le traitement de la tuberculose et a prouvé son efficacité. Ce n'est que par la suite que des équipes se sont rendu compte que cette molécule n'était pas active *in vitro* sur *M. tuberculosis* dans les conditions habituelles de culture. Le passage d'emblée à l'étude *in vivo* chez la souris a probablement permis la conservation de cet antibiotique dans la thérapeutique antituberculeuse. Pour être actif sur *M. tuberculosis*, le PZA a besoin d'un pH acide. Cette condition est retrouvée au cours de l'inflammation puisque les cellules effectrices produisent de l'acide lactique. Il a ensuite été découvert que le PZA était la pro-drogue de l'acide pyrazinoïque (POA), son métabolite actif, et que sa métabolisation était sous la dépendance d'une amidase [60].

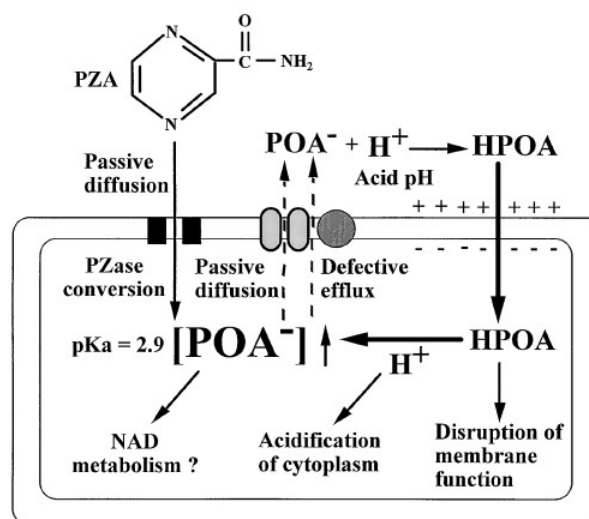


Figure 16 – Mode d'action du PZA [60].

POA : acide pyrazinoïque ; HPOA : forme protonée de POA ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide.

Son mécanisme d'action a été récemment découvert [60]. Le PZA pénètrent dans le bacille par diffusion passive, un transport actif a également été évoqué. Il est ensuite métabolisé par la pyrazinamidase (PZase), codée par le gène *pncA*, en POA dans le cytoplasme du bacille (pH neutre) et n'a alors aucune activité antibactérienne. Ce métabolite actif est un acide faible. Le POA issu de la métabolisation hépatique peut également pénétrer dans le bacille mais faiblement à pH neutre. La PZase n'est autre que la nicotinamidase (enzyme ubiquitaire) qui par homologie structurale est capable de métaboliser le PZA. Le POA métabolisé *in situ* sort ensuite de la cellule par diffusion passive. Un mécanisme d'efflux actif a été décrit chez certaines espèces de mycobactéries mais n'a pas été retrouvé chez *M. tuberculosis* à ce jour. Si le pH extracellulaire est acide, le POA capte un proton conduisant à une forme protonée HPOA non chargée dont le transport à travers la membrane est facilité. A l'intérieur du bacille, le HPOA interfère avec le potentiel membranaire du bacille et, en perdant son proton (acide faible, cytoplasme à pH neutre) devient responsable de l'acidification du cytoplasme et donc de l'inactivation des enzymes vitales. Enfin, le POA pourrait interférer avec le métabolisme du NAD. Ces effets aboutissent à la lyse bactérienne : le PZA est bactéricide. Cette théorie explique le rôle important d'un environnement acide pour l'activité de cet antituberculeux.

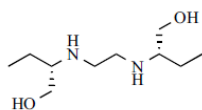
Parmi les facteurs capables d'affecter son activité, le pH est de loin le plus important [60]. En effet, à pH 5,5 la CMI du PZA retrouvée est 50 mg/L, à pH 5,8 elle est de 100 mg/L et à pH 6,1 de 200 mg/L. Ainsi, tout paramètre capable de remonter la valeur du pH, comme un inoculum trop important et l'albumine sérique bovine, diminue son efficacité. L'accumulation du POA en position intracellulaire est favorisée par un environnement acide. A pH neutre ou alcalin, ce métabolite actif est plus volontiers retrouvé à l'extérieur de la mycobactérie.

Les inhibiteurs du métabolisme énergétique tels que le N, N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) et l'azide de sodium exaltent l'activité des acides faibles en général et donc celle du POA sous condition d'aérobiose et également sous condition d'anaérobiose chez *M. tuberculosis* [61]. La synergie retrouvée tient d'une part à la capacité des acides faibles à transporter et libérer des protons dans les bacilles ce qui induit une accumulation d'anions et une rupture du maintien du potentiel membranaire, et d'autre part, à la capacité du DCCD et de l'azide de sodium à empêcher la restauration du potentiel de membrane. Cette synergie

n'est observée que chez *M. tuberculosis* et est donc attribuée à un mécanisme d'efflux moindre et à l'absence d'un maintien efficace du potentiel membranaire [61,62].

Pour revenir à ses propriétés, son activité antituberculeuse bactéricide n'est assurée qu'à l'encontre de *M. tuberculosis*, *M. africanum* et *M. microti*. Le PZA doit toujours être associé aux autres antituberculeux majeurs et son utilisation n'intervient que durant la phase initiale du traitement (2 mois) à la posologie 30 mg/kg/jour chez l'adulte et 20 mg/kg/jour chez l'enfant [53]. *M. bovis* est naturellement résistant par mutation sur le gène *pncA* (169C>G). Bien que la nicotinamidase soit ubiquitaire et présente chez les autres procaryotes, le PZA n'a pas d'activité sur les autres bactéries. Son activité bactéricide à l'encontre des bacilles quiescents est certaine, cependant son activité est moins importante à l'encontre des bacilles à croissance rapide. A pH 5,5, la CMI de *M. tuberculosis* est comprise entre 6,25 et 50 mg/L [60]. Il présente une absorption presque complète et une bonne diffusion tissulaire avec pénétration intracellulaire y compris dans le LCR avec une biodistribution supérieure à celle de l'INH et de la RMP [63]. Sa métabolisation hépatique le transforme en métabolite actif [53], le POA, bien que plusieurs études rapportent des CMI très élevées du POA chez *M. tuberculosis* [64,65]. Les effets indésirables retrouvés sont une hépatotoxicité dose-dépendante, des arthralgies et des troubles digestifs [53]. Une étude récente menée *in vitro* et portant sur les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques du PZA est en faveur d'une augmentation de la posologie quotidienne afin d'optimiser son efficacité [66].

○ Ethambutol EMB

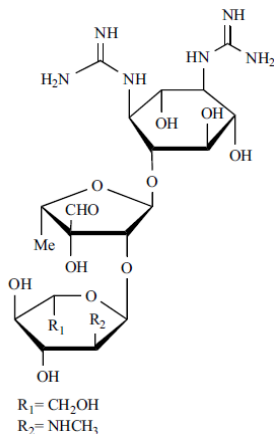


Cette molécule fait partie du traitement standard de la tuberculose bien qu'ayant seulement une activité bactériostatique. Son mécanisme d'action n'a pas été entièrement élucidé, on sait cependant que cette molécule est capable d'inhiber l'arabinosyl transférase empêchant ainsi la synthèse de l'arabinogalactane, constituant de la paroi, et entraînant l'accumulation d'acide mycolique. La synthèse de l'arabinosyl transférase est sous la dépendance de l'opéron *emb* dont les trois gènes sont *embA*, *embC* et *embB*. Le locus *emb* est considéré comme étant la cible de l'EMB [67].

La diffusion tissulaire est excellente mais l'EMB diffuse mal dans le LCR y compris au cours des méningites. L'EMB doit toujours être associé aux autres antituberculeux majeurs et son

utilisation n'intervient que durant la phase initiale du traitement (2 mois) à la posologie 15-20 mg/kg/jour chez l'adulte, 25-30 mg/kg/jour chez l'enfant et 30-40 mg/kg/jour chez le nourrisson. Les effets indésirables occasionnés sont oculaires (risque de névrite optique rétrobulbaire après 2-3 mois de traitement) et digestifs [53].

○ Streptomycine SM



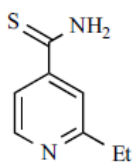
Cet antibiotique bactéricide de la famille des aminosides a été le premier antituberculeux actif sur *M. tuberculosis*. Découvert par S.A. Waksman, cette molécule est utilisée dans le traitement de la tuberculose depuis 1944. Dès le début de son utilisation, des résistances par sélection de mutants résistants ont été observées et ont orientées vers une polychimiothérapie [68].

Son mécanisme d'action est semblable à celui des autres aminosides.

La voie d'administration est intra-musculaire à la posologie de 15 mg/kg/jour chez l'adulte et 20-40 mg/kg/jour chez l'enfant [53].

• Les antituberculeux de seconde ligne

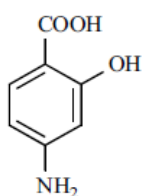
○ Ethionamide



De structure similaire à celle de l'INH, cet antibiotique bactéricide semble avoir le même mécanisme d'action (inhibition de l'énoyl ACP réductase InhA). Son activité est restreinte au « complexe *tuberculosis* » [69].

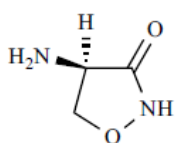
Cet antituberculeux est réservé au traitement des souches MDR. Les effets indésirables les plus fréquemment retrouvés sont des troubles digestifs, une hépatotoxicité, un goût métallique et des réactions cutanées [16].

○ Acide para-aminosalicylique PAS



Son activité bactériostatique à l'encontre du « complexe *tuberculosis* » relève de l'inhibition de la synthèse de l'acide folique [69]. Il est utilisé dans le traitement des tuberculoses multi-résistantes. Les effets indésirables les plus fréquents sont des troubles digestifs, une éruption cutanée et un prurit [16]. Des cas d'hépatotoxicité ont été rapportés.

○ D-cyclosérine

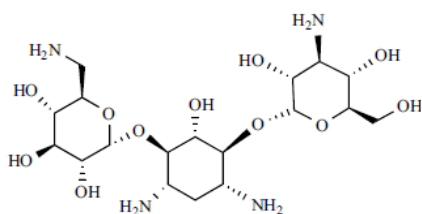


Cet antituberculeux bactériostatique inhibe la synthèse de la paroi. Il est actif sur la plupart des espèces de mycobactéries [69]. Il peut être utilisé dans le traitement des tuberculoses multi-résistantes. Des troubles neuropsychiques et des crises convulsives sont fréquemment rapportés au cours de son utilisation [16].

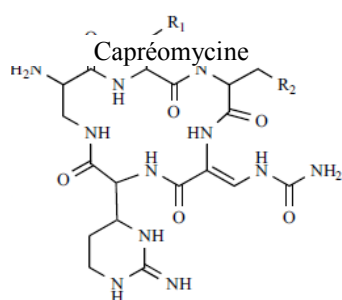
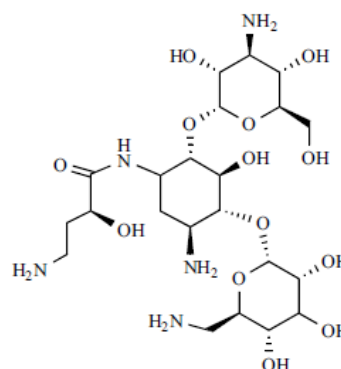
○ Aminosides et apparentés

Leur mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la synthèse protéique par fixation à l'ARNr 16S, constituant de la sous-unité 30S. Les protéines anormales synthétisées entraînent une perte de l'intégrité membranaire expliquant l'activité bactéricide de ces antibiotiques [69]. Etant donné leur très faible résorption digestive, leur utilisation impose la voie parentérale. Les effets indésirables sont une toxicité cochléovestibulaire favorisée par les doses élevées et les traitements prolongés, et une toxicité rénale réversible [53].

Kanamycine



Amikacine



R<sub>1</sub> = H, OH  
R<sub>2</sub> = NH<sub>2</sub>, β-Lys

Elle présente des similarités avec les aminosides.

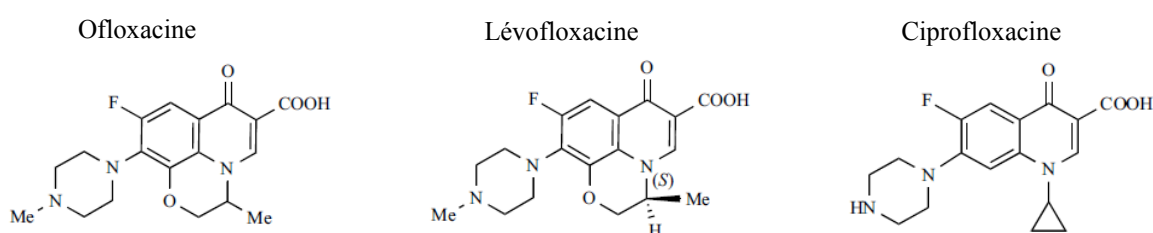
Son mécanisme d'action relève de sa liaison aux sous-unités 30S et 50S interférant ainsi avec la synthèse protéique [69].

Elle ne peut être administrée que par voie parentérale.

### ○ Fluoroquinolones

Leur mécanisme d'action commun consiste en l'inhibition des topo-isomérases. Ces enzymes sont impliquées dans la régulation du surenroulement de l'hélice d'ADN et dans le bon déroulement de la réplication. Parmi elles, l'ADN gyrase (topo-isomérase II), composée de deux sous-unités A et de deux sous-unités B, et la topo-isomérase IV sont les cibles privilégiées de ces antibiotiques. L'ADN gyrase permet de couper le double-brin d'ADN afin d'initier la réplication. Cette coupure est normalement transitoire mais la quinolone forme un complexe irréversible avec l'ADN et la gyrase empêchant ainsi la réparation de l'ADN. Les sous-unités A et B sont codées par les gènes *gyrA* et *gyrB* [69]. Concernant la topo-isomérase IV, il n'y a pas de preuve à l'heure actuelle de la présence d'homologues des gènes *parC* et *parE* chez *M. tuberculosis* [70].

#### ▪ Fluoroquinolones à activité antituberculeuse

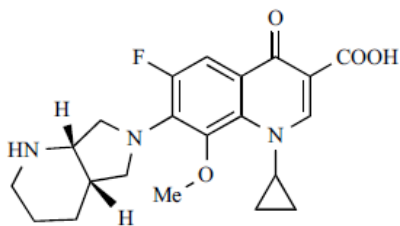


Ces fluoroquinolones sont déjà utilisées en thérapeutique et ont pu prouver leur efficacité au cours de tuberculoses pulmonaires multi-résistantes.

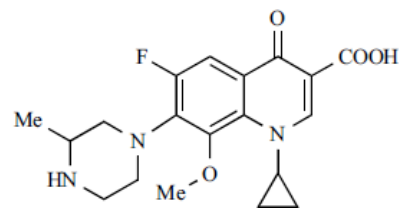
- Nouvelles fluoroquinolones antituberculeuses : moxifloxacin et gatifloxacin

Elles présentent une bonne distribution et une activité à l'encontre des mycobactéries à localisation intracellulaire. Ces 8-méthoxy fluoroquinolones sont les molécules candidates de part leur faible CMI et leur activité bactéricide immédiate. Elles sont en cours d'évaluation dans des essais cliniques visant à raccourcir la durée du traitement de la tuberculose [56].

Moxifloxacinine



Gatifloxacinine



○ Autres antituberculeux à l'étude [56,59]

Les caractéristiques idéales recherchées lors du développement des nouvelles molécules antituberculeuses sont une bonne résorption digestive autorisant la voie orale, une longue durée d'action pour améliorer la compliance et un faible coût de production autorisant son utilisation dans les pays en développement. Une activité bactéricide est recherchée, y compris sur les bacilles quiescents, par un mécanisme d'action différent pour éviter une résistance croisée avec les antituberculeux actuels. La molécule idéale doit être active sur les souches résistantes avec une grande zone d'efficacité thérapeutique, ne pas avoir d'effet antagoniste sur les traitements actuels mais, au contraire, rechercher un effet de synergie. Enfin, étant donné le grand nombre de patients VIH positifs atteints de tuberculose, il faut privilégier les molécules sans interaction avec les antirétroviraux .

▪ Oxazolidinones : linézolide LZD et PNU-100480 [59]

Le LZD agit par inhibition de la synthèse protéique par liaison à la sous-unité 50S ribosomal empêchant la formation du complexe d'initiation. Son activité antituberculeuse *in vitro* est excellente et ses propriétés pharmacocinétiques favorables. Son utilisation est cependant limitée du fait de ses effets secondaires et de son coût. Sa posologie et sa durée d'utilisation



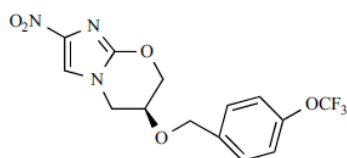
restent à définir. Ce médicament, en 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> ligne, est tout à fait légitime dans les cas de tuberculoses multi-résistantes en raison de son efficacité, de l'absence de réaction croisée avec les autres thérapeutiques antituberculeuses et de la quasi absence d'interaction médicamenteuse.

Le PNU-100480 semble plus efficace que le LZD avec une meilleure pharmacocinétique.

Ces deux oxazolidinones sont en phase d'essais et leur utilisation devrait être limitée aux cas de tuberculoses multi-résistantes du fait de leurs effets secondaires importants.

- Dérivés nitroimidazolés [56,59]

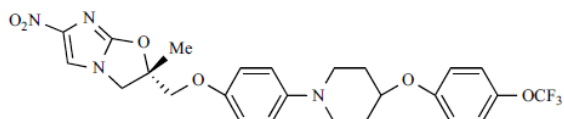
- PA-824



Cette molécule est une nitroimidazo-oxazine. A la différence du métronidazole, sa structure bicyclique imidazopyrane la rend active sur les populations aérobies et anaérobies de *M. tuberculosis*. Ce médicament est issu de la recherche sur les chimiothérapies anticancéreuses.

Son mécanisme d'action est unique. Il s'agit d'une pro-drogue activée par une bioréduction qui est catalysée par l'association d'un cofacteur (F240) et d'une protéine bacillaire (la Rv 3547). Le métabolite actif est capable d'inhiber la synthèse des acides mycoliques. Son activité *in vitro* sur les souches sensibles et MDR est bonne et son pouvoir stérilisant a pu être démontré *in vitro* et *in vivo*. Aucune résistance croisée n'a jusqu'alors été observée. Ce médicament est bien toléré et semble intéressant en association. Une interrogation persiste quant au risque de mutagénicité.

- OPC-67683



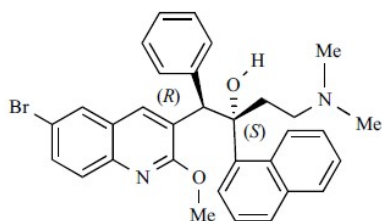
Cette molécule serait 10 à 20 fois plus efficace que le PA-824. Elle présente un potentiel bactéricide aux basses concentrations et une activité excellente à l'encontre des souches de *M. tuberculosis* sensibles et résistantes.

Son activité intracellulaire et stérilisante semblent supérieures à celles de l'INH et du PA-824.

Le mécanisme d'action fait intervenir l'inhibition de synthèse des acides mycoliques. Aucune

résistance croisée avec les antituberculeux de 1<sup>ère</sup> ligne n'a été observée. Il ne présente pas de risque de mutagenicité. Ce nouvel antituberculeux semble prometteur.

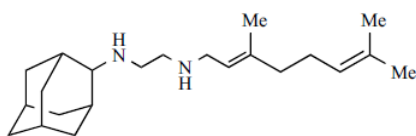
- Diarylquinoline : TMC207 [56,59]



Une seule diarylquinoline est actuellement en cours d'essai : la TMC207. Sa structure diffère des quinolones et des quinolines par sa chaîne latérale en 3'.

Son mode d'action est également unique. Cette molécule est capable d'inhiber l'ATP synthétase (sous-unité *atpE*) entraînant une déplétion des réserves en ATP de la mycobactérie y compris chez les formes quiescentes. Il n'existe pas de résistance croisée avec les autres antituberculeux. *In vitro*, cette molécule a démontré une activité sur les souches sensibles et résistantes de *M. tuberculosis* et plusieurs études sont en faveur d'une activité stérilisante. Elle présente une très bonne pharmacocinétique avec toutefois un métabolisme hépatique faisant intervenir le CYP450.

- Diamine : SQ109 (1,2 éthylène diamine) [56,59]

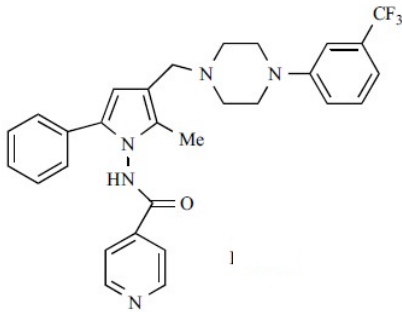


Il s'agit d'un dérivé de l'EMB. Son mécanisme d'action relève d'une inhibition de synthèse de la paroi mais sa cible est inconnue à ce jour. Il s'agirait d'une pro-drogue dont la métabolisation impliquerait les cytochromes bactériens.

Son spectre d'action est étroit : *M. tuberculosis* (y compris les souches résistantes à l'EMB) et *M. bovis*. *In vivo*, la bactéricidie est rapide et supérieure à celle de l'EMB. Sa

pharmacocinétique n'est pas favorable puisque sa biodisponibilité est faible par voie orale et son métabolisme hépatique fait intervenir le CYP450. Son pouvoir stérilisant reste à définir.

- Pyrrole : LL3858 [56,59]



Le LL3858 est le moins toxique et le plus actif des dérivés pyrrolés. Son mécanisme d'action reste inconnu. Il est actif sur les souches sensibles et résistantes de *M. tuberculosis*, présente une activité à l'encontre des mycobactéries atypiques et des champignons. Il est actuellement en phase 1 d'essai clinique.

D'autres molécules sont actuellement en cours d'évaluations précliniques chez *M. tuberculosis* [59]. Il s'agit de la dipipéridine SQ609 active sur *M. tuberculosis* par inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, du SQ641 inhibiteur de la translocase I intervenant dans la synthèse de la paroi cellulaire, du synthetase inhibitor FAS20013 dont le mécanisme d'action fait intervenir la synthèse de la paroi cellulaire et le métabolisme énergétique. Au stade de la recherche, on trouve les nitrofuranylammides et la phytothérapie (antituberculeux polyynes issus des racines de *Angelica sinensis*).

### 1.7.2 Modalités thérapeutiques

- **Traitement de la primo-infection tuberculeuse symptomatique**

Toute primo-infection symptomatique avec signes généraux et/ou radiologiques doit bénéficier d'un traitement curatif de tuberculose maladie. Seules les formes asymptomatiques peuvent être traitées comme des infections latentes.

- **Traitement de l'infection tuberculeuse latente**

- Indications au traitement [71]

D'après la Société de Pneumologie de Langue Française, le traitement de l'infection tuberculeuse latente doit intéresser :

- En traitement prophylactique, tout enfant de moins de 2 ans et tout sujet immunodéprimé ou porteur d'une maladie chronique ayant été exposé à un cas de

tuberculose pulmonaire, même en l'absence de critères initiaux d'infection tuberculeuse ;

- Tout sujet exposé dans les cas suivants :
  - Enfant de moins de 18 ans immunocompétent avec une IDR  $\geq 15$  mm ;
  - Enfant de moins de 18 ans immunocompétent vacciné par le BCG avec une IDR comprise entre 10 et 15 mm dans une situation à fort risque ;
  - Enfant immunocompétent non vacciné avec une IDR  $\geq 10$  mm voire  $\geq 5$  mm dans une situation à fort risque de contamination ;
  - Adulte immunocompétent (en dehors du vieillard) et migrants arrivés en France depuis moins de 2 ans en provenance d'un pays à forte prévalence avec une IDR  $\geq 15$  mm quelles que soient les circonstances, ou avec une IDR  $\geq 10$  mm dans les situations à très haut risque ou lorsqu'il y a certitude d'une infection récente.

Il n'y a pas d'indication au traitement de la tuberculose latente :

- Chez le sujet de plus de 80 ans ;
- Chez l'adulte immunocompétent sur le simple fait d'une IDR positive même si elle est  $\geq 15$  mm en dehors de l'exposition à un risque ou d'une immigration récente.

Le traitement préventif du sujet VIH positif intervient :

- Si exposition à la mycobactérie ;
- Si, en dehors de tout contact, il y a découverte d'une IDR  $\geq 5$  mm en l'absence de vaccination ou d'une IDR  $\geq 10$  mm si vaccination par le BCG.

- Possibilités thérapeutiques de l'infection tuberculeuse latente [71]

- En cas de contact avec un bacille *a priori* sensible

- Chez l'enfant, le traitement consiste en l'administration pendant 3 mois d'INH, à 10 mg/kg/jour chez le moins de 2 ans et 5 mg/kg/jour chez le plus de 2 ans, et de RMP à raison de 10 mg/kg/jour ;
- Chez l'adulte, deux recommandations existent : INH à 5 mg/kg/jour pendant 9 mois ou l'association INH à 5 mg/kg/jour et RMP à 10 mg/kg/jour durant 3 mois, cette dernière étant la plus prescrite ;
- Au cours de la grossesse, les recommandations habituelles peuvent être appliquées ;

- Au cours de l'infection VIH ou d'une autre immunodépression, un traitement par INH durant 9 mois est recommandé ;
- En cas de maladie hépatique grave, un traitement par RMP à 10 mg/kg/jour durant 3 mois doit être privilégié ;
- En cas d'insuffisance rénale terminale, les recommandations habituelles s'appliquent.

Les neuropathies périphériques provoquées par l'INH peuvent être prévenues par l'administration de vitamine B6 chez les patients à risque (grossesse, alcoolisme, dénutrition, neuropathie préexistante, insuffisance rénale, infection par le VIH).

Ces modalités thérapeutiques sont celles recommandées en France. Des alternatives sont proposées par le CDC en prise quotidienne ou bihebdomadaire plus adaptée à la stratégie des DOTS [25].

- En cas de contact avec un bacille résistant à l'INH

Il n'existe pas de recommandation en raison d'absence de données.

- En cas de contact avec un bacille MDR

Il est recommandé d'attendre l'antibiogramme complet du sujet contact avant d'envisager le traitement.

#### • [Traitement de la tuberculose maladie](#)

Le traitement standard de la tuberculose maladie recommandé en France par la Société de Pneumologie de Langue Française chez l'adulte associe quatre antibiotiques durant la première phase de traitement d'une durée de 2 mois : INH, RMP, PZA et EMB, suivie de 4 mois à base d'INH et de RMP. Malgré l'absence d'études démonstratives, des formes galéniques combinées sont utilisées afin d'améliorer l'observance.

##### ○ Traitement standard

Ce traitement est bien codifié et consiste en l'administration quotidienne par voie orale d'INH à la dose 5 mg/kg/jour et de RMP à la dose de 10 mg/kg/jour. Pendant les deux premiers mois de traitement, y sont ajoutés le PZA à la dose de 20-25 mg/kg/jour et l'EMB à la dose de 15-20 mg/kg/jour [71]. La durée totale du traitement est en général de 6 mois, y compris pour la

plupart des formes extrapulmonaires et chez les immunodéprimés. Chez les sujets VIH positifs, il est possible de remplacer la RMP par la RFB du fait des interactions médicamenteuses occasionnées avec les antirétroviraux. Seules les tuberculoses extrapulmonaires graves ou neuroméningées peuvent justifier d'un allongement de traitement à 9-12 mois [20].

Le recours à la corticothérapie durant le premier mois de traitement est indiqué pour la tuberculose miliaire dans sa forme fulminante avec détresse respiratoire aiguë et coagulation intravasculaire disséminée, pour la pleurésie sévère d'évolution prolongée et pour certaines localisations extrapulmonaires lorsque les lésions continuent d'évoluer sous traitement bien conduit. La posologie recommandée est 0,5-1 mg/kg/j d'équivalent prednisone [16].

- Cas particuliers [71]

Le traitement de la tuberculose multi-résistante doit avoir recours à des antituberculeux de 2<sup>ème</sup> ligne et la durée du traitement dans ce cas doit être prolongée. Chez ces patients, il est recommandé de ne jamais ajouter isolément un antituberculeux, de veiller à ce que le malade n'ait jamais moins de 3 médicaments actifs en début du traitement, et de traiter au moins 12 mois après la négativation des cultures. En cas de suspicion d'infection à bacille MDR et si la situation le permet, il est préférable d'attendre les résultats de l'antibiogramme, sinon le traitement doit comprendre 3 à 6 molécules n'ayant encore jamais été utilisées chez le patient. En cas de résistance confirmée à l'INH dans les formes peu bacillifères, la seconde phase consistera en 7 mois d'administration de RMP et d'EMB. Dans les formes bacillifères, il faudra évaluer le risque d'acquisition de résistance et discuter l'ajout d'un nouvel antituberculeux.

En cas de résistance naturelle au PZA (*M. bovis*), le traitement sans PZA sera poursuivi durant 9 mois.

Le traitement de la tuberculose maladie chez la femme enceinte doit être impératif. La RMP est impliquée dans un risque hémorragique maternel et néonatal en fin de grossesse qui peut être évité par administration de vitamine K. La prescription d'INH doit être accompagné de vitamine B6. Les aminosides sont contre-indiqués en raison d'un risque de toxicité cochléo-vestibulaire pour l'enfant et le PZA ne peut pas être utilisé en raison d'absence d'études. Les fluoroquinolones sont contre-indiquées.

### 1.7.3 Mécanismes de résistance aux antituberculeux

- **Résistance naturelle**

Les mycobactéries du « complexe *tuberculosis* » et les autres mycobactéries sont naturellement résistantes aux principales familles d'antibiotiques comme les  $\beta$ -lactamines, les macrolides, les cyclines, les sulfamides et les glycopeptides. Les mycobactéries atypiques présentent en plus une résistance naturelle à la plupart des antituberculeux actifs sur les mycobactéries de la tuberculose tels que l'INH, le PZA, l'EMB et le PAS [68].

L'imperméabilité naturelle est en majeure partie liée à la composition de leur paroi. En effet, elle est très dense et très riche en lipides tels que les acides mycoliques. La multi-résistance naturelle chez *M. tuberculosis* est également le fait d'une grande production d'enzymes telles que les  $\beta$ -lactamases de classe A (activité pénicillinase) et d'aminoglycosyl acétyltransférases (modifiant les aminosides) [68].

*M. bovis* et la souche BCG sont des espèces naturellement résistantes au PZA par mutation sur le gène *pncA* en position nucléotidique 169 (169C>G).

- Avancée sur les connaissances de la résistance aux  $\beta$ -lactamines

Les  $\beta$ -lactamines n'ont jamais été utilisées dans le traitement de la tuberculose du fait de leur résistance naturelle. La  $\beta$ -lactamase présente chez *M. tuberculosis* est une Ambler class A  $\beta$ -lactamase BlaC. Cette enzyme est une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) capable d'hydrolyser toutes les classes de  $\beta$ -lactamines. Elle confère un haut niveau de résistance aux pénicillines et aux céphalosporines. Son affinité pour les carbapénèmes est plus faible [72]. Il a récemment été découvert que cette BlaC pouvait être inhibée de façon irréversible par l'acide clavulanique ce qui a laissé penser que cet inhibiteur de  $\beta$ -lactamase pouvait permettre de restaurer l'activité des  $\beta$ -lactamines chez *M. tuberculosis*. Une étude a été conduite sur des souches de *M. tuberculosis* pour évaluer l'efficacité de différentes associations de l'acide clavulanique avec une  $\beta$ -lactamine [73]. Il en ressort une variation de réponse entre les souches vis-à-vis des pénicillines et des céphalosporines. L'association méropénème-acide clavulanique est en revanche active sur toutes les souches, le méropénème étant un mauvais substrat pour BlaC. Par ailleurs, il a été démontré que la paroi de *M. tuberculosis* en phase stationnaire était polymérisée par un membre d'une classe d'enzymes particulières : les L,D-transpeptidases [73,74] qui remplacent les PLP (protéines de liaison à la pénicilline). De plus, cette L,D-transpeptidase est surexprimée lors de la dormance. Les équipes ont donc démontré

d'une part, que la combinaison méropénème-acide clavulanique était efficace *in vitro* en aérobiose sur les bacilles en répliation et sur les bacilles en dormance, et, d'autre part, que cette L,D-transpeptidase pourrait être la cible du méropénème [73,74]. Gupta et al. [74] rapportent que la L,D-transpeptidation joue un rôle important dans la virulence des souches et dans la résistance à l'association amoxicilline-acide clavulanique. L'association méropénème-acide clavulanique a été approuvée par la Food and Drug Administration et est actuellement en cours d'essais cliniques pour le traitement de tuberculose à souche XDR [75].

- **Résistance acquise**

La sélection de mutants résistants a pu être observée lors de la première utilisation en monothérapie de chacun des antituberculeux. Les connaissances tenant aux mécanismes de résistance des mycobactéries ont émergé avec le développement d'outils génétiques utilisables chez les mycobactéries. C'est donc à partir des années 1990 qu'ont pu être élucidés les mécanismes de résistance acquise de *M. tuberculosis* à la RMP, à la SM, à l'INH, aux fluoroquinolones, au PZA et à l'EMB.

La résistance acquise chez les mycobactéries est toujours liée à des mutations de gènes chromosomiques et n'est pas transférable d'une souche à l'autre (ni plasmides ni transposons décrits) [68].

En France, la surveillance de la résistance aux antituberculeux de 1<sup>ère</sup> ligne est menée par un réseau de laboratoires hospitalo-universitaires de bactériologie (Groupe AZAY-Mycobactéries).

- Souches multi-résistantes MDR et ultra-résistantes XDR

Pour rappel, une souche MDR se définit par la résistance à l'INH et à la RMP. Une souche XDR correspond à une souche MDR ayant acquis en plus la résistance à un antituberculeux injectable de seconde ligne (amikacine, kanamycine et capréomycine) et à une fluoroquinolone.

Actuellement des souches MDR sont retrouvées chez 1 à 2 millions de patients tuberculeux chaque année. En 2006, environ 489.000, soit 5% des nouveaux cas de tuberculose, étaient dus à une souche MDR. Ce chiffre correspond à une augmentation de 12% par rapport aux données de 2004 et de 56% par rapport à celles de 2000. Empêchant l'utilisation du traitement standard, l'efficacité thérapeutique chez ces patients sous-entend le recours à des



antituberculeux de seconde ligne constituant une barrière dans les pays pauvres. L'OMS s'est donc engagée en 2000 à faciliter l'accès à ces molécules et à en superviser l'utilisation. En effet, ces souches résistantes transmissibles sont responsables de morbi-mortalité excessive. Il a donc été important d'une part de réduire les coûts des antituberculeux de seconde ligne, et d'autre part de promouvoir le développement de nouvelles thérapeutiques [8].

La résistance aux antituberculeux est définie par la croissance *in vitro* de la souche en présence de l'antituberculeux. Des mutations spontanées responsables de cette résistance acquise se produisent de façon aléatoire au cours des cycles de division cellulaire. Les taux varient suivant les molécules, ils sont de  $10^{-10}$  pour la RMP, de  $10^{-8}$  pour l'INH et la SM, de  $10^{-6}$  à  $10^{-8}$  pour les fluoroquinolones, de  $10^{-7}$  pour l'EMB et de  $10^{-3}$  pour le PZA [76]. Au sein d'une caverne tuberculeuse, qui contient  $10^8$ - $10^9$  bacilles, il y a naturellement des bacilles résistants avant tout traitement. Cette résistance apparaît d'autant plus facilement que la molécule est utilisée à mauvais escient. Ce phénomène de résistance acquise a été observé pour la première fois en 1944 après l'introduction de la SM comme antituberculeux [68]. L'association de plusieurs antituberculeux a été instaurée dans le but d'éviter l'apparition de souches résistantes. En effet, cette association diminue le risque de sélectionner un mutant du fait du caractère indépendant des mutations.

- Résistance à l'isoniazide [68,69]

Dès le début de son utilisation, une association entre résistance et perte de l'activité catalasique avait été observée. Ce n'est qu'en 1992 qu'il a été démontré que le gène *katG* restaurait la sensibilité à l'INH chez *M. tuberculosis*. L'étude génétique des souches résistantes a montré des mutations ponctuelles du gène *katG*, en particulier des codons 275 et 315, ainsi que des délétions partielles voire complètes du gène. Ces mutations entraînent une réduction de l'activité catalasique plus ou importante avec résistance. Si le gène porte une délétion, l'activité catalasique est nulle et le niveau de résistance toujours élevé avec des CMI > 10 mg/L. L'activité catalase-peroxydase est indispensable à l'activation de l'INH en métabolite actif. Cependant, les mutations du gène *katG* ne sont retrouvées que dans 50 à 70% des souches résistantes à l'INH. Le gène *inhA* est impliqué chez 10 à 30% des souches résistantes. Dans ce cas, les mutations intéressent le plus souvent des séquences régulatrices et promotrices et parfois la séquence codante du gène (exemple : S94A) et se traduisent par un bas niveau de résistance ( $0,2 < \text{CMI} < 1,0$  mg/L). Ce mécanisme de résistance est croisé avec l'éthionamide. Des mutations ont été observées dans un 3<sup>ème</sup> gène chez environ 15% des

souches résistantes. Il s'agit du gène *ahpC* codant une hydroxyperoxyde réductase dont l'expression est régulée positivement par le gène *oxyR*. Ces deux gènes jouent un rôle important dans la défense bactérienne vis-à-vis du stress oxydatif. Chez *M. tuberculosis*, le gène *oxyR* contient naturellement de nombreuses mutations entraînant un faible niveau d'expression des protéines OxyR et AhpC ce qui expliquerait la bonne sensibilité de cette espèce à l'INH par rapport aux autres mycobactéries. Récemment, un autre gène a été porté candidat, il s'agit de *ndh* codant pour la NADH réductase. D'autres gènes pourraient également jouer un rôle, pour exemple le gène *kasA* codant une  $\beta$ -kétocoacyl ACP réductase. Chez 20% des souches résistantes, aucune mutation n'est retrouvée ce qui témoigne de la complexité de la résistance à l'INH.

- Résistance aux rifamycines

La résistance aux rifamycines chez *M. tuberculosis* est liée à un mécanisme bien connu chez les autres bactéries. Elle résulte de mutations sur le gène *rpoB* codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase. Environ 95% des souches résistantes à la RMP étudiées présentent une mutation sur le gène *rpoB* intéressant une courte région de 81 paires de bases (pb) qui s'étend du codon 507 au codon 533 [56,59]. Ces mutations sont le plus souvent ponctuelles. Les plus fréquentes impliquent le codon sérine 531 (chez 50% des souches de *M. tuberculosis* résistantes) et le codon histidine 526 (chez 30% des souches résistantes). Ces mutations sont associées à un haut niveau de résistance à la RMP (CMI > 64 mg/L). D'autres mutations peuvent être associées à des niveaux de résistance plus bas. Des délétions et des insertions ont également été rapportées. Les mutations entraînent une modification structurale de la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase qui diminue la fixation ou l'accessibilité de la rifamycine à son site [68]. Cette résistance est croisée à toutes les rifamycines. Cependant, les nouvelles rifamycines permettent d'obtenir des CMI 4 à 8 fois plus basses que celle de la RMP pour les souches sensibles de *M. tuberculosis*. De ce fait, environ 30% des souches résistantes à la RMP sont sensibles à la RFB [69].

- Résistance au pyrazinamide

Le PZA n'est actif que sur *M. tuberculosis* et *M. africanum*. *M. bovis* y est naturellement résistant. Son activité nécessite un environnement acide et une enzyme : la PZase qui le transforme par déamination en métabolite actif bactéricide : le POA. Cette enzyme a été

étudiée par Zhang *et al.* [77]. Chez *M. tuberculosis*, elle est monomérique, contient des ions métalliques ( $Mn^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ ) et a une activité enzymatique optimale à pH 7,0 et à 40°C. Dès les années 1970, une association entre perte de l'activité enzymatique et résistance avait été établie. Le gène *pncA* codant pour l'enzyme a été identifié en 1996 [68].

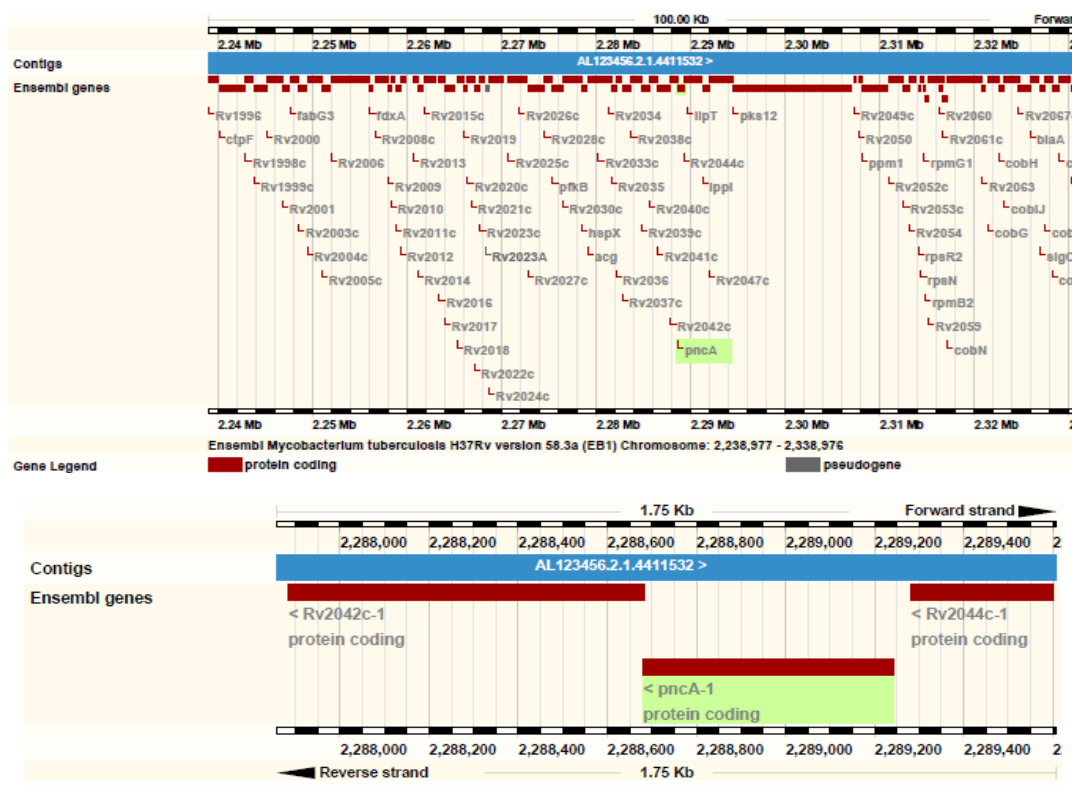


Figure 17 – Positionnement du gène *pncA* sur le chromosome de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [http://bacteria.ensembl.org/Mycobacterium/M\\_tuberculosis\\_H37Rv/Location/View?db=core;g=EBMYCG00000000137;r=Chromosome](http://bacteria.ensembl.org/Mycobacterium/M_tuberculosis_H37Rv/Location/View?db=core;g=EBMYCG00000000137;r=Chromosome)

Les isolats de *M. tuberculosis* résistants au PZA présentent en général une altération de l'activité PZase et il existe une bonne corrélation entre résistance et perte de l'activité enzymatique [60]. La base génétique de cette résistance concerne le gène *pncA*. En effet, une étude a démontré qu'une souche de *M. bovis* BCG naturellement résistante était transformable en souche sensible par clonage du gène *pncA* d'une souche sensible de *M. tuberculosis* [78]. Les mutations du gène *pncA* représentent le mécanisme majeur de résistance (72-98% des isolats résistants selon les études [60]), de nombreuses études l'ont démontré [79-81,78,82-

85]. Les mutations sont très diverses et peuvent survenir sur la totalité du gène ainsi que sur la région que l'on suppose promotrice (juste en amont du gène). Il s'agit essentiellement de substitutions nucléotidiques mais des délétions ou des insertions peuvent survenir. Bien que les mutations puissent intéresser la totalité du gène, une étude menée par Lemaitre et *al.* [86] a démontré que trois régions hautement conservées et probablement impliquées dans l'activité catalytique de la PZase représentaient des localisations privilégiées de mutations. Sur la séquence en acides aminés, ces trois régions correspondent aux positions 3 à 17, 61 à 79 et 132 à 142.

Certaines souches résistantes ne présentent pas de modification de séquence sur le gène *pncA*. Chez ces souches sans activité PZase détectable, il a été envisagé le rôle d'un gène régulateur inconnu [60]. D'autres souches conservent une activité enzymatique avec un niveau de résistance bas. Selon les études, 10 à 30% des souches résistantes ne présentent pas de mutations ce qui suppose l'existence d'autres mécanismes de résistance [68,69]. Une modification ou une absence de cible (non identifiée à ce jour) a été suspectée [84] et une imperméabilité de la paroi au PZA ou au POA a été formulée [87]. Zhang et *al.* ont envisagé une résistance au PZA par mécanisme d'efflux du POA [88,89] bien que les souches sauvages de *M. tuberculosis* ne soient *a priori* pas munies de ce mécanisme. Une pompe à efflux a été mise en évidence chez *M. smegmatis*, *M. kansasii* [56,59] et *M. avium* [90]. En effet, chez *M. avium* et *M. smegmatis*, la résistance au PZA n'est pas liée à une mutation sur le gène *pncA* (activité PZase conservée) mais relève d'un puissant efflux du POA. Ce mécanisme de résistance peut être inhibé par la réserpine, un inhibiteur de pompe à efflux, qui est capable d'accroître l'accumulation de POA chez *M. tuberculosis*. La réserpine a démontré son efficacité sur *M. tuberculosis* H37Ra pour laquelle elle permet d'augmenter sa sensibilité au PZA [56,59].

- Résistance à l'éthambutol

La cible de l'EMB est une arabinosyl transférase impliquée dans la liaison arabinose-galactane. L'arabinogalactane est un constituant majeur de la paroi mycobactérienne. La résistance à cet antituberculeux chez *M. tuberculosis* est liée à des mutations de l'opéron *emb* CAB [69]. Le plus fréquemment, soit dans 70% des cas, ces mutations intéressent le gène *embB* et plus précisément le codon méthionine 306 [67]. Les autres mutations retrouvées concernent les codons 330 et 630 ou sont situées en amont de l'opéron. Enfin, chez 30% des

souches de *M. tuberculosis* résistantes, aucune mutation n'est retrouvée et le niveau de résistance est en général faible (CMI×2-4) [68].

- Résistance à la streptomycine

Elle est liée à une modification de la sous-unité 30S, l'ARNr 16S et la protéine S12 sont les cibles de cet antibiotique. Des mutations ont été mises en évidence sur le gène *rpsL* codant pour la sous-unité 12S du ribosome. Plus de la moitié des souches résistantes présentent une mutation sur ce gène. Chez 21% des souches résistantes, une mutation sur le gène *rrs*, codant pour la sous-unité 16S de l'ARNr, est retrouvée. Chez *M. avium*, la résistance serait plutôt le fait d'une faible perméabilité de la paroi pour cet antibiotique [68].

- Résistance aux aminosides

Les mécanismes de résistance aux aminosides de seconde ligne sont mal connus en raison d'un manque d'étude. Les mêmes mécanismes que ceux rencontrés chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif sont évoqués [91]. En effet, une inactivation enzymatique de l'antibiotique a été retrouvée chez quelques espèces et une imperméabilité est évoquée puisque la paroi est riche en acides mycoliques et donc lipophile. Le mécanisme de modification de la cible a été décrit pour la SM et est évoqué pour ces molécules de seconde ligne.

- Résistance aux fluoroquinolones

La résistance aux quinolones résulte principalement de mutations sur le gène *gyrA* et concernent surtout le « domaine déterminant la résistance aux quinolones » (QRDR) de la sous-unité A [92-94]. Le gène *gyrB* peut également être muté. Les mutations les plus fréquemment retrouvées portent sur les codons 88, 90 et 94 de la sous-unité A et les codons 495, 516 et 533 de la sous-unité B. D'autres mécanismes de résistance peuvent être impliqués comme une imperméabilité, une inactivation de l'antibiotique ou encore un mécanisme d'efflux qui a été démontré chez *M. smegmatis* et évoqué chez *M. tuberculosis* [93,95]).

## 1.8 Méthodes d'étude de la sensibilité aux antituberculeux

### 1.8.1 Méthodes phénotypiques

La réalisation d'un antibiogramme doit être systématique lors de l'isolement initial d'une mycobactérie de la tuberculose. Il doit également être entrepris si une souche est isolée après 3 mois de traitement. Les antituberculeux majeurs doivent être étudiés d'emblée. En cas de rechute ou s'il y a suspicion d'une souche MDR, l'étude de la sensibilité aux antituberculeux de 2<sup>ème</sup> ligne doit être envisagée (centre national de référence).

La culture et donc l'étude de la sensibilité aux antituberculeux des mycobactéries étudiées nécessite des milieux spécifiques en raison de leur croissance lente.

- **Méthode des proportions**

Parmi les méthodes permettant l'étude de la sensibilité aux antituberculeux du « complexe *tuberculosis* », la méthode indirecte des proportions en milieu solide reste la référence [96] mais les méthodes en milieu liquide tendent à la supplanter du fait d'une détection plus rapide et d'une automatisation possible. La méthode en milieu solide reste cependant très utilisée en France.

- Méthodes en milieu solide

La méthode indirecte des proportions correspond à la réalisation de l'antibiogramme à partir des souches isolées de prélèvements. Elle consiste en l'ensemencement d'une quantité connue de bactéries sur des milieux de Löwenstein-Jensen, ou sur milieux Middlebrook 7H10 ou 7H11 dans lesquels l'antibiotique est ajouté avant coagulation ou solidification de l'agar. Pour chaque antibiotique, une gélose témoin (sans antibiotique) est inoculée en parallèle d'une gélose test contenant l'antibiotique à sa « concentration critique ». La numération des colonies apparues sur la gélose témoin permet de déterminer la quantité de bacilles déposés et celle effectuée sur la gélose test permet de déterminer la proportion de bacilles résistants. Cette proportion critique est fixée à 1% pour l'INH, la RMP, l'EMB et la SM et à 10% pour le PZA. Si le pourcentage de bacilles ayant poussé sur le milieu avec antibiotique à la concentration critique est inférieur à la proportion critique, la souche est dite sensible, si elle est supérieure ou égale, elle est alors considérée résistante. Cette méthode permet d'obtenir

des résultats en 14-16 jours pour les souches résistantes. Pour les souches sensibles, le résultat définitif est rendu après 42 jours d'incubation [96].

Une méthode directe à partir du produit pathologique est possible si l'examen microscopique est suffisamment positif. La lecture et l'interprétation sont identiques à celles de la méthode indirecte [96].

Dans un but de standardisation, il est conseillé d'utiliser des milieux commercialisés. La trousse *Mycobacterium tuberculosis* susceptibility test kit (Bio-Rad, France) permet l'étude de la sensibilité à l'INH, la RMP, l'EMB, la SM et le PAS en milieu Löwenstein-Jensen. Ce kit ne permet pas l'étude de la sensibilité au PZA.

- Méthodes en milieu liquide

Au début des années 1980, l'automate Bactec™ 460 TB (Becton Dickinson), qui n'est plus commercialisé à ce jour, avait permis un progrès considérable dans la réduction du délai de culture. Cette méthode radiométrique automatisée en milieu Middlebrook 7H12, applicable à l'étude de la sensibilité aux antituberculeux, avait permis un gain de temps d'environ 2 semaines par rapport au milieu solide pour le rendu des résultats [48,96]. Ses résultats, interprétés par les différences de GI entre le flacon témoin et les flacons tests, étaient comparables à ceux de la méthode des proportions en milieu solide et avait fait de cette technique la méthode de référence en milieu liquide.

Le milieu MGIT™ associant milieu de culture et système de détection de la croissance permet l'isolement des mycobactéries à partir du produit pathologique mais également l'étude de la sensibilité aux antibiotiques [96]. L'antibiogramme est automatisable sur Bactec™ MGIT™ 960 et offre l'avantage de l'absence de manipulation de radioactivité et d'aiguille puisque les tubes peuvent être inoculés à la pipette. La Trousse BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE pour le test de sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux antimycobactériens (Becton Dickinson) permet l'étude de la sensibilité à la SM, à l'INH, la RMP et à l'EMB. L'étude de la sensibilité au PZA est possible avec la trousse BACTEC™ MGIT™ 960 PZA (Becton Dickinson). Ces kits sont basés sur le principe de la méthode des proportions en milieu solide. Ils permettent la comparaison de croissance entre un tube contenant l'antituberculeux et l'autre ne le contenant pas. La résistance de la souche est déterminée par la présence d'une culture dans le tube contenant l'antibiotique. Cette méthode est qualitative.

L'étude phénotypique en milieu liquide permet de raccourcir le délai de réponse par rapport à la méthode en milieu solide. Toutefois, en cas de résultat douteux, il est recommandé de déterminer la proportion exacte de mutants résistants sur milieu solide [48].

- Détermination des CMI [96,97]

Elle peut être déterminée en ensemencant un inoculum défini sur des milieux solides ou liquides contenant l'antituberculeux à différentes concentrations.

Dans un contexte de routine, la détermination des CMI reste exceptionnelle. La méthode du E-Test est disponible pour la RMP, l'EMB, l'INH et la SM. Le milieu de culture utilisé est la gélose Middlebrook 7H11 supplémentée en OADC. L'ensemencement est pratiqué à l'écouvillon et l'incubation réalisée à 37°C en atmosphère enrichie à 10% de CO<sub>2</sub>. Avec l'utilisation d'un inoculum à 3 McFarland, le résultat chez *M. tuberculosis* peut être rendu en 5 à 10 jours. Cependant, cette méthode expose à un risque de contagion du fait des aérosols générés et ne doit pas être préconisée.

- Détection de l'activité enzymatique impliquée dans l'efficacité de l'antituberculeux

- Détection de l'activité PZase pour déterminer la sensibilité au pyrazinamide

La méthode de Wayne [98], qui n'est pas commercialisée, s'applique à l'évaluation de la sensibilité des souches de mycobactéries au PZA par détection de l'activité enzymatique. Il s'agit d'un test colorimétrique en présence de pyruvate de sodium révélé par l'ajout d'une solution de sulfate d'ammonium ferreux à 1%. Ce test ne peut suffire à lui seul étant donné l'existence de souches résistantes conservant une activité enzymatique.

- Méthodes utilisant un indicateur de croissance

- Méthode utilisant un bactériophage spécifique de *M. tuberculosis* [1,96,97]

Cette méthode est du domaine de la recherche. Elle utilise un bactériophage dans lequel le gène de la luciférase des vers lumineux a été préalablement introduit avant infection de la culture. En présence de croissance mycobactérienne, *M. tuberculosis* est lumineuse. Ainsi,



si l'antibiotique est actif, on observe une décroissance de luminescence. En revanche, si *M. tuberculosis* est résistante, la luminescence persiste.

- Test à la nitrate réductase

Bien que figurant parmi les tests biochimiques d'identification d'espèces (nitrate réductase présente chez *M. tuberculosis* et *M. africanum*, absente chez *M. bovis* et la souche BCG), cette enzyme peut être utilisée comme moyen de détection de croissance en présence d'antibiotique chez les espèces la détenant naturellement [96,97].

Plusieurs études ont été conduites pour la détermination de la sensibilité au PZA.

Martin et al. [99] ont développé un test à la nitrate réductase sur milieu Löwenstein-Jensen à pH neutre en utilisant le nicotinamide comme marqueur de résistance au PZA. Les performances du test ont été évaluées par comparaison à la méthode radiométrique et au kit BACTEC™ MGIT™ 960 PZA. Sa sensibilité est de 91% et sa spécificité variable (71-94%) en fonction de la CMI obtenue.

Syre et al. [100] ont évalué ce test colorimétrique à pH acide 6,0 en le comparant à la méthode radiométrique, au séquençage du gène *pncA* et au test de Wayne. En milieu liquide, à la concentration critique de 100 mg/L, la sensibilité était proche de 90% et la spécificité d'environ 84%. Celle-ci augmentait aux plus fortes concentrations de PZA. Ces auteurs, tout comme Zhang et al. [101], encouragent à augmenter la concentration critique du PZA pour améliorer les résultats et lever les ambiguïtés de souches faussement résistantes.

Syre et al [102] ont également testés cette méthode colorimétrique en milieu liquide pour la détermination de la sensibilité de souches de *M. tuberculosis* à l'INH et à la RMP. En employant la méthode radiométrique comme gold standard, la sensibilité et la spécificité du test sont respectivement de 100% et 95% pour l'INH et de 94% et 100% pour la RMP.

- Test à la résazurine

Ce colorant bleu est utilisé comme indicateur coloré pour les analyses de viabilité des cellules, et notamment des bactéries, puisque sa réduction entraîne son changement de couleur en rose. Ce test a été appliqué à la détermination des CMI à l'INH et à la RMP chez des souches de *M. tuberculosis* par Palomino et al [103]. Son application peut être étendue à la détermination de la sensibilité d'autres antituberculeux. Ainsi, Martin et al. [104] l'ont appliqué à l'étude de la sensibilité au PZA en utilisant le nicotinamide comme marqueur de résistance.

### 1.8.2 Méthodes moléculaires

Les mutations responsables de résistance peuvent être identifiées par une méthode moléculaire après amplification des gènes impliqués. Les méthodes proposées pour identifier les mutations sont l'hybridation moléculaire après amplification des gènes cibles, la PCR en temps réel, le polymorphisme de fragments de restriction, le polymorphisme de conformation simple brin, la chromatographie liquide haute performante avec étape de dénaturation, ou encore le séquençage.

- Hybridation moléculaire

La technique LiPA (Line Probe Assay) peut être utilisée. Un test est commercialisé pour la détection de résistance à la RMP : Inno-LIPA RifTB® (InnoGenetics). Ce test d'hybridation sur support solide utilise plusieurs sondes oligonucléotidiques spécifiques de l'allèle sauvage et des mutations les plus fréquemment rencontrées. Après hybridation des produits d'amplification du gène *rpoB*, la présence d'hybrides est révélée par une réaction colorimétrique. Ce test peut être effectué à partir d'une culture pour détecter ou confirmer une résistance, ou directement sur le produit pathologique en cas de suspicion de résistance si l'examen microscopique est très positif. Cette technique est applicable à la RMP car 95% des mutations impliquent une région étroite du gène avec une grande fréquence de modifications identiques [48,96].

Sekiguchi et *al.* [105] ont développé et évalué la technique LiPA pour l'identification de résistance au PZA chez *M. tuberculosis*. Etant donné la grande variabilité des mutations et de leur localisation sur le gène, 47 sondes oligonucléotidiques ont été dessinées afin de couvrir la totalité du gène *pncA*. La séquence sauvage de référence utilisée pour le développement du test est celle de *M. tuberculosis* H37Rv. Les résultats de l'étude indiquent une sensibilité et une spécificité de 100% en référence aux techniques usuelles de détermination de la sensibilité au PZA (méthode radiométrique et test de Wayne). Ce test n'est pas commercialisé.

Les tests GenoType® MTBDRplus et GenoType® MTBDRsl (Hain Lifescience) permettent l'identification du « complexe *tuberculosis* » par amplification d'une séquence de 115 pb spécifique. Ils ont avant tout été développés pour la détection de résistances et utilisent la technologie DNA-STRIP®. Le kit GenoType® MTBDRplus assure la détection des mutations les plus fréquemment retrouvées chez les souches résistantes à la RMP et à l'INH en ciblant

les principales mutations des gènes *rpoB*, *katG* et du promoteur du gène *inhA*. Le kit GenoType® MTBDRsl permet de détecter les principales mutations retrouvées chez les souches résistantes aux fluoroquinolones, aux aminosides et à l'EMB impliquant respectivement le gène *gyrA*, le gène *rrs* et le gène *embB*. Les résistances retrouvées ne sont interprétables que s'il s'agit d'une mycobactérie de la tuberculose. Ces deux tests ont été validés pour une utilisation sur culture et sur examen microscopique positif.

- PCR en temps réel

La technique de PCR en temps réel est applicable à la détection des souches résistantes à haut niveau à l'INH et à la RMP car les mutations les plus fréquentes sont en nombre limitées. L'utilisation de sondes spécifiques de régions sauvages et mutées permet d'identifier les souches résistantes dans la mesure où la résistance est imputable à une des régions ciblées.

Le test commercialisé GeneXpert®MTB/RIF (Cepheid) est basé sur l'amplification d'une région de 81 pb du gène *rpoB* spécifique du « complexe *tuberculosis* ». Une PCR semi-nichée et l'utilisation de sondes permettent d'identifier les mutations les plus fréquemment retrouvées chez les souches résistantes à la RMP.

Garcia de Viedma et *al.* [106] ont mis au point un test permettant de détecter simultanément les mutations impliquées dans la résistance à la RMP et celles responsables d'un haut niveau de résistance à l'INH. Cette méthodologie a également été développée pour une application directe sur produit pathologique par Espasa et *al.* [107]. Tous les essais montrent une grande spécificité de la méthode par comparaison aux résultats obtenus par séquençage. Appliquée à la détection sur produit pathologique, la sensibilité s'élève à 95-99% lorsque l'examen microscopique est positif, elle n'est que de 30-35% dans les situations à examen microscopique négatif [107].

- Polymorphisme de fragments de restriction RFLP

Après amplification par PCR du gène d'intérêt, la technique de RFLP est possible pour les gènes *katG*, *aphC* impliqués dans la sensibilité à l'INH, de l'opéron *emb* CAB codant pour l'arabinosyl transférase indispensable à l'activité de l'EMB, et des gènes *rrs* et *rpsL* impliqués dans l'activité de la SM [96].

- Polymorphisme de conformation simple brin SSCP

Après amplification des fragments d'intérêt, la technique SSCP est utilisable pour l'étude du gène *rpoB*, des gènes *katG*, *inhA* et *ahpC*, et du gène *pncA* [96]. Scorpio et al. [82] ont mis au point cette méthode pour identifier les souches résistantes au PZA et avaient conclu à une technique fiable pour la détection de mutants résistants. Sheen et al. [108] ont repris cette méthode PCR-SSCP pour détecter la résistance au PZA non seulement sur des souches mais également sur des produits pathologiques. L'étude menée sur 185 isolats de *M. tuberculosis* et sur 65 expectorations a fourni des résultats cohérents aux méthodes habituelles (méthode radiométrique, test de Wayne, séquençage, CMI sur bouillon 7H9 supplémenté à pH acide 6,0) à hauteur de 89-97%.

- Denaturing High-Performance Liquid Chromatography dHPLC

Cette méthode a été développée et évaluée par Cooksey et al. [109] pour les gènes *rpoB*, *katG*, *pncA*, *rpsL*, *embB* et *oxyR*. Il s'agit d'une technique rapide de screening du polymorphisme génotypique basée sur la détection d'hétéroduplexes (chimères allèle sauvage-allèle muté). Cette technique doit être suivie d'un séquençage afin d'identifier la modification de séquence responsable. Les auteurs ont rencontré des difficultés de mise au point des températures d'étude pour le gène *pncA* en raison de régions très stables (richesse en GC) et de la longueur du fragment.

- Séquençage

L'amplification des gènes impliqués dans la sensibilité aux antituberculeux suivie du séquençage du fragment d'intérêt est possible à partir du moment où ils ont été identifiés. Des couples d'amorces ont été déterminés pour l'étude des gènes impliqués dans la sensibilité à l'INH, la RMP, le PZA et l'EMB soient *katG*, *oxyR-ahpC*, *inhA*, *rpoB*, *pncA* et *embB* [110].

Ces méthodes moléculaires sont très intéressantes pour leur rapidité de détection des résistances de *M. tuberculosis* aux antituberculeux mais ne peuvent pas supplanter l'étude phénotypique de sensibilité puisque, d'une part, certains tests ne sont pas exhaustifs, et d'autre part, des mécanismes de résistance différents restent inconnus. De plus, elles ont un coût, requièrent un équipement et du personnel formé.



## 2 ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

## 2.1 Introduction

Le PZA, analogue du nicotinamide, est considéré comme un antituberculeux de première ligne dans la mesure où, associé à la RMP et à l'INH pendant les deux premiers mois de traitement, il permet de réduire celui-ci de 9 à 6 mois.

Son intérêt réside en son activité bactéricide à l'encontre des bactéries semi-dormantes qui persistent en environnement acide [111]. Ce concept semble peu cohérent avec le stade initial de l'infection, période où l'antituberculeux est utilisé et efficace. Son activité pourrait être retrouvée dans les phagosomes des macrophages [112] mais cette idée est controversée car une étude menée *in vitro* sur des macrophages humains infectés ne retrouve aucune efficacité du PZA [113]. En fait, les mécanismes régissant son activité n'ont pas encore été entièrement élucidés. Cet antituberculeux a seulement une activité bactériostatique sur les bacilles en répllication active.

Une des particularités de cet antituberculeux tient au fait qu'il requiert un pH acide pour être actif et qu'il ne le soit pas dans des conditions standards de culture. Cette particularité constitue d'ailleurs le principal obstacle à la réalisation d'études phénotypiques chez les mycobactéries du complexe de la tuberculose. En effet, à pH acide, *M. tuberculosis* a une croissance moindre et 10% des isolats ne se développent pas [114]. Par ailleurs, tout paramètre capable de remonter la valeur du pH influence l'activité antituberculeuse de ce médicament. Il a notamment été démontré que la taille de l'inoculum ne doit pas être négligée. En effet, un inoculum  $\geq 10^7$  bactéries/mL induit l'augmentation d'une unité de pH alors qu'un inoculum de plus petite taille  $10^6$  bactéries/mL a un impact moindre puisqu'il remonte de 0,3 unité la valeur du pH [100].

Parmi les souches appartenant au « complexe *tuberculosis* », la résistance aux antituberculeux est de plus en plus fréquente. Les laboratoires de bactériologie doivent donc être en mesure de tester la sensibilité des souches vis-à-vis des antituberculeux majeurs. Tester la sensibilité au PZA est important du fait de la réduction du délai de traitement qu'il autorise mais aussi parce qu'il peut être utilisé dans les situations de tuberculose à bacille MDR ou XDR. Cependant, l'étude phénotypique de la sensibilité aux antituberculeux des mycobactéries du « complexe *tuberculosis* » requiert au moins trois semaines de culture.

Chez *M. tuberculosis*, la sensibilité au PZA est corrélée pour une majeure partie à l'intégrité d'une amidase ayant deux activités enzymatiques : PZase et nicotinamidase [87]. De nombreuses études ont démontré la grande implication des mutations sur le gène *pncA* dans la résistance des souches de *M. tuberculosis* au PZA. Ces mutations peuvent survenir sur la

totalité du gène, de ce fait seul le séquençage du gène *pncA* permet d'être exhaustif. La plupart des bacilles résistants au PZA présentent une substitution nucléotidique dont la conséquence est la modification d'un acide aminé, plus rarement il s'agit d'une insertion ou d'une délétion d'un fragment de taille variable (de 1 à plus de 100 nucléotides). La mutation peut également intéresser la séquence supposée promotrice juste en amont du gène. En effet, plusieurs souches de *M. tuberculosis* résistantes au PZA étudiées présentaient uniquement une substitution localisée sur le 11<sup>ème</sup> nucléotide en amont du codon d'initiation.

Un des objectifs de notre travail a été de développer au laboratoire un test de biologie moléculaire basé sur le séquençage du gène *pncA*. Actuellement, la sensibilité des souches vis-à-vis du PZA est évaluée par une approche phénotypique en milieu liquide à l'aide de la trousse BACTEC™ MGIT™ 960 PZA (MGIT PZA) automatisée sur Bactec™ MGIT™ 960 System à pH 5,9. Une fois l'approche génotypique réalisée, le second objectif de ce travail a consisté en une étude phénotypique de la sensibilité au PZA par détermination des CMI en milieu liquide et en milieu gélosé.

La mise au point de ces deux méthodes, génotypique puis phénotypique, nous a également permis d'évaluer les performances du test utilisé en routine par le laboratoire.

## 2.2 Matériels et méthodes

### 2.2.1 Matériels : souches de mycobactéries

- Souches témoins

La souche *M. tuberculosis* H37Rv constitue la souche témoin sensible au PZA et de séquence sauvage pour le gène *pncA*. La souche *M. bovis* BCG CIP 105050 (ATCC 35734) est utilisée comme souche témoin résistante au PZA puisqu'elle porte une mutation sur le gène *pncA* en position nucléotidique 169 (169C>G) ayant pour conséquence une modification du codon 57 (H57D).

- Critères d'inclusion des souches cliniques

Les souches sélectionnées sont issues de prélèvements reçus au laboratoire de bactériologie du CHU de Limoges et appartiennent toutes au « complexe *tuberculosis* ». Cette appartenance a été déterminée au laboratoire à l'aide de la sonde Accuprobe® (Gen-Probe), l'identification



au niveau de l'espèce a été réalisée par amplification génique suivie d'une hybridation avec le test Génotype<sup>®</sup> MTBC (Hain Diagnostika).

Les souches cliniques étudiées (A, B, C et D) sont phénotypiquement résistantes au PZA.

Les études à venir ont toutes été réalisées avec les témoins typés génétiquement et de sensibilité connue pour le PZA.

- Sensibilité aux antituberculeux des souches cliniques

L'étude de la sensibilité aux antituberculeux des souches cliniques a été réalisée par la méthode habituelle du laboratoire. L'antibiogramme a été effectué en milieu liquide sur l'automate Bactec<sup>™</sup> MGIT<sup>™</sup> 960 System et a utilisé la trousse BACTEC<sup>™</sup> MGIT<sup>™</sup> 960 SIRE pour le test de sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux antimycobactériens. Ce kit a permis l'étude de la sensibilité à la SM, à l'INH, à la RMP et à l'EMB sur milieu MGIT<sup>™</sup>. Le test MGIT PZA a permis l'étude de la sensibilité au PZA en milieu liquide. Ce test utilise un bouillon Middlebrook 7H9 assurant la croissance et la détection des mycobactéries à pH acide 5,9.

Les résultats de l'antibiogramme réalisé au laboratoire sont présentés dans le tableau VIII.

Tableau VIII – Résultats de l'antibiogramme des souches cliniques étudiées.

SM, streptomycine ; RMP, rifampicine ; INH, isoniazide ; PZA, pyrazinamide

S, sensible ; R, résistante.

| Souche | Espèce                 | Année d'isolement | Sensibilité aux antituberculeux sur Bactec <sup>™</sup> MGIT <sup>™</sup> 960 |               |          |          |               |                 |
|--------|------------------------|-------------------|---|---------------|----------|----------|---------------|-----------------|
|        |                        |                   | SM<br>1 mg/L  | RMP<br>1 mg/L | INH      |          | EMB<br>5 mg/L | PZA<br>100 mg/L |
|        |                        |                   |   |               | 0,1 mg/L | 0, 4mg/L |               |                 |
| A      | <i>M. tuberculosis</i> | 2006              | S   | S             | S        |          | S             | R               |
| B      | <i>M. tuberculosis</i> | 2008              | S   | S             | S        |          | S             | R               |
| C      | <i>M. africanum</i>    | 2009              | S   | S             | R        | R        | S             | R               |
| D      | <i>M. tuberculosis</i> | 2009              | S   | S             | S        |          | S             | R               |

### 2.2.2 Méthodes

Les mycobactéries de la tuberculose étant des agents biologiques de groupe 3, les mesures de sécurité biologique en vigueur au laboratoire ont été respectées. Les souches ont été manipulées sous PSM2.

- **Les souches de mycobactéries**

Des extraits d'ADN étaient disponibles au laboratoire (conservés à -20°C) et ont été utilisés pour l'étude génotypique des souches cliniques en échec de culture. En effet, il n'a pas été possible d'obtenir les souches A et B en subculture. Pour le patient qui hébergeait la souche B, la subculture d'un autre prélèvement (effectué un mois après) a été repiquée et a pu être obtenue en culture. Nous l'avons incluse à l'étude et la nommons B'.

- Culture des souches

Les souches témoins et cliniques ont été repiquées sur milieux solides Löwenstein-Jensen et Coletsos et sur milieu liquide MGIT™. La culture des souches en vue de l'étude phénotypique a été réalisée soit à partir de leurs aliquots congelés à -20°C au laboratoire (*M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG CIP 105050, C et D), soit à partir des subcultures lorsque les aliquots n'étaient plus disponibles en raison de tentatives de culture précédentes ayant échouées (A et B). B' n'avait pas été conservée par congélation.

- Extraction de l'ADN

Les ADN génomiques ont été extraits à l'aide du kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Courtabœuf, France) d'après la procédure spécifique aux bactéries à Gram positif. Les ADN ont été repris dans un volume de 55 µL d'éluant.

L'extraction des souches obtenues en culture a été évaluée à l'aide du Nanodrop® 1000 (Thermo Scientific). Ce spectrophotomètre nous a permis d'apprécier la quantité et la qualité des extraits d'ADN.

- Mise au point de la méthode d'amplification et de séquençage du gène *pncA*

- Le gène *pncA*

Ce gène codant pour la nicotinamidase/PZase est constitué de 561 pb soit 186 acides aminés. Chez *M. tuberculosis* H37Rv, il est porté par le segment 7/13 du génome et référencé Rv2043c. Sa séquence est disponible sur internet [115] et mentionnée sur la figure 18. Le génome de *M. bovis* BCG 1173P2 Pasteur a été entièrement séquencé et disponible sur internet [116], celui de *M. africanum* a été partiellement séquencé mais la séquence du gène d'intérêt est connue [117].

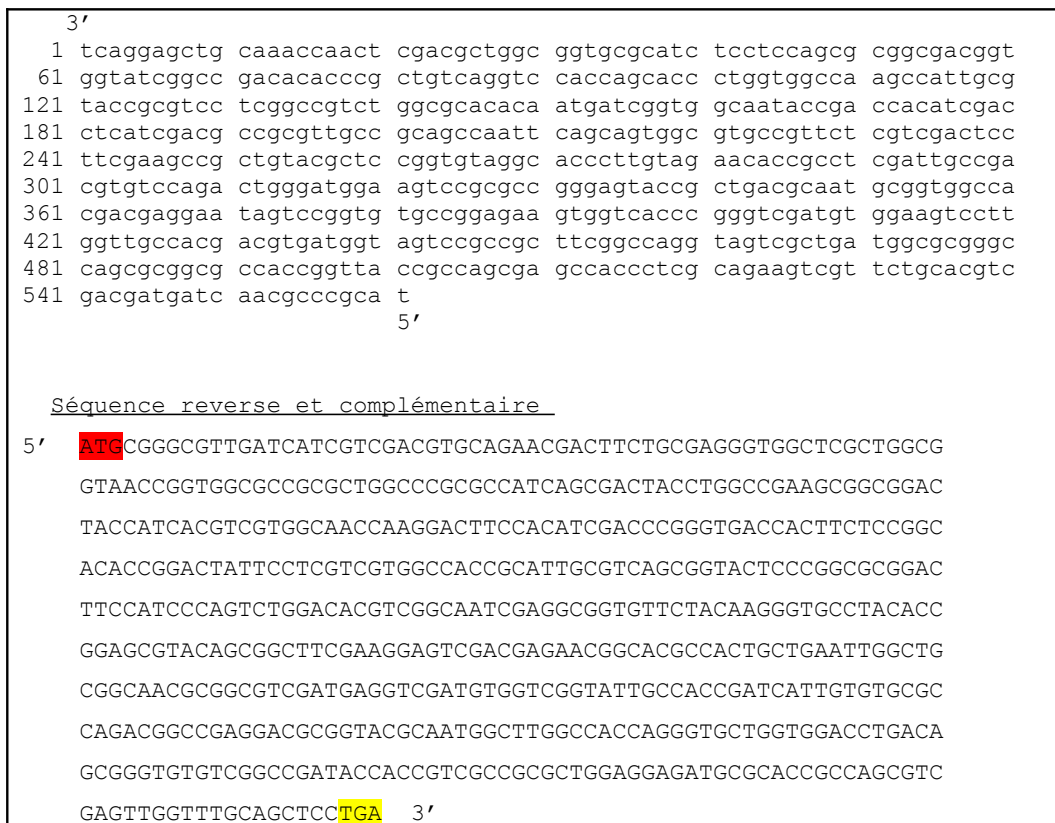


Figure 18 - Séquence du gène *pncA* chez *M. tuberculosis* H37Rv.

ATG : codon d'initiation ; TGA : codon stop.

- Selection des amorces

Chez les trois espèces considérées, la séquence nucléotidique du gène *pncA* ainsi que les séquences en amont et en aval ont pu être comparées par alignement à l'aide du logiciel informatique ClustalW disponible sur internet [118]. L'alignement nucléotidique obtenu est

présenté sur la figure 20 et montre une homologie parfaite entre les séquences des trois espèces étudiées (hormis la substitution nucléotidique attendue chez *M. bovis*).

Les amorces ont été déterminées à l'aide du logiciel Primer 3 disponible sur internet [119]. Ce logiciel permet d'évaluer les qualités de couples d'amorces choisis manuellement. Nous avons voulu retenir deux couples d'amorces pour que la réaction de séquence soit effectuée avec une amorce interne et pour anticiper le recours à une PCR semi-nichée. Les critères de choix des amorces sont une température de fusion ( $T_m$ ) optimale, un risque minimum d'hybridation des amorces entre-elles et avec celles du second couple. Leur taille a été fixée autour de 20 nucléotides. Chacun des deux couples permet d'amplifier le gène *pncA* dans sa totalité. Les séquences des amorces sélectionnées sont présentées dans le tableau IX et leur positionnement par rapport au gène présenté sur la figure 19.

Tableau IX – Amorces choisies pour la mise au point de l'amplification du gène *pncA* par PCR en point final.

| Amorces                                  | Séquences 5' – 3'  | $T_m$ (°C) | Taille (nucléotides) | Position par rapport à la séquence codante |
|--|--|------------|----------------------|--|
| pncA P1' (sens)<br>pncA P2' (anti-sens)  | CAG CTG GTC ATG TTC GCG ATC G<br>GCT TGC GGC GAG CGC TCC A | 70<br>74   | 22<br>19             | - 106 pb<br>+ 55 pb                        |
| pncA 1589 (sens)<br>pncA 796 (anti-sens) | GCG TCG GTA GGC AAA CTG<br>CGA TGA AGG TGT CGT AGA AGC     | 60<br>60   | 18<br>21             | - 50 pb<br>+ 183 pb                        |

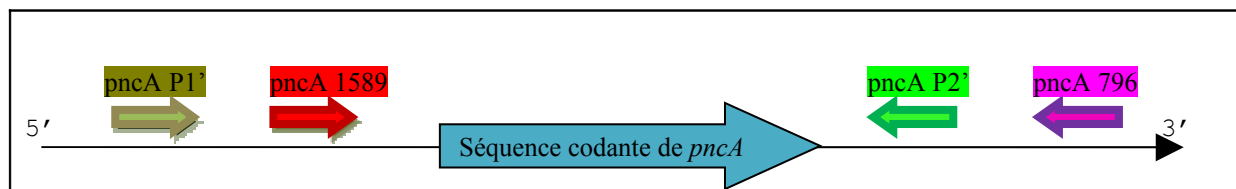


Figure 19 – Positionnement des deux couples d'amorces par rapport à la séquence du gène *pncA*.

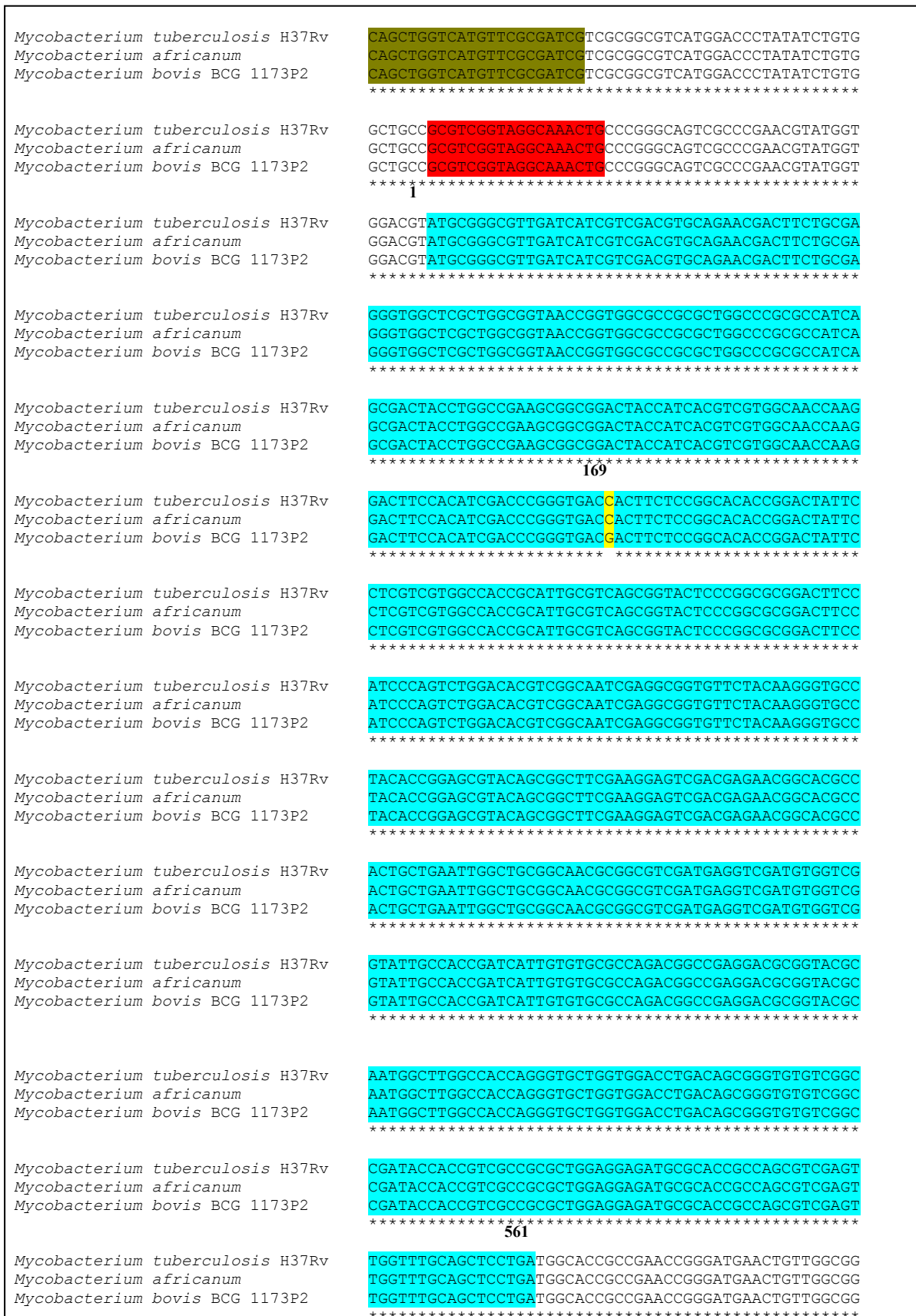


Figure 20 – Aligement chez les trois espèces étudiées des séquences sauvages du gène *pncA* encadré des amorces dessinées.

Séquence d'intérêt - pncA P1 - pncA P2 - pncA 1589 - pncA 796 – modification de séquence chez *M. bovis*

|   |   |
|---|---|
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv | CGG <b>TGGAGCGCTCGCCGCAAGC</b> GGCCGCCGCGCACGACCGCGCCGGCTGG |
| <i>Mycobacterium africanum</i>          | CGG <b>TGGAGCGCTCGCCGCAAGC</b> GGCCGCCGCGCACGACCGCGCCGGCTGG |
| <i>Mycobacterium bovis</i> BCG 1173P2   | CGG <b>TGGAGCGCTCGCCGCAAGC</b> GGCCGCCGCGCACGACCGCGCCGGCTGG |
|   | *****   |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv | GTCGGGTTGTTACCGGTGACGCGCGGGTCAAGACCCGGTGGGTTTCGCA           |
| <i>Mycobacterium africanum</i>          | GTCGGGTTGTTACCGGTGACGCGCGGGTCAAGACCCGGTGGGTTTCGCA           |
| <i>Mycobacterium bovis</i> BCG 1173P2   | GTCGGGTTGTTACCGGTGACGCGCGGGTCAAGACCCGGTGGGTTTCGCA           |
|   | *****   |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv | GCCGCAGGTGGGGCATGAGGCCATCGGCC <b>GCTTCTACGACACCTTCATCG</b>  |
| <i>Mycobacterium africanum</i>          | GCCGCAGGTGGGGCATGAGGCCATCGGCC <b>GCTTCTACGACACCTTCATCG</b>  |
| <i>Mycobacterium bovis</i> BCG 1173P2   | GCCGCAGGTGGGGCATGAGGCCATCGGCC <b>GCTTCTACGACACCTTCATCG</b>  |
|   | *****   |

Suite de la figure 20 – Alignement chez les trois espèces de mycobactéries étudiées des séquences sauvages du gène *pncA* encadré des amorces dessinées.

Séquence d'intérêt - **pncA P1'** - **pncA P2'** - **pncA 1589** - **pncA 796** – modification de séquence chez *M. bovis*

- Mise au point du programme d'amplification du gène *pncA* par PCR en point final

Une fois la conception des amorces réalisée, la première étape a consisté en la mise au point du mélange réactionnel puis du programme d'amplification sur le thermocycleur GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, Courtabœuf, France). Les deux couples d'amorces ont été testés. Les réactifs utilisés et la *Taq* ADN polymérase (5 U/μL) sont commercialisés par Qiagen. Le volume réactionnel est fixé à 50 μL. Chaque réaction contient 5 μL d'extrait d'ADN, 1,5 μL de MgCl<sub>2</sub> à 25 mM soit une concentration finale de 0,75 mM ; 0,5 μL d'une dilution à 20 μM de chaque amorce testée soit 10 pmol ou une concentration finale à 0,2 μM (couples testés : *pncA* P1'-*pncA* P2' et *pncA* 1589-*pncA* 796) ; 0,4 μL de *Taq* DNA polymérase soit 2 U, 5 μL de tampon 10X (contenant 15 mM de MgCl<sub>2</sub>), 4 μL de dNTP à 200 μM chacun soit 80 nmol ou une concentration finale pour chaque dNTP à 16 μM, puis de l'eau stérile pour compléter le volume réactionnel à 50 μL.

Le programme d'amplification sélectionné a été décrit par Scorpio et *al.* [82]. A la dénaturation thermique à 95°C durant 5 minutes succèdent 30 cycles de dénaturation, hybridation, élongation : 95°C pendant 1 minute, 55°C pendant 1 minute puis 72°C durant 1 minute. Une phase d'élongation terminale à 72°C pendant 7 minutes met un terme à la réaction avant refroidissement à 4°C.

L'amplification est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% sur 5 μL de produits de PCR. La migration en tampon tris-borate EDTA est effectuée sous un champ électrique fixé à 50V. La taille du fragment est évaluée par utilisation d'un étalon de poids moléculaires d'échelle 123 pb d'ADN (Invitrogen). La taille attendue des produits amplifiés est de 722 pb avec le couple *pncA* P1'-*pncA* P2' et de 784 pb avec le couple *pncA* 1589-*pncA* 796. Lorsque

le signal d'amplification est trop faible, une PCR semi-nichée est réalisée sur 1  $\mu\text{L}$  de produits de PCR obtenus au cours de la première amplification. Quel que soit le couple d'amorces utilisé pour la première amplification, la PCR semi-nichée utilise les amorces pncA 1589 et pncA P2' (figure 19). Le mélange réactionnel et le programme du thermocycleur restent identiques.

- Purification des produits de PCR

La purification utilise le kit MSB® Spin PCRapace (EUROBIO, Les Ulis, France) selon les recommandations du fabricant. La pureté des produits de PCR est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8%.

- Mise au point du séquençage du gène *pncA*

La PCR de séquençage est réalisée sur le thermocycleur GeneAmp® PCR System 2700. Un programme de 25 cycles : 96°C pendant 10 secondes, 50°C durant 5 secondes, 60°C pendant 4 minutes, suivis d'un refroidissement à 4°C a été réalisé. La réaction de séquençage est effectuée sur chaque brin complémentaire. Le mélange réactionnel est constitué de 2  $\mu\text{L}$  d'une solution à 2  $\mu\text{M}$  de l'amorce utilisée (pncA 1589 ou pncA P2') soit 4 pmol ou une concentration finale de 0,4  $\mu\text{M}$  ; de 1  $\mu\text{L}$  de tampon BigDye® Terminator 5X Sequencing Buffer AB (Applied Biosystems), de 5  $\mu\text{L}$  de produits de PCR purifiés et de 2  $\mu\text{L}$  de BigDye® X Terminator (Applied Biosystems). Le volume réactionnel est fixé à 10  $\mu\text{L}$  mais peut être doublé pour les amplifications de faible intensité en gel d'agarose. Au contraire, si l'intensité est forte, la prise d'essai est ramenée à 2  $\mu\text{L}$  et complétée de 3  $\mu\text{L}$  d'eau stérile.

Une fois l'amplification réalisée, les réactions de séquence sont purifiées à l'aide de colonnes NucleoSEQ (MACHEREY-NAGEL EURL, Hoerd Cedex, France) puis concentrées avec le SpeedVac Concentrator (SAVANT). Après concentration, 20  $\mu\text{L}$  de formamide sont ajoutés avant analyse sur le séquenceur ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems). L'interprétation des résultats du séquenceur est effectuée à l'aide du logiciel Sequencing Analysis version 5.3.2.

Les électrophorégrammes sont ensuite convertis en séquences au format FASTA avec le logiciel Chromas 1.45 (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>).

L'alignement nucléotidique est réalisé avec l'application Blast disponible sur internet [120] en utilisant comme référence la souche *M. tuberculosis* H37Rv.

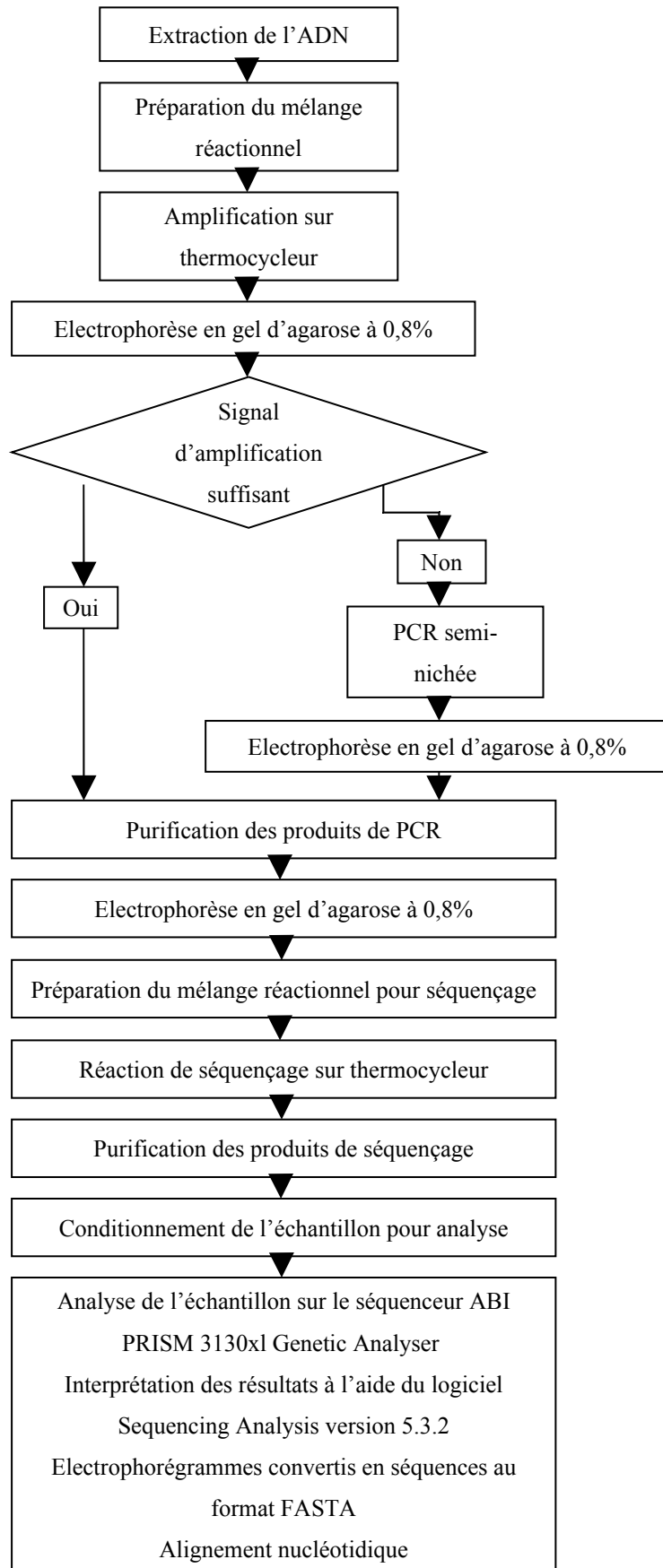


Figure 21 – Protocole de séquençage du gène *pncA*.



- Concentration minimale inhibitrice du pyrazinamide

Les souches témoins, *M. tuberculosis* H37Rv et *M. bovis* BCG CIP 105050, sont étudiées en parallèle des souches cliniques résistantes au PZA.

Les subcultures disponibles sur Löwenstein-Jensen ou Coletsos des souches témoins et des souches cliniques (B', C et D) sont utilisées. Plusieurs colonies sont prélevées à l'ose, dissociées à l'aide de billes de verre stériles contenues dans un tube à bouchon vissé stérile puis remises en suspension dans de l'eau stérile. Cette suspension est homogénéisée (vortex) durant plusieurs minutes jusqu'à disparition des gros agrégats. Après décantation et dépôt des grosses particules, la suspension de mycobactéries est ensemencée dans le milieu de culture Middlebrook 7H9 Broth avec glycérol (Becton Dickinson, Maryland, USA) supplémenté en albumine, dextrose et catalase (ADC). L'incubation est prolongée jusqu'à ce que le trouble du milieu atteigne une opacité équivalente à celle de l'étalon BCG 1 mg/mL.

Les différentes étapes de la détermination des CMI en milieu liquide et en milieu gélosé sont résumées sur la figure 24.

- CMI du pyrazinamide en milieu liquide

Pour cette étude, nous utilisons le bouillon Middlebrook 7H9 Broth avec glycérol supplémenté en ADC. La préparation de l'inoculum et du milieu de culture a été décrite par Aono et *al.* [121]. Les étapes techniques sont résumées sur la figure 22.

- Préparation de l'inoculum

Lorsque la culture en Middlebrook 7H9 supplémenté est suffisante, la suspension est dissociée en tube à bouchon vissé. Après sédimentation des particules de grande taille, la turbidité est ajustée à un standard McFarland 1 ( $\approx 10^8$  UFC/mL) en milieu Middlebrook 7H9. Ce standard est préparé au laboratoire à l'aide d'une culture de bacilles à Gram négatif dans ce même milieu de culture supplémenté. L'inoculation des tubes tests et témoins est effectuée avec 100  $\mu$ L de la dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la suspension de mycobactéries à 1 McFarland. La dilution est réalisée en Middlebrook 7H9 supplémenté.

- Préparation des solutions de pyrazinamide

Le médicament disponible en poudre est commercialisé par MP Biomedicals, Inc. (Illkirch, France). Le PZA a une solubilité dans l'eau de 15 g/L [60]. Les concentrations testées sont 25, 50, 100, 200, 300, 600, 900 et 1 200 mg/L. Cette gamme comprend la concentration critique du PZA que nous fixons à 100 mg/L par analogie au test MGIT PZA formulé sur la base d'un bouillon Middlebrook 7H9.

La solution mère de PZA est préparée en eau stérile à la concentration 12 g/L. Un volume suffisant est élaboré pour qu'elle soit d'une part utilisée telle quelle (tubes tests à 1 200 mg/L) et, d'autre part, diluée pour préparer la gamme de concentrations testées.

- Préparation des milieux de culture

La CMI en milieu liquide est réalisée dans des tubes en verre stériles à bouchon vissé. Le volume total, PZA inclus, est fixé à 4 mL (3,6 mL de Middlebrook 7H9 supplémenté et 400 µL de solution de PZA).

Le PZA étant efficace à pH acide, le lyophilisat du milieu de culture des tubes tests est reconstitué non pas avec de l'eau mais avec du tampon phosphate préparé au laboratoire. Le pH est ensuite ajusté à 6,0 à l'aide d'une solution d'acide phosphorique.

- Témoins de l'étude en milieu liquide

La suspension à 1 McFarland de chaque souche est diluée au 1/100<sup>ème</sup> dans le milieu de culture et 100 µL de cette dilution sont inoculés dans un tube sans PZA à pH 6,0. Ce tube constitue le témoin croissance 1% et sa positivité constitue la condition *sine qua none* pour interpréter la CMI. Si la croissance obtenue dans le tube à 100 mg/L est supérieure à celle du témoin 1%, la souche est considérée résistante [100]. Le tube sans PZA à pH 6,0 constitue un second témoin.

En parallèle, nous avons testé à pH  $6,6 \pm 0,2$  le témoin croissance 1% et la suspension au 1/10<sup>ème</sup> dans des tubes sans PZA. Le milieu de culture Middlebrook 7H9 a alors été reconstitué avec de l'eau stérile puis supplémenté en glycérol et ADC. Ces témoins permettent d'évaluer l'impact du pH acide sur la culture.

- Inoculation des milieux

Les concentrations testées pour la souche sensible de référence *M. tuberculosis* H37Rv sont 25, 50, 100 et 200 mg/L, celles testées pour la souche résistante *M. bovis* BCG CIP 105050 sont 300, 600, 900 et 1200 mg/L. En revanche, pour les souches cliniques disponibles en subculture (B', C et D), l'ensemble de la gamme de concentrations est testé. Cent microlitres de la dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la suspension bactérienne à 1 McFarland sont inoculés dans les tubes avec ou sans PZA : l'inoculum est d'environ 10<sup>6</sup> UFC. L'inoculum du témoin croissance 1% est de l'ordre de 10<sup>5</sup> UFC.

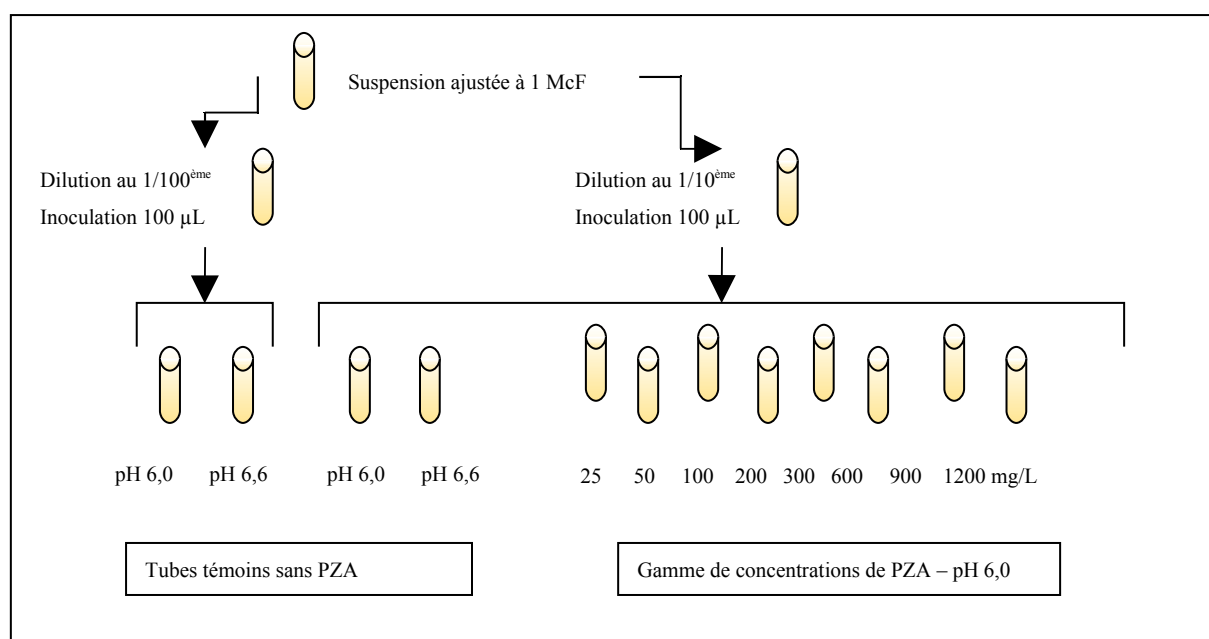


Figure 22 – Inoculation des tubes témoins et tests pour la détermination de la CMI du PZA en milieu liquide.

- Incubation des cultures

Les tubes sont placés à l'étuve à 37°C en aérobiose. La croissance est vérifiée après 14 jours d'incubation pour les espèces considérées. Les périodes d'incubation variant en fonction des études, nous avons fait le choix d'effectuer une première lecture de la CMI à J14 et une définitive à J28.

La CMI attendue de *M. tuberculosis* H37Rv est inférieure à 100 mg/L (variable en fonction des études [87,122]). La CMI attendue de *M. bovis* est > 500 mg/L [89].

- CMI du pyrazinamide en milieu solide

Le milieu utilisé pour cette étude est le Middlebrook 7H11 agar avec glycérol (Becton Dickinson) supplémenté en OADC. La détermination des CMI du PZA est réalisée en boîte de Pétri sur un volume de 20 mL de gélose. Les étapes techniques sont illustrées sur la figure 23.

- Préparation de l'inoculum

Cette étape a été décrite par Sun et *al.* [89]. Les conditions de calibration de l'inoculum sont différentes de celles utilisées pour la détermination des CMI en milieu liquide. L'inoculum doit avoir une opacité équivalente à celle de l'étalon BCG d'opacimétrie = 1 mg/mL. La préparation de la suspension est identique à celle de l'étude en milieu liquide. Après sédimentation, les suspensions dépourvues de grosses particules sont diluées en Middlebrook 7H9 au 1/10<sup>ème</sup> puis en progression géométrique de raison 10 afin d'obtenir les deux dilutions testées : 10<sup>-2</sup> et 10<sup>-4</sup>.

- Préparation des solutions de pyrazinamide

La solution mère de PZA est préparée de façon identique à celle de l'étude en milieu liquide à une concentration de 12 g/L.

- Préparation des milieux de culture

La solution de PZA est incorporée dans le milieu de base avant gélification, en même temps que l'OADC [123]. A 18 mL de Middlebrook 7H11 supplémenté en OADC, 2 mL de solution de PZA sont ajoutés.

Le milieu de culture est reconstitué avec du tampon phosphate comme précédemment puis le pH est ajusté à 5,5 [89] à l'aide d'une solution d'acide phosphorique.

- Témoins de l'étude en milieu solide

Le milieu de culture à pH 5,5 sans PZA constitue le témoin de l'étude.

Un milieu non acidifié à pH 6,6 ± 0,2 est inoculé pour évaluer l'impact de l'acidité sur la culture. Pour cela, le milieu Middlebrook 7H11 agar supplémenté en OADC est reconstitué d'après les recommandations du fabricant avec de l'eau stérile.

- Inoculation des milieux

Les concentrations testées sont ciblées en fonction des résultats obtenus en milieu liquide. La concentration critique du PZA est fixée à 50 mg/L sur Middlebrook 7H11 agar [123]. Elle est testée chez toutes les souches de l'étude (y compris *M. bovis* BCG CIP 105050). Les souches sont inoculés en spots de 50 µL après séchage de la gélose à l'étuve. Les souches témoins et les souches cliniques disponibles en subculture (B', C et D) sont testées vis-à-vis des concentrations 25, 50 et 100 mg/L pour les deux dilutions bactériennes ( $10^{-2}$  et  $10^{-4}$ ). La souche *M. bovis* BCG CIP 105050 est, quant à elle, testée aux plus fortes concentrations : 600, 900 et 1 200 mg/L.

Les souches sont également ensemencées en spots de 50 µL sur la gélose témoin non acidifiée.

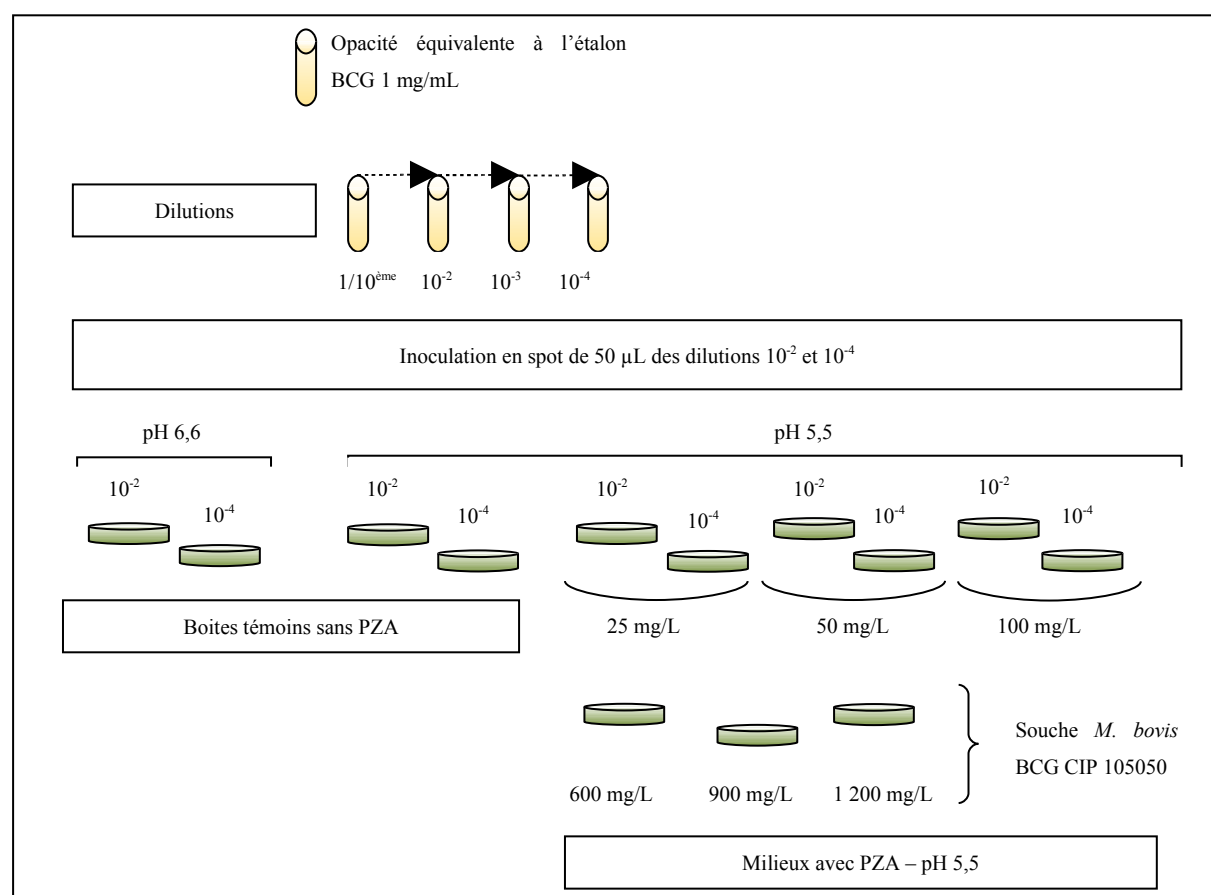


Figure 23 – Inoculation des boîtes témoins et tests pour la détermination de la CMI en milieu solide.

- Incubation des cultures

Les boîtes sont placées à l'étuve à 37°C en atmosphère aérobie. Le première lecture est effectuée à J21 et la lecture finale à J42.

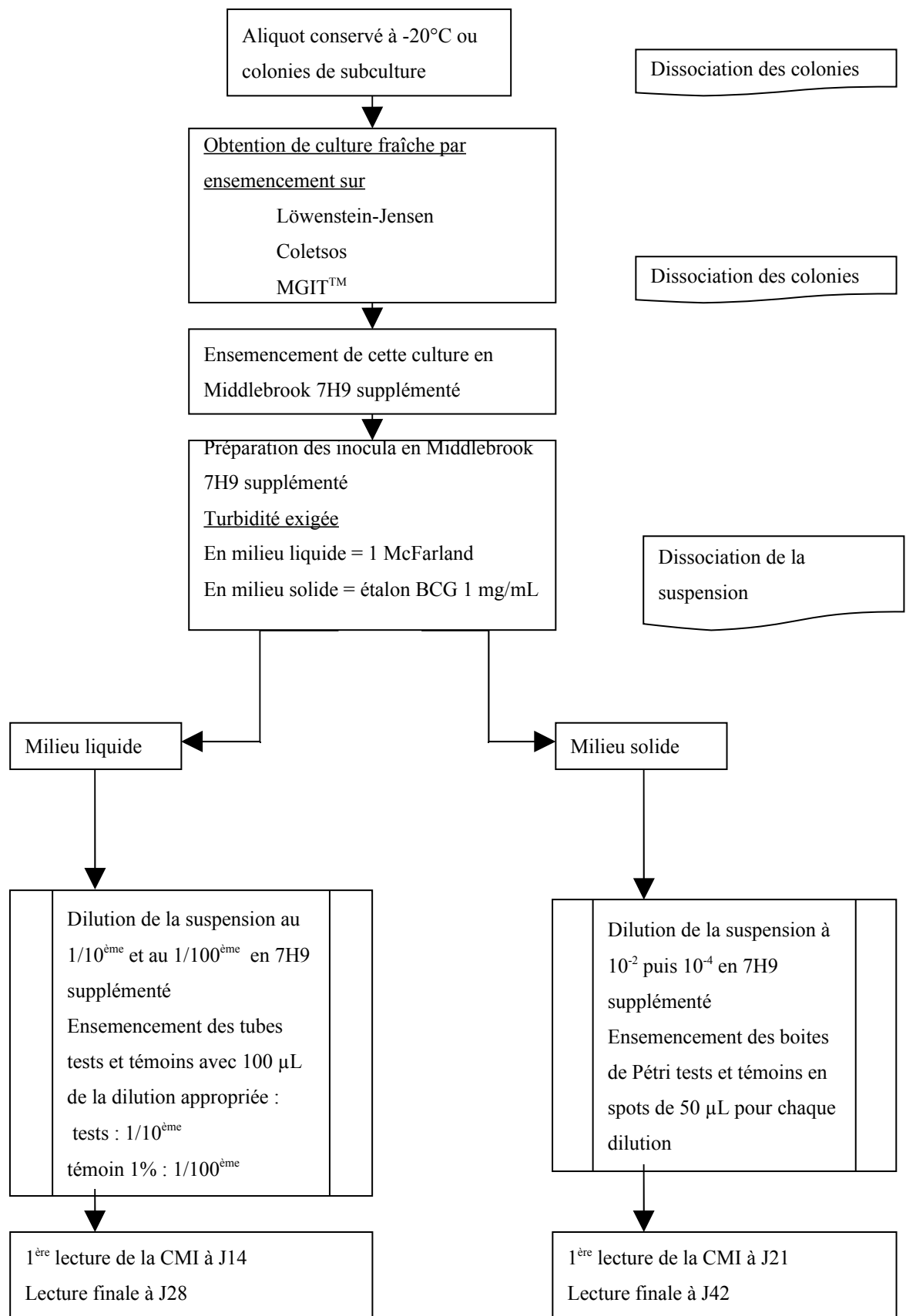


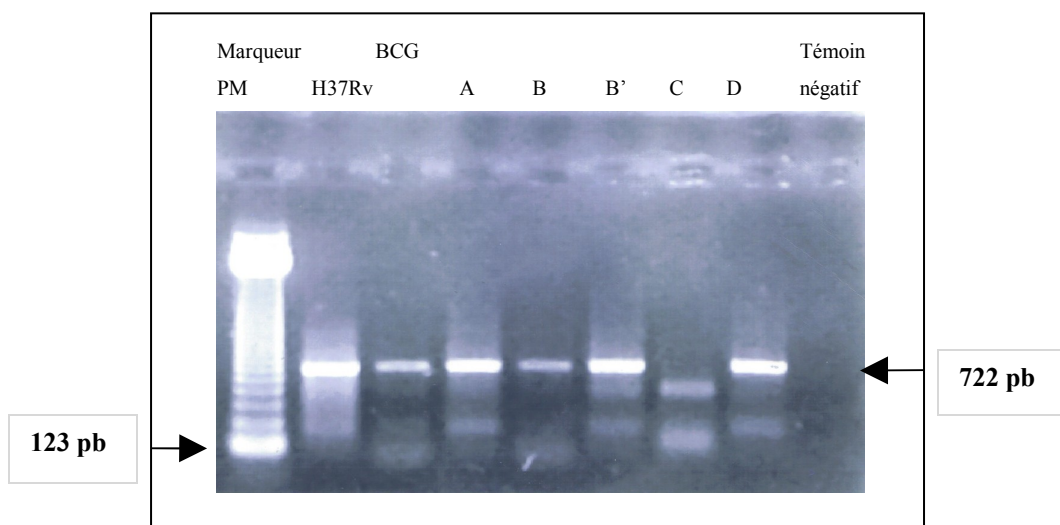
Figure 24 – Etude phénotypique : protocole de détermination des CMI du PZA en milieux liquide et solide.

## 2.3 Résultats

### 2.3.1 Mise au point de la méthode d'amplification et de séquençage du gène *pncA* codant pour la pyrazinamidase

- Amplification du gène *pncA* par PCR en point final

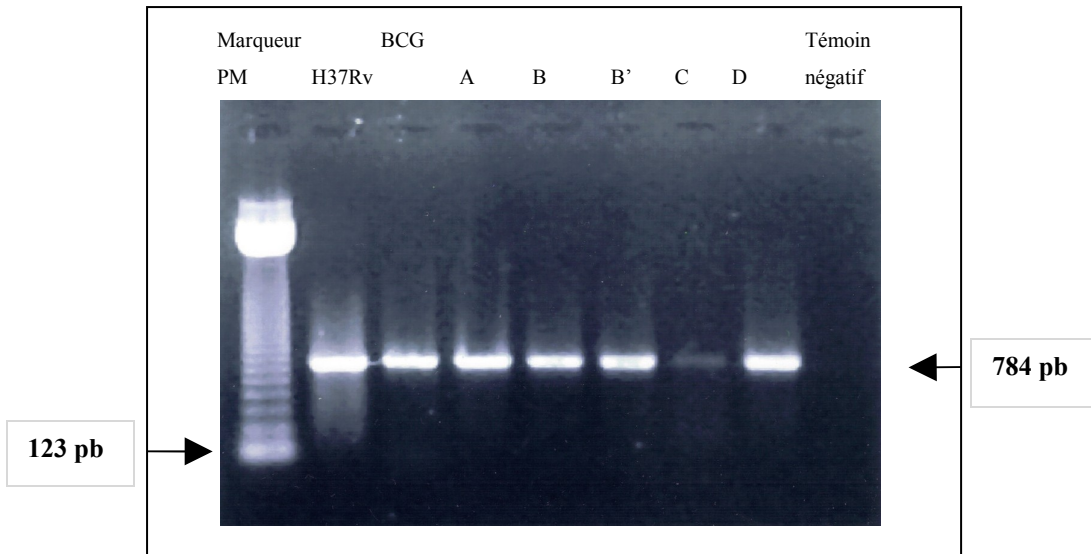
Le premier couple d'amorces testé : *pncA* P1'-*pncA* P2' n'a pas permis d'obtenir l'amplification de la souche clinique C (*M. africanum*). La taille attendue des produits de PCR avec ce couple est de 722 pb.



**Figure 25** – Electrophorèse en gel d'agarose à 0.8%. Détermination de l'amplification du gène *pncA* par le couple d'amorces *pncA* P1'-*pncA* P2'.

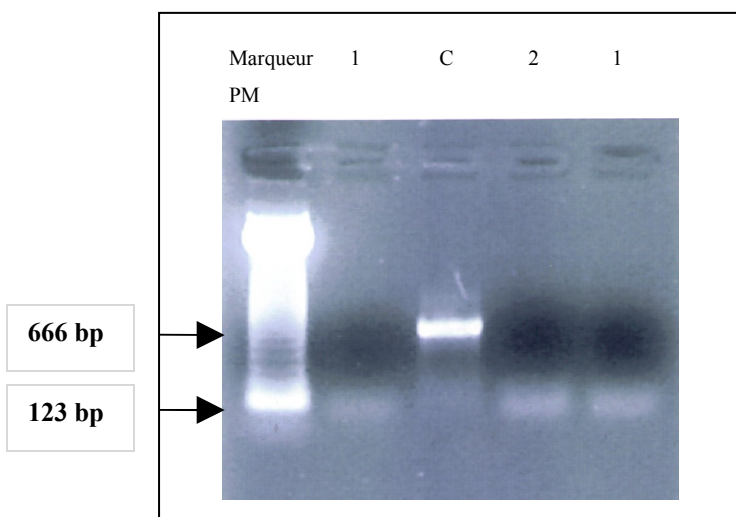
PM, étalon poids moléculaires d'échelle 123 pb d'ADN (Invitrogen).

L'autre couple d'amorces testé : *pncA* 1589-*pncA* 796 nous a permis d'obtenir le fragment d'intérêt chez toutes les souches, y compris la souche clinique C. Le mélange réactionnel et le programme d'amplification n'ont pas été modifiés. La taille attendue du fragment avec ce couple est de 784 pb.



**Figure 26** – Electrophorèse en gel d’agarose à 0.8%. Détermination de l’amplification du gène *pncA* par le couple d’amorces *pncA* 1589-*pncA* 796.  
PM, étalon poids moléculaires d’échelle 123 pb d’ADN (Invitrogen).

Le signal d’amplification obtenu pour la souche C étant trop faible pour obtenir un séquençage de qualité, nous avons eu recours à une PCR semi-nichée avec les amorces *pncA* 1589 et *pncA* P2’ sur 1 µL de produits de PCR. Etant donné le haut risque de contamination, le témoin négatif de la première amplification a été manipulé en parallèle de la souche C. L’amplicon de la PCR semi-nichée a une taille de 666 pb.



**Figure 27** – Electrophorèse en gel d’agarose à 0.8%. Détermination de l’amplification du gène *pncA* de la souche clinique C après PCR semi-nichée avec les amorces *pncA* 1589 et *pncA* P2’  
PM, étalon poids moléculaires d’échelle 123 pb d’ADN (Invitrogen) ;  
1, témoin négatif PCR semi-nichée ;  
2, témoin négatif PCR initiale.

La PCR semi-nichée permet d’obtenir un signal d’amplification satisfaisant pour la souche C.



Les différents produits de PCR ont ensuite été purifiés sur colonne.

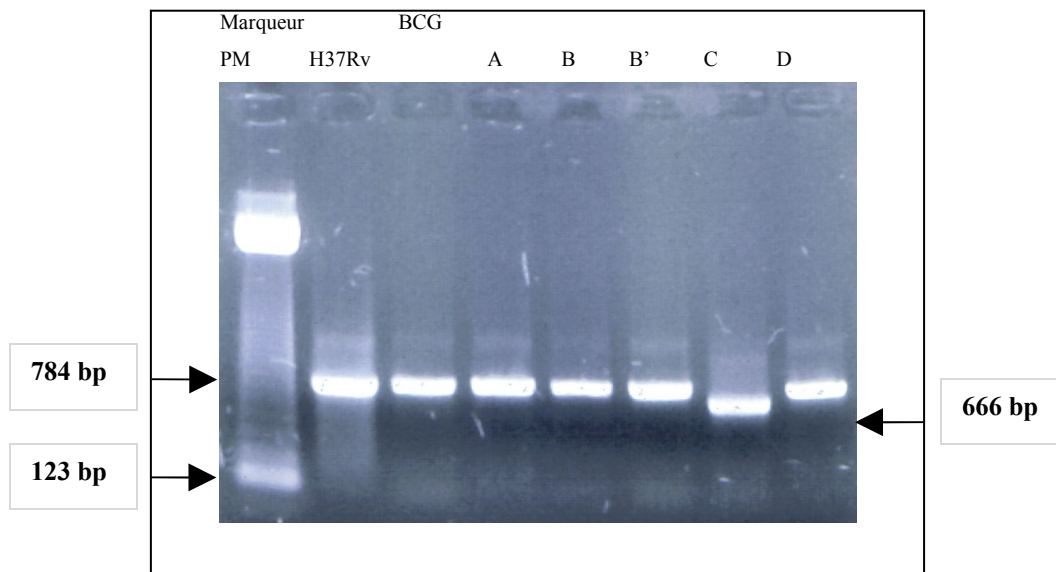


Figure 28 – Electrophorèse en gel d’agarose à 0.8%. Détermination de la pureté des produits de PCR. PM, étalon poids moléculaires d’échelle 123 pb d’ADN (Invitrogen).

- Séquençage du gène *pncA* codant pour la pyrazinamidase

Les amorces utilisées pour la réaction de séquence (*pncA* 1589 et *pncA* P2’) permettent l’une et l’autre d’obtenir la séquence du gène *pncA* dans sa totalité. L’amorce *pncA* 1589 couvre la séquence du nucléotide -12 (en amont du codon d’initiation) au nucléotide +50 au moins (en aval du codon stop). L’amorce *pncA* P2’ permet l’analyse du nucléotide -45 au nucléotide +20. L’analyse des séquences obtenues chez les souches témoins et cliniques permet d’apprécier le caractère « sauvage » ou « muté » du gène *pncA*.

Le caractère sauvage du gène *pncA* chez la souche témoin *M. tuberculosis* H37Rv et la dérive génotypique de la souche *M. bovis* BCG CIP 105050 sont confirmées par cette technique. La souche A présente la délétion d’une cytosine 116delC responsable d’un décalage du cadre de lecture. La souche B porte une substitution nucléotidique 465G>T qui n’entraîne pas de modification de séquence en acides aminés V155V. Les autres souches cliniques étudiées : B’ de phénotype sensible, C et D présentent une séquence du gène *pncA* identique à celle de *M. tuberculosis* H37Rv. Les résultats de cette étude sont rapportés sur le tableau X en parallèle des résultats obtenus au laboratoire par la méthode phénotypique MGIT PZA.

### 2.3.2 Etude de la sensibilité au pyrazinamide en milieu liquide

L'objectif de cette étude a été de déterminer la CMI du PZA sur bouillon Middlebrook 7H9. La CMI permet de quantifier la bactériostase et correspond à la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible à l'œil nu [48].

La concentration critique retenue pour cette étude est 100 mg/L. La CMI ne peut être validée que lorsqu'une croissance est détectée dans le tube témoin 1% [100].

La souche témoin *M. tuberculosis* H37Rv a une CMI  $\leq 25$  mg/L, elle est de phénotype sensible. La souche témoin *M. bovis* BCG CIP 105050 a une CMI  $> 1\ 200$  mg/L, elle est phénotypiquement résistante.

Une croissance des souches témoins et de la souche clinique B' a été observée dès le 14<sup>ème</sup> jour. La souche B' a une CMI  $\leq 25$  mg/L. En revanche les souches C et D n'ont pas poussé sur le tube témoin 1% à pH 6,0 et sur les tubes tests. Chez ces deux souches, une croissance a pu être observée sur les tubes à pH 6,6. Les résultats sont détaillés dans le tableau X.

### 2.3.3 Etude de la sensibilité au pyrazinamide en milieu solide

La méthode en milieu gélosé présente deux différences par rapport à la méthode en milieu liquide : un inoculum plus lourd (dilutions  $10^{-2}$  et  $10^{-4}$  d'une densité équivalente à l'étalon BCG 1 mg/mL versus  $10^6$  UFC pour le milieu liquide) et un pH plus acide (5,5 versus 6,0 pour le milieu liquide). La concentration critique du PZA sur gélose 7H11 est fixée à 50 mg/L [123] et la proportion critique pour cet antituberculeux à 10% [124].

Au cours de cette étude, nous avons rencontré un problème de croissance de la souche témoin sensible et des souches cliniques B', C et D. En effet, seule la souche *M. bovis* BCG CIP 105050 s'est développée à pH 5,5 avec des résultats notables dès le 21<sup>ème</sup> jour. La souche *M. tuberculosis* H37Rv et la souche clinique B' ont rapidement poussé sur la gélose témoin à pH  $6,6 \pm 0,2$ . Lors de la lecture finale, à pH 5,5 sans PZA, on pouvait observer un début de culture pour *M. tuberculosis* H37Rv à la dilution  $10^{-2}$ . Aucune croissance n'a pu être détectée à J42 pour les souches C et D quel que soit le pH. Les résultats sont détaillés dans le tableau X.

Ces résultats et ceux obtenus avec la technique en milieu liquide confirment la difficulté de croissance de ces souches.

Tableau X – Synthèse des résultats obtenus pour l'ensemble des souches étudiées.

NR, non réalisé ; S, sensible ; R, résistant ; Ind, indéterminé par absence de croissance visible.

| SOUCHE            | ESPECE                 | TESTS    |                 |                                |           |                                |           |
|-------------------|------------------------|----------|-----------------|--------------------------------|-----------|--------------------------------|-----------|
|                   |                        | MGIT PZA | Séquençage      | Etude en milieu liquide<br>7H9 |           | Etude en milieu gélosé<br>7H11 |           |
|                   |                        |          |                 | CMI<br>(mg/L)                  | Phénotype | CMI<br>(mg/L)                  | Phénotype |
| H37Rv             | <i>M. tuberculosis</i> | S        | Sauvage         | ≤ 25                           | S         | Ind                            | Ind       |
| BCG CIP<br>105050 | <i>M. bovis</i>        | NR       | 169C>G<br>H57D  | > 1 200                        | R         | > 1 200                        | R         |
| A                 | <i>M. tuberculosis</i> | R        | del116C         | NR : absence de subculture     |           |                                |           |
| B                 | <i>M. tuberculosis</i> | R        | 465G>T<br>V155V | NR : absence de subculture     |           |                                |           |
| B'                | <i>M. tuberculosis</i> | S        | Sauvage         | ≤ 25                           | S         | Ind                            | Ind       |
| C                 | <i>M. africanum</i>    | R        | Sauvage         | Ind                            | Ind       | Ind                            | Ind       |
| D                 | <i>M. tuberculosis</i> | R        | Sauvage         | Ind                            | Ind       | Ind                            | Ind       |

## 2.4 Discussion

Des souches MDR et XDR ont émergé ces dernières années en Asie (Inde, Chine), dans les pays de l'Europe de l'Est et en Afrique du Sud. Les laboratoires de bactériologie équipés d'un secteur mycobactéries doivent donc être en mesure de tester la sensibilité des souches isolées vis-à-vis des antituberculeux de 1<sup>ère</sup> ligne, d'une part dans un objectif d'adaptation thérapeutique et, d'autre part, dans le cadre de la surveillance épidémiologique de la tuberculose.

Le principal écueil de la détermination de la sensibilité des mycobactéries du « complexe *tuberculosis* » par les techniques de routine reste le délai de rendu des résultats. En effet, même si l'antibiogramme en milieu liquide permet de raccourcir ce délai par rapport à celui en milieu solide, 5 à 13 jours sont nécessaires pour connaître la sensibilité d'une souche à la SM, à l'INH, à la RMP et à l'EMB, et 5 à 21 jours pour le PZA. De plus, le risque de contamination de l'inoculum est important du fait de la croissance très lente des mycobactéries comparativement à celle d'éventuels contaminants (bactéries, champignons, levures). Une contrainte supplémentaire est rencontrée dans l'étude de la sensibilité au PZA puisque l'efficacité de cet antituberculeux est conditionnée par l'acidité du milieu. Cette acidité limite la croissance bactérienne et notamment celle de *M. tuberculosis*. A pH 5,5, 10% des isolats de *M. tuberculosis* ne poussent pas et 50% des colonies sont inhibées avec une taille considérablement diminuée par rapport à celle à pH 6,8 [114].

Ces contraintes d'étude phénotypique justifient le développement d'une méthode génotypique permettant l'obtention rapide d'un résultat et non dépendante des conditions particulières de culture.

Au cours de cette étude, la première difficulté a été d'obtenir une subculture des souches cliniques. En effet, deux des souches cliniques détectées résistantes au laboratoire (A et B) n'ont pas pu être obtenues en subcultures et les deux autres (C et D) ont poussé difficilement. Ce problème met en exergue les difficultés de conservation des souches mycobactériennes. Cette difficulté d'obtention de subcultures à partir d'aliquots congelés à -20°C étant récurrente, la nouvelle pratique du laboratoire est une conservation à -80°C en glycérol. En terme de réglementation, il n'existe pas d'obligation de conservation des souches isolées de produits pathologiques. La conservation des mycobactéries de la tuberculose est cependant souhaitable du fait de leur caractère épidémiologique important, et pour l'évaluation de méthode par exemple. De plus, il s'agit de bactéries pathogènes spécifiques impliquées dans des infections graves et, de même que le guide de bonne exécution des analyses impose le

délai de conservation de un an pour les sérums, ce même délai pourrait s'appliquer aux mycobactéries de la tuberculose. Plusieurs conditions de conservation sont proposées dans le référentiel Rémic édité par la SFM [125] : la lyophilisation (peu pratique), la technique de subculture (consommatrice de temps technique, dérives génétiques), la conservation des milieux de culture initiaux (conservation à court terme), la conservation par piqûre en gélose profonde (peu onéreuse, non adaptée aux bactéries fragiles ou d'exigences culturales particulières), et la congélation. La méthode de congélation convient à toutes les souches bactériennes et permet une conservation à long terme en limitant les dérives génétiques. Elle doit être pratiquée en milieu cryoprotecteur tel que le glycérol à 1,2 M à température  $\leq -80^{\circ}\text{C}$  avec un inoculum massif. La congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  permet une bonne conservation pendant environ un an.

Pour revenir à l'objectif principal de notre étude, qui était d'installer au laboratoire une technique de séquençage du gène *pncA*, la première difficulté rencontrée a été de déterminer le couple d'amorces capable d'amplifier la séquence d'intérêt chez les trois espèces de mycobactéries. En effet, l'amplification du gène *pncA* des souches témoins et cliniques était possible quel que soit le couple d'amorces utilisé à l'exception de la souche clinique C (*M. africanum*) qui n'était pas amplifiée avec le couple *pncA* P1'-*pncA* P2'.

L'absence d'amplification du gène *pncA* de la souche clinique C avec le couple *pncA* P1'-*pncA* P2' est vraisemblablement liée à l'impossibilité d'hybridation de l'amorce *pncA* P1'. La souche C présente probablement une modification de séquence sur la zone d'hybridation de cette amorce mais le séquençage ne nous a pas permis de l'affirmer. La détermination d'un nouveau couple d'amorces pour l'amplification et le séquençage de cette région pourrait permettre de lever cette incertitude. Toutefois, aucune mutation n'a été décrite sur cette région (environ 100 pb en amont du codon d'initiation) chez les souches résistantes au PZA répertoriées dans la littérature.

Les mutations retrouvées chez les souches cliniques A (del116C) et B (mutation silencieuse 465G>T soit V155V) n'ont jamais été décrites. La mutation silencieuse de B n'étant pas retrouvée chez B' (isolée chez le même patient un mois après), un typage moléculaire par la méthode MIRU VNTR (Mycobacterial Interspered Repetitive Units Variable Number Tandem Repeat) a été réalisé afin de déterminer si ces deux souches sont différentes. A partir des 5 loci évalués les plus discriminants (MIRU04, ETRA, ETRB, ETRC et QUB26), les résultats ont montré que les souches B et B' présentaient des profils distincts pour 3 loci (MIRU04, ETRA et QUB26). Ces deux isolats sont différents. Le patient hébergeait donc deux populations de *M. tuberculosis*.

La difficulté principale de l'étude génotypique réside dans son interprétation. En effet, seule la présence d'une mutation responsable d'une modification de séquence en acides aminés (modification de la structure protéique) permet de confirmer la résistance d'une souche. Or, même si les mutations du gène *pncA* représentent un mécanisme majeur dans la résistance au PZA (72-98% [60]), d'autres hypothèses ont été démontrées ou formulées pour les souches résistantes présentant une séquence sauvage du gène *pncA* (modification de la cible, mécanisme d'efflux, imperméabilité, gène(s) régulateur(s)). Le séquençage n'est donc pas exhaustif pour la détermination de la sensibilité au pyrazinamide mais a une bonne valeur prédictive puisque l'on peut prédire, à partir des données de la littérature, que 3 souches résistantes sur 4 présentent une mutation sur le gène *pncA*. Cependant, la présence et la nature d'une modification de séquence du gène *pncA* sont relativement mal corrélées au niveau de résistance. Concernant les mutations silencieuses, plusieurs études rapportent qu'elles ne sont pas responsables de résistance au PZA chez *M. tuberculosis* [85,126]. Des études ont été menées afin de montrer d'une part une corrélation entre le degré de perte d'activité enzymatique et le niveau de résistance, et d'autre part, une corrélation entre la localisation des mutations retrouvées et le niveau de résistance des bacilles. Toutes ces études ont retrouvé un lien entre modification de séquence et diminution de l'activité PZase. Il a en effet été démontré que les souches hautement résistantes au PZA (CMI = 900 mg/L) présentaient une mutation et perdaient leur activité PZase, alors que les souches de bas niveau de résistance (CMI = 100-300 mg/L) étaient de séquence sauvage et conservaient une activité enzymatique [82,127,128]. Toutefois, lors d'une étude menée par Clemente et al. [129], 60% des souches mutées pour le gène *pncA* conservaient une activité enzymatique ce qui va à l'encontre de ce qu'ont mentionné les auteurs précédents. Etant donné la grande variabilité dans la conservation ou la perte de l'activité enzymatique, Sheen et al [130] ont suggéré que le niveau de résistance était le fait d'accumulation de plusieurs mécanismes pour la plupart des souches.

Le critère de sensibilité de la méthode n'a pas été abordé au cours de cette étude puisque nous avons travaillé sur des extraits d'ADN génomiques de souches obtenues en culture. Si cette technique venait à être utilisée directement sur un prélèvement (environnement complexe, quantité de mycobactéries et donc de gène *pncA* plus faible), il serait nécessaire de disposer d'une bonne sensibilité et de la réévaluer.

Le second axe de notre étude a consisté en l'étude phénotypique de la sensibilité au PZA en milieux liquide et solide. L'objectif de cette étude était de déterminer les CMI des souches cliniques étudiées et d'en confronter les résultats à ceux de l'étude génotypique. Cependant,

l'étude phénotypique nous a uniquement permis d'obtenir des résultats pour les souches témoins et la souche B' en milieu liquide. Les CMI obtenues pour ces trois souches sont corrélées à ceux du séquençage du gène *pncA*. Pour les souches témoins, les CMI sont cohérentes avec celles mentionnées dans la littérature. Celle de la souche *M. tuberculosis* H37Rv est  $\leq 25$  mg/L (attendue  $< 100$  mg/L), celle de *M. bovis* BCG CIP 105050  $> 1\ 200$  mg/L (attendue  $> 500$  mg/L) soit un niveau de résistance très élevé bien que la mutation H57D n'intéresse pas une région hautement conservée de la protéine (codons 3-17, 61-79 et 132-142) [87,89].

La concentration critique du PZA retenue sur milieu liquide 7H9 semble judicieuse. Aucune étude ne la précise. Nous avons retenu 100 mg/L par analogie au test MGIT PZA et à plusieurs études [82,100]. En effet, au cours d'une étude impliquant 38 souches de *M. tuberculosis* résistantes au PZA testées en Middlebrook 7H9, Scorpio et al. [82] avaient utilisé cette concentration critique. Une étude menée par Syre et al [100] sur 75 souches de *M. tuberculosis* a démontré qu'en utilisant 100 mg/L comme concentration critique, la sensibilité était de 87.5% et la spécificité de 83.7 %.

Il aurait été intéressant de pouvoir investiguer en CMI les souches cliniques A et B présentant une modification de séquence, mais le mode de conservation utilisé au laboratoire ne nous l'a pas permis. Le résultat du test MGIT PZA de la souche A est corrélé à l'étude génotypique. La mutation silencieuse V155V de la souche B ne peut pas être responsable de la résistance phénotypique obtenue avec le test MGIT PZA.

En ce qui concerne l'absence d'obtention de résultats pour les souches cliniques C et D en milieu liquide, la période d'incubation retenue à 28 jours n'était peut être pas suffisante. Pourtant, le délai d'incubation utilisé par Aono et al. au cours de leur étude était de 14 jours [121], celui utilisé par Syre et al. était plus long et fixé à 21 jours [100]. D'après le fabricant, le milieu Middlebrook 7H9 peut être incubé pendant 8 semaines mais une croissance modérée à importante doit être obtenue dans les 21 jours qui suivent l'ensemencement.

Concernant l'étude phénotypique en milieu gélosé, le pH et la composition de la gélose peuvent être incriminés. Ce milieu Middlebrook 7H11 est pourtant préconisé pour la croissance de souches de mycobactéries de culture difficile et de souches résistantes [131]. Les agents qui entrent dans sa composition pour réduire la croissance des contaminants sont incriminés dans l'inhibition de certaines souches de mycobactéries. Contrairement à Sun et al. [89], le protocole utilisé ne nous a pas permis d'obtenir de résultats bien que les recommandations tenant à l'ajustement du pH et à la taille de l'inoculum aient été respectées. Les délais de culture retenus semblent corrects puisque, d'après Gérôme et al. [96], les

souches résistantes doivent pousser sur ce milieu en 14-16 jours alors qu'il faut attendre 42 jours pour les souches sensibles. Les souches témoins et B' ont poussé rapidement sur la gélose témoin tandis que les souches C et D ne se sont pas développées après 42 jours d'incubation quel que soit le pH.

Concernant les performances du test MGIT PZA, plusieurs études ont rapporté des résultats corrélés à la méthode radiométrique et au séquençage [126,127,132]. En revanche, Chedore et al. [133] ont retrouvé des souches faussement résistantes avec le test MGIT PZA par comparaison à la méthode radiométrique, à la détermination de l'activité PZase et à l'étude génotypique. D'après ces auteurs, plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces fausses résistances. Tout d'abord, ils ont mis en cause la quantité de bacilles inoculés. En effet, un inoculum trop lourd est responsable d'une élévation du pH, entraînant l'inefficacité du PZA, et augmente le risque de retrouver un mutant résistant par mutation spontanée. Ensuite, la manière de déposer l'inoculum a été mise en cause du fait de l'utilisation d'une pipette responsable d'une mauvaise distribution des bacilles dans le milieu et entraînant une croissance en amas. Les résistances observées avec la technique MGIT PZA chez les quatre souches A, B, C et D sont critiquables. En effet, mise à part la souche A qui présente une délétion responsable d'une modification de la séquence en acides aminés, l'étude génotypique et le test MGIT PZA ne sont pas corrélés pour les souches B, C et D. La CMI de la souche B n'ayant pas pu être réalisée en raison de l'absence de subculture, et n'étant pas concluante pour les souches C et D, nous ne pouvons pas être certains de la résistance de ces souches. Etant donné le faible pourcentage de souches résistantes par un mécanisme autre qu'une mutation sur le gène *pncA*, il est possible que ces souches catégorisées résistantes par le test MGIT PZA soient de phénotype sensible.



## 2.5 Conclusion

La technique génotypique de détection de mutation sur le gène *pncA* développée est spécifique et permet d'apporter rapidement la confirmation de résistance au pyrazinamide d'une souche de mycobactérie de la tuberculose. Elle ne peut cependant pas se substituer à l'étude phénotypique du fait du faible pourcentage de souches résistantes ayant une séquence sauvage du gène *pncA*. Des investigations à venir chez le « complexe *tuberculosis* » concernant l'identification d'autres cibles, la découverte d'un mécanisme d'efflux, d'imperméabilité voire l'identification de gène(s) régulateur(s) devraient permettre d'augmenter la spécificité de la technique. En attendant, le séquençage du gène *pncA* a sa place en complément de l'antibiogramme. Cette technique de biologie moléculaire reste cependant coûteuse et nécessite un personnel formé et, de ce fait, est réservée à des laboratoires référents.

L'étude phénotypique mise en place a le bénéfice d'apporter des résultats cohérents avec ceux du séquençage lorsqu'une croissance est possible sur ces milieux Middlebrook 7H9 et 7H11 à pH acide. Le mode de conservation par congélation à -20°C, utilisé pour ces souches, ne nous a pas permis d'investiguer plus avant les mécanismes moléculaires de résistance des souches phénotypiquement résistantes. Les problèmes rencontrés viennent confirmer les difficultés de culture des mycobactéries et d'étude de la sensibilité au pyrazinamide. L'étude en milieu gélosé ne peut pas être appliquée en routine du fait des difficultés de croissance rencontrées. L'étude phénotypique de détermination des CMI en milieu liquide peut être intéressante en complément du test MGIT PZA chez des souches de phénotype résistant.

## BIBLIOGRAPHIE

1. CARBONNELLE B, DAILLOUX M, LEBRUN L, MAUGEIN J, PERNOT C. Mycobactéries Mycobactérioses. Cahier de formation biologie médicale N°29, Bioforma, Paris, 2003, 157 p.
2. PANTEIX G, GUTIERREZ MC, BOSCHIROLI ML, ROUVIERE M, PLAIDY A, PRESSAC D, et al. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti* : a study of six recent cases in France. Journal of Medical Microbiology, 2010, 59, 984-989.
3. COMITÉ NATIONAL D'ÉLABORATION DU PROGRAMME DE LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE. Programme de lutte contre la tuberculose en France 2007-2009. Ministère de la Santé, de la jeunesse et des sports, Paris, 2007, 72 p.
4. ANTOINE D, CHE D. Les cas de tuberculose maladie déclarés en France en 2007. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 2009, 12-13, p. 106-109.
5. RÉSEAU NATIONAL DE SANTÉ PUBLIQUE. L'infection VIH en France : tendances et caractéristiques actuelles. Journée Mondiale sur le Sida du 1<sup>er</sup> décembre 1996.
6. OMS. Traitement antirétroviral de l'infection à VIH chez l'adulte et l'adolescent en situation de ressources limitées : vers un accès universel. Recommandations pour une approche de santé publique - Version 2006. Geneva, WHO, 2008.
7. OMS. Stratégie Halte à la tuberculose. Geneva, WHO, 2006.
8. OMS. Global tuberculosis control 2009 : epidemiology, strategy, financing. Geneva, WHO, 2009.
9. OMS. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB) : 2010 global report on surveillance and response. Geneva, WHO, 2010.
10. OMS Europe. Plan to Stop TB in 18 High-priority Countries in the WHO European Region, 2007–2015. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2007.
11. OMS Europe. DOTS Expansion Plan to Stop TB in the WHO European Region 2002–2006. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2002.
12. ECDC, OMS Europe. Tuberculosis surveillance in Europe 2008. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control, 2010.
13. Fiche de déclaration des issues de traitement anti tuberculeux.  
<http://www.invs.sante.fr/surveillance/tuberculose/Fiche%20de%20d%C3%A9claration%20des%20issues%20de%20traitement%20anti%20tuberculeux.pdf>  
 (consulté le 28/08/2010)
14. Fiche de déclaration obligatoire de la tuberculose  
[http://www.invs.sante.fr/surveillance/mdo/fiches/fiche\\_tuberculose.pdf](http://www.invs.sante.fr/surveillance/mdo/fiches/fiche_tuberculose.pdf)  
 (consulté le 28/08/2010)
15. Document d'information concernant les modifications de 2007 de la déclaration obligatoire de la tuberculose. InVS, 2010.

16. DENIS F, PERRONNE C. *Mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques. Elsevier, Paris, 2004, 298 p.
17. ANTOINE D, CHE D. Epidémiologie de la tuberculose en France : bilan des cas déclarés en 2008. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 2010, 27-28, p. 289-293.
18. ANTOINE D, CHE D. Les cas de tuberculose maladie déclarés en France en 2006. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 2008, 10-11, p. 69-72.
19. Calendrier des vaccinations et recommandations vaccinales 2009 selon l'avis du Haut conseil de la santé publique. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 2009, 16-17, 145-176.
20. PERRONNE C. Tuberculose pulmonaire et primo-infection tuberculeuse. In Maladies infectieuses, tome 1. PERRONNE C, Doin, Paris, 1999, 279-285.
21. AMERICAN THORACIC SOCIETY AND CDC. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2000, 161, 1376-1395.
22. BEH numéro spécial (janvier 1997). Tuberculose : traitement et prévention.
23. CDC. Tuberculin Skin Testing for TB. 2010.  
<http://www.cdc.gov/tb> (consulté le 25/07/2010)
24. PAI M, RILEY LW, COLFORD JM. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis : a systematic review. Lancet Infectious Diseases, 2004, 4, 761-776.
25. CDC. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2000, 49(No.RR-6).
26. CDC. General Information about TB Blood Tests. 2010.  
<http://www.cdc.gov/tb> (consulté le 26/07/2010)
27. CDC. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2010, 59(No.RR-5).
28. JAFARI C, ERNST M, KALSDORF B, GREINERT U, DIEL R, KIRSTEN D et al. Rapid Diagnosis of Smear-negative Tuberculosis by Bronchoalveolar Lavage Enzyme-linked Immunospot. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2006, 174, 1048-1054.
29. PAI M, KALANTRI S, DHEDA K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis : Part I. Latent tuberculosis. Expert Revue of Molecular Diagnostics, 2006, 6, 413-422.
30. T-SPOT®.TB - Detecting Tuberculosis infection - bioMérieux Clinical Diagnostics  
[http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_15](http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL_CLN_PRD_G_PRD_CLN_15) (consulté le 28/08/2010).
31. FR France QFT IT

<http://www.cellestis.com/irm/content/pdf/FR%20France%20QFT%20IT%20Package%20insert%20C.pdf> (consulté le 28/08/2010)

32. HAS. Test de détection de la production d'interféron  $\gamma$  pour le diagnostic des infections tuberculeuses. 2006.  
<http://www.has-sante.fr> (consulté le 22/07/2010)
33. CRUAUD P. La tuberculose : les réponses humorales, vers un sérodiagnostic ? *Médecine et Maladies Infectieuses*, 1996, 26, 898-903.
34. SANCHEZ-RODRIGUEZ C, ESTRADA-CHAVEZ C, GARCIA-VIGIL J, LAREDO-SANCHEZ F, HALABE-CHEREM J, PEREIRA-SUAREZ A et al. An IgG antibody response to the antigen 85 complex is associated with good outcome in Mexican Totonaca Indians with pulmonary tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2002, 6, 706-712.
35. BOTHAMLEY GH, RUDD RM. Clinical evaluation of a serological assay using a monoclonal antibody (TB72) to the 38 kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *The European Respiratory Journal*, 1994, 7, 240-246.
36. AMICOSANTE M, BARNINI S, CORSINI V, PAONE G, READ CA, TARTONI PL et al. Evaluation of a novel tuberculosis complex-specific 34 kDa protein in the serological diagnosis of tuberculosis. *The European Respiratory Journal*, 1995, 8, 2008-2014.
37. ROVATTI E, CORRADI MP, AMICOSANTE M, TARTONI PL, PANINI W, ANCORA A et al. Evaluation of a western blot serum test for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *The European Respiratory Journal*, 1996, 9, 288-292.
38. BUTT T, MALIK HS, ABBASSI SA, AHMAD RN, MAHMOOD A, KARAMAT KA et al. Genus and species-specific IgG and IgM antibodies for pulmonary tuberculosis. *Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan*, 2004, 14, 105-107.
39. DEMKOW U, ZIELONKA TM, NOWAK-MISIAK M, FILEWSKA M, BIALAS B, STRZALKOWSKI J et al. Humoral immune response against 38-kDa and 16-kDa mycobacterial antigens in bone and joint tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2002, 6, 1023-1028.
40. SHIN SJ, KIM S, SHIN A, KIM H, CHO S, PARK J. Identification of Rv2041c, a novel immunogenic antigen from *Mycobacterium tuberculosis* with serodiagnostic potential. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2009, 70, 457-464.
41. KHOMENKO AG, BAYENSKY AV, CHERNOUSOVA LN, KULIKOVSKAYA NV, DEMIANENKO NV, LITVINOV VI. Serodiagnosis of tuberculosis : detection of mycobacterial antibodies and antigens. *Tubercle and Lung Disease*, 1996, 77, 510-515.
42. POTTUMARTHY S, WELLS VC, MORRIS AJ. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38, 2227-2231.
43. D'ALESSANDRO A, DE WAARD JH. Evaluation of two commercial tests for the serodiagnosis

- of pulmonary tuberculosis. *Revista Chilena De Infectología*, 2008, 25, 37-40.
44. L'examen microscopique de BAAR. Programme de formation en techniques de laboratoire.  
<http://wwwn.cdc.gov/dls/afb/french/french.pdf> (consulté le 29/07/2010).
  45. SFM. Mycobactéries. In Rémic : Vivactis Plus Ed, 2007, 147-154.
  46. MARTIN ME, HORTON CL, SHEFFNER AL, SALOMON JD. Direct Comparison of the N-Acetyl-L-Cysteine-Sodium Hydroxide and the Trisodium Phosphate Digestion Methods for the Culture of Mycobacteria. *Applied Microbiology*, 1968, 16, 506-508.
  47. Tuberculose. Techniques de diagnostic en mycobactériologie.  
<http://www.mycobacterie.fr/index.htm> (consulté le 26/08/2010).
  48. MARTIN C, DENIS F. Mycobactéries. In *Bactériologie Médicale Techniques usuelles* DENIS F, PLOY MC, MARTIN C, BINGEN E, QUENTIN R, Masson, 2007, 467-489.
  49. KIM TC, BLACKMAN RS, HEATWOLE KM, KIM T, ROCHESTER DF. Acid-fast bacilli in sputum smears of patients with pulmonary tuberculosis. Prevalence and significance of negative smears pretreatment and positive smears post-treatment. *The American Review of Respiratory Disease*, 1984, 129, 264-268.
  50. API TB Consensus Guidelines 2006 : Management of pulmonary tuberculosis, extra-pulmonary tuberculosis and tuberculosis in special situations. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 2006, 54, 219-234.
  51. LEI B, WEI C, TU S. Action Mechanism of Antitubercular Isoniazid. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275, 2520 -2526.
  52. ARGYROU A, VETTING MW, BLANCHARD JS. New Insight into the Mechanism of Action of and Resistance to Isoniazid. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129, 9582-9583.
  53. Dorosz. *Guide pratique des médicaments*. 24 éd. Maloine, 2004, 1876p.
  54. MITCHISON DA. Role of individual drugs in the chemotherapy of tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2000, 4, 796-806.
  55. KARAKOUSIS PC, WILLIAMS EP, BISHAI WR. Altered expression of isoniazid-regulated genes in drug-treated dormant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 61, 323-331.
  56. VAN DEN BOOGAARD J, KIBIKI GS, KISANGA ER, BOEREE MJ, AARNOUTSE RE. New drugs against tuberculosis: problems, progress, and evaluation of agents in clinical development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53, 849-862.
  57. DIACON AH, PATIENTIA RF, VENTER A, HELDEN PD, SMITH PJ, McILLERON H et al. Early Bactericidal Activity of High-Dose Rifampin in Patients with Pulmonary Tuberculosis

- Evidenced by Positive Sputum Smears. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51, 2994-2996.
58. JAYARAM R, GAONKAR S, KAUR P, SURESH BL, MAHESH BN, JAYASHREE et al. Pharmacokinetics-Pharmacodynamics of Rifampin in an Aerosol Infection Model of Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47, 2118-2124.
  59. MARIGOT-OUTTANDY D, PERRONNE C. Les nouveaux antituberculeux. *Réanimation*, 2009, 18, 334-342.
  60. ZHANG Y, MITCHISON D. The curious characteristics of pyrazinamide : a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2003, 7, 6-21.
  61. GU P, CONSTANTINO L, ZHANG Y. Enhancement of the antituberculosis activity of weak acids by inhibitors of energy metabolism but not by anaerobiosis suggests that weak acids act differently from the front-line tuberculosis drug pyrazinamide. *Journal of Medical Microbiol*, 2008, 57, 1129-1134.
  62. ZHANG Y, WADE MM, SCORPIO A, ZHANG H, SUN Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52, 790-795.
  63. LIU L, XU Y, SHEA C, FOWLER JS, HOOKER JM, TONGE PJ. Radiosynthesis and bioimaging of the tuberculosis chemotherapeutics isoniazid, rifampicin and pyrazinamide in baboons. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53, 2882-2891.
  64. ELLARD G. Absorption, metabolism and excretion of pyrazinamide in man. *Tubercle*, 1969, 50, 144-158.
  65. HEIFETS LB, FLORY MA, LINDHOLM-LEVY PJ. Does pyrazinoic acid as an active moiety of pyrazinamide have specific activity against *Mycobacterium tuberculosis*? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1989, 33, 1252-1254.
  66. GUMBO T, SIYAMBALAPITIYAGE DONA CSW, MEEK C, LEFF R. Pharmacokinetics-Pharmacodynamics of Pyrazinamide in a Novel In Vitro Model of Tuberculosis for Sterilizing Effect : a Paradigm for Faster Assessment of New Antituberculosis Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53, 3197-3204.
  67. SRIVASTAVA S, GARG A, AYYAGARY A, NYATI K, DHOLE T, DWIVEDI S. Nucleotide Polymorphism Associated with Ethambutol Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Microbiology*, 2006, 53, 401-405.
  68. VEZIRIS N, CAMBAU E, SOUGAKOFF W, ROBERT J, JARLIER V. Résistance aux antituberculeux. *Archives de Pédiatrie*, 2005, 12(Supplement 2), S102-S109.
  69. JEHL F, CHOMARAT M, WEBER M, GERARD A. De l'antibiogramme à la prescription. 2 éd. Biomérieux, 2003, 136 p.
  70. MDLULI K, MA Z. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase as a target for drug discovery. *Infectious Disorders Drug Targets*, 2007, 7, 159-168.

71. Recommandations de la Société de Pneumologie de Langue Française sur la prise en charge de la tuberculose en France. *Revue des Maladies Respiratoires*, 2004, 21, 3S5-3S11.
72. HUGONNET JE, BLANCHARD JS. Irreversible Inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -lactamase by Clavulanate. *Biochemistry*, 2007, 46, 11998-12004.
73. HUGONNET JE. Une thérapie prometteuse contre les souches ultrarésistantes de *M. tuberculosis*. *Médecine Sciences*, 2009, 25, 661-663.
74. GUPTA R, LAVOLLAY M, MAINARDI J, ARTHUR M, BISHAI WR, LAMICHHANE G. The *Mycobacterium tuberculosis* protein LdtMt2 is a nonclassical transpeptidase required for virulence and resistance to amoxicillin. *Nature Medicine*, 2010, 16, 466-469.
75. HUGONNET JE, TREMBLAY LW, BOSHOF HI, BARRY CE, BLANCHARD JS. Meropenem-Clavulanate Is Effective Against Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 2009, 323, 1215-1218.
76. Epidemiology and Treatment of Multidrug Resistant Tuberculosis: Programmatic Management of MDR-TB.  
[http://www.medscape.com/viewarticle/581866\\_3](http://www.medscape.com/viewarticle/581866_3) (consulté le 1/08/2010).
77. ZHANG H, DENG J, BI L, ZHOU Y, ZHANG Z, ZHANG C et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* nicotinamidase/pyrazinamidase. *FEBS Journal*, 2008, 275, 753-762.
78. SCORPIO A, ZHANG Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nature Medicine*, 1996, 2, 662-667.
79. CHENG SJ, THIBERT L, SANCHEZ T, HEIFETS L, ZHANG Y. *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44, 528-532.
80. HIRANO K, TAKAHASHI M, KASUMI Y, FUKASAWA Y, ABE C. Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease*, 1997, 78, 117-122.
81. SOMOSKOVI A, DORMANDY J, PARSONS LM, KASWA M, GOH KS, RASTOGI N et al. Sequencing of the *pncA* Gene in Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex Has Important Diagnostic Applications : Identification of a Species-Specific *pncA* Mutation in *Mycobacterium canettii* and the Reliable and Rapid Predictor of Pyrazinamide Resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45, 595-599.
82. SCORPIO A, LINDHOLM-LEVY P, HEIFETS L, GILMAN R, SIDDIQI, CYNAMON M et al. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium*



- tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997, 41, 540-543.
83. SREEVATSAN S, PAN X, ZHANG Y, KREISWIRTH BN, MUSSEY JM. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1997, 41, 636-640.
  84. MESTDAGH M, FONTEYNE PA, REALINI L, ROSSAU R, JANNES G, MIJS W et al. Relationship between Pyrazinamide Resistance, Loss of Pyrazinamidase Activity, and Mutations in the *pncA* Locus in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 43, 2317-2319.
  85. JUREEN P, WERNGREN J, TORO J, HOFFNER S. Pyrazinamide Resistance and *pncA* Gene Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52, 1852-1854.
  86. LEMAITRE N, SOUGAKOFF W, TRUFFOT-PERNOT C, JARLIER V. Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase PncA. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 43, 1761-1763.
  87. SUN Z, SCORPIO A, ZHANG Y. The *pncA* gene from naturally pyrazinamide-resistant *Mycobacterium avium* encodes pyrazinamidase and confers pyrazinamide susceptibility to resistant *M. tuberculosis* complex organisms. Microbiology (Reading, Engl.), 1997, 143, 3367-3373.
  88. ZHANG Y, SCORPIO A, NIKAIDO H, SUN Z. Role of Acid pH and Deficient Efflux of Pyrazinoic Acid in Unique Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide. The Journal of Bacteriology 1999, 181, 2044-2049.
  89. SUN Z, ZHANG Y. Reduced Pyrazinamidase Activity and the Natural Resistance of *Mycobacterium kansasii* to the Antituberculosis Drug Pyrazinamide. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, 43, 537-542.
  90. VIVEIROS M. Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. International Journal of Antimicrobial Agents, 2003, 22, 274-278.
  91. HO IY, CHAN CY, CHENG AFB. Aminoglycoside Resistance in *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *Mycobacterium fortuitum* : Are Aminoglycoside-Modifying Enzymes Responsible? Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2000, 44, 39-42.
  92. ALANGADEN GJ, MANAVATHU EK, VAKULENKO SB, ZVONOK NM, LERNER SA. Characterization of fluoroquinolone-resistant mutant strains of *Mycobacterium tuberculosis* selected in the laboratory and isolated from patients. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995, 39, 1700-1703.
  93. WEBSTER D, LONG R, SHANDRO C, PETTIPAS J, LEBLANC J, DAVIDSON R et al. Fluoroquinolone resistance in renal isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. The International Journal of

Tuberculosis and Lung Disease, 2010, 14, 217-222.

94. GUILLEMIN I, JARLIER V, CAMBAU E. Correlation between Quinolone Susceptibility Patterns and Sequences in the A and B Subunits of DNA Gyrase in Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42, 2084-2088.
95. POOLE K. Efflux-Mediated Resistance to Fluoroquinolones in Gram-Positive Bacteria and the Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44, 2595-2599.
96. GÉRÔME P, FABRE M, KOECK J. Les méthodes d'étude de la sensibilité de *Mycobacterium tuberculosis* aux antibiotiques. *Revue Française des Laboratoires*, 2003, 2003, 65-74.
97. PALOMINO JC, MARTIN A, VON GROLL A, PORTAELS F. Rapid culture-based methods for drug-resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 75, 161-166.
98. WAYNE LG.. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *American Review of Respiratory Disease*, 1974, 109, 147-151.
99. MARTIN A, CUBILLOS-RUIZ A, VON GROLL A, DEL PORTILLO P, PORTAELS F, PALOMINO JC. Nitrate reductase assay for the rapid detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 61, 123-127.
100. SYRE H, OVREAS K, GREWAL HMS. Determination of the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide in liquid and solid media assessed by a colorimetric nitrate reductase assay. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65, 704-712.
101. ZHANG Y, PERMAR S, SUN Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of Medical Microbiology*, 2002, 51, 42-49.
102. SYRE H, PHYU S, SANDVEN P, BJORVATN B, GREWAL HMS. Rapid Colorimetric Method for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Isoniazid and Rifampin in Liquid Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41, 5173-5177.
103. PALOMINO J, MARTIN A, CAMACHO M, GUERRA H, SWINGS J, PORTAELS F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46, 2720-2722.
104. MARTIN A, TAKIFF H, VANDAMME P, SWINGS J, PALOMINO JC, PORTAELS F. A new rapid and simple colorimetric method to detect pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using nicotinamide. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 58, 327-331.
105. SEKIGUCHI J, NAKAMURA T, MIYOSHI-AKIYAMA T, KIRIKAE F, KOBAYASHI I, AUGUSTYNOWICZ-KOPEC E et al. Development and Evaluation of a Line Probe Assay for Rapid Identification of pncA Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium*

- tuberculosis* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45, 2802-2807.
106. GARCIA DE VIEDMA D, DEL SOL DIAZ INFANTES M, LASALA F, CHAVES F, ALCALA L, BOUZA E. New Real-Time PCR Able To Detect in a Single Tube Multiple Rifampin Resistance Mutations and High-Level Isoniazid Resistance Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40, 988-995.
  107. ESPASA M, GONZALES-MARTIN J, ALCAIDE F, ARAGON LM, LONCA J, MANTEROLA JM et al. Direct detection in clinical samples of multiple gene mutations causing resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampicin using fluorogenic probes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 55, 860-865.
  108. SHEEN P, MENDEZ M, GILMAN RH, PENA L, CAVIEDES L, ZIMIC MJ et al. A sputum PCR-SSCP test for same-day detection of pyrazinamide resistance in tuberculosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47, 2937-2943.
  109. COOKSEY RC, MORLOCK GP, HOLLOWAY BP, LIMOR J, HEPBURN M. Temperature-Mediated Heteroduplex Analysis Performed by Using Denaturing High-Performance Liquid Chromatography To Identify Sequence Polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40, 1610-1616.
  110. BROWN TJ, TANSEL O, FRENCH GL. Simultaneous identification and typing of multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by analysis of *pncA* and *rpoB*. *Journal of Medical Microbiology*, 2000, 49, 651-656.
  111. HEIFETS L, LINDHOLM-LEVY P. Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. *The American Review of Respiratory Disease*, 1992, 145, 1223-1225.
  112. MACKANESS GB. The intracellular activation of pyrazinamide and nicotinamide. *American Review of Tuberculosis*, 1956, 74, 718-728.
  113. HEIFETS L, HIGGINS M, SIMON B. Pyrazinamide is not active against *Mycobacterium tuberculosis* residing in cultured human monocyte-derived macrophages. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2000, 4, 491-495.
  114. BUTLER WR, KILBURN JO. Improved method for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *Journal of Clinical Microbiology*, 1982, 16, 1106-1109.
  115. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv complete genome  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/38490288?from=209978&to=210538&report=gbwithparts> (consulté le 1/07/2010).
  116. *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2, complete genome  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=nucleotide&dopt=GenBank&RID=1CK1JJ6E01N&log%24=nuclalign&blast\\_rank=7&list\\_uids=121491530](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=nucleotide&dopt=GenBank&RID=1CK1JJ6E01N&log%24=nuclalign&blast_rank=7&list_uids=121491530) (consulté le 14/07/2010).

117. <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Mycobacterium/africanum/MAF.dbs> (consulté le 14/07/2010)
118. Multiple Sequence Alignment - CLUSTALW  
<http://align.genome.jp/>
119. Primer3 Input (version 0.4.0)  
<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
120. Nucleotide BLAST  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
121. AONO A, HIRANO K, HAMASAKI S, ABE C. Evaluation of BACTEC MGIT 960 PZA medium for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide (PZA) : compared with the results of pyrazinamidase assay and Kyokuto PZA test. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2002, 44, 347-352.
122. GUO M, SUN Z, ZHANG Y. *Mycobacterium smegmatis* Has Two Pyrazinamidase Enzymes, PncA and PzaA. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182, 3881-3884.
123. Azay-Mycobactéries. Mode opératoire Antibiogramme des mycobactéries.  
<http://azaymycobacteries.free.fr/GBEA/MO006.pdf> (consulté le 22/06/2010).
124. GUMBO T. New Susceptibility Breakpoints for First-Line Antituberculosis Drugs Based on Antimicrobial Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Science and Population Pharmacokinetic Variability. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54, 1484-1491.
125. SFM. Conservation des souches bactérienes. In Rémic : Vivactis Plus Ed, 2007, 217-219.
126. SHENAI S, RODRIGUES C, SADANI M, SUKHADIA N, MEHTA A. Comparison of phenotypic and genotypic methods for pyrazinamide susceptibility testing. *The Indian Journal of Tuberculosis*, 2009, 56, 82-90.
127. PFYFFER GE, PALICOVA F, RUSCH-GERDES S. Testing of Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Pyrazinamide with the Nonradiometric BACTEC MGIT 960 System. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40, 1670-1674.
128. BUTLER WR, KILBURN JO. Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide and its relationship to pyrazinamidase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1983, 24, 600-601.
129. CLEMENTE WT, SOARES LIMA SS, PALACI M, SILVA MS, SUMNIENSKI RODRIGUES VF, DALLA COSTA ER et al. Phenotypic and genotypic characterization of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008, 62, 199-204.

130. SHEEN P, FERRER P, GILMAN RH, LOPEZ-LLANO J, FUENTES P, VALENCIA E et al. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2009, 89, 109-113.
131. BD - Diagnostic Systems: Middlebrook 7H10 // Middlebrook 7H10 Agar <http://www.bd.com/ds/productCenter/295964.asp> (consulté le 6/07/2010).
132. KONTOS F, NICOLAOU S, KOSTOPOULOS C, GITTI Z, PETINAKI E, MANIATI M et al. Multicenter evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide: comparison with the radiometric Bactec 460TB system. Journal of Microbiological Methods, 2003, 55, 331-333.
133. CHEDORE P, BERTUCCI L, WOLFE J, SHARMA M, JAMIESON F. Potential for erroneous results indicating resistance when using the Bactec MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48, 300-301.

## SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

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

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

- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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

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