

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



FACULTE DE MEDECINE, PHARMACIE ET ODONTOLOGIE

Année: 2015

Numéro : 001

ANALYSE DES RESISTANCES PHENOTYPIQUE ET GENOTYPIQUE DES SOUCHES DU COMPLEXE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLEES A L'HOPITAL ARISTIDE LEDANTEC EN 2012.

MEMOIRE DE MASTER II

Spécialité : MICROBIOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE

Présenté et soutenu

Le 18 Décembre 2015

Par :

Carine Laurence YEHOUENOU

Devant le jury composé de :

	Prénoms	Nom	Grade
Président	Cheikh Saad	BOYE	Professeur
Membres	Coumba Touré	KANE	Professeur
	Halimatou Diop	NDIAYE	Maître de conférences agrégé
Directeur de Mémoire	Aïssatou Gaye	DIALLO	Professeur

Dédicaces

Je dédie ce travail à Dieu le père sans qui aucune œuvre n'est possible sur terre.

A mon père Séverin ANAGONOU YEHOUENOU

Tu as toujours été mon modèle et malgré ta grande rigueur, je ne suis pas sûre d'être aussi brillante que toi. Ce travail est le tien. Compte sur ma détermination sans faille de ne pas te décevoir.

A ma mère Rita D'ALMEIDA YEHOUENOU

Aucun enfant ne réussit sans le soutien de sa mère. Tu as toujours été là quand papa était dans les avions. De la première dictée matinale à la lecture de ma thèse de médecine, tu n'as jamais manqué de mots pour m'encourager. Merci maman chérie tu restes ma préférée.

A Claudia, Ephrem et Anicet YEHOUENOU pour votre soutien indéfectible

A mon gros bébé Dr Honoré FATON

Merci pour ta très grande patience. Puisse l'éternel nous unir d'avantage.

Au personnel du service de Bactériologie de l'hôpital Aristide Le Dantec dont la disponibilité m'a aidé à réaliser ce travail en particulier Mme Awa Ndiaye DIAWARA, Mme Mame Yacine FALL NIANG, Mr Aliou THIAM.

A Gédéon OSSOGA

Comme un grand frère tu as toujours été là, ne ménageant aucun effort pour porter de l'aide. Des remarques les plus simples aux plus pertinentes tu as fait de ce travail celui de ta petite sœur merci infiniment.

Remerciements

A notre maitre et directrice de mémoire Professeur Aissatou GAYE DIALLO d'avoir accepté de coordonner ce travail.

A notre codirectrice **Docteur Awa BA DIALLO** qui n'a ménagé aucun effort pour se rendre disponible

Au **professeur Souleymane MBOUP**, plus qu'un tuteur vous avez été toujours présent Merci infiniment

A nos honorables membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail

Liste des Abréviations

BK Bacille de Koch

FDA Food and Drug Administration

TB: Tuberculose

MDR: Multi Drug Resistance

TB-MDR: Multi Drug Resistance Tuberculosis

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PNT : Programme Nationale de lutte contre la Tuberculose

ADN : Acide Désoxynucléique

PCR Polymérase Chain Réaction

DOT : Directly observed treatment

HALD : Hôpital Aristide LE DANTEC

LBV : Laboratoire de Bactériologie Virologie

BCG : Bacille de Calmette et Guerin

PCR: Polymerase Chain Reaction

PZA: Pyrazinamide

EMB : Ethambutol

INH: Isoniazide

RIF: Rifampicine

MGIT: Mycobacterium Grow Indicator Tube

XDR : Extensevely Drug Resistance

ZN : Coloration de Ziehl Nielsen

ARN : Acide Ribonucléique

Kat G : Gene de la catalase peroxydase

Rpo B : Gene de la sous unité bêta de la polymérase virale

UITMR : Union Internationale contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires

SIRE : Streptomycine Isoniazide Rifampicine Ethambutol

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Analyse des échantillons par cas diagnostiqué

Tableau 2 : Analyse de la sensibilité phénotypique selon le type d'antibiotique testé

Tableau 3 : Répartition du type de résistance en fonction de l'âge

Tableau 4 : Test de sensibilité génotypique aux antituberculeux majeurs et répartition par tranche d'âge, par cas diagnostiqué et par sexe.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Classification schématique des mycobactéries selon Schinnick et Good (1994)

Figure 2 : Schéma du *Mycobacterium tuberculosis* en microscopie électronique à balayage

Figure 3 : Génome du H37Rv

Figure 4 : MDR dans le monde selon l'OMS chez les nouveaux patients

Figure 5 : Automate BD BACTEC MGIT

Figure 6 : Exemple de lecture de bandelettes MTBDRplus

Table des matières

Dédicaces	I
Remerciements	II
Liste des Abréviations	III
INTRODUCTION	1
GENERALITES SUR LES MYCOBACTERIES	4
1. Historique (4).....	4
2. Définition et classification (3).....	4
3. Caractères bactériologiques du complexe <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
3.1 Etude microscopique	6
o Coloration de Ziehl-Nielsen.....	6
o Coloration à l'auramine.....	7
3.2. Culture sur milieu solide.....	7
3.3. Culture sur milieu Liquide	8
3.4. Génome bactérien	9
3.5. Résistance aux agents physiques et chimiques.....	10
5. Pouvoir pathogène	13
❖ Physiopathologie	13
6. Les Antituberculeux [44, 45].....	13
6.1. Mécanismes d'action des antituberculeux de première ligne	13
6.2. Schéma thérapeutique.....	14
6.3. Résistance aux antituberculeux [6, 22]	14
6.3.1. Résistance naturelle	14
6.3.2. Résistance primaire	15
6.3.3. Résistance acquise	15
6.3.4. Mécanisme et gènes de la résistance	15
6.3.5. Diagnostic de la tuberculose résistante aux antituberculeux	17
6.3.5.1. Techniques phénotypiques.....	17
➤ Génotype MTBDRplus	20
2. CADRE D'ETUDE	22
2.1. Justificatifs.....	22
2.2. Laboratoire de Bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec de Dakar	22
3. METHODOLOGIE	23
3.1. Population d'étude	23
3.2. Echantillonnage	23

3.3. Traitement des prélèvements et mis en culture	23
3.4.. Génotype MTBDRplus	23
3.4.2. Amplification de l'ADN	24
3.4.3. Hybridation	24
3.5. ANALYSE DES DONNEES	26
4. RESULTATS.....	27
4.1. Analyse de la Population d'étude et des souches isolées par cas diagnostiqués.....	27
4.4. Répartition des souches multirésistantes en fonction de la tranche d'âge	28
4.5. Répartition des patients en fonction des résistances génotypiques, de l'âge, du sexe et des cas diagnostiqués.	29
5. DISCUSSION.....	30
6. CONCLUSION.....	35
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	37

INTRODUCTION

Troisième cause de décès dans le monde, la tuberculose (TB) reste un problème majeur de santé publique. Selon le rapport 2014 de l’OMS, 9 millions de personnes l’ont contractée dans le monde et plus d’un million en sont décédées [1]. Un tiers des cas de tuberculose survient sur le continent africain et précisément dans les pays en développement. Au Sénégal, 13 515 cas ont été déclarés en 2013 [2]. Même si la tuberculose représente la huitième grande cause de décès dans les pays à revenu faible et intermédiaire, elle reste une maladie curable dans la majorité des cas. En utilisant des associations de médicaments (streptomycine (SM), isoniazide (INH), rifampicine (RMP), éthambutol (EMB) et pyrazinamide (PZA), près de 90% des patients qui ont une tuberculose sensible aux antituberculeux peuvent être guéris en six mois (2). Bien que les modalités cliniques et thérapeutiques de la TB soient connues, l’émergence de la TBMDR n’est pas rare.

En effet, la tuberculose multirésistante (TB-MR) dont la prévalence semble augmenter dans le monde, représente une des menaces les plus sérieuses pour le contrôle de la tuberculose. Son traitement même s’il est disponible, fait appel à des médicaments dits de seconde ligne, moins efficaces, plus toxiques et dure plus longtemps que le traitement standard à germes sensibles. En outre, les malades atteints de TB-MR peuvent rester contagieux plus longtemps que les autres et transmettre le germe à leur entourage pendant une période plus longue. [6] La TB-MR est une forme de tuberculose causée par un bacille qui résiste à la fois à l’isoniazide et à la rifampicine, deux antituberculeux de première intention. Cette résistance résulte d’un traitement inapproprié ou d’une prise incorrecte des antituberculeux. Dans le monde, plus de 450.000 nouveaux cas de TB-MR ont été notifiés [1]. L’ampleur du problème est variable d’un pays à un autre. Le Sénégal quant à lui dénombrait en 2013, 680 cas de TB-XDR/MR confirmés au laboratoire [2]. La connaissance des bases moléculaires d’acquisition de ces résistances chez *M. tuberculosis* permettrait leur dépistage précoce pour la mise en place d’un traitement adapté.

Par ailleurs, même s’il existe un traitement pour cette TB-MR, à peine la moitié des patients en sont guéris [1]. L’OMS estime que les formes pharmaco-résistantes de la TB constituent une crise sanitaire mondiale négligée. C’est pour y remédier que des techniques de typage moléculaire, basées sur le polymorphisme de certains gènes, ont été mises au point pour identifier plus précisément les mycobactéries, et pour accélérer la détection des résistances

aux antibiotiques. Au nombre de ces techniques de typage le génotype MTBDR plus nous a permis de caractériser les gènes de résistance au sein de la population. Après avoir défini les caractéristiques actuelles de la tuberculose multirésistante, la présente étude présentera les caractéristiques phénotypiques et génotypiques des gènes de résistance observées en 2012 à l'hôpital Aristide Le Dantec.

Pour y arriver nous nous sommes fixés les objectifs suivants:

Objectif général

Caractériser les gènes de résistance des souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées au HALD durant l'année 2012.

Objectifs spécifiques

- Tester la sensibilité phénotypique et génotypique des souches de *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux.

- Faire une comparaison entre les résultats obtenus avec les méthodes phénotypiques (MGIT 960) et les méthodes génotypiques (Génotype MTBDR plus).

GENERALITES SUR LES MYCOBACTERIES

1. Historique (4)

La tuberculose est une maladie très ancienne dont l'évolution semble avoir suivi celle de l'homme. Elle est connue depuis des milliers d'années. On a d'ailleurs pu identifier des séquelles de cette maladie sur des momies égyptiennes. Les Grecs nommaient la tuberculose "**phtisie**". Si elle avait déjà été très bien décrite du temps d'Hippocrate, il a fallu attendre 1882 pour que **Robert KOCH** découvre le microbe responsable de cette terrible maladie dont on connaissait par ailleurs le caractère contagieux. Il a été dénommé **bacille de KOCH**. La tuberculose devient un véritable fléau à la fin du 18^{ème} et au début du 19^{ème} siècle. A cette époque, la cure hygiéno-diététique et le repos dans des établissements spécialisés (sanatoriums) étaient la seule chance de guérison pour les tuberculeux car il n'existait pas encore de traitement médicamenteux (4). En 1924 Albert CALMETTE et Camille GUERIN mettent au point un vaccin contre la tuberculose reposant sur l'injection de bacilles tuberculeux vivants mais de virulence atténuée appelé **BCG** [4]. En 1944, **S.A.WAKSMAN**, un microbiologiste américain découvre le premier antibiotique actif contre le bacille : la **Streptomycine**. La régression du nombre de cas avait commencé avant la découverte des antibiotiques à la suite de l'amélioration des conditions de vie de la population. Ce fait illustre bien le caractère social de cette maladie dont l'apparition et l'évolution sont fortement liées à la pauvreté et à la promiscuité qui en découle très souvent (4). Après 50 ans sans nouvelle découverte, un nouveau médicament antituberculeux, la **bédaquiline** a été approuvée en 2013 par la Food and Drug administration (**FDA**).

2. Définition et classification (3)

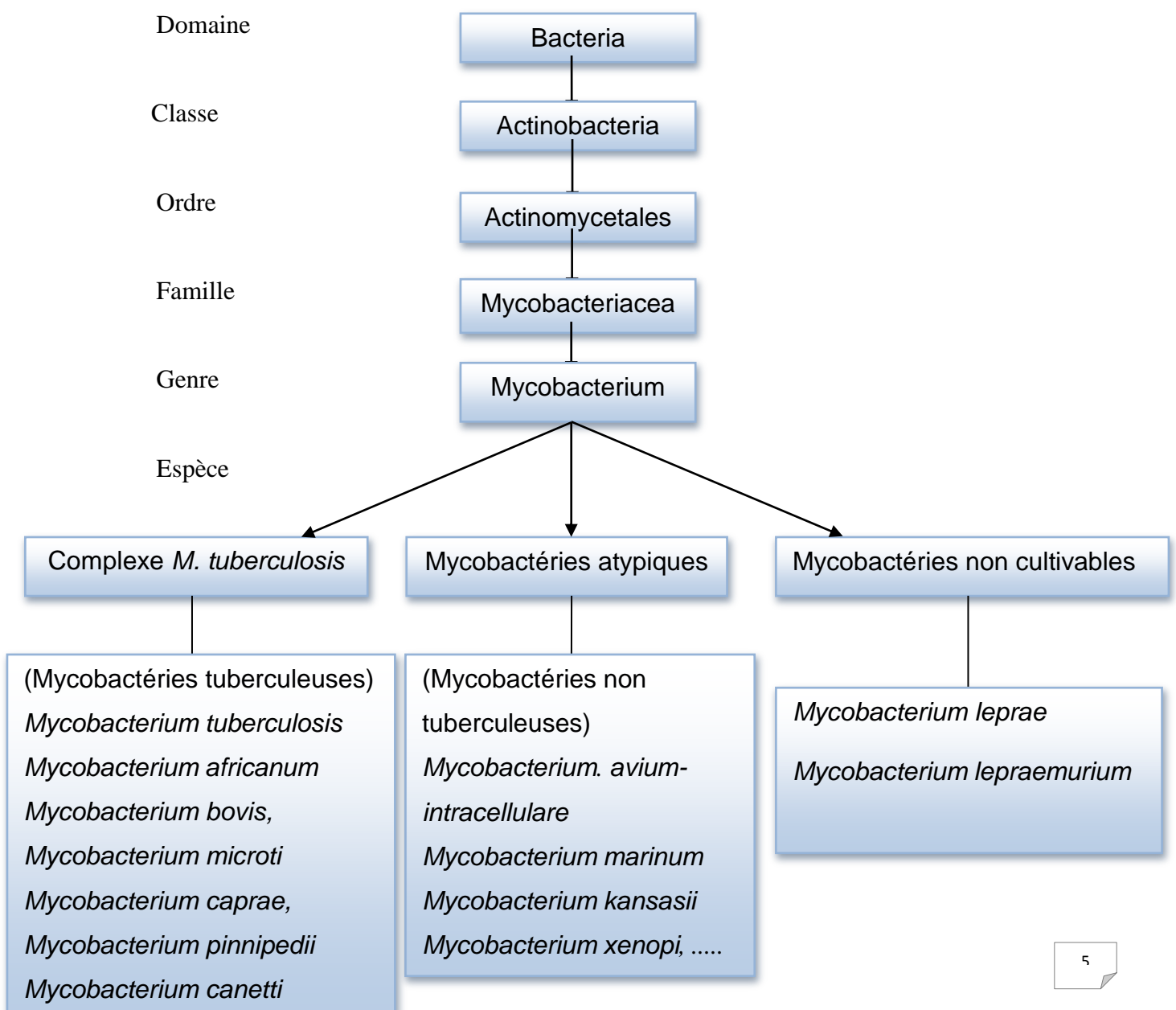
Le genre *Mycobacterium* est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae*. Cette famille fait partie du sous ordre des *Corynebacteriaceae* dans l'ordre des *Actinomycetales*. Le schéma récapitulatif suivant résume les diverses espèces.

- *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacille de Koch (B.K) : responsable de la tuberculose humaine est la variété la plus répandue.
- *Mycobacterium africanum* : agent responsable, le plus souvent, de la tuberculose en Afrique de l'ouest.
- *Mycobacterium bovis* : agent responsable de la tuberculose chez les bovins et parfois chez l'homme.

- *Mycobacterium microti*, *caprae* et *pinnipedii* : agents responsables de la tuberculose chez les rongeurs, les chèvres et les mammifères marins.
- *Mycobacterium Canetti* : agent responsable de tuberculose humaine (en particulier à Djibouti).

Toutes ces mycobactéries, capables de causer la tuberculose, sont regroupées sous la dénomination de mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Au sein du genre *Mycobacterium*, ces pathogènes opportunistes obligatoires sont très liés et partagent des facteurs de virulence en commun. Les mutations, plus que les transferts horizontaux de gène, ont conduit l'évolution récente de *Mycobacterium tuberculosis* et son adaptation à l'hôte humain [27]. En dehors du complexe, d'autres mycobactéries non ou peu pathogènes peuvent causer occasionnellement des affections chez l'homme.

Figure 1 : Classification schématique de Shinnick et Good (1994)



3. Caractères bactériologiques du complexe *Mycobacterium tuberculosis*

Le *Mycobactérium* est un bacille aérobie, immobile, non ramifié et non sporulé possédant une propriété tinctoriale essentielle : l'acido- alcool résistance due à la richesse en lipide de sa paroi [3]. Il est légèrement incurvé ou droit, de 1 à 10 micromètres de long et 0,1 à 0,6 micromètre de diamètre. Les mycobactéries synthétisent de la catalase et produisent des acides à partir des sucres de la voie oxydative.

3.1 Etude microscopique

○ Coloration de Ziehl-Nielsen

Après coloration de Ziehl-Nielsen (ZN) (fuchsine phéniquée à chaud, décoloration par acide-alcool, recoloration par le bleu de méthylène), il apparaît comme un bacille rouge légèrement incurvé, aux extrémités arrondies. L'examen direct après coloration à la fuchsine de ZN est utilisé pour le diagnostic et la confirmation de frottis positif après coloration à l'auramine qui nécessite un microscope à fluorescence. Afin d'éviter la préparation des réactifs et pour mieux standardiser la méthode, de nombreux coffrets de réactifs prêts à l'emploi sont disponibles dans le commerce [4]. Cette propriété constitue la base de la coloration de Ziehl Nielsen, mise au point par R. Koch et améliorée par F. Ziehl et FC. Nielsen en 1885 : les mycobactéries colorées par la fuchsine phéniquée retiennent le colorant après traitement par l'alcool acidifié alors que les autres bactéries sont rapidement décolorées. En outre, bien que faiblement colorées par la méthode de Gram, ces bactéries sont considérées comme des bactéries Gram positif (6).



Figure 2 : Bacille sous forme d'un bâtonnet rouge.

(<http://www.fares.be/content/view/176/240/>) Aout 2014

○ Coloration à l'auramine

Le principe de la coloration à l'auramine est le même que celui du ZN. La fuchsine est remplacée par l'auramine phéniquée à froid et le bleu de méthylène remplacé par une solution de rouge de thiazine. Les mycobactéries apparaissent comme des bacilles fluorescents jaune vert sur fond rouge.

M. bovis est habituellement plus court et plus trapu que *M. tuberculosis*. Dans les cultures âgées on note fréquemment deux granulations subpolaires rouge foncées, après coloration de Ziehl Neelsen. Par contre *M. africanum* a les mêmes caractères microscopiques que *Mycobacterium tuberculosis*.

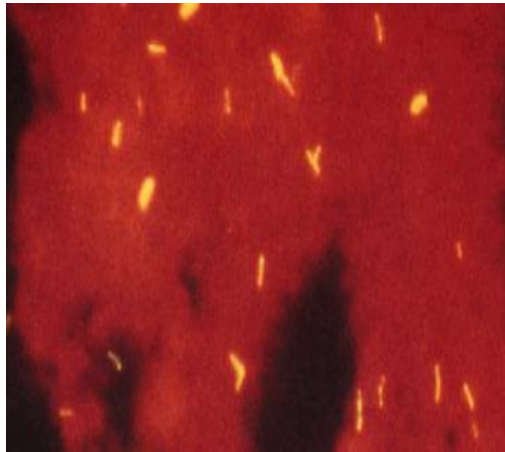
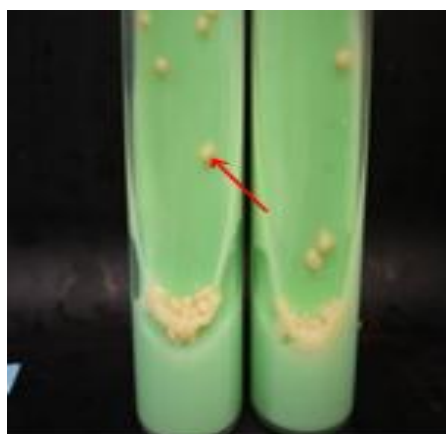


Figure 3: Coloration à l'auramine des BAAR
(<http://www.fares.be/content/view/176/240/>) Aout 2014

3.2. Culture sur milieu solide

Sur milieu solide, les mycobactéries donnent des colonies d'aspects différents : lisses (S), rugueuses, eugoniques (grande taille), ou dysgoniques (petite taille). L'aspect est variable en fonction du milieu mais reste inchangé pour un milieu donné. Les cellules de *M. tuberculosis* ont tendance à se ranger parallèlement pour constituer des cordes ou « serpentes ». Cette propriété est associée à la présence d'un glycolipide toxique (Cord factor) (6).



1
M. Tuberculosis (sur LJ)

Figure 4 Colonies de *M. Tuberculosis* sur LJ

(<http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9e/M-tuberculosis-on-Lowenstein-Jensen.jpg>) Aout 2015

La structure très particulière de la paroi mycobactérienne qui peut contenir jusqu'à 60% de lipides confère à ces organismes une extrême hydrophobicité et une résistance aux agents chimiques (bases, acides, détergents) d'où l'appellation de Bacille Acido-alcool résistant (BAAR).

Le temps de génération des mycobactéries étant de 20 heures en moyenne, les cultures sur milieu solide ne sont positives qu'après un délai de 21 à 28 jours d'incubation à 37 degré, et un délai plus court de 10 à 14 jours lorsqu'on utilise un milieu liquide. *M. tuberculosis* a une activité catalasique thermolabile (elle disparaît après chauffage pendant 20 minutes à 68 degré) ; une activité nitrate réductase et accumule de l'acide nicotinique ce qui peut être révélé par l'épreuve à la niacine. Ce sont les trois caractères biochimiques types de cette espèce (4).

3.3. Culture sur milieu Liquide

Les milieux liquides sont fabriqués pour la plupart avec la même base (7H9) et doivent être supplémentés avec des facteurs de croissance rendus sélectifs à l'aide d'un mélange d'antibiotiques (pour augmenter la spécificité de la culture). Certains de ces milieux peuvent être couplés à une détection automatique de la croissance (MGIT 960, MB 9000, BacT /Alert 3D). Le milieu MGIT le plus souvent utilisé, est un milieu 7H9 supplémenté contenant un indicateur de fluorescence sensible à la concentration du milieu en O₂ composés. Une diminution de la concentration en O₂ génère après excitation à 365 nm, une fluorescence visible à l'œil nu ou détectable à l'aide d'un automate. L'inoculation des tubes ne nécessite pas l'utilisation d'aiguille.

Le MGIT 960 est un système mis au point par les Laboratoires Becton Dickinson (Microbiology System) constitué d'un tube de 16 x 100mm contenant 7 ml du bouillon 7H9 Middlebrook modifié dont le fond est muni d'une substance fluorescente (silicone imprégné avec du ruthénium penta hydrate). Le MGIT 960 est une méthode simple ne nécessitant pas un équipement lourd, non radioactive et d'utilisation facile. En respirant, les mycobactéries consomment de l'oxygène et permettent l'observation de la fluorescence visible en utilisant une lumière UV à 365 nm (3).

3.4. Génome bactérien

La séquence complète du génome de *M. tuberculosis* H37Rv publié en 1998 par Steward Cole et al. a permis d'expliquer certains caractères propres aux Mycobactéries. Ce génome (H37Rv souche de référence) a été complètement séquencé et annoté. Comme chez l'ensemble des mycobactéries (excepté *M. Leprae*), *M. tuberculosis* se caractérise par une teneur en Guanine et Cytosine plus élevée (65,6%). Environ 4000 gènes ont été identifiés dans le génome du *M. tuberculosis*. Le génome du *M. tuberculosis* est riche en séquences répétées d'ADN, en particulier en séquences d'insertion IS6110 spécifiques du complexe. La position et le nombre de ces séquences sur le génome sont stables pour une souche donnée mais variable d'une souche à l'autre. Cette particularité a été mise à profit pour développer l'analyse RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism) du génome des souches de bacilles tuberculeux, utiles dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques nécessitant la comparaison des souches. Les souches virulentes de *M. tuberculosis* et de *M. bovis* présentent une protéine antigénique ESAT-6 absente par ailleurs de *M. bovis* BCG. *M. Tuberculosis* partage plus de 99,9% de son identité d'ADN avec les autres membres du complexe (3).

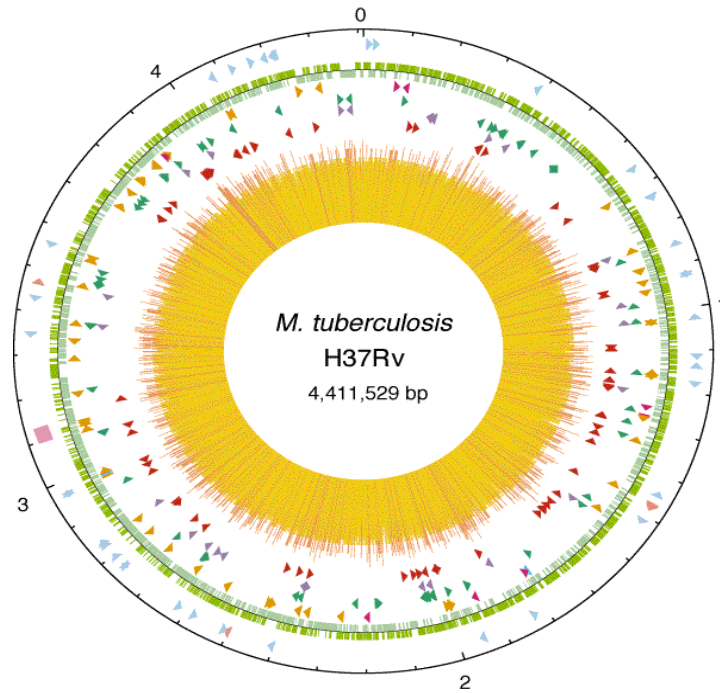


Figure 5 : Génome de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (<http://www.fares.be/content/view/176/240/>) Aout 2014

Le cercle extérieur indique l'échelle de Mb, 0 représentant l'origine de répliation. Le premier anneau de l'extérieur indique les positions des gènes de l'ARN stables (les ARNr sont bleus, et les autres sont de couleur rose) et la région de répétition directe (cube rose); les entrailles du second anneau montrent la séquence codante par brin (sens horaire, vert foncé; antihoraire, vert clair), le troisième anneau représente l'ADN répétitif (séquences d'insertion, orange, famille REP 13E12, rose foncé; prophage, bleu), le quatrième anneau montre les positions des membres de la famille PPE (vert), le cinquième anneau montre la famille PE les membres (violet, à l'exclusion PGRS), et le sixième cycle montre les positions de l' PGRS séquences (rouge foncé). L'histogramme (au centre) représente G + C, avec <65% G + C en jaune, et > 65% G + C en rouge. Elle a été produite avec le logiciel de DNASTAR.

3.5. Résistance aux agents physiques et chimiques

M. tuberculosis est très sensible à la chaleur, aux rayons ultra-violets et aux rayons X. En revanche, il résiste au froid et à la dessiccation. La lyophilisation est d'ailleurs un excellent moyen de conservation. Détruit par l'alcool en 5 minutes, *M. tuberculosis* résiste plus que les autres bactéries aux acides dilués, aux antiseptiques et aux détergents.

4. Epidémiologie

4.1. Habitat

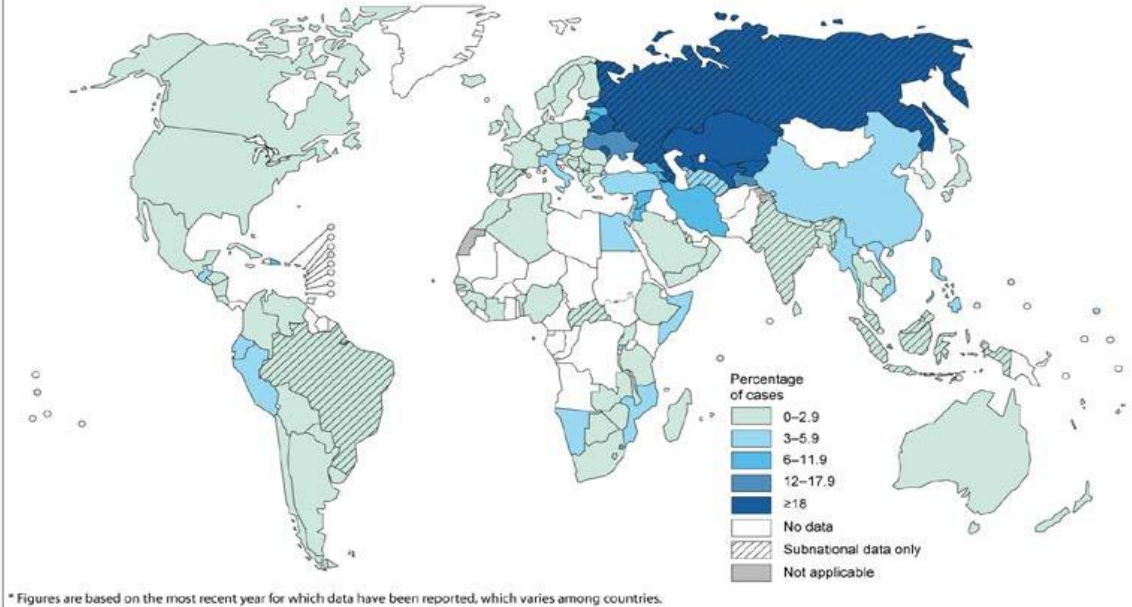
M. tuberculosis et *M. africanum* sont des parasites stricts de l'espèce humaine. En effet, *M. tuberculosis* est capable d'infecter certaines espèces animales vivant à ses côtés (chien, Chat, perroquet et animaux de ménagerie). Cependant, *M. bovis* est un parasite strict des bovins et il est aussi capable d'infecter l'homme et certaines espèces animales notamment le chat, le chien et la chèvre. La transmission interhumaine est habituellement directe et se fait par voie aérienne. Les animaux familiers à l'homme peuvent occasionnellement être contaminés.

4.2 Données sur la tuberculose et la TB-MDR

Quatre vingt quinze pour cent des cas de décès surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. La tuberculose figure parmi les trois principales causes de décès chez les femmes âgées de 15 à 44 ans. Cependant le nombre de nouveaux cas est en baisse et le taux de mortalité a diminué de 45% depuis 1990 [1]. Près de 37 millions de vie ont été sauvées entre 2000 et 2013 grâce au diagnostic et au traitement de la tuberculose. En 2013 au Sénégal, **680** cas de MDR et XDR ont été diagnostiqués au laboratoire dont 48 seulement sont mis sous traitement [1].

La tuberculose multi résistante ne répond pas aux traitements classiques et fait recourir à un traitement plus délicat et couteux. En 2013 on estime à 480.000, le nombre de cas de tuberculose multi résistante dans le monde. Près de 56 millions de malades ont été traités avec succès depuis 1995 grâce au programme DOTS. En 2013, parmi les cas de multi résistance l'OMS estime que plus de 9% étaient plutôt des XDR [1].

Percentage of new TB cases with multidrug-resistant tuberculosis*



* Figures are based on the most recent year for which data have been reported, which varies among countries.

The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: *Global Tuberculosis Report 2013*. WHO, 2013.

© WHO 2013. All rights reserved.



5. Pouvoir pathogène

❖ Physiopathologie

Emis par une source d'infection, le plus souvent un tuberculeux pulmonaire, *M tuberculosis* est inhalé et atteint l'alvéole pulmonaire. La maladie résulte de la multiplication du bacille et de ses interactions avec l'hôte infecté (immunité à médiation cellulaire, activation des lymphocytes T et des macrophages). Il ne produit pas de toxine (4). La pénétration du bacille dans l'organisme ne conduit à la maladie que dans 10 % des cas en moyenne. Dans 90 % des cas, la multiplication des bacilles s'arrête rapidement. C'est la primo-infection simple qui se traduit par le développement de l'hypersensibilité tuberculique et de l'immunité de surinfection. Le sujet n'est pas malade, il est simplement infecté.

La maladie tuberculeuse est habituellement provoquée par la multiplication des bacilles de la primo-infection soit immédiatement soit après un temps de latence, les bacilles ayant survécu dans les lésions primaires (réinfection endogène). Plus rarement, elle l'est par de nouveaux bacilles inhalés d'une nouvelle source de contamination (réinfection exogène).

Deux types de localisation peuvent s'observer. Les localisations pulmonaires sont les plus fréquentes (90 % des cas environ) et les plus dangereuses épidémiologiquement car ce sont elles (notamment les cavernes) qui permettent la transmission du bacille. Les localisations extra-pulmonaires sont généralement pauvres en bacilles mais invalidantes (ostéo-arthrite) ou gravissimes (méningite). Le substratum anatomique des lésions est le même ; c'est le granulome et surtout la caséification.

6. Les Antituberculeux [44, 45]

6.1. Mécanismes d'action des antituberculeux de première ligne

- Les antituberculeux sont soit bactériostatiques (ralentissement de la croissance des bactéries pouvant aller jusqu'à l'arrêt de cette croissance lorsque la bactériostase est maximale), soit bactéricides (mort directe des bactéries). Ils agissent tous sur le complexe *M. tuberculosis* avec toutefois une résistance d'emblée expliquant d'ailleurs pourquoi ils sont toujours associés.

D'une façon générale on distingue :

- Les composés à large spectre (non spécifiques) qui possèdent une activité contre plusieurs espèces de bactéries, y compris les mycobactéries. Ils agissent sur des cibles moléculaires présentes dans une grande variété de bactéries. Ils bloquent la transcription (rifampicine, fluoroquinolone), la réplication de l'ADN (fluoroquinolone), la traduction (streptomycine) ou la synthèse d'autres macromolécules (acide gras : thiolactomycine ; peptidoglycane : D-cyclosérine).
- Les composés dont l'activité est spécifique des mycobactéries, voire une seule espèce de mycobactérie. Ce sont les antibiotiques les plus sélectifs et ils interfèrent en général avec la biosynthèse de la paroi mycobactérienne, une structure propre des mycobactéries. C'est le cas de l'isoniazide, la pyrazinamide, l'éthionamide et l'ethambutol. Les trois premiers sont des prodrogues nécessitant une étape d'activation à l'intérieur de la mycobactérie. Ceci contribue à la sélectivité de ces médicaments.

Sur le plan clinique on distingue pour le traitement, deux catégories de médicaments : ceux de première ligne surtout pour la phase intensive et un traitement de seconde ligne.

6.2. Schéma thérapeutique

Le schéma actuel de traitement proposé par l'OMS appelé aussi SCC «Short course Chemotherapy», comporte deux phases successives :

- **Phase initiale** de 2 mois: isoniazide, rifampicine, pyrazinamide + streptomycine ou Ethambutol. Cette phase initiale permet la négativation des crachats des patients.
- **Phase de continuation** de 4 mois: isoniazide et une autre drogue de première ligne (il s'agit souvent de la rifampicine). Cette phase a pour but d'éliminer les bacilles restants et ainsi de prévenir toute rechute [25]. Un traitement antibiotique réussi aboutit à une conversion d'un expectorât et vers une négativation de la culture en 2 mois. Les souches résistantes apparaissent quand la chimiothérapie est intermittente ou inadéquate.

6.3. Résistance aux antituberculeux [6, 22]

6.3.1. Résistance naturelle

Chez les Mycobactéries, le phénotype « sensible » ou « résistant » à un antibiotique donné est spécifique d'espèce. Les Mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* sont naturellement résistantes aux principales familles d'antibiotiques comme les β -lactamines, les macrolides, les cyclines, les sulfamides et les glycopeptides (22). En effet la paroi des

mycobactéries est la principale cause de cette résistance naturelle. La perméabilité de la paroi du MT pour les bêta lactamines est 100 fois plus faible que celle d'*Escherichia coli*. Ceci s'explique par la structure de la paroi très dense et très riche en lipides. Les mycobactéries non tuberculeuses présentent également une résistance naturelle à ces antibiotiques usuels. De plus, elles sont naturellement résistantes à la plupart des antibiotiques efficaces sur *M. tuberculosis* tels que l'isoniazide, la pyrazinamide, l'Ethambutol, l'acide para - aminosalicylique [22].

6.3.2. Résistance primaire

La résistance primaire se définit comme la résistance aux antituberculeux survenant chez un patient n'ayant jamais été traité auparavant ou ayant reçu un traitement inférieur à 1 mois. Elle est la conséquence de l'infection d'un malade par une souche de *M. tuberculosis* provenant d'un malade ayant développé cette résistance au cours d'un traitement inapproprié (OMS, 2004).

6.3.3. Résistance acquise

La résistance acquise s'observe chez un patient avec un antécédent de traitement aux antituberculeux d'au moins un mois et enfin la multi résistance s'observe lorsque la souche isolée présente une résistance à la fois à la rifampicine et à l'isoniazide (1). La multi résistance, dont la prévalence semble augmenter dans le monde, représente une menace très sérieuse pour le contrôle de la tuberculose et également une menace épidémiologique et une charge économique importante pour les pays qui en sont touchés.

6.3.4. Mécanisme et gènes de la résistance

La multi résistance apparaît lorsqu'une mycobactérie développe successivement deux mutations qui la rendent résistante successivement à l'isoniazide et à la rifampicine. Le phénomène peut se produire lorsqu'un germe résistant issu d'une mutation spontanée ou induite par un traitement antituberculeux insuffisant (monothérapie), ayant favorisé les mutations conduisant à la résistance, est sélectionné par l'élimination des germes sensibles dans une population mycobactérienne. Dans chaque population d'une certaine taille, apparaissent naturellement, des mutants mono résistants à l'isoniazide, la Rifampicine, la pyrazinamide ou l'Ethambutol (fréquence de 10^{-6}). Avec une association thérapeutique de ces quatre antibiotiques la probabilité statistique d'apparition d'un mutant présentant une

résistance à toutes les quatre substances est de 10^{-24} . Un tel nombre de bacilles n'est jamais rencontré dans une infection [6].

Un germe qui a subi une première mutation, par exemple à l'isoniazide (cas le plus courant), et qui est soumis à l'influence d'un traitement insuffisant (par exemple, administration d'isoniazide et de rifampicine) sera soumis à une monothérapie involontaire (dans ce cas la rifampicine) qui favorisera l'émergence d'une nouvelle mutation conduisant au développement d'une multi résistance (isoniazide et rifampicine) [6]. Le phénomène peut se poursuivre par l'apparition successive de résistances contre d'autres antituberculeux (amplification). Il en résulte que la multi résistance peut se développer même chez un malade au bénéfice d'un traitement antituberculeux standard, si la sensibilité initiale du germe est méconnue et si le risque de résistance primaire envers l'un des médicaments de base est élevé [2, 3]. Les souches résistantes à l'isoniazide tendent à développer plus souvent de nouvelles résistances que les souches sensibles [4, 5]. La multi résistance n'est pas due au hasard mais résulte presque toujours d'une erreur dans la gestion du traitement antituberculeux, de la part du programme national (recommandations inappropriées, médicaments inefficaces, retards de livraison avec interruption partielle de traitement), du corps médical et infirmier (choix erroné des médicaments, absence de supervision de la prise du traitement, changements chaotiques du programme en cas d'intolérances médicamenteuses) ou du malade (abandon précoce ou sélection d'une partie des médicaments au détriment d'autres) [6]. Dans de rares cas, la résorption insuffisante de certains médicaments, en particulier l'isoniazide et la rifampicine, peut également conduire au développement de résistances en dépit d'une adhérence thérapeutique apparemment sans faille [7, 8, 9].

Les patients peuvent être porteurs de mycobactéries résistantes d'emblée lors d'une première manifestation de tuberculose (résistance primaire) ou héberger des mycobactéries qui étaient initialement sensibles et qui sont devenues résistantes en cours du traitement ou entre un premier et un second traitement (résistance secondaire ou acquise). Les premiers ont acquis les mycobactéries par contamination à partir d'un malade atteint de tuberculose multirésistante, les seconds sont probablement porteurs de germes qui ont subi une mutation en cours de traitement. La distinction est importante car la fréquence de la multi résistance primaire traduit l'importance de la transmission des mycobactéries dans la population locale, donc l'importance des erreurs commises dans un passé plus ou moins lointain. Par contre, la multi résistance secondaire reflète les déficiences potentielles du programme actuel. Plus la proportion de multi résistance primaire est élevée, plus le programme doit investir dans le traitement des cas existants. Globalement, l'OMS estime que si la proportion de multi

résistances primaires atteint ou dépasse 4 % parmi tous les cas de tuberculose, il existe une menace sérieuse pour la structure du programme local (1). Dans le cas contraire, une prévention de l'émergence des multi-résistances est encore possible. En pratique, une telle distinction n'est pas toujours possible, car la notion d'un traitement préalable ne peut pas toujours être objectivée. Les supports génétiques de la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux sont résumés dans le tableau suivant :

Supports génétiques de la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux

Antibiotique	Nature de la résistance	Fréquence des mutations
INH	Gène <i>KatG</i> codant pour une catalase / peroxydase	47 %
	Gène <i>InhA</i> codant pour la biosynthèse des acides mycoliques	21 %
	Gène <i>ahpC</i> codant pour une alkyl-peroxydase réductase	10 %
SM	Gène <i>rpsL</i> codant la ss-U ^{12S}	52 %
	Gène <i>rrs</i> codant la ss-U du ARNr	21 %
RIF	Gène <i>rpo B</i> codant la ss-U B de l'ARN polymérase	96 %
EMB	Gènes <i>embA</i> et <i>embB</i> de l'opéron responsable de la synthèse de l'arabinogalactane	-
FQN	Mutations non-sens dans le gène <i>gyrA</i>	75 %

19/12/15

13

6.3.5. Diagnostic de la tuberculose résistante aux antituberculeux

6.3.5.1. Techniques phénotypiques

➤ Culture par méthode des proportions (3)

Le milieu de Löwenstein-Jensen, milieu à l'oeuf, est le milieu de référence recommandé par l'UICMR (Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires).

Elle peut se réaliser sur milieu solide ou sur milieu liquide. Cette méthode consiste à déterminer pour la souche à étudier la proportion de mutants résistants à un antibiotique donné. On l'obtient en dénombrant sur des milieux solides contenant la concentration critique d'antibiotiques les colonies qui se sont développées. On compare ce nombre à celui des germes viables contenus dans l'inoculum et dénombrés sur milieux sans antibiotiques. Ce rapport permet d'établir la proportion. La proportion critique est de 1% pour l'INH, La R, la SM et l'EMB. Une souche est résistante si la proportion obtenue est supérieure à 1%. La proportion critique est de 10% pour tous les antibiotiques de seconde ligne.

➤ **BACTEC MGIT**

L'instrument BD BACTEC MGIT utilise une technologie non radiométrique basée sur la fluorescence. Les microorganismes présents dans les échantillons métabolisent les nutriments et l'oxygène présents dans le tube MGIT. Les tubes contiennent un détecteur fluorescent qui réagit en fonction de la concentration en oxygène du milieu de culture. Les détecteurs photosensibles de l'instrument mesurent l'intensité de la fluorescence, laquelle correspond à la quantité d'oxygène consommée par les microorganismes. Cette technique est destinée à réduire le délai nécessaire entre la réception d'un échantillon et l'obtention des résultats.

Pour la réalisation de l'antibiogramme deux types de procédures rapides et qualitatives existent :

BD BACTEC MGIT AST SIRE : test rapide de type qualitatif pour la détection de la sensibilité à la streptomycine, l'isoniazide, la rifampicine, et l'éthambutol à partir d'une culture sur milieu solide ou liquide. Le test est basé sur la comparaison entre la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* dans un tube contenant un antibiotique et celle obtenue dans un tube sans antibiotique aux moyens d'algorithmes interprétés par le système BD BACTEC.

BD BACTEC MGIT AST PZA : test qualitatif de 4 à 21 jours pour la détection de la sensibilité de souches de MTB à la pyrazinamide.



Figure 7 : Présentation du Bactec MGIT 960 et ces composants.

(<http://www.bd.com/ds/productcenter/mt-bactecmgit960.asp>)

(www.invs.sante.fr/content/download/.../EmmanuelleCambau10avril.pdf) 15 décembre 2015

6.3.5.2 Techniques génotypiques

La détection de la résistance médicamenteuse peut aussi s'effectuer par des méthodes moléculaires qui mettent en évidence les mutations génétiques associées aux différents types de résistance, par exemple *kat G* et *inhA* pour la résistance à l'isoniazide et *rpoB* pour la résistance à la rifampicine .

Les méthodes génotypiques, dont il existe plusieurs variantes reposant toutes sur l'amplification de séquences génétiques, peuvent s'effectuer sur un échantillon natif, sans attendre la croissance des mycobactéries, et sont théoriquement disponibles en quelques heures [26]. Elles ont une fiabilité comparable à celle des méthodes traditionnelles [19] et offrent donc un avantage considérable par rapport à ces dernières, mais leur coût et leur complexité technique représentent un obstacle à leur diffusion large, précisément dans les régions où la multirésistance est la plus répandue. Plusieurs études ont montré que l'introduction des méthodes de dépistage moléculaire de la résistance médicamenteuse ou la combinaison de méthodes de culture rapide en milieu liquide et de tests génotypiques de dépistage des mutations devrait être envisagée dans les régions où la multi résistance représente une menace sérieuse pour la santé publique [25].

L'OMS insiste, dans la dernière révision de ses recommandations [1], sur la nécessité de pratiquer une recherche de la sensibilité des germes dans tous les cas où une multi résistance est probable, par exemple en cas :

- d'échec d'un traitement standard bien supervisé,
- de rechute après deux cures de traitement,
- dans les cas chroniques,
- les contacts documentés avec un cas de tuberculose multirésistante,
- ceux qui ont été contaminés dans un pays ou un milieu où la multi résistance est fréquente.

Le plus fiable des tests génotypiques concerne l'étude de la résistance à la rifampicine. Les mutations touchant certaines régions du gène *rpoB* qui code pour la sous-unité β de l'ARN polymérase, sont susceptibles d'entraîner un changement de conformation du site de liaison avec la rifampicine, entraînant une perte d'affinité.

➤ Génotype MTBDRplus

Le test génotype MTBDRplus permet après amplification, l'identification du complexe *M. tuberculosis* et la détection des résistances à la Rifampicine et/ou à l'isoniazide d'une Mycobactérie cultivée sur milieu liquide ou solide.

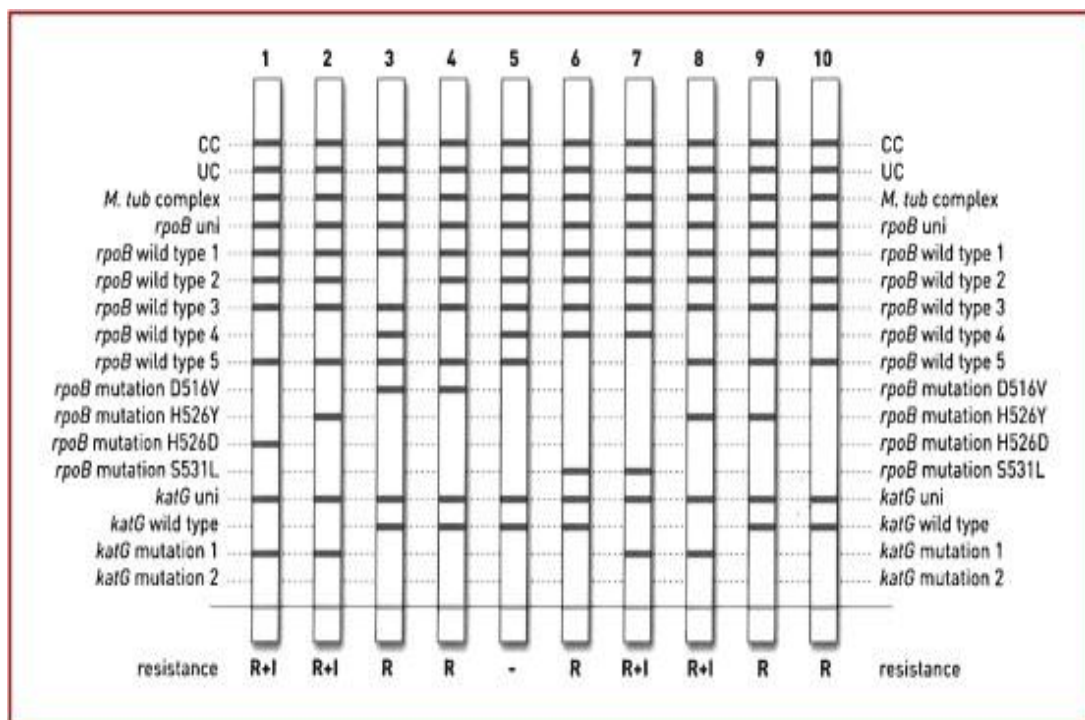


Figure 7 : Lecture des bandelettes MTBDR plus : résistante et sensible.

(<http://www.fares.be/content/view/176/240/>) Aout 2014

➤ **Le séquençage**

Le séquençage du gène a permis d'établir que la majorité des mutations se situe dans la région 69-bp, et qu'elles sont au nombre de huit. Depuis que l'on sait que 94 % des cas de résistance à la rifampicine sont liés à des mutations non-sens de cette région confinée du gène, des techniques d'analyses moléculaires peuvent être employées pour le diagnostic. Signalons toutefois qu'un faible pourcentage de cas ne possédant pas de mutations sur ce segment échappe au test [29].

Concernant les autres drogues, des mutations touchant certains gènes peuvent aussi être retrouvées quoique moins fréquemment, la résistance étant multifactorielle. C'est le cas pour 62 à 90% des résistances à l'isoniazide dont l'origine peut être multigénique, pour 72 à 97% des résistances au pyrazinamide qui peuvent toucher plusieurs codons du même gène (*pncA*) ; pour 47 à 65 % des résistances à l'Ethambutol par substitution du codon 306 du gène *embB*; et pour environ 70 % des résistances à la Streptomycine [28].

2. CADRE D'ETUDE

2.1. Justificatifs

Le grand nombre de cas de tuberculose n'épargne pas l'Afrique et spécifiquement le Sénégal. En effet, selon le dernier rapport du programme national de lutte contre la tuberculose, le nombre de MDR est toujours en croissance. Peu d'études ont été réalisées au Sénégal à cet effet. L'OMS a préconisé l'utilisation en routine de beaucoup de méthodes moléculaires pour le diagnostic rapide des TB-MDR telles que le Gene Xpert, le MTBDRplus de Hain[®] qui présente une sensibilité de plus de 98% [25]. C'est dans ce cadre que s'inscrit cette étude qui consistera donc à caractériser grâce au génotype MTBDRplus les souches de *Mycobacterium tuberculosis* isolées à l'Hôpital A. Le Dantec en 2012 après réalisation de leur sensibilité aux molécules de seconde ligne sur l'automate BACTEC MGIT 960.

2.2. Laboratoire de Bactériologie-virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec de Dakar

Le laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'HALD est le centre national de référence pour le diagnostic du SIDA et des IST. Il assure un contrôle de qualité des laboratoires de la sous-région et constitue un centre de formation, de perfectionnement et d'expertise.

Il comprend :

- Une unité de Bactériologie
- Une unité de Virologie
- Une unité d'immunologie
- Une unité de biologie moléculaire

3. METHODOLOGIE

3.1. Population d'étude

Cette étude s'est déroulée de janvier à décembre 2012 à l'Unité des Mycobactéries du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec de Dakar. A cet effet, **909** patients avaient été enregistrés. Nous avons retenu **780** patients dont les âges étaient répertoriés. Ces derniers étaient composés de **443** hommes et **337** femmes. Il s'agit des patients de tout âge ayant une tuberculose pulmonaire ou extra pulmonaire. Ces patients étaient composés de 864 nouveaux patients diagnostiqués et 45 patients déjà sous traitement antituberculeux.

3.2. Echantillonnage

Tous les échantillons quels qu'ils soient provenant de diverses régions de Dakar. Nous avons collecté deux (2) échantillons par patient. Un total de 1560 échantillons avait été obtenu auprès de 780 patients. Ces échantillons étaient constitués de 544 crachats, 365 Liquides de ponction (pleural, pus..) etc.

3.3. Traitement des prélèvements et mis en culture

Après l'examen direct (coloration de Ziehl Neelsen) tous les prélèvements ont été décontaminés selon la méthode Kubica. Le culot de décontamination a été utilisé pour la culture sur le milieu de Löwenstein-Jensen. Les souches du complexe *Mycobacterium tuberculosis* isolées ont servi pour faire un antibiogramme sur MGIT 960 et le test de sensibilité au génotype MTBDRplus.

3.4.. Génotype MTBDRplus

Les diverses étapes de réalisation sont les suivantes :

3.4.1. Extraction de l'ADN ou Génomolyse

A partir de prélèvements cliniques, utiliser 500µl d'échantillon décontaminé (les échantillons doivent être traités par NALC/NaOH). Centrifuger pendant 15mn à 10000 x g sur une centrifugeuse de paillasse à l'aide d'un rotor protégeant contre les aérosols dans sécurisé de classe II. Jeter le surnageant et reprendre le culot dans 100 µl d'eau. Mettre au Vortex.

Ensuite, incuber les bactéries 20 minutes à 95°C (bain-marie bouillonnant).

Centrifuger 5mn à vitesse maximale. Utiliser directement 5 µl de surnageant pour la PCR. Si la solution d'ADN doit être conservée de façon prolongée, transférer le surnageant dans un nouveau tube.

3.4.2. Amplification de l'ADN

Distribuer dans chaque tube :

- 10 µl Amplification Mix A (AM-A)
- +35 µl Amplification Mix B (AM-B)

Mélanger doucement avec la pipette

Sortir de la « pièce blanche » avec les tubes du mix.

Ajouter dans chaque tube 5µl de l'ADN à tester extrait par la méthode GenoLyse pour la version 2.0.

Centrifuger brièvement

Les amplicons produits présentent des longueurs respectives de 63bp (contrôle d'amplification), de 115bp (complexe *M. tuberculosis*), de 166bp (*rpoB*), de 20bp (*katG*) et de 110bp (*inhA*). L'électrophorèse sur gel d'agarose est optionnelle.

3.4.3. Hybridation

Préchauffer le bain-marie agitateur/Twincubator à 45°C (dérivation maximale : +/-1°C).

- Préchauffer les solutions HYB et STR à 27-45°C avant utilisation. Les réactifs ne doivent présenter aucun précipité (à noter cependant que la solution CON-D est opaque). Si besoin, agiter.

- Laisser les autres réactifs (à l'exception des solutions CON-C et SUB-C) à température ambiante.

- Dans un tube approprié, diluer le Conjugué Concentré (CON-C, orange) et le Substrat Concentré (SUB-C, jaune) au 1:100 dans un volume adéquat du tampon correspondant (CON-C avec CON-D, SUB-C avec SUB-D). Bien homogénéiser et laisser à température ambiante. Pour chaque échantillon testé, ajouter 10µl de concentré à 1ml de tampon. Diluer CON-C avant chaque utilisation. Une fois dilué, SUB-C reste stable pendant 4 semaines conservé à température ambiante et à l'obscurité.

1. Déposer 20µl de Solution de Dénaturation (DEN, bleu) à une extrémité de chaque puits utilisé.
2. Ajouter 20µl d'échantillon amplifié et mélanger les deux solutions par pipetages répétés. Incuber 5mn à température ambiante.
3. Pendant ce temps, à l'aide d'une pince, sortir du tube le nombre approprié de bandelettes (STRIPS), et inscrire au crayon leur numéro d'identification dans l'espace situé sous le marquage coloré. Toujours porter des gants pour manipuler les bandelettes.
4. Ajouter dans chaque puits 1ml de Tampon d'Hybridation (HYB, vert) préchauffé et

homogénéisé. Doucement agiter le bac jusqu'à ce que le mélange prenne une coloration homogène. Eviter les éclaboussures vers les autres puits.

5. Déposer une bandelette dans chaque puits utilisé. Les bandelettes doivent être entièrement recouvertes par le liquide, avec la face marquée (identifiable par le marquage coloré) tournée vers le haut. Les bandelettes mal orientées doivent être remises en position à l'aide de pincettes propres. Afin d'éviter toute contamination, bien nettoyer les pincettes après chaque utilisation. Cela vaut aussi pour toutes les étapes suivantes.
6. Placer le bac dans bain-marie agitateur/TwinCubator et incubé 30mn à 45°C. Pour le bain-marie agitateur, sélectionner une fréquence d'agitation suffisante pour assurer un bon brassage du tampon. Ajuster le niveau de l'eau dans le bain-marie agitateur au moins à un tiers de la hauteur du bac de façon à assurer un bon transfert de chaleur. Cela vaut aussi pour toutes les étapes suivantes.
7. Aspirer le Tampon d'Hybridation. Utiliser par exemple une pipette Pasteur reliée à une pompe vide.
8. Ajouter à chaque puits 1ml de Solution de Lavage Stringent (STR, rouge) et incubé 15mn à 45°C dans le bain-marie agitateur/TwinCubator.
9. A partir de cette étape, travailler à température ambiante. Vider la Solution de Lavage Stringent. Eliminer tout le liquide résiduel en retournant la plaque sur du papier absorbant (effectuer de même pour les autres étapes du lavage).
10. Laver chaque puits avec 1ml de Solution de Rinçage (RIN) et incubé pendant 1mn sous agitation (TwinCubator/plateau agitateur). Vider la Solution de Rinçage par retournement de la plaque sur un container à déchets.
11. Ajouter à chaque puits 1ml de Conjugué dilué (voir ci-dessus) et incubé 30 mn sous agitation (TwinCubator/plateau agitateur).
12. Vider le contenu des puits et rincer sous agitation 1mn à l'aide de 1ml de Solution de Rinçage (RIN). Vider RIN. Répéter ce rinçage une nouvelle fois, puis rincer une fois avec environ 1ml d'eau distillée à l'aide d'une pissette. Bien éliminer toute trace d'eau dans les puits après cette première étape.
13. Ajouter 1ml de Substrat dilué (voir ci-dessus) dans chaque puits et incubé sans agitation à l'obscurité (recouvrir d'un papier d'aluminium). Le temps de révélation peut varier en fonction des conditions de déroulement du test (de 3 à 20 mn), notamment de la température de la pièce. Des temps de révélation trop longs peuvent entraîner un bruit de fond qui peut gêner l'interprétation des résultats.
14. Arrêter la réaction en rinçant brièvement deux fois à l'eau distillée.

15. A l'aide de pincettes, récupérer les bandelettes et les sécher entre deux couches de papier absorbant.
16. Scotcher les bandelettes sur la feuille de résultats
17. Lecture et interprétation selon les abaques

3.5. ANALYSE DES DONNEES

Les données une fois répertoriées ont été saisies dans le logiciel Microsoft Excel 2007 et transférées dans le logiciel Epi Info 7 TM (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, États-Unis) pour les analyses statistiques. Il a été calculé les fréquences des variables quantitatives et qualitatives.

4. RESULTATS

4.1. Analyse de la Population d'étude et des souches isolées par cas diagnostiqués.

Un total de **1560** échantillons a été traité et mis en culture sur les **1818** de départ. Nous avons obtenu 102 cultures positives appartenant à 102 patients c'est-à-dire une culture positive par patient a été retenue. Ces patients étaient constitués de 59 (57,84%) hommes et 43 (42,16%) femmes. Les âges allaient de 10 mois à 82 ans. La moyenne d'âge était de 33 ans. Les cas diagnostiqués étaient composés de 83 (81,37%) nouveaux cas et 19 (18,63%) en retraitement. Les échantillons ont été classés par ordre de fréquence décroissante : les expectorations, les liquides de tubage, les pus, les liquides de ponction et enfin les urines. Cet ordre reste inchangé que ce soit chez les nouveaux patients comme pour les cas de retraitement. Les crachats représentaient plus de la moitié de nos prélèvements. Les détails sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Analyse des échantillons par cas diagnostiqués.

Cas diagnostiqués	Crachats N(%)	Liquide de ponction N(%)	Pus N(%)	Tubage N(%)	Urines N(%)	Total N(%)
Nouveau	54(52,94)	3(2,94)	6(5,88)	19(18,63)	1(0,98)	83(81,37)
Retraitement	19(18,63)	-	-	-	-	19(18,63)
Total	73(71,57)	3(2,94)	6(5,88)	19(18,63)	1(0,98)	102 (100)

4.2. Test de sensibilité phénotypique

Nous avons utilisé le MGIT 960 AST SIRE (Streptomycine, Isoniazide, Rifampicine, Ethambutol) pour réaliser l'antibiogramme des 102 souches de complexe *M. tuberculosis*. Cependant, l'isoniazide était l'antibiotique pour lequel on a obtenu le plus de résistance (26,47%) suivi de la streptomycine (18,63%). En effet, 14,71% des patients avaient simultanément une résistance phénotypique à l'isoniazide et la Rifampicine. La répartition de ce test de sensibilité est présentée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Analyse de la sensibilité phénotypique selon le type d'antibiotique testé.

	Streptomycine	Isoniazide	Rifampicine	Ethambutol	MDR (IHN+RIF)
	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)	N(%)
Sensible	83 (81,37)	75(73,53)	84 (84,31)	90 (88,24)	87 (85,29)
Résistant	19 (18,63)	27(26,47)	16 (15,69)	12 (11,76)	15 (14,71)
Total	102(100%)	102(100%)	102(100%)	102(100%)	102(100%)

4.3. Test de sensibilité génotypique et gènes de résistance.

Nous avons utilisé le génotype MTBDRplus pour tester la sensibilité des 102 souches isolées. Cependant, 6 souches ont présenté une multirésistance (rifampicine et isoniazide). Les gènes de résistance identifiés étaient *rpoB* pour la rifampicine et *katG* et *inhA* pour l'isoniazide. Les codons et régions retrouvés sont essentiellement : **S315T** pour le Kat G, **C15T** pour le gène *inhA* et enfin **D516V** pour le RpoB.

4.4. Répartition des souches multirésistantes en fonction de la tranche d'âge

La résistance phénotypique à la rifampicine et à l'isoniazide a été notée chez 15 patients au total. La tranche d'âge la plus touchée était celle de 25 à 50 ans, suivie de celle de moins de 25 ans. Mais au-delà de ses fourchettes aucune résistance n'avait été observée. Les effectifs ont été exprimés en proportion et les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3: Répartition du type de résistance en fonction de l'âge

Age	MDR (RIF + IHN)	
	Effectif (N)	Proportion (%)
≤ 25 ans	6	40
25 à 50 ans	9	60
50 à 60 ans	-	-
≥ 60 ans	-	-
Total	15	100%

4.5. Répartition des patients en fonction des résistances génotypiques, de l'âge, du sexe et des cas diagnostiqués.

Le nombre de MDR observé était plus important dans la catégorie des cas de retraitement. Les cas de MDR se sont observés chez des patients de 25 à 50 ans. Les hommes étaient un peu plus touchés que les femmes mais sans différence significative. Les MDR obtenus par MTBDRplus étaient déjà résistants à la Rifampicine et l'Isoniazide sur MGIT 960. Seule une souche multirésistante sur le MTBDRplus était uniquement sensible à l'isoniazide sur le MGIT.

Tableau 4 : Test de sensibilité génotypique aux antituberculeux majeurs (Rifampicine et l'Isoniazide) et Répartition par tranche d'âge, par cas diagnostiqué et par sexe.

Tranche d'âge		≤ 25 ans N(%)	25 - 50 ans N(%)	50 - 60 ans N(%)	≥ 60 ans N(%)	Total N(%)	Type de résistance
Nouveau cas	homme	–	–	–	–	–	Mono- résistance à l'Isoniazide
	femme	1(16,67)	1(16,67)	–	–	2(33,33)	
Retraitement	homme	–	3(50)	–	–	3(50)	
	femme	–	1(16,67)	–	–	1(16,67)	
Nouveau cas	Homme	–	–	–	–	–	MDR (INH+RIF)
	femme	1(16,67)	1(16,67)	–	–	2(33,33)	
Retraitement	homme	–	3(50)	–	–	3(50)	
	femme	–	1(16,67)	–	–	1(16,67)	

5. DISCUSSION

L'étude de la résistance de *Mycobacterium tuberculosis* aux traitements de première ligne est d'actualité mais malheureusement très peu d'études ont été réalisées au Sénégal dans ce sens. Nous avons travaillé sur des souches de 2012 pour lesquelles la culture sur Löwenstein-Jensen et l'antibiogramme sur le MGIT 960 ont été réalisés. Le génotype MTBDRplus est le test génotypique utilisé pour la caractérisation des gènes de résistance. Hormis la caractérisation des gènes de résistance, une comparaison sera faite entre les résultats du MGIT 960 et ceux du MTBDRplus.

Tous les échantillons monorésistants (isoniazide ou Rifampicine) ne se sont pas confirmés avec le MTBDRplus. Une seule souche était retrouvée multirésistante avec le génotype alors qu'il était totalement sensible aux antituberculeux sur milieu solide. Les gènes retrouvés sont par ordre de fréquence les mêmes que ceux observés dans la littérature pour beaucoup d'auteurs (Bénin, Burkina Faso cote d'ivoire) (3).

Répartition des patients selon l'âge et le sexe

Dans notre étude les hommes étaient plus atteints que les femmes. La moyenne d'âge était de 33 ans avec un écart compris entre 10 mois et 82ans. Cette différence sexuelle a été observée dans beaucoup d'études [5,11] effectuées au Burkina Faso et en Côte d'ivoire. De façon générale en Afrique subsaharienne la tuberculose touche les jeunes de 20 à 45 ans avec une nette prédominance masculine (54). Ceci pourrait s'expliquer par le mode de vie, les conditions de travail plus difficiles chez les hommes le tout dans un contexte de pauvreté généralisée. En effet cette prédominance masculine s'explique par la différence d'exposition entre les deux sexes, différence en rapport avec leurs activités facilitant la transmission du bacille plus chez les hommes. Notons que les travaux des ménagères moins exposées aux conditions difficiles en dehors du domicile seraient un facteur de protection [46]. Les tranches d'âge (25 à 50 ans) atteintes sont comparables à celles obtenues pour la même étude au Népal [21]. Ces données précisent une fois de plus l'atteinte de la population jeune par la tuberculose. Certains auteurs en France en 2002 [48] ont conclu à une expansion de MDR plus prononcée chez les femmes que les hommes. En Côte d'ivoire, NGUESSAN et associés avaient observé dans leur étude un sex ratio supérieur à 2 au profit des hommes [36].

Répartition de la résistance phénotypique en fonction des tranches d'âge

Après la culture sur milieu solide (LJ) et l'antibiogramme sur MGIT 960, les populations chez qui on avait déjà une résistance à l'isoniazide et à la Rifampicine étaient une

population jeune. En effet sur les 15 cas observés, 60% avaient entre 25 et 50 ans et le reste avait moins de 25 ans. Il ne peut en être autrement dans la mesure où la tranche d'âge la plus atteinte par le germe était très jeune. On comprend aisément que les cas de MDR se concentrent dans ces tranches d'âge. Au Congo en 2011 une étude a rapporté des résultats similaires de plus de 57% de MDR chez les moins de 40 ans [46]. Dans une étude réalisée en Uguanda la population la plus touchée était encore plus jeune (moins de 30 ans) [52]. Ceci se comprend aisément puisque dans beaucoup d'études le jeune âge fait partie des différents facteurs de risque de la tuberculose multirésistante.

Répartition de la population d'étude selon le type de traitement

Nous avons remarqué que la grande partie de notre population d'étude était représentée par des sujets nouveaux cas c'est-à-dire qui venaient d'être mis sous traitement (moins de 6 mois). Par contre, 19% étaient des sujets déjà traités et déclarés guéris. On s'attend donc comme dans la littérature à voir plus de bacilles résistants dans la catégorie des sujets en retraitement. Selon le dernier rapport de l'union internationale de lutte contre la tuberculose et les maladies respiratoires (UITMR) la proportion de MDR est indubitablement plus grande chez les patients antérieurement traités que chez les nouveaux [47]. L'explication est qu'il faut une certaine pression de sélection des médicaments soit sur la base d'un traitement inadéquat ou incorrectement pris. Les souches d'emblée résistantes initialement sans traitement antituberculeux sont moins fréquentes. Pour d'autres auteurs les MDR se sont observés seulement chez les patients en échec thérapeutique [52].

Différents types de prélèvement de la population d'étude

Par ordre de décroissance il s'agissait dans notre étude d'expectorations, ensuite les liquides de ponction et enfin très peu d'échantillons d'urine. Dans la littérature en effet peu d'études ont été menées sur la détection des MDR sur d'autres types de prélèvement. C'est dire la localisation particulièrement fréquente et préférentielle du *Mycobacterium tuberculosis*. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus au Congo et en Chine où plus de 90% de leur patients présentaient une tuberculose pulmonaire [46, 44]. Par contre dans une autre étude en Afrique du sud, ils avaient obtenu autant d'expectorations que de liquide d'épanchement (articulaire, pleural) [42]. Plus du tiers des expectorations étaient étiquetés à bacilloscopie positive avec tout au moins 1+, c'est dire le seuil de sensibilité des tests moléculaires sur ces expectorations. En effet, dans d'autres études, ils ont rejeté tout prélèvement d'expectorations qui à l'examen direct n'avait pas au moins 2+. [32,33].

Profil de sensibilité phénotypique vis à vis des antituberculeux de première ligne

La monorésistance observée était plus fréquente à l'Isoniazide. Viennent ensuite de façon décroissante la streptomycine, la rifampicine et enfin l'Ethambutol. Au total, 15 souches étaient résistantes à la fois à la Rifampicine et à l'isoniazide sur milieu MGIT. Dans une étude faite au Rwanda la monorésistance à la streptomycine était plutôt de loin, la plus fréquente suivie de celle à l'Ethambutol [49]. Certains auteurs en Côte d'Ivoire sur une population certes plus grande avaient eu des MDR et seulement une monorésistance à l'isoniazide. Ils n'ont pas observé de monorésistance ni à l'Ethambutol à la Pyrazinamide ou à la Rifampicine [36]. Sangaré et ses collaborateurs au Burkina en 2010 (54) n'avaient eu aucune monorésistance à la rifampicine malgré une population d'étude cinq fois plus grande que la nôtre.

Répartition selon le type d'échantillons collectés

Que ce soit chez les sujets déjà traités ou chez les nouveaux cas, le produit pathologique utilisé était dans plus de deux cas sur trois les expectorations. Dans une étude faite en Tunisie en 2014 [52], les auteurs n'ont évalué la sensibilité du MTBDRplus que sur des expectorations et tous les autres échantillons ont été rejetés. Certains auteurs pensent que la sensibilité du test est d'autant plus grande qu'il s'agisse de crachats BAAR et encore plus si la bacilloscopie est fortement positive 3 ou 4+ [53]. Les performances du test ne varient pas fortement selon que l'on travaille sur des cultures ou directement sur du matériel clinique.

Répartition des souches de MDR selon l'âge, le sexe et les cas diagnostiqués

Nous avons retrouvé presque tous les cas de MDR dans la catégorie des patients qui étaient âgés de moins de 50 ans. Il est en effet moins fréquent de trouver des sujets neufs infectés d'emblée par des bacilles résistants [50]. Ces résultats n'étonnent pas outre mesure puisqu'on sait que dans cette étude comme dans beaucoup d'autres la tuberculose elle-même touche les populations les plus jeunes. Il n'y a pas eu de différence entre les hommes et les femmes sur la fréquence de MDR, presque autant d'hommes que de femmes avait une tuberculose multirésistante. On sait par contre que le sexe féminin serait un autre facteur de risque d'apparition des MDR [53].

Répartition selon les résistances génotypiques (MTBDRplus)

Avec le MTBDRplus presque toutes les résistances phénotypiques ont été confirmées sauf dans un cas où le bacille était déjà résistant aux quatre antituberculeux majeurs sur DST mais est revenu sensible au MTBDRplus. Il s'agissait probablement d'une mutation silencieuse ou d'une absence d'identification par les sondes. En effet, le MTBDRplus utilise des sondes particulières à chaque gène de résistance. Pour des localisations rares cette technique peut donc paraître insuffisante. 5 cas de MDR ont été observés autant par la méthode phénotypique que par le MTBDRplus. Ce test a toujours été d'une sensibilité très grande de plus de 95%. [2]. En Uganda, la seule étude réalisée en 2013 avait montré un pourcentage plus élevé de MDR et la moitié d'ailleurs était en fait des XDR [52]. Au Burkina Faso en 2008 près de la moitié de leur population d'étude avaient des bacilles multirésistants [54]. Certaines études ont noté une influence de la répartition géographique des patients et la notion de multirésistance. En effet les patients résidents dans la capitale ont plus de chance de s'approvisionner à temps en médicaments nécessaires ce qui n'est pas toujours le cas avec les non-résidents quand on sait aussi que le nomadisme peut être un facteur de risque additionnel [52]. En 2007 au Bénin l'étude menée par l'équipe de Dissou et collaborateurs avait prouvé ces faits. Le nombre de MDR était au moins 3 fois plus élevé lorsqu'on considérait toute la population comportant les béninois de toutes les localités du pays [53]. La relation avec la localité n'a pas pu être précisée dans la présente étude du fait du manque des autres renseignements nécessaires.

Répartition selon les gènes en cause

Les gènes de résistance obtenus étaient le rpoB (Rifampicine), le katG et l'inhA pour l'isoniazide. Les mutations précises obtenues se trouvaient respectivement dans les loci: **D516V** (rpoB), **S315T** (KatG) et **C 15T** (InhA). Ceci reflète les données de la littérature où plus de 95% des résistances à la rifampicine se trouvaient dans le gène rpoB et dans le codon S315T pour l'isoniazide (3). Nos résultats sont les mêmes que ceux obtenus en Russie où la grande partie des résistances se retrouvait dans le D516V [55]. En Côte d'Ivoire également par ordre de fréquence il a été retrouvé : le D516V, puis H526D [52]. La mutation S315T katG est la plus courante pour l'isoniazide et ce dans 50 à 95% des cas (35). En 2012 par contre en Afrique du sud, contrairement à nos résultats, Blessing et collaborateurs ont eu les mutations de bas niveau à l'isoniazide majoritairement en C15T (55). Dans le gène rpoB ils n'ont eu que des mutations en H526Y. En effet il a été prouvé que les mutations dans le promoteur du gène InhA reflètent un bas niveau de résistance (Telenti, 1993, Musser 1998)

contrairement aux résistances classiques du katG. Les cas de monorésistance phénotypique à l'isoniazide n'étaient pas tous confirmés avec le test MTBDRplus. Seul un cas sur les 15 était retrouvé résistant. Ceci peut certainement s'expliquer par le fait que ces mutations soient silencieuses ou simplement parce que les sondes utilisées ne détectent pas toutes les mutations du gène InhA. La culture sur milieu liquide aussi peut manquer de spécificité et expliquer e nombre assez élevé de mono résistance à l'isoniazide. Une autre culture des souches concernées sur milieu solide avec la méthode des proportions pourrait aider à une meilleure compréhension.

6. CONCLUSION

Les médicaments antituberculeux standards sont utilisés depuis des décennies, et la résistance à ces médicaments s'accroît. La tuberculose multirésistante résulte avant tout d'un traitement inadapté. L'utilisation inappropriée ou incorrecte des antituberculeux, ou de médicaments de mauvaise qualité, peuvent entraîner une résistance. Dans cette étude il a été souligné une fois de plus l'apport effectif des méthodes génotypiques dans la promptitude du diagnostic de la tuberculose multirésistante. Tous les cas de monorésistance phénotypique surtout à l'isoniazide n'ont pas été confirmés par le test du génotype MTBDRplus probablement à cause des sondes utilisées qui n'ont pas pu détecter toutes les mutations des gènes concernés.

Comme le montre notre étude, la population jeune est la plus touchée et les hommes encore plus que les femmes par le problème de multirésistance. Nous avons travaillé beaucoup plus sur des expectorations que les liquides d'épanchement. Il y a eu plus de cas de résistance chez les patients en retraitement que chez les nouveaux sujets puisqu'il faut une certaine pression de sélection par les médicaments pour l'apparition de mutants résistants.

Le problème de MDR étant d'une grande inquiétude surtout au Sénégal où peu d'études ont été publiées à cet effet, il serait toutefois judicieux de compléter la présente étude par celle des années à venir c'est à dire 2013, 2014 et 2015 en vue d'obtenir des résultats encore plus pertinents et significatifs.

PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

La présente étude n'est que le début d'une série qui s'attardera sur la recherche de MDR au cours des années suivantes 2013, 2014 et 2015 au HALD.

Il serait tout aussi intéressant de comparer les résultats obtenus avec le génotype MTBDRplus avec ceux qu'on obtiendrait avec le GenXpert[®] concernant les monorésistances à la rifampicine.

Il serait judicieux de pouvoir centraliser tous les résultats nationaux dans un registre au PNT avec des chiffres récents. Nous avons déploré le manque d'informations récentes et le nombre très peu élevé d'études sur les MDR et XDR au Sénégal. Il existe dans notre étude beaucoup de cas de retraitement et ceci est le reflet d'un traitement mal fait certainement dû aux contraintes liées au traitement de la tuberculose ou de la disponibilité des médicaments. En effet des ruptures fréquentes sont notées dans le pays.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2014. WHO/HTM/TB/201408
2. Rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé 2014. Profil de tuberculose par pays.
3. Ploy MC. Denis F. Martin C. Bactériologies médicales techniques usuelles. Dans : Martin C. Denis F. Mycobactéries, Masson, 2011: 467- 493.
4. Panteix G. Mycobactéries tuberculeuses : Actinomycètes et mycobactéries ; ESKA Mars Juin 2007.
5. Exner R. Felkel M. Lay H. et al. Evaluation of Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility in clinical specimens from Nigeria using genotype MTBDR plus and MTBDR sl assays. Eur. J. Microbiol Immunol. 2013 ; 3 (4) : 252-257.
6. Kayser F. Manuel de poche de microbiologie médicale ; Medecine sciences ; Flammarion p 278-290
7. Sane M. Camara P. Thiam M. et al. Epidémiologie de la résistance de Mycobacterium tuberculosis aux antituberculeux à l'hôpital principal de Dakar. Etude rétrospective sur 4 ans (2000-2003). Revue de pneumologie clinique 2010 ; 66 : 266 - 271.
8. Hall AJ. Faustini A. Perrucci CA. Risks factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review thorax 2006; 61: 158-163.
9. Migliori GB. Centis R. Lange C, et al. Emerging epidemic of drug resistant tuberculosis in Europe, Russia, China, south America and Asia: current status and global perspectives curr opin pulm Med 2010; 16: 171-179.
10. Hanrahan CF. Erasmus L. Dorman SE, et al. The impact of expanded testing for multidrug resistant tuberculosis using genotype MTBDRplus in South Africa an observational cohort study. PLoS One. 2012; 7(11): e49898.

11. Affolabi D. Gninafon M. Anagonou SY, et al. Antituberculosis drug resistance among new and previously treated pulmonary tuberculosis patients in Cotonou Benin. *Int J. tuberculosis lung disease* 2007; 11(11): 1221- 4.
12. Anand KM. Jyoti U, et al. Evaluation of genotype MTBDRplus assay for rapid detection of drug susceptibility testing of multidrug resistance tuberculosis in Northern india 2013; 56: 139-143.
13. Sveltana Z Savilov E.. Heysell S, et al. Primary multidrug resistant mycobacterium tuberculosis in 2 regions, eastern siberia, russian federation; *emerg inf disease* 2013; 19(10) : 1649-52
14. Maurya AK. Singh AK. Kant S. et al. Use of genotype MTBDR plus assay to assess drug resistance and mutations pattern of multidrug tuberculosis isolates in nothern india 2013 31: 230-236.
15. Simner PJ. Buckwalter SP, et al. Identification of Mycobacterium species resistance determinant by use of Pcr electrospray ionization mass spectrometry ; *J. clin. Microbiol.* 2013; 51 (11): 3492-8.
16. Houpt E. Pholwat S. Stroup S, et al. Digital Pcr to detect and quantify heteroresistance in drug resistance mycobacterium tuberculosis; *plos one.* 2013; 8(2): e57238.
17. Susan E. Grant D. Violet N, et al. Genotype MTBDRplus for direct detection of mycobacterium and drug resistance in strains from gold miners in South Africa, *JCM.* April 2012; 50(4): 1189-1194.
18. Huang WL. Ruwen J, et al. Performance assessment of the genotype MTBDRplus test and DNA sequencing in detection of multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis. *JCM* 2009; 47(8): 2520-2524.
19. Franck GJ. Tran N. Kristen K, et al. Epidemiology of isoniazid resistance mutations and their effect on tuberculosis treatment outcome ; *JCM* 2011; 23 (8) : 124-129.

20. Seyoum B. Demissie M. Abraham A, et al. Prevalence and drug resistance pattern of *Mycobacterium tuberculosis* among new smear positive pulmonary tuberculosis patients in eastern Ethiopia. *Tuberculosis Research and Treatment* 2014; 753492: 7.
21. Sharma S. Madan M. Asthana AK, et al. Genotype MTBDR plus assay for molecular detection of Rifampicin and Isoniazid resistance in *M. tuberculosis*. *Indian J. Pathol Microbiol* 2014; 57 (3) : 423-6.
22. Ninet B. Nouveaux tests pour le diagnostic de la tuberculose. *Revue des Maladies Respiratoires* 2011; 28 (6) : 823-833.
23. Zhang Y. Yew W. Mécanismes de la résistance aux médicaments chez *M. tuberculosis* : *Int Journal Tuberculosis Lung Disease* 2009 ; 13(11) : 1320-1330.
24. Truffot pernot C, Veziris N, et al. Tests bactériologiques de la tuberculose maladie : standards et perspectives. *Revue des Maladies Respiratoires* 2011 ; 28(8) : 1034-1047.
25. Desire I. Diagnostic moléculaire par PCR en temps réel du complexe *Mycobacterium tuberculosis* résistant à l'isoniazide et à la Rifampicine : Thèse de biologie moléculaire 2013 ; 60.
26. Mathys V. Contribution à la compréhension des mécanismes moléculaires de résistance du *Mycobacterium tuberculosis* aux antituberculeux : Thèse de sciences biomédicales, Bruxelles 2010, 221.
27. Laurent xavier M. Recherche des marqueurs génétiques de souches de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes aux antibiotiques en république centrafricaine. Thèse 2011 ; 100.
28. Hilleman D. Rusch Gerdes S. Ritcher E, et al. Evaluation of the genotype MTBDRplus assay for Rifampicin and Isoniazid susceptibility testing of MT strains and clinical specimens. *J. clinic Microbiol* 2007; 45(8) : 2635-2640.

29. Raj NY, Surendra K, Rahul T, et al. Comparative evaluation of genotype MTBDRplus line probe assay with solid culture method in early diagnosis of multidrug resistant tuberculosis at a tertiary care centre in India. *Plos One* 2013; 8(10) : e 72036.
30. Therese KL, Natrajan S, Gayathri R, et al. Phenotypic and Genotypic characteristics of drug resistance in MT isolates from pediatric population of Chennai, India. *Ind J. Med Microbiol* 2012; 30(4): 411-417.
31. Saglik I, Oz Y, Kiraz N, et al. Evaluation of the Genotype MTBDR assay for detection of Rifampicin and Isoniazid resistance in MTBC isolates. *Indian J. Med Microbiol* , July 2014; 32(3) : 318-322.
32. Sjen O, Venter A, et al. Suitability of xpert MTB/Rif and genotype MTBDRplus for patient selection for TB clinical trial. *J. clin. Microbiol* 2011; 49(8) : 2827-2831.
33. Saleri N, Ouedraogo M, Dembele M, et al. Molecular detection of Rifampicin and isoniazid resistance to guide chronic tuberculosis patient management in Burkina Faso. *BMC infect Dis* 2009; 28(9) : 142.
34. Fabre M, Vong R, Pourcel C, et al. Performances du kit MTBDRplus dans le cadre de la surveillance de la résistance à la Rifampicine chez *Mycobacterium tuberculosis*. *Pathol biol* 2011 ; 59 : 94-96.
35. Zhang L, Duo L, et al. Application of genotype MTBDRplus in rapid detection of the *Mycobacterium* complex as well as its resistance to isoniazid and Rifampicin in a high volume laboratory in southern China. *Mol Biol Rep* 2011; 38(3) : 2185-92.
36. Khan S, Niemen S, et al. Molecular characterization of multidrug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients in punjab, Pakistan. *Pakistan J Zool* 2011; 45(1); 93-100.

37. De Freitas FA, Sola C, Bernado V, et al. Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: retrospective kat G and rpoB mutation profile analysis in isolates from a reference center in Brazil. Plos One 2014; 9(8): 104100.
38. Nguessan K, Ouassa T, Assi JS, et al. Assessment of Genotype MTBDRplus assay for Rifampicin and Isoniazid resistance detection on sputum samples in Côte d'Ivoire. Eur J Microbiol Immunol (BP). 2014; 4(3) : 166-73.
39. Chryssanthou E, Angebry K, et al. The Genotype MTBDRplus assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium Tuberculosis* in Sweden. APMIS 2012; 120: 405-9.
40. Felkel M, Lay H, Exner R, et al. Evaluation of *Mycobacterium Tuberculosis* drug susceptibility in clinical specimens from Nigeria using Genotype MTBDRplus and MTBDRsl assays. Eur J Microbiol Immunol (BP) 2013; 3(4): 252-57.
41. Vibol I, Buisson Y, Silaphet S, et al. Resistance of *Mycobacterium Tuberculosis* to antibiotics in Lao : first multicentric study conducted in « hospital. BMC Infectious diseases 2013; 13: 275.
42. Susan E, Mathema B, Violet N, et al. Genotype MTBDRplus for direct detection of MT and drug resistance in strains from Gold miners in South Africa. J. Clin. Microbiol. 2012; 50(4): 1189-94.
43. Michel F, Soler C, Gilles V, et al. Comparison of two commercial assays for the characterization of rpoB mutations in MT and description of new mutations conferring weak resistance to rifampicin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2009; 64: 259-62.
44. Rastogi N, and David H.L. Mode of action of antituberculosis drugs and mechanism of drug resistance in mycobacterium tuberculosis. Res Microbiol, 1993; 144 (2): 133-142.
45. Zhang Y. Genetics basis of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*; Res microbiol; 1993; 144 (2): 143-149.

46. Mario Raviglione C. Richard J O. Tuberculosis. In Harrison's principles of internal medicine, 17th edition. 2008 USA. The McGraw Hill companies.
47. JQ.Faroqi. Hasan R. Khan E, et al. Line probe assay for detection of rifampicin and Isoniazid resistant tuberculosis in Pakistan, J.PAK. Med Assoc 2012; 62 (8): 767-72.
48. Marzouk M. Dhaou M. Ferjani A, et al. Evaluation of Genotype MTBDRplus assay for rapid detection of resistance to INH and Resistance in Mycobacterium tuberculosis isolates collected in Tunisia. Mycobacterial diseases 2014; 4:2.
49. Mai Huyen NT. Edene W T, et al. Validation de l'essai genotype MTBDRplus pour le diagnostic de la tuberculose multirésistante au Sud Vietnam. BMC infectious Diseases 2010 ; 10: 149.
50. Michel F. Augu F. Tuberculose: technique de diagnostic en mycobactériologie, procédure simplifiée Xpert MTB/ RIF.
51. El hassani S. Déterminants de la tuberculose multirésistante dans la région de Rabat Salé Zemmour entre 2003 et 2013. Master en administration sanitaire et santé.
52. Lukoya D. Adatu F, et al. Among new and previously treated sputum smear plus tuberculosis patients in Uganda: results of the first national surveys. Plos One 2013; 8(8): e70763.
53. Caminero JA. Multidrug resistant tuberculosis epidemiology risk factors and case finding. Int J Tuber lung Dis 2010; 14 (4): 382-390.
54. Sangare L. Diande S. Badoum G. Résistance aux antituberculeux chez les cas de tuberculose pulmonaire nouveaux ou retraités au Burkina Faso. INT.J.tuberculosis lung Dis 14(11): 1424-1429.
55. Blessing S. Green E. Ndip R. et al. Molecular detection and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex from cattle at a dairy farm in the Nkonkobe region of south: a pilot study. Int Environ Res public health; 2012 june ; 9 (6) 2045-2056.