

Liste des abréviations :

ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
ARN	:	Acide Ribonucléique
ARNr	:	Acide Ribonucléique Ribosomal
ATP	:	Adenosine Triphosphate
BAAR	:	Bacille Acido-Alcool Résistant
CCM	:	Chromatographie en Couche Mince
CHU	:	Centre Hospitalo-Universitaire
CO ₂	:	Dioxyde de carbone
CPG	:	Chromatographie en Phase Gazeuse
CTA	:	Centre de Traitement Ambulatoire
HALD	:	Hôpital Aristide Le Dantec
HOGGY	:	Hôpital Général de Grand Yoff
IHS	:	Institut d'Hygiène et Social
IDR	:	Intradermoréaction
INH	:	Isoniazide
J	:	Jour
LCR	:	Liquide céphalo-rachidien
LJ	:	Lowenstein Jensen
MAC	:	Mycobacterium avium complex
MGIT	:	Mycobacterium Growth Indicator Tube
MDR	:	Multi Drug Resistance
NaCl	:	Chlorure de sodium
NALC	:	N-Acetyl-L-Cysteine
NaOH	:	Hydroxide de sodium
O ₂	:	Dioxygène
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
PANTA	:	Polymixine B, Azlociline, Acide naladixique, Trimetoprime, Amphotéricine B
PCR	:	Polymerase Chain Reaction

PRA	:	PCR-Restriction enzymatic Analysis
R	:	Rugueux
S	:	Dysgoniques
SDA	:	Strain Displacement Amplification
SIDA	:	Syndrome d'Immuno-Déficience Acquis
SPS	:	Sodium Polyanethole Sulfonate
TBMR	:	Tuberculose Multi Résistante
VIH	:	Virus de l'Immunodéficience Humain
ZN	:	Zielh Neelsen

Liste des tableaux :

Tableau I. Classification de Runyon des mycobactéries atypiques

Tableau II. Classification des espèces de mycobactéries en fonction du risque infectieux

Tableau III. Quantification des BAAR à l'examen après coloration des lames au ZN

Tableau IV. Identification phénotypiques des principales espèces de mycobactéries atypiques

Tableau V : Provenance des échantillons selon les hôpitaux

Tableau VI : Répartition des prélèvements selon les services hospitaliers

Tableau VII : Nature des prélèvements

Tableau VIII : Résultats globaux de la bacilloscopie et de la culture

Tableau IX : Provenance des cultures positives selon les hôpitaux

Tableau X : Provenance des cultures positives selon les services hospitaliers

Tableau XI : Origine des échantillons à culture positive aux mycobactéries

Tableau XII : Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon les services hospitaliers

Liste des figures :

Figure 1 : Filiation taxonomique des mycobactéries

Figure 2 : Paroi des mycobactéries

Figure 3 : Mycobactéries à l'examen après coloration au ZN

Figure 4 : Mycobactéries à l'examen après coloration à l'auramine

Figure 5 : Cultures des mycobactéries sur milieu LJ

Figure 6 : Répartition de la population d'étude selon le sexe

Figure 7 : Répartition de la population d'étude selon l'âge

Figure 8 : Statut des patients selon le diagnostic

Figure 9 : Résultats de la bacilloscopie et de la culture

Figure 10 : Cultures positives selon l'espèce isolée

Figure 11 : Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon les structures de santé

Figure 12 : Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon le sexe et l'âge

Figure 13 : Nature des cultures positives aux mycobactéries atypiques

Figure 14 : Répartition des espèces de mycobactéries isolées

MYCOBACTERIES ATYPIQUES ISOLEES AU LABORATOIRE
DE BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE DE L'HOPITAL ARISTIDE
LE DANTEC DE JANVIER 2011 à JUIN 2012

Table des matières

Introduction	6
I. DEFINITION :	8
II. CLASSIFICATION	8
II.1 Classification sur le plan bactériologique	8
II.2 Classification sur le plan clinique	10
III. Caractères bactériologiques	11
III. 1 Caractères communs au genre Mycobacterium	11
III.1.1 structure.....	11
III.1.2 Caractères morphologiques.....	12
III.1.3 Caractères biochimiques	13
III.2 Caractères d'orientation des mycobactéries atypiques les plus rencontrées en pathologie humaine	15
III.2.1 Les mycobactéries photochromogènes	15
III.2.2 Les mycobactéries scotochromogènes	15
III. 2.3 Les mycobactéries non chromogènes.....	16
III.2.4 Les mycobactéries à croissance rapide.....	17
IV. Epidémiologie	17
IV.1 Habitat	17
IV.2 Transmission	18
V. Pouvoir pathogène	18
V.1 Infections pulmonaires	18
V.2 Les ganglions lymphatiques	18
V.3 Les atteintes cutanées	18
V.4 Infections disséminées	19
V.5 Manifestations inhabituelles	19
VI. Diagnostic bactériologique	20
VI.1 Prélèvement	20

VI.1.1 Prélèvements pulmonaires	20
VI. 1.2 Prélèvements extrapulmonaires.....	21
VI. 2 Transport et Conservation	22
VI. 3 Décontamination	22
VI.3.1 Méthode au N Acetyl L cystéine sodique (NALC)	23
VI. 3.2 Méthode de Petroff.....	23
VI.4 Examen direct.....	24
VI.4.1 Réalisation des frottis	24
VI.4.2 Coloration des lames	24
VI.4.3 Lecture des lames.....	25
VI. 5 Culture	27
VI.5.1 Milieux solides	27
VI.5.2 Les milieux gélosés semi-synthétiques	29
VI.5.3 Milieux liquides	29
VI.5.4 Méthode MGIT®	29
VI.5.5 BacT/Alert 3D®	30
VI.5.6 MB Redox®	30
VI.5.7 Hémocultures	30
VI.6 Identification	31
VI. 6.1 Identification phénotypique	31
VI.6.2 Identification génotypique	33
I. Cadre d'étude.....	37
II. Période d'étude.....	38
III. Matériels et produits	38
III.1 Matériels	38
III.1.1. Equipements.....	38
III.1.2 Consommables.....	38

III.2 Réactifs et milieux de culture	38
IV. Méthodologie	39
IV.1 Prélèvements	39
IV.2 Recueil des prélèvements	39
IV.3 Réalisation de frottis	39
IV.4 Coloration de Ziehl-Neelsen	40
IV.5 Lecture des lames	40
IV.6 Décontamination-Fluidification-Concentration	40
IV.7 Culture des échantillons	40
IV.7.1 Culture sur milieux solides (Lowenstein Jensen)	40
IV.7.2 Culture sur milieu liquide	41
IV.8 Identification	41
IV.8.1 Extraction d'ADN par la méthode au chloroforme :	42
IV.8.2 Amplification	42
IV.8.3 Hybridation.....	44
V. Expression des résultats	47
V. 1 Echantillons colligés	47
V.1.1 Logiciels statistiques:.....	47
V.1.2 Nombre	47
V.2 Données épidémiologiques	47
V.2.1 Provenance des prélèvements	47
V.2.2 Provenance des prélèvements selon le service hospitalier	48
V.2.3 Nature des prélèvements.....	49
V.3 Répartition de la population d'étude	51
V.3.1 Répartition selon le sexe.....	51
V.3.2 Répartition selon l'âge	52
V.3.3 Répartition selon le statut.....	53

V.4 Données bactériologiques	54
V.4.1 Résultats globaux	54
V.4.2 Cultures positives	55
V.4.3 Cultures positives aux mycobactéries atypiques	59
1. Echantillons colligés	64
1.1 Nombre	64
1.2 Nature des échantillons	64
2. Données épidémiologiques	64
3. Résultats bacilloscopie et culture	65
4. Cultures positives aux mycobactéries atypiques	66
4.1 Nombre	66
4.3 Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon l'âge et le sexe	67
4.4 Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon la nature des prélèvements	68
4.5 Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon le motif de prescription	69
4.6 Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon l'espèce	69
Discussion	64
Conclusion	71
Recommandations	74
Références bibliographiques	75
Annexes	91

INTRODUCTION

Les mycobactéries atypiques sont des germes de l'environnement humain et animal [63] peu virulents chez les immunocompétents.

A la fin du XIX siècle et pendant toute la moitié du XXe siècle, la tuberculose représentait un tel problème de santé publique que toutes les recherches se sont focalisées sur le bacille de la tuberculose. Etant relégués au rang de simples saprophytes, ces Bacilles Acido-Alcool Résistants (BAAR) ne présentaient pas les caractéristiques de *M. tuberculosis* et étaient observés dans l'environnement et dans les prélèvements d'origine humaine ou animale. Ils étaient considérés comme des bacilles sans importance. Ce n'est qu'à partir des années 1950, que des publications de plus en plus nombreuses ont attiré l'attention sur la responsabilité indiscutable de mycobactéries différentes du bacille de la tuberculose dans le déroulement d'un certain nombre de processus pathologique. Leur rôle pathogène chez l'homme est de plus en plus reconnu [32 ; 71].

Au cours des dernières années, avec l'avènement du SIDA, on a assisté à une recrudescence des infections à mycobactéries, notamment les mycobactéries atypiques dont certaines occupent une place importante dans les infections opportunistes [43 ; 81 ; 91].

Dans le domaine du diagnostic biologique, des changements importants ont été mis au point avec l'application des méthodes de la biologie moléculaire. Un diagnostic correct et rapide permet une meilleure prise en charge et une prescription adaptée.

Dans notre étude nous nous proposons de :

- faire le point sur les mycobactéries atypiques isolées de patients reçus au laboratoire de bactériologie de l'hôpital Aristide Le Dantec.
- Donner les caractéristiques épidémiologiques de ces mycobactérioses.

Dans la première partie de ce travail, nous allons nous consacrer à un rappel bibliographique sur les mycobactéries et particulièrement sur les mycobactéries atypiques et dans la deuxième partie, nous décrivons la

méthodologie et nous rapportons les résultats de notre travail qui seront commentés et confrontés avec les données de la littérature.

PREMIERE PARTIE

I. DEFINITION :

Les mycobactéries sont des bacilles à Gram positif faible, caractérisées par leur aptitude à conserver la coloration malgré l'action combinée de l'alcool et des acides dilués; elles sont appelées bacilles acido-alcoolo résistants.

Les mycobactéries se distinguent également par leur métabolisme aérobie stricte ou micro aérophile, et par leur croissance lente ou très lente (2 jours à 8 semaines) [17 ; 24].

Les mycobactéries atypiques sont ceux n'appartenant ni au "complexe *Mycobacterium tuberculosis*" (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*) ni au groupe *M. leprae*. [66]

Elles sont présentes dans l'environnement et chez les animaux et se comportent chez l'homme comme des opportunistes. Elles sont la cause de mycobactérioses. [58 ; 65]

II. CLASSIFICATION

II.1 Classification sur le plan bactériologique

Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des Actinomycétales, à la famille des *Mycobacteriaceae*, au genre *Mycobacterium* et à plusieurs dizaines d'espèces qui sont maintenant identifiées et classées dans trois groupes :

Complexe *M. tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* et le groupe des mycobactéries atypiques. [17 ; 24 ; 65]

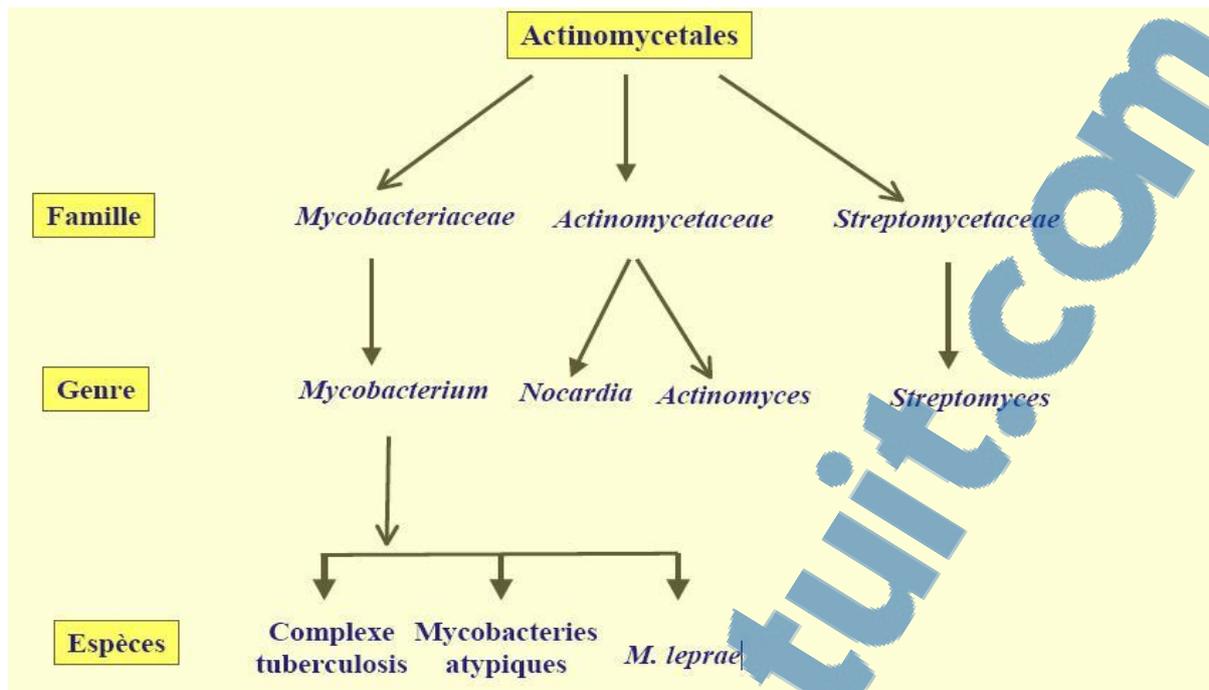


Figure 1 : Filiation taxonomique des mycobactéries [24]

Tableau I : Classification de Runyon des mycobactéries atypiques [24]

Groupe	Mycobactéries	Caractères cultureux
Groupe I	Mycobactéries photochromogènes	Colonies non pigmentées à l'obscurité, se pigmentent en jaune après exposition à la lumière (caratogenèse photo-inductible)
Groupe II	Mycobactéries scotochromogènes	Colonies à croissance lente, pigmentées en jaune orangé à l'obscurité, plus intensément à la lumière (caratogenèse constitutive)
Groupe III	Mycobactéries non chromogènes	Colonies à croissance lente non pigmentées à l'obscurité
Groupe IV	Mycobactéries à croissance rapide	Colonies apparaissent entre 7 et 10j dont la pigmentation est variable suivant les espèces

II.2 Classification sur le plan clinique

Les mycobactéries atypiques peuvent être classées selon le risque infectieux. On distingue ainsi le :

- Groupe I où le risque d'infection est faible pour l'individu et les populations. Rarement pathogènes, ces espèces ne sont jamais, ou presque jamais responsables de maladies chez l'adulte normal.
- Groupe II où le risque d'infection est modéré pour l'individu. Les bactéries en cause sont à l'origine d'infections de sévérité moyenne dans la population. Elles sont généralement classées parmi les germes pathogènes opportunistes.
- Groupe III où le risque est élevé pour l'individu mais modéré pour la population. La maladie faisant suite à l'infection est sévère et parfois mortelle. Il s'agit généralement de pathogènes stricts ou spécifiques [18].

Tableau II: Classification des espèces de Mycobactéries en fonction du risque infectieux [48]

Groupe de risque I	Groupe de risque II		Groupe de risque III
<i>M. segmatis</i>	<i>M. aurum</i>	<i>M. avium</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. phlei</i>	<i>M. chitae</i>	<i>M. intracellulaire</i>	<i>M. bovis</i>
<i>M. fallax</i>	<i>M. duveitii</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. africanum</i>
<i>M. thermoresistibile</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. ulcerans</i>
<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. gilvum</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. microti</i>
<i>M. gastri</i>	<i>M. kemossense</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. leprae</i>
<i>M. triviale</i>	<i>M. lepraemunium</i>	<i>M. marinum</i>	
<i>M. sphaigui</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. paratuberculosis</i>	
<i>M. gordonae</i>	<i>M. voccae</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	
<i>M. fluvescens</i>	<i>M. agri</i>	<i>M. szulgai</i>	
<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. aichiense</i>	<i>M. xenopi</i>	
<i>M. senegalense</i>	<i>M. chubuense</i>	<i>M. asiaticum</i>	
<i>M. terrae</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. haemophilum</i>	
<i>M. porcinum</i>	<i>M. rhodesiae</i>	<i>M. shimoidei</i>	
<i>M. diernhofai</i>	<i>M. moriokoense</i>	<i>M. simiae</i>	
<i>M. pulveris</i>	<i>M. poriferae</i>		
<i>M. tokaense</i>			
<i>M. nonchromogenicum</i>			

III. Caractères bactériologiques

III.1 Caractères communs au genre *Mycobacterium*

III.1.1 structure

Les mycobactéries ont la structure des bactéries à Gram+ sans enveloppe externe. Leur paroi est très riche en lipides avec des polyosides pariétaux, l'arabinogalactane et la lipoarabinomannane, des glycolipides et une grande richesse en acides gras, les acides mycoliques qui tapissent la surface de ces bactéries. Cette paroi complexe confère une grande résistance dans l'environnement et à la digestion des macrophages. [36; 47 ; 68 ; 74 ; 90 ; 93]

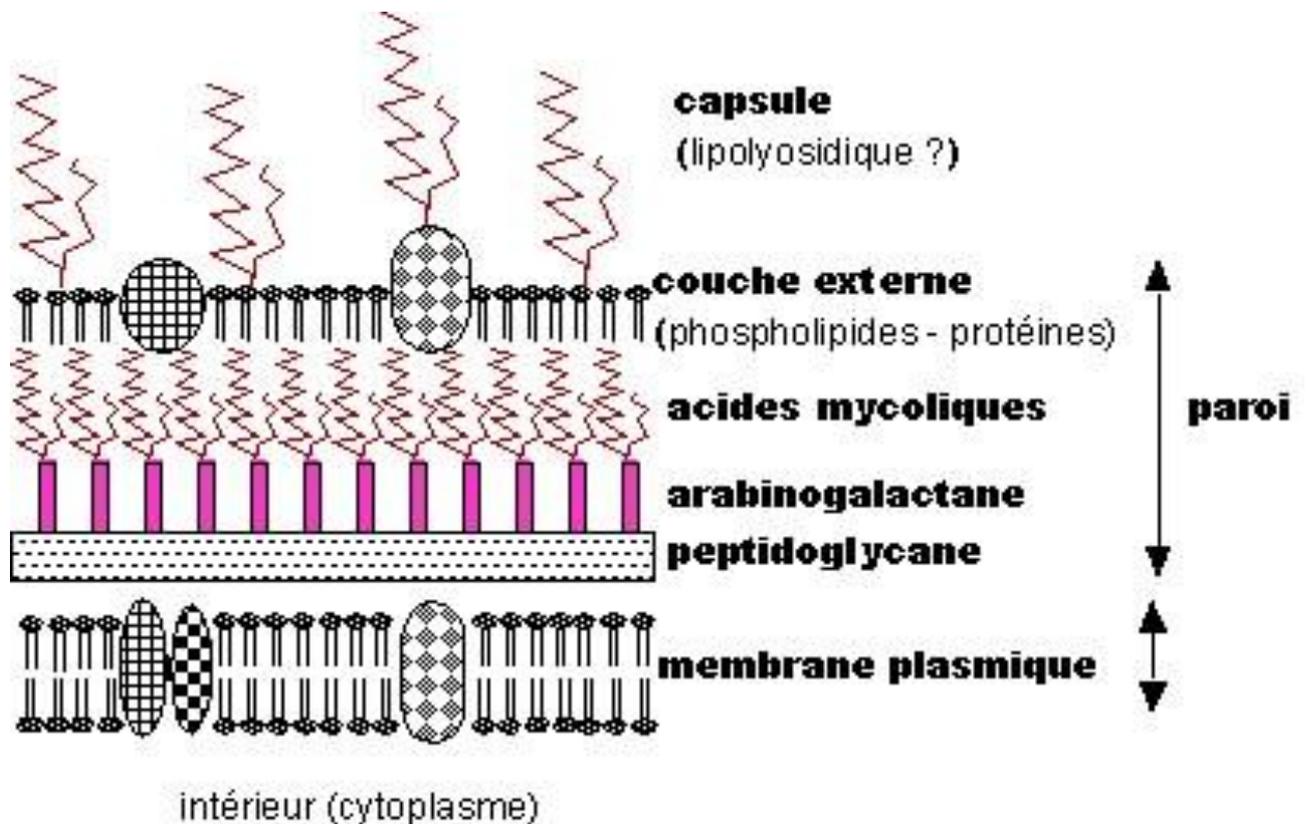


Figure 2 : Paroi des mycobactéries [29]

III.1.2 Caractères morphologiques

Les bactéries du genre *Mycobacterium* se présentent sous la forme de bacilles fins, légèrement incurvés de 2 à 5 μm de long sur 0,2 à 0,3 μm de large, aux extrémités arrondies. Ces bacilles sont immobiles, acapsulés et asporulés.

Bien qu'ayant la structure générale des bactéries à Gram positif, les mycobactéries sont difficilement colorables par les colorants usuels. Mais colorées par la fuchsine phéniquée à chaud selon la méthode de Ziehl Nielsen, elles retiennent le colorant malgré l'action combinée des acides dilués et de l'alcool (acido-alcool-résistance) et apparaissent alors comme de fins bâtonnets rouges. Les mycobactéries, colorées par l'auramine phéniquée, deviennent fluorescentes sous l'influence de la lumière U.V. [4 ; 24]

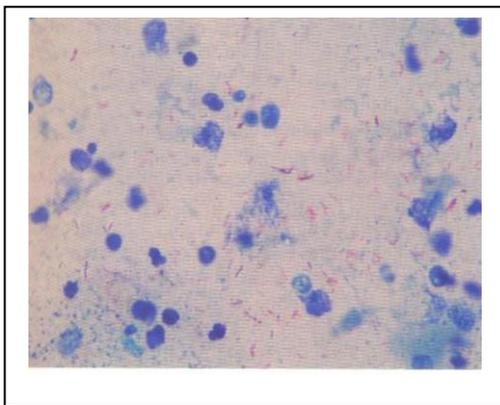


Figure 3 : Mycobactéries à l'examen après coloration de Ziehl Nelsen [24]

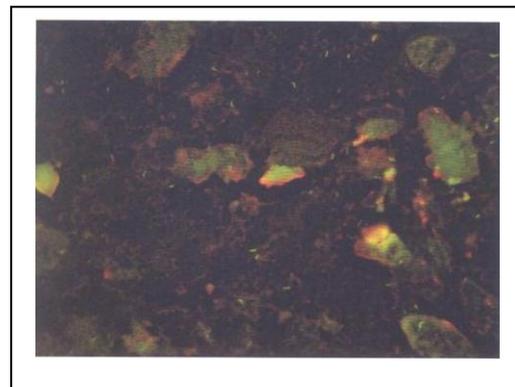


Figure 4 : Mycobactéries après coloration à l'auramine [24]

Dans les produits pathologiques, elles apparaissent isolées ou groupées en petit amas, parfois sous forme d'ébauche de cordes et de torsades.

En culture, on peut observer des formes coccoïdes ou filamenteuses ; dans les cultures âgées ou dans les produits pathologiques provenant de malades sous traitement antibiotique, les mycobactéries ont souvent un aspect granuleux.

III.1.3 Caractères biochimiques

L'étude des caractères biochimiques repose essentiellement sur la recherche de la production d'acide nicotinique, de nitrate réductase et d'une catalase [4; 5 ; 14 ; 57].

III.1.3.1 Production d'acide nicotinique ou Niacine

Certaines espèces de mycobactéries libèrent de l'acide nicotinique dans le milieu de culture sans l'utiliser. Les quantités de niacine produites varient d'une espèce à l'autre et, c'est cette propriété qui est mise à profit dans le Niacin-test pour l'identification de *M tuberculosis*.

III.1.3.2 Réduction des nitrates en nitrites

C'est Virtanen [27] qui, le premier, a étudié la capacité des mycobactéries à réduire les nitrates en nitrites. La plupart d'entre elles possèdent une nitrate réductase.

III.1.3.3 Activité catalasique

Toutes les mycobactéries produisent une catalase sauf les souches de *M. tuberculosis* et de *M. bovis* résistantes à plus de 10 $\mu\text{g/ml}$ d'isoniazide (INH). Il s'agit d'une enzyme soluble, intracellulaire, avec différents types. Elle est thermolabile (inactive à +68°C) pour les mycobactéries tuberculeuses.

III.1.3.4 Aryl sulfatases

Ce sont des enzymes qui hydrolysent les composés de formule générale R-OSO₃H, dans lesquels le radical R a une structure aromatique.

Cette activité aryl sulfatase a été mise en évidence par Whitehead et Coll [18] en utilisant comme substrat le disulfate de phénolphtaléine et le naphtylsulfate: la phénolphtaléine libérée par l'enzyme est mise en évidence par alcalinisation ; le naphthol libéré est révélé par une réaction de diazotation, peu spécifique cependant, car d'autres réactions de ce genre peuvent se produire dans le milieu de culture.

III.1.3.5 Amidases

Il s'agit de la nicotinamidase, de l'uréase et de la pyrazinamidase.

III.1.3.6 Hydrolyse du Tween 80

David et Dubor [4] ont montré que les mycobactéries possèdent des estérases capables de libérer, par hydrolyse, de l'acide oléique à partir du dérivé polyoxyéthylénique du monoléate de sorbitan (Tween 80).

L'étude de cette hydrolyse est particulièrement utile pour distinguer *M. scrofulaceum* (réaction négative) de *M. gordonae* et *M. flavescens* (réaction positive) et, pour le diagnostic différentiel des mycobactéries non chromogènes.

III.1.3.7 Croissance en présence d'inhibiteurs

Certaines mycobactéries ont la capacité de croître sur des milieux contenant des produits toxiques. En général, cette croissance est étudiée en utilisant deux produits: le thiacetazone ou thiosemicarbazone (TB1) et l'hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique (TCH).

M. tuberculosis et *M. bovis* sont sensibles à 10µg/ml de TB1 alors que la plupart des mycobactéries non tuberculeuses à l'exception de (*M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. gastri*) y sont résistantes
M. africanum peut y être sensible ou résistant.

III.2 Caractères d'orientation des mycobactéries atypiques les plus rencontrées en pathologie humaine

III.2.1 Les mycobactéries photochromogènes

Les colonies sont non pigmentées à l'obscurité, et se pigmentent en jaune après exposition à la lumière (caratogenèse photo-inductible).

III. 2.1.1 M. kansasii

Il a un aspect caractéristique : gros bacilles, granuleux, groupés en chainettes. Le délai de croissance est de 2 à 3 semaines à 37°C. Il possède une forte activité catalasique et est nitrate réductase fortement positive, il hydrolyse le Tween 80 et possède une phosphatase acide.

III.2.1.2 M. marinum

Il est plus trapu que *M. kansasii* et donne sur milieu LJ des colonies lisses régulières. Il réduit les nitrates en nitrites, hydrolyse le tween 80 et possèdent une phosphatase acide.

III.2.2 Les mycobactéries scotochromogènes

Les colonies sont à croissance lente, pigmentées en jaune orangé à l'obscurité, plus intensément à la lumière (caratogenèse constitutive).

III.2.2.1 M. gordonae

Sur milieu LJ, les bacilles sont longs (4 à 6 µm) parfois granuleux. Les colonies ont l'aspect eugonique. Le délai de croissance est de 7 à 10 jours à 37°C et à 30°C. Il est nitrate réductase négative et l'hydrolyse du tween 80 et la phosphatase acide sont souvent positives.

III. 2.2.2 M. szulgai

Il a la même morphologie que *M. gordonae* mais diffère par une réaction de la nitrate réductase positive et par une hydrolyse très tardive du Tween 80.

III.2.2.3 M. xenopi

C'est un bacille long et fin. Il donne de petites colonies (dysgoniques) à la surface lisse. Sur milieu de Löwenstein-Jensen enrichi de 0,25 % de pyruvate ou sur milieu de Coletsos, les colonies apparaissent plus précocement, sont plus grosses et souvent plus nombreuses, notamment à l'isolement [27].

La croissance est optimale à 45°C, et est possible à 52°C.

Les réactions de la nitrate réductase, de l'hydrolyse du Tween 80 et de la phosphatase acide sont négatives [30].

III.2.2.4 M. scrofulaceum

Les bacilles en culture sur milieu LJ sont courts. Les colonies sur ce milieu sont semblables à celles de *M. gordonae* mais sont dysgoniques. Le délai de croissance est de 3 semaines. Les épreuves de réduction des nitrates, d'hydrolyse du Tween 80 et de la phosphatase acide sont négatives, la catalase faible et l'uréase positive.

III. 2.3 Les mycobactéries non chromogènes

Colonies à croissance lente non pigmentées à l'obscurité.

III.2.3.1 M. avium

Les bacilles sont très courts (coccobacilles). Les colonies se caractérisent par leur dissociation en grandes colonies plates, opaques et régulières et en petites colonies transparentes et irrégulières. Une pigmentation beige jaune peut apparaître sous l'effet de l'âge et de la lumière (photo induction tardive).

III.2.3.2 M. malmoense

Les bacilles sont courts. Ils ont une faible activité catalasique et sont dépourvus de nitrate réductase et de phosphatase acide. Ils hydrolysent le Tween 80.

III.2.3.3 *M. ulcerans*

C'est un bacille dont l'aspect microscopique et les colonies ressemblent beaucoup à ceux de *M. tuberculosis*. Il se différencie de *M. tuberculosis* par sa forte activité catalasique thermostable, sa température optimale de culture à 33°C, sa difficulté et sa lenteur de croissance sur milieu LJ. Il présente une résistance aux antituberculeux notamment l'isoniazide et produit une toxine nécrosante responsable de la gravité des ulcérations qu'il provoque.

III.2.4 Les mycobactéries à croissance rapide

Les colonies apparaissent entre 7 et 10 jours et la pigmentation est variable suivant les espèces (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. phlei*, *M. senegalense*). *M. fortuitum* possède une forte activité nitrate réductase alors que *M. chelonae* en est dépourvu. *M. phlei* donne des colonies rugueuses scotochromogènes. *M. senegalense* se caractérise par des bacilles longs, cyanophiles. La catalase est thermolabile tandis que la peroxydase, la nitrate réductase, l'hydrolyse du Tween 80, la phosphatase acide et l'uréase sont positives.

IV. Epidémiologie

IV.1 Habitat

Les mycobactéries atypiques sont largement distribuées dans l'environnement. Elles sont retrouvées dans le sol, l'eau, l'air, les animaux et les produits laitiers [25 ; 67 ; 94]. Certaines peuvent contaminer l'homme et occasionner une infection surtout chez les personnes immunodéprimées [32; 67 ; 73; 82 ; 94]

IV.2 Transmission

L'homme est contaminé par contact avec l'environnement souillé (Eau, air ...), ou par contact avec une personne porteuse de mycobactéries (malade qui tousse). Le facteur le plus déterminant des Mycobactérioses est l'immunodépression [26; 33 ; 65 ; 92].

V. Pouvoir pathogène

Le spectre des manifestations cliniques causées par les mycobactéries atypiques est très large surtout chez les personnes immunodéprimées : infections pulmonaires (similaires à la tuberculose pulmonaire), infections cutanées et des tissus mous, lymphoadénite surtout chez l'enfant [75] et des infections disséminées.

La seule mise en évidence de mycobactéries dans un prélèvement ne permet pas d'affirmer le caractère pathogène (bactéries opportunistes).

V.1 Infections pulmonaires

Les infections pulmonaires causées par les mycobactéries atypiques sont similaires à la tuberculose pulmonaire [22 ; 42]. *Mycobacterium kansasii* est le plus pathogène des mycobactéries atypiques affectant les poumons [65].

Des cas ont été rapportés avec des atteintes pulmonaires chez des immunocompétents et des immunodéprimés : *Mycobacterium xenopi* [19; 31 ; 44 ; 57], et *M. avium* [8 ; 10 ; 32 ; 41].

V.2 Les ganglions lymphatiques

Les lymphoadénites dues aux mycobactéries atypiques touchent le plus souvent les enfants de moins de 5ans et est très rares chez les enfants de plus de 12 ans. [33 ; 37 ; 38 ; 51 ; 89]

V.3 Les atteintes cutanées

Les mycobactéries atypiques peuvent causées des atteintes cutanées

M. haemophilum peut être responsable de manifestations dermatologiques notamment des lésions suppuratives ou granulomateuses, ulcérations, abcès subcutanés [74; 80 ; 84]. *M. fortuitum* est plus impliqué dans les infections cutanées [75]. *M. haemophilum* est aussi une cause reconnue de lésions cutanées chez les personnes immunodéprimées [54].

M. ulcerans est l'agent responsable de l'ulcère de Buruli [9 ; 42 ; 56] qui sévit en Afrique centrale ou il existe un foyer important dans la région de Buruli en Ouganda [64]. L'ulcère de Buruli est la troisième mycobactériose la plus sévère après la tuberculose et la lèpre [25 ; 81 ; 86].

V.4 Infections disséminées

Les infections disséminées s'observent surtout chez les personnes immunodéprimées. En dehors du SIDA, il s'agit des transplantés, des dialysés, des lymphomes, des leucémies, des malades sous traitement immunosuppresseurs [3 ; 55 ; 73 ; 76 ; 89 ; 91].

Ce sont des septicémies avec diffusion dans plusieurs organes : foie, rate, ganglions, peau, articulation. On observe aussi des coinfections avec d'autres germes opportunistes [78].

Les infections disséminées à mycobactéries atypiques sont surtout observées quand le taux de CD4 est faible [43].

V.5 Manifestations inhabituelles

Des cas ont été rapportés : ostéomyélites, atteinte de la moelle osseuse, atteintes urinaires, infections ORL, infections oculaires, infections sur matériel de prothèse, maladie de Crohn, spondylarthrite. [1 ; 30 ; 40; 70 ; 72 ; 77]

VI. Diagnostic bactériologique

VI.1 Prélèvement

Tous les organes peuvent être le siège d'une infection à mycobactéries. Le biologiste pourra orienter le prélèvement en fonction des résultats négatifs de la bactériologie standard et du contexte clinique.

La majorité des prélèvements a une origine broncho-pulmonaire (expectorations, tubages bronchiques). Les autres prélèvements sont essentiellement des prélèvements d'urines, des liquides de ponction (liquides céphalo-rachidiens, liquides pleuraux, abcès, ganglions) et des biopsies. [24 ; 35]

L'émission bacillaire étant intermittente, les prélèvements broncho-pulmonaires et urinaires doivent être répétés trois jours de suite et traités séparément.

VI.1.1 Prélèvements pulmonaires

Les prélèvements respiratoires sont recueillis dans du matériel stérile, de préférence dans des tubes à centrifuger à vis de 50ml se fermant de manière hermétique pour éviter tout risque de contamination.

Les expectorations spontanées sont recueillies après un effort de toux le matin au lever. Si le sujet ne tousse pas, les expectorations sont provoquées par inhalation d'un aérosol de sérum physiologique ou après kinésithérapie.

Les tubages gastriques permettent le recueil des sécrétions bronchiques dégluties au cours de la nuit et sont réalisés au lit du malade chez un sujet en jeun depuis la veille. Les aspirations bronchiques, les brossages et les liquides de lavages alvéolaires recueillis lors d'une fibroscopie sont aussi contributifs dans la recherche de mycobactéries.

Deux techniques récemment rapportées permettent de pallier les difficultés rencontrées pour obtenir des expectorations chez les bébés, les enfants et chez les adultes qui ne crachent pas :

- ✓ La première technique repose sur l'inhalation d'un vasoconstricteur (salbutamol 200µg) suivie d'une nébulisation d'eau salée (5ml) et d'oxygène (5l/min) pendant 15min. Une percussion thoracique suivie d'une aspiration douce des sécrétions nasopharyngées sont réalisées.
- ✓ La seconde utilise un dispositif constitué d'une capsule de gélatine relié à une ficelle. Après ingestion de la capsule, une stimulation de la sécrétion bronchique par une solution de NaCl à 20% est réalisée pendant 90minutes. La capsule est ensuite recueillie à l'aide de la ficelle puis soumise aux étapes classiques du diagnostic de laboratoire.

VI. 1.2 Prélèvements extrapulmonaires

VI.1.2.1 Urines

Après restriction hydrique la veille du prélèvement, 50ml des urines du matin sont prélevés dans un pot stérile.

VI.1.2.2 Sang

La recherche de mycobactéries dans le sang est réalisée à partir d'une ponction veineuse, le sang étant recueilli dans un tube contenant un anticoagulant liquide (SPS, citrate, héparine). Elle peut aussi être réalisée sur les flacons des systèmes de lecture automatisée (Myco/F-lytic[®], Becton Dickinson[®] ; MB Blood[®], biomerieux[®]) et sur le système de lyse-centrifugation Isolator (Oxoid[®])

VI.1.2.3 LCR et liquides d'épanchements (ascites, pleuraux, articulaires)

Un volume de 3ml est nécessaire à l'étude cyto bactériologique de ces prélèvements.

Le LCR est prélevé au niveau de la moelle épinière entre L4 et L5 après désinfection de la zone et est recueilli dans un tube stérile.

VI.1.2.4 Ponctions d'abcès

Le prélèvement à la seringue doit être privilégié et la seringue adressée directement au laboratoire. Les prélèvements à l'écouvillon sont déposés dans un flacon stérile et humidifiés avec quelques gouttes d'eau stérile ou d'eau physiologique stérile.

VI.1.2.5 Biopsies et pièces opératoires

Une bonne collaboration (transmission d'examen direct et de prélèvements) entre les laboratoires d'anatomie pathologique et de bactériologie permet de conforter et de rattraper certains diagnostics.

Le prélèvement effectué stérilement est envoyé dans un flacon stérile contenant un petit volume d'eau stérile.

VI. 2 Transport et Conservation

Si le laboratoire se trouve à l'extérieur de la structure ayant effectué le prélèvement, celui-ci devra être transporté à 4°C après avoir été bien conditionné selon les normes en vigueur pour le transport de produits biologiques infectieux.

Les prélèvements sont conservés à 4° C si le traitement est différé.

VI. 3 Décontamination

En fonction du caractère polymicrobien ou monomicrobien, les prélèvements vont faire l'objet ou non d'une décontamination. Cette étape a pour but d'éliminer la flore commensale des échantillons qui envahirait les milieux de culture avant la détection des mycobactéries qui sont des bactéries à croissance lente. Les mycobactéries sont plus résistantes à l'action des antiseptiques, des acides et des bases dilués que les bactéries commensales.

Les liquides de ponction, les ponctions de collections fermées ou les biopsies prélevées stérilement sontensemencées sans décontamination après centrifugation. [17 ; 24]

Les autres prélèvements considérés comme polybactériens (tubages, expectorations, liquides d'aspiration bronchique, urines, abcès futilisés...) sont décontaminés avant ensemencement.

De nombreuses méthodes de décontamination ont été décrites :

VI.3.1 Méthode au N Acetyl L cystéine sodique (NALC)

On prépare extemporanément la solution décontaminante en mélangeant dans un flacon stérile 100ml d'une solution de NaOH (solution A), 100ml d'une solution de citrate de sodium (solution B) et 1g de N Acetyl L Cysteine (NALC). Dans un tube à centrifuger conique :

Ajouter aux expectorations de volume inférieur à 10ml, de l'eau distillée stérile jusqu'à 10ml, puis ajouter la même quantité de la solution décontaminante (10ml). Mélanger par agitation au vortex pendant 20s et laisser en contact pendant 20min à température ambiante en agitant doucement sur agitateur de Kahn. Enfin ajouter le tampon phosphate jusqu'à 50ml puis centrifuger à 3000 tours/min pendant 15min. Jeter le surnageant et reprendre le culot avec 1ml de tampon phosphate.

VI. 3.2 Méthode de Petroff

Un volume de NaOH à 4% est ajouté à un volume égal d'expectoration dans un tube de centrifugation, le tout est agité. Le tube est mis à l'agitateur de Kahn pendant 15 à 20min pour homogénéiser les échantillons.

De l'eau distillée stérile est par la suite ajoutée jusqu'à 3 cm du haut du tube. Ce qui réduit la viscosité de la solution, dilue l'excès de soude et augmente l'efficacité de la centrifugation. La solution ainsi obtenue est centrifugée 20min à 3000trs. Le surnagent est décanté et le culot est neutralisé.

Le culot est ensemencé à raison de 2 à 3 gouttes avec une pipette Pasteur stérile sur le milieu de culture. Un frottis d'environ 1 à 2cm de longueur sur 1cm de largeur est préparé pour coloration et microscopie.

Il existe d'autres méthodes de décontamination comme la méthode au lauryl sulfate de sodium, la méthode au chlorure de cetyl pyridinium, et la méthode à l'acide oxalique.

VI.4 Examen direct

VI.4.1 Réalisation des frottis

Les frottis sont effectués soit après centrifugation (5 min de centrifugation à 3000 trs/mn) pour les prélèvements non contaminés, soit à partir du culot de décontamination pour les prélèvements polymicrobiens.

Les lames utilisées pour la confection des frottis doivent être neuves et éventuellement dégraissées par un mélange acide sulfurique-alcool (90/10). Les solutions de coloration doivent être préparées avec de l'eau distillée stérile pour éviter les contaminations par les mycobactéries présentes dans l'eau de robinet. Pour les pièces opératoires, on peut également pratiquer des empreintes. Les frottis réalisés doivent être fins, pas trop étalés. Ils sont séchés sur plaque chauffante.

VI.4.2 Coloration des lames

Les espèces du genre *Mycobacterium* sont difficilement colorées par la coloration de Gram. Le principe des colorations (Ziehl-Neelsen, Auramine) des mycobactéries est basé sur la propriété acido-alcool résistance.

VI.4.2.1 Technique de coloration par la méthode de Ziehl-Neelsen

Le frottis est coloré par une solution alcoolique saturée de fuschine basique phéniquée pendant 10minutes en chauffant jusqu'à émission de vapeurs. Après décoloration (3min) avec un mélange acide-alcool (acide sulfurique à 25% dans l'alcool à 90°), la lame est rincée à l'eau distillée stérile puis contre colorée 3min par une solution aqueuse de bleu de méthylène à 3%. Les frottis sont ensuite rincés à l'eau puis séchés à l'étuve ou à l'air libre.

Une technique à froid plus longue peu aussi être réalisée.

L'observation est ensuite effectuée à l'objectif 100 avec l'huile à immersion.

VI.4.2.2 Technique de coloration à l'auramine

Le principe de la coloration est le même que pour la coloration de Ziehl-Neelsen : coloration des bacilles par une solution d'auramine O phéniquée à froid pendant 15 minutes. Après rinçage avec de l'eau distillée, une décoloration pendant 5 minutes par le mélange acido-alcool (acide chlorhydrique-éthanol) est réalisée. Une contre coloration avec une solution de rouge de thiazine (1min) est effectuée après un nouveau rinçage à l'eau distillée. Les lames séchées recouvertes d'une lamelle en verre sont observées à l'aide d'un microscope muni d'un dispositif à fluorescence à l'objectif 25.

VI.4.3 Lecture des lames

Les mycobactéries colorées par la fuschine phéniquée apparaissent en rouge vif sur le fond bleu de la préparation fait de débris cellulaire, mucus, bactéries commensales. Les mycobactéries colorées à l'auramine apparaissent comme des bacilles fluorescents jaune-vert sur fond rouge.

Un frottis est considéré comme négatif après au moins 15 minutes d'observation de la lame par la méthode de Ziehl-Neelsen (300 champs) et au moins 5 minutes par la méthode à l'auramine. La méthode à l'auramine permet d'éliminer rapidement les frottis négatifs. Chaque lame positive par la méthode à l'auramine doit être recolorée par la méthode de Ziehl-Neelsen.

L'examen direct ne permet pas de distinguer les espèces du genre *Mycobacterium*, le résultat de cet examen signalera la présence ou l'absence de bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) et exprimera en cas de positivité la densité bacillaire.

L'examen microscopique a une spécificité très élevée voisine de 100%. Des faux positifs peuvent être observés si les réactifs utilisés ont été préparés avec de l'eau du robinet (mycobactéries saprophytes) et avec des prélèvements contenant des *Nocardia* ou avec des bactéries apparentées.

La sensibilité est relativement faible : le prélèvement doit contenir 10^5 BAAR/ml pour que la probabilité de positivité de l'examen soit supérieure à 95%. Pour les frottis présentant moins de 10 BAAR, il est recommandé d'effectuer un contrôle sur un autre prélèvement.

Néanmoins l'examen microscopique demeure une étape incontournable dans le diagnostic.

Tableau III : Quantification des BAAR à l'examen microscopique après coloration au Ziehl-Neelsen [24]

Ziehl-Neelsen (1000)	Résultat à reporter
Pas de BAAR	Absence de BAAR
1 à 9 BAAR/100 Champs	Noter le nombre exact (très faible)
10 à 99/ 100 champs	1+
1 à 10 BAAR /champs	2+
≥10 BAAR/ champs	3+

VI. 5 Culture

La culture des mycobactéries nécessite le recours à des milieux spécifiques et complexes en raison de leur croissance lente (quelques jours à plusieurs semaines).

Les milieux se présentent en tube, ou flacon à vis afin de permettre une observation prolongée sans dessiccation et sans création d'aérosols. L'association d'un milieu liquide à des milieux solides est recommandée. Les mycobactéries nécessitent pour la plupart, des milieux enrichis et des conditions strictes pour leur croissance (température comprise entre 30°C et 45°C, aérobiose et pH optimal situé à 6,7).

VI.5.1 Milieux solides

Le milieu le plus utilisé pour l'ensemencement des produits pathologiques est le milieu de Lowenstein-Jensen à base de sels minéraux, de fécule de pomme de terre, de glycérine, de vertes malachites (antiseptique) et d'œuf (albumine). L'adjonction de certains composés comme le pyruvate de sodium dans le milieu de Colestos ou le citrate de fer favorise la croissance respectivement de *M. bovis* et *M. africanum* et de *M. haemophilum*. Les milieux sont présentés sous forme de tubes fermés à vis ou par du coton et obturés par une capsule en plastique.

Trois gouttes de culot centrifugation sont déposées au sommet de la pente gélosée. Deux (si couplés à des milieux liquides) à six tubes sont ensemencés et incubés à 37°C excepté pour les prélèvements d'origine cutanée et ostéo-articulaire incubés à 30°C et à 37°C et 42°C. Les tubes sont incubés inclinés et incomplètement vissés afin de permettre l'évaporation de l'excès de liquide de l'échantillon (48h). Les milieux sont observés une fois par semaine pendant au moins 8 semaines. L'observation des cultures pendant la première semaine permettra de mettre en évidence une contamination par des bactéries commensales ou la présence d'une mycobactérie à croissance rapide. Dès l'apparition de colonies, un frottis coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen sera

effectué pour vérifier la présence de BAAR avant de déclarer la culture positive.
Le nombre de colonies est rapporté ainsi que le délai d'apparition de la culture
Les mycobactéries atypiques ont été classées par Runyon selon le délai
d'apparition des colonies et leur pigmentation.

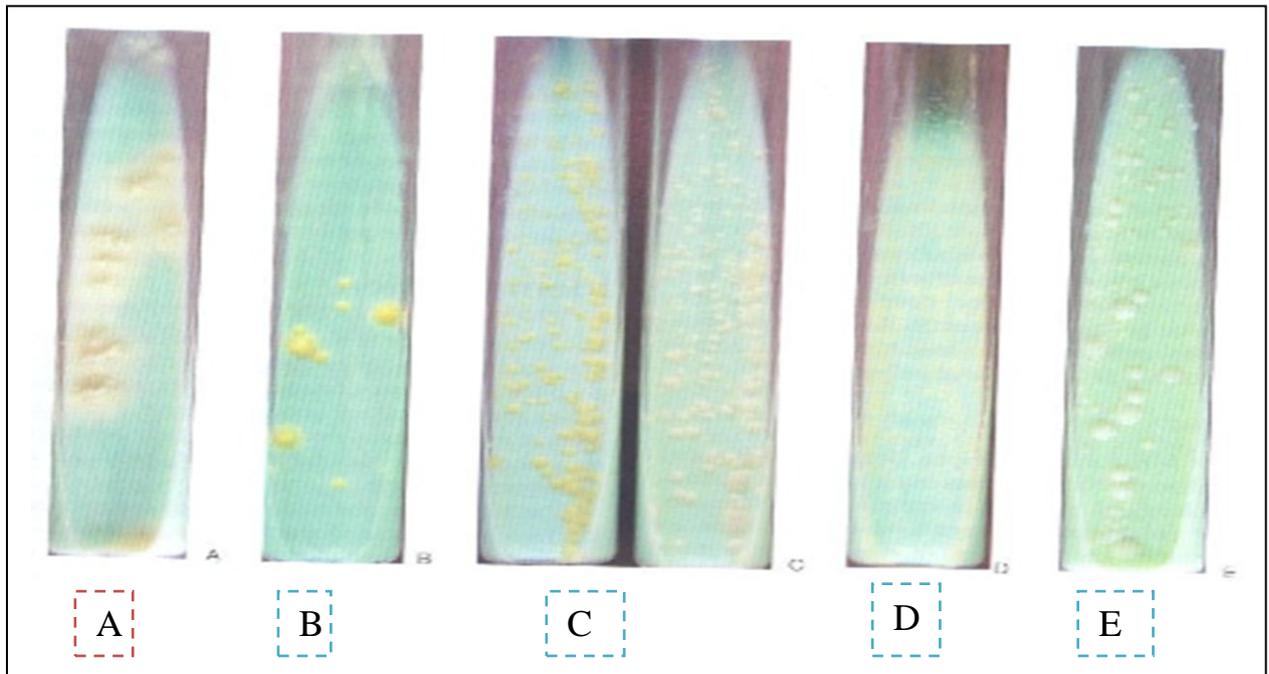


Figure 5: Cultures de mycobactéries sur milieu de Lowenstein Jensen

A : *M. tuberculosis* B, C, D et E : Mycobactéries atypiques [24]

VI.5.2 Les milieux gélosés semi-synthétiques

Des milieux semi-synthétiques transparents (Middle-brook 7H10 et 7H11) contiennent des sels minéraux, du pyruvate de sodium, de l'hydrolysate de caséine (7 H 11) et nécessitent l'adjonction extemporanée d'un supplément contenant l'acide oléique, dextrose, albumine et catalase lors de leur préparation et une incubation sous 5% de CO₂. Ils demeurent cependant moins performants lors de la primoculture.

VI.5.3 Milieux liquides

Les milieux liquides sont fabriqués pour la plupart avec la même base (7H9) et doivent être supplémentés avec des facteurs rendus à l'aide d'un mélange d'antibiotiques (afin d'augmenter la spécificité de la culture). Certains de ces milieux peuvent être couplés à une détection automatique de la croissance (MGIT 960^R, MB 9000^R, BACT/ALERT 3D^R).

VI.5.4 Méthode MGIT[®]

A l'aide d'une pipette en plastique à usage unique 0,5ml de l'échantillon est inoculé dans un flacon auquel 0,8ml d'un mélange constitué par le supplément inhibiteur PANTA (Polymixine B, Azlociline, acide Nalidixique, Triméthoprime et Amphotérocine B) et du stéarate de polyoxyéthylène ont été préalablement ajoutés afin d'augmenter la spécificité de la culture. Le milieu MGIT (Mycobacteria Growth Indicator Tube) est un milieu 7H9 supplémenté, contenant un indicateur de fluorescence sensible à la concentration du milieu en O₂ composé. 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 (MGIT 960^R, Becton Dickinson[®]).

VI.5.5 BacT/Alert 3D[®]

La croissance dans les flacons BacT/Alert MP (Bio-Mérieux[®]) est détectable à la base du flacon par un indicateur colorimétrique sensible à l'augmentation du pH (présence de CO₂) reconnu par l'automate (BacT/Alert 3D[®]). L'ensemencement des flacons supplémentés par un mélange PANTA contenant de la vancomycine en plus des antibiotiques contenus dans le mélange PANTA, nécessite le recours à une aiguille.

VI.5.6 MB Redox[®]

Le milieu MB Redox (Heipha Diagnostika/Biotest[®]) est un milieu de Kirchner contenant un sel de trétrazolium incolore qui pendant la croissance bactérienne est réduit en formazan (rouge à violet) insoluble en milieu aqueux. Le formazan s'accumule à la surface sous forme de grains permettant de visualiser les micro colonies sous formes de particules colorées. Le virage coloré des particules est visible à l'œil nu. Ce milieu prêt à l'emploi ne nécessite pas l'adjonction de supplément d'antibiotique et vitaminique.

VI.5.7 Hémocultures

Des milieux pour hémocultures disponibles pour les systèmes automatisés de détection (Myco/F lytic^R, BacT/Alert^R, MB Blood^R) contiennent de la saponine qui permet la lyse des cellules et du SPS (Sodium Polyanethole Sulfonate) comme anticoagulant. Contenant ces mêmes composés (saponine et SPS), le système de lyse-centrifugation Isolator constitue une bonne alternative à l'utilisation de ces flacons. Après centrifugation, le culot est ensemencé immédiatement sur milieu solide à l'œuf.

VI.6 Identification

L'identification des mycobactéries à partir d'une culture positive s'effectue en plusieurs étapes : vérification de l'appartenance au genre mycobactérie, identification du groupe tuberculosis, identification des mycobactéries non tuberculeuses dites atypiques et différenciation des espèces. Le premier stade de l'identification se fait par un contrôle microscopique de la présence de BAAR sur les milieux de culture. La deuxième étape a pour but de différencier les mycobactéries du complexe tuberculosis des mycobactéries atypiques. L'utilisation de la sonde monospécifique en milieu liquide (Mycobacterium tuberculosis Complex, Accuprobe) détectant les mycobactéries de la tuberculose répond à cette exigence.

Pour les mycobactéries atypiques des informations peuvent être obtenues à partir de l'observation de la primoculture des milieux solides : aspect, délai d'apparition et pigmentation des colonies sur milieu solide (classification de Runyon).

VI. 6.1 Identification phénotypique

Les épreuves d'orientation reposent principalement sur l'étude de la morphologie des bacilles à l'examen direct et des colonies sur milieux solides, des critères utilisés dans la classification de Runyon (vitesse de croissance et pigmentation de la souche) et sur la recherche d'une activité catalasique. Cette dernière épreuve permet de distinguer les mycobactéries du complexe tuberculosis des mycobactéries atypiques. Les mycobactéries du complexe tuberculosis possèdent une catalase thermosensible (68°C) à la différence des mycobactéries atypiques. A partir des résultats des épreuves d'orientation, des tests culturaux (sensibilité à des substances antibacillaires, assimilation de substrats, croissance sur milieux ordinaires) et des épreuves biochimiques de mise en évidence d'activité enzymatique sont choisis pour permettre une identification biochimique complète.

Les caractères biochimiques et les profils phénotypiques des principales espèces de mycobactéries atypiques classées selon les critères de la classification de Runyon sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV : identification phénotypiques des principales espèces de mycobactéries atypiques [24]

Caractères	Aspect/LJ	Propriétés biochimiques						
		vitesse	Tween 80	Niacine	NR	Uréase	PA	AS
<i>M. kansasii</i>	E, R ou S	21	+	-	+	+/-	+	+/-
<i>M. marinum</i>	E ou S	35	+	-	-	+	+	+
<i>M. simiae</i>	D ou S	21	+	+	-	+	-	-
<i>M. goodnae</i>	E ou S		+		-	V	V	-
<i>M. scrufulaceum</i>	S		-		-	V	-	-
<i>M. szulgai</i>	E ou S		V		+	+	+	+
<i>M. terrae</i>	E, R ou S	14	+(1-3)		V	-	+	
<i>M. xenopi</i>	D, S	28	-		-	-	-	
<i>M. malmoense</i>	D, S	≥21	+(10)		-	V	-	
<i>M. avium</i>	D, S	≥21	-		-	-	-	
<i>M. haemophilus</i>	D, S ou R	≥21	-		-	-	-	
<i>M. ulcerans</i>	D, R	≥42	-		-	-	-	
<i>M. fortuitum</i>		7-10j		-	+			+
<i>M. chelonae</i>		7-10j		-	-			+

R : rugueux , S : lisse, D : Dysgonique, E : eugonique, NR : Nitrate réductase
LJ : Lowenstein Jensen, V : variable, PA: Phosphatase acide, AS: Aryl sulfate

VI.6.2 Identification génotypique

Les techniques de biologie moléculaire d'identification ont supplémen-té les méthodes biochimiques. L'utilisation des méthodes moléculaires a permis de s'affranchir, dans la plupart des cas, de l'étude longue et fastidieuse des caractères métaboliques. Les régions de l'ADN les plus fréquemment ciblées par ces techniques sont les gènes codant l'ARN 16S, les séquences intergéniques 16-23S, ARNr 23S, recA, gyrB, hsp65 et rpoB. Seuls certains tests phénotypiques sont encore utilisés couramment.

Les méthodes de détection et d'identification moléculaire sont réalisables à partir de culture en milieux solides ou liquides. Le principe et les espèces identifiées par ces techniques commercialisées sont précisés dans le tableau (VIII). Ces techniques peuvent être classées en trois grands groupes selon leur spectre d'identification :

- les sondes monospécifiques
- les systèmes de détection après amplification et hybridation sur support solide identifiant 10 à 16 espèces
- les systèmes de détection universelle basés sur le séquençage ou la restriction enzymatique. [24 ; 34]

La stratégie d'utilisation de ces techniques doit tenir compte du cout, de l'épidémiologie, de critères d'orientation (pigmentation, vitesse de croissance). Les techniques universelles de séquençage permettant une approche à priori de l'espèce sont utilisées en seconde intention.

➤ *Sondes commercialisées*

Des sondes commercialisées (Accuprobe^R, Gen-probe^R, Biomerieux^R), basées sur le même principe que la sonde <Mycobacterium tuberculosis complex>, sont disponibles pour les mycobactéries du complexe aviaire (MAC), *M. avium*, *M. intracellulaire*, *M. kansasii* et *M. gordonae*.

La spécificité est bonne pour l'ensemble de ces sondes. En revanche la sensibilité est variable ; 100% pour *M. gordonae*, 95% pour *M. avium* et *M. intracellulaire*.

➤ ***Polymorphisme de restriction du gène hsp65***

Le gène hsp65 code une protéine de choc thermique universelle. L'utilisation d'amorces spécifiques du genre *Mycobacterium* :

Tb11 : (5'ACCAACGATGGTTGTCCAT3') et Tb12 : (5'CTTGTCGAACCGCATACCCT3') permet l'amplification de 439 paires de bases. L'amplicon est digéré séparément par BstELL et HaeIII. La taille des fragments est déterminée après séparation par électrophorèse en gel d'agarose à 4% à bas point de fusion (Resophor, Eurobio). Les résultats de cette méthode appelés PRA (PCR-Restriction enzymatic analysis) sont interprétés à l'aide d'un algorithme publié par Telenti. La prise en compte de la taille des fragments obtenus avec digestion avec BstELL, puis la taille des bandes obtenues après restriction par HaeIII permet d'identifier une cinquantaine d'espèces de mycobactéries. La lecture est parfois difficile. IL est préférable de constituer sa propre banque de profils pour optimiser la lecture des gels. [20 ; 66 ; 79 ; 85]

➤ ***Séquençage des gènes hsp65 et ARN16S [50 ; 87]***

Le séquençage du gène hsp65 constitue une alternative à la méthode de restriction et est réalisée à l'aide des mêmes amorces.

Le séquençage de l'ADNr 16S permet d'identifier la majorité d'intérêt médical après comparaison de la séquence obtenue à des banques de données disponibles sur Internet (Blast, Ridom). Les positions 590-609 et 182-202 sont respectivement spécifiques de genre et d'espèce.

Le séquençage d'autres gènes (rpoB, its) est possible mais les banques de données concernant ces cibles sont incomplètes.

➤ **Détection du polymorphisme de séquence de gènes à l'aide de coffrets commercialisés [49 ; 50]**

Des méthodes moléculaires (hybridation sur support solide après amplification par PCR) permettent d'identifier une souche (Genotype Mycobacterium, Hain diagnostika-Biocentric, Hain Lifescience, Innolipa Mycobacteria, Innogenetics). Le kit Genotype Mycobacterium CM permet d'identifier les mycobactéries atypiques les plus courantes et le kit Genotype Mycobacterium AS les moins rencontrées. La procédure d'identification comporte trois étapes : une extraction de l'ADN à partir de culture suivie d'une amplification à l'aide d'amorces biotinylées (ADN polymérase) et une phase de détection de l'ADN amplifié par hybridation inverse. Cette dernière étape comporte les étapes suivantes : dénaturation chimique de l'ADN amplifié, hybridation des amplicons simples brins biotinylés aux sondes pré-immobilisés, lavage stringent et enfin une addition du conjugué streptavidine/phosphatase alcaline suivie d'une révélation chromosomique.

➤ **PCR**

Cette technique d'amplification génique consiste à amplifier une séquence nucléotidique. A l'aide d'amorces encadrant cette séquence et l'activité polymérase d'une enzyme thermorésistante (Taq polymérase), la cible est multipliée en plusieurs millions de copies au cours de 30 à 35 cycles de la réaction.

La détection de produit d'amplification est réalisée par électrophorèse en gel d'agarose éventuellement suivi d'un transfert et d'une hybridation sur membrane ou en milieu liquide. [60 ; 92]

Le GeneXpert est un nouveau système automatisé permettant la détection de bacille de *M. tuberculosis* en 2h de temps. Cet outil est recommandé par l'OMS dans le diagnostic de TBMR.

➤ **Méthodes immunochromatographiques [62 ; 69]**

Ces tests utilisent un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine mycobactériale. Le test TBc Id permet de différencier les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* des atypiques par détection de la protéine MPT64 qui est secrétée uniquement par les mycobactéries appartenant au complexe *M. tuberculosis*.

DEUXIEME PARTIE

I. Cadre d'étude

L'étude a lieu dans la sous unité de Mycobactériologie du laboratoire de Bactériologie et Virologie de l'hôpital Aristide le Dantec qui est un hôpital de niveau 3. C'est l'une des structures Hospitalo-universitaires les plus importantes de la sous région. Il constitue un haut lieu de formation des étudiants en Médecine, en Pharmacie et en Odonto-Stomatologie mais aussi des élèves des écoles de formation paramédicales.

Le laboratoire de Bactériologie-Virologie a pour vocation le diagnostic biologique des infections bactériennes et virales, la recherche et la formation dans les domaines de la bactériologie et de la virologie. C'est un centre collaborateur de l'ONUSIDA. C'est également le siège du Réseau Africain de Recherche sur le SIDA qui regroupe des pays de l'Afrique de l'Ouest et du Centre. Le laboratoire abrite aussi l'observatoire des résistances aux antirétroviraux et le programme de recherche sur les vaccins anti-VIH en Afrique.

Le laboratoire est constitué de plusieurs unités : l'unité de Bactériologie, de Virologie, de Biologie moléculaire, d'Immunologie, d'essais cliniques.

L'unité de Bactériologie est divisée en deux sous unité :

La sous unité de Bactériologie classique et celle des Mycobactéries.

La sous unité de Mycobactériologie est ouvert en 1988, elle est devenue aujourd'hui un laboratoire de niveau III où s'effectuent la bacilloscopie, la culture, l'identification et l'antibiogramme pour les souches appartenant au complexe tuberculosis.

La sous unité de mycobactériologie reçoit les prélèvements des patients admis à l'hôpital Aristide le Dantec mais aussi ceux des autres hôpitaux et centres de santé de la région de Dakar. La bacilloscopie, la culture, l'identification, le génotypage et l'antibiogramme y sont effectués.

II. Période d'étude

Notre étude s'étend du 01 Janvier 2011 au 30 Juin 2012.

III. Matériels et produits

III.1 Matériels

III.1.1. Equipements

Hotte à flux laminaire, Centrifugeuse, Réfrigérateur à 4°C, Etuve

Automate MGIT 960, Agitateur type vortex, Agitateur de Kahn

Chronomètre, Microscopes optiques

III.1.2 Consommables

Pipette pasteur stériles, Anses calibrés de 10 µl, Embouts de 200-1000 µl

Lames porte-objet, Tubes coniques de 50 ml, Gants, Compresses, Pots stériles

Papier buvard

III.2 Réactifs et milieux de culture

Alcool à 95°, Alcool à 70°, Eau de javel, Fuchsine phéniquée de Ziehl

Bleu de méthylène à 0,3%, Acide sulfurique à 25%, Eau physiologique

N-Acetyl L-Cystéine à 0,5%, Soude à 4%, Tampon phosphate, Glycérol

Milieu de base de Lowenstein Jensen, Milieu Middlebrook 7H9.

IV. Méthodologie

IV.1 Prélèvements

Il s'agit de prélèvements de patients hospitalisés dans différents services cliniques de l'hôpital (patients internes) ou non hospitalisés et envoyés au laboratoire (patients externes).

IV.2 Recueil des prélèvements

Les prélèvements sont essentiellement des produits d'expectorations recueillis dans des pots stériles. Pour chaque patient, trois prélèvements sont recueillis avec un prélèvement le premier jour le matin et les deux autres jours suivants (2^{eme} ou 3^{eme}) avec au moins 3 heures d'intervalle.

Les prélèvements sont reçus avec les bulletins d'analyse du prescripteur (patients internes) ou avec une fiche d'enquête remis au patient (patients externes) comportant les renseignements cliniques et épidémiologiques.

Les autres prélèvements sont les liquides de tubage gastrique, les urines, les pus, les liquides d'épanchement (ascite, pleural, articulaire), LCR, sang, liquide de lavage gastrique, pièce opératoire....Ces prélèvements sont recueillis en général dans un tube stérile ou à défaut dans un pot stérile ou seringue (pus).Un seul prélèvement est recueilli en général sauf pour les liquides de tubage gastrique.

Les prélèvements sont traités quotidiennement ou à défaut conservés au réfrigérateur à 4°C.

IV.3 Réalisation de frottis

L'essentiel du travail s'effectue sous hotte à flux laminaire et le manipulateur doit porter des gants, un masque et une blouse.

Des lames neuves sont utilisées, elles sont identifiées avec un numéro de paillasse et le numéro d'ordre du prélèvement.

A l'aide d'une anse calibrée, on prélève une portion muqueuse de l'échantillon et on effectue un frottis d'environ 2 cm sur 1 cm.

Les frottis sont laissés sécher sous la hotte.

IV.4 Coloration de Ziehl-Neelsen

Cette coloration s'effectue comme suit (confère Annexes)

IV.5 Lecture des lames

Les lames sont lues à l'objectif 100 avec huile à immersion au microscope optique. Les BAAR apparaissent en rouge sur un fond bleu.

Les résultats sont notés selon l'échelle du tableau (III).

IV.6 Décontamination-Fluidification-Concentration

C'est la méthode de Kubica modifiée qui est utilisée.

Tout le travail s'effectue sous hotte à flux laminaire et les conditions d'asepsie et de stérilité doivent être rigoureusement respectées. Après cet étape de décontamination le culot estensemencé sur les milieux de culture (Lowenstein Jensen et tube MGIT).

IV.7 Culture des échantillons

IV.7.1 Culture sur milieux solides (Lowenstein Jensen)

Préparer un portoir contenant une série de tubes de milieu Lowenstein-Jensen identifié avec le numéro de paillasse et la date d'ensemencement.

Distribuer, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, quelques ml de suspension du culot de centrifugation dans les tubes.

Incliner le tube de façon à étaler l'inoculum sur toute la surface de la pente.

Incuber les tubes à l'étuve à 37°C en position horizontale, légèrement inclinés et légèrement dévissés pour éviter la dessiccation des milieux.

Quelques millilitres de la suspension sont remis dans des cryotubes et conservés à 20°C pour une éventuelle redécontamination et réensemencement si des

cultures sont souillées. Les cultures sont lues à partir du deuxième jour pour détecter les éventuelles souillures, au septième jour pour déceler les croissances rapides et à partir de là tous les 2 jours pendant 8 semaines.

Les cultures souillées sont éliminées et les échantillons correspondant décontaminés à nouveau et réensemencés.

Le résultat d'une culture positive est rendu dès l'apparition des premières colonies sur au moins un milieu de culture.

Le résultat d'une culture négative est rendu au bout d'1 mois ou 2mois.

Les cultures sont appréciées macroscopiquement et un frottis est réalisé et coloré par la méthode de Ziehl-Neelsen pour confirmation.

IV.7.2 Culture sur milieu liquide

On dispose de tubes pour culture sur milieu liquide auxquels on ajoute préalablement 0,8ml de mélange constitué par le supplément de croissance PANTA et de stéarate de polyoxyéthylène.

On prélève 0,5ml de l'échantillon qu'on inocule dans chaque tube.

Les tubes sont ensuite incubés dans l'automate MGIT 960 BD[®].

Toute croissance est détectée automatiquement et signalée par un bruit sonore et lumineux. Pour chaque culture positive, un frottis est réalisé et coloré par la méthode de Ziehl Neelsen pour confirmer la présence de BAAR.

IV.8 Identification

Les colonies sont observées macroscopiquement et on note l'aspect des colonies (eugoniques, dysgoniques), la présence ou l'absence de pigmentation, le délai de croissance.

Les souches du complexe tuberculosis apparaissent en colonies habituellement R (eugéniques), en chou-fleur, de couleur crème pour *M. tuberculosis* ou S (dysgoniques) pour *M. bovis* et *M. africanum*.

La présence de BAAR est confirmée par la microscopie.

Ces colonies sont repiquées systématiquement sur milieu neuf pour éviter le développement tardif de souillure sur le milieu originel.

Les souches suspectées appartenir au complexe tuberculosis sont soumises à un test rapide d'identification (TBc ID test[®]).

C'est un test qualitatif d'identification des souches du complexe tuberculosis dont le principe est immunochromatographique. Ce test détecte la MPT64 qui est une fraction de protéine mycobactérienne sécrétée par les souches appartenant au complexe tuberculosis lors de la culture.

Le test Genotype Mycobacterium CM (Common Mycobacterial) a été utilisé pour l'identification des espèces de mycobactéries atypiques les plus courantes.

Le test permet d'identifier les mycobactéries suivantes : *M.avium spp.*, *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.fortuitum*, *M.gordoniae*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum*, *M.interjectum*, *M.kansasii*, *M.malmoense*, *M.peregrinum*, *M.marinum/M.ulcerans*, *M.xenopi* et complexe *M.tuberculosis*

La procédure comporte trois phases : une extraction de l'ADN à partir de cultures, une amplification multiplex à l'aide d'amorces biotinylées et une hybridation inverse

IV.8.1 Extraction d'ADN par la méthode au chloroforme :

L'ADN des mycobactéries est extrait à partir de cultures en milieu solide (Lowenstein Jensen) ou en milieu liquide (MGIT). Les manipulations sont faites dans un espace exempt de toute trace d'ADN. (Confère Annexes)

IV.8.2 Amplification

Préparer le mélange réactionnel (45 µl) dans une pièce exempte d'ADN. L'échantillon d'ADN doit être rajouté dans une pièce séparée.

Préparer le mélange suivant par tube :

- 35 µl de mélange Amorces/Nucléotides (PNM)
- 5 µl de tampon d'incubation de la polymérase 10x
- x µl de MgCl₂
- 1–2 unité(s) d'ADN polymérase thermostable (se référer au manuel)
- y µl d'eau qsp 45 µl (hors volume de l'enzyme)
- Ajouter 5 µl de solution d'ADN (20–100 ng d'ADN) pour atteindre un volume final de 50 µl (hors volume de l'enzyme).

Selon le système tampon/enzyme utilisé, la concentration optimale de MgCl₂ peut varier de 1,5 à 2,5 mM. A noter que certains tampons contiennent déjà le MgCl₂.

Déterminer le nombre d'échantillons à amplifier (nombre d'échantillons à analyser + contrôles). Pour un contrôle négatif, par exemple, la solution d'ADN à amplifier est remplacée par 5 µl d'eau. Préparer une solution mère de mélange réactionnel contenant tous les réactifs à l'exception de l'ADN, et bien homogénéiser (ne pas vortexer).

Si le thermocycleur ne possède pas de couvercle chauffant, recouvrir les échantillons d'huile minérale.

Profil d'Amplification :

Le profil d'amplification est le suivant :

5 min 95°C – 1 cycle

30 sec } 95°C 10 cycles
2 min } 58°C

25 sec } 95°C
40 sec } 53°C 20 cycles
40 sec } 70°C

8 min 70°C 1 cycle

La durée de cette étape doit être rallongée en cas d'utilisation d'ADN polymérase de type «hot start» (se référer au manuel de l'enzyme). Selon le thermocycleur utilisé, le profil d'amplification peut demander des modifications (contacter votre distributeur).

Les produits de l'amplification peuvent être conservés entre +4 et -20°C.

La réaction d'amplification peut être contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose 2% en déposant directement 5 µl de chaque échantillon (sans aucun tampon additionnel). Les amplicons ont une taille de 230 pb et 200 pb.

IV.8.3 Hybridation

L'étape d'hybridation suit le protocole suivant :

Préchauffer le bain-marie agitateur/Twin Cubator® à exactement 45°C +/-1°C. Préchauffer les solutions HYB et STR à 37-45°C avant utilisation. Les réactifs ne doivent présenter aucun précipité (à noter cependant que la solution CON-D est opaque). Si besoin, agiter. Equilibrer 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 équilibrer à température ambiante. Pour chaque échantillon testé, ajouter 10 µl de concentré à 1 ml 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.
- Déposer 20 µl de Solution de Dénaturation (DEN, bleu) à une extrémité de chaque puits utilisé.
- Ajouter 20 µl d'échantillon amplifié et mélanger les deux solutions par pipetages répétés. Incuber 5 minutes à température ambiante. 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 la ligne de repère. Toujours porter des gants pour manipuler les bandelettes.

- Ajouter dans chaque puits 1 ml de Tampon d'Hybridation (HYB, vert) pré chauffé et homogénéisé. Homogénéiser jusqu'à ce que le mélange devienne une coloration homogène.

Eviter les éclaboussures vers les autres puits.

- Déposer une bandelette dans chaque puits utilisé.

Les bandelettes doivent être entièrement recouvertes par le liquide, avec la face sensibilisée (identifiable par la ligne de repère) 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.

- Placer la plaque dans le bain-marie agitateur/Twin Cubator® et incuber 30 minutes 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 des puits de façon à assurer un bon transfert de chaleur. Cela vaut aussi pour toutes les étapes suivantes.

- Aspirer le contenu des puits.

Utiliser par exemple une pipette pasteur reliée à une pompe à vide.

- Ajouter à chaque puits 1 ml de Solution de Lavage Stringent (STR, rouge) et incuber 15 minutes à 45°C dans le bain-marie agitateur/TwinCubator®.
- A partir de cette étape, travailler à température ambiante.
- Eliminer la Solution de Lavage Stringent.

Vider la Solution de Lavage Stringent dans un container à déchets.

Éliminer tout le liquide résiduel en retournant les puits sur du papier absorbant (effectuer de même pour les autres étapes de lavage).

- Laver chaque puits avec 1 ml de Solution de Rinçage (RIN) et incubé pendant une minute sous agitation. Vider la Solution de Rinçage.
- Ajouter à chaque puits 1 ml de Conjugué dilué (voir ci-dessus) et incubé 30 minutes sous agitation.
- Vider le contenu des puits et rincer sous agitation 1 minute à l'aide de 1 ml de Solution de Rinçage (RIN). Vider RIN. Répéter ce rinçage une nouvelle fois, puis rincer une fois avec environ 1 ml d'eau distillée à l'aide d'une pissette.
- Bien éliminer toute trace d'eau dans les puits après cette dernière étape.
- Ajouter 1 ml de Substrat dilué (voir ci-dessus) dans chaque puits et incubé sans agitation à l'obscurité. Le temps de révélation peut varier en fonction des conditions de déroulement du test (de 3 à 20 minutes), 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.
- Arrêter la réaction en rinçant brièvement deux fois à l'eau distillée.
- A l'aide de pincettes, récupérer les bandelettes et les sécher entre deux couches de papier absorbant.

V. Expression des résultats

V. 1 Echantillons colligés

V.1.1 Logiciels statistiques:

L'analyse des données s'est faite en utilisant les logiciels suivants :

File Make Pro 06 (Gestion des données)

Microsoft Excel 2007 (Réalisation de graphiques)

Epi info 3.5.1 (Analyse des données)

V.1.2 Nombre

De Janvier 2011 à Juin 2012, nous avons reçu 1208 prélèvements dont 797 en 2011 et 414 en 2012. Tous ces prélèvements ont été traités dans le laboratoire de Mycobactériologie de l'hôpital Le Dantec.

V.2 Données épidémiologiques

V.2.1 Provenance des prélèvements

Les prélèvements proviennent essentiellement de patients reçus en consultation dans les hôpitaux de Dakar avec 77,9% venant de HALD et 12% de FANN.

Tableau V : Provenance des échantillons selon les hôpitaux

Origine	Nombre	Pourcentage(%)
HALD	941	77,9
FANN	147	12,1
HOGGY	12	1,0
Hôpital de Pikine	5	0,4
Principal	2	0,1
Albert Royer	8	0,6
Privé	18	1,5
Structures périphériques	54	4,7
Non précisée	20	1,6
Régions	1	0,08
Total	1208	100

V.2.2 Provenance des prélèvements selon le service hospitalier

Les prélèvements proviennent pour l'essentiel des services de médecine interne avec 35% et de la pédiatrie 14%.

Tableau VI : Répartition des prélèvements selon les services hospitaliers

Services	Nombre	Pourcentage (%)
Médecine interne	426	35,2
Cardiologie	72	5,9
Dermatologie	17	1,4
Maladies infectieuses	07	0,6
Pneumologie	104	8,6
Pédiatrie	170	14,0
Chirurgie et spécialités chirurgicales	38	3,1
Réanimation	07	0,5
Externes	287	23,7
Privés	18	1,5
Autres	27	2,2
Non précisés	30	2,5
Total	1208	100

Autres : Pavillon Spécial, Neurologie, Centre de Traitement Ambulatoire (CTA)

V.2.3 Nature des prélèvements

Les prélèvements sont essentiellement d'origine pulmonaire : expectorations (67%), tubages gastriques (17,6%) et prélèvements bronchiques

(1,7%). Nous avons aussi reçu un nombre non négligeable de liquides d'épanchement (5,5%).

Tableau VII: Nature des prélèvements.

Prélèvements	Nombre	Pourcentage (%)
Expectorations	808	66,9
Tubages gastriques	213	17,6
Liquides d'épanchement	67	5,5
Urines	36	2,9
Pus	43	3,5
Prélèvements bronchiques	21	1,7
LCR	8	0,6
Autres liquides de ponction	8	0,6
Pièce opératoire	1	0,1
Non précisé	3	0,2
Total	1208	100

Les liquides d'épanchement sont constitués de liquides d'ascite, pleural, péricardique, articulaire. Les autres liquides de ponction sont les liquides de ponction hépatique, ganglionnaire, Myélome, liquide distal fémur

V.3 Répartition de la population d'étude

V.3.1 Répartition selon le sexe

Parmi les 1208 prélèvements reçus durant la période d'étude, nous avons une prédominance des hommes (60%) par rapport aux femmes.

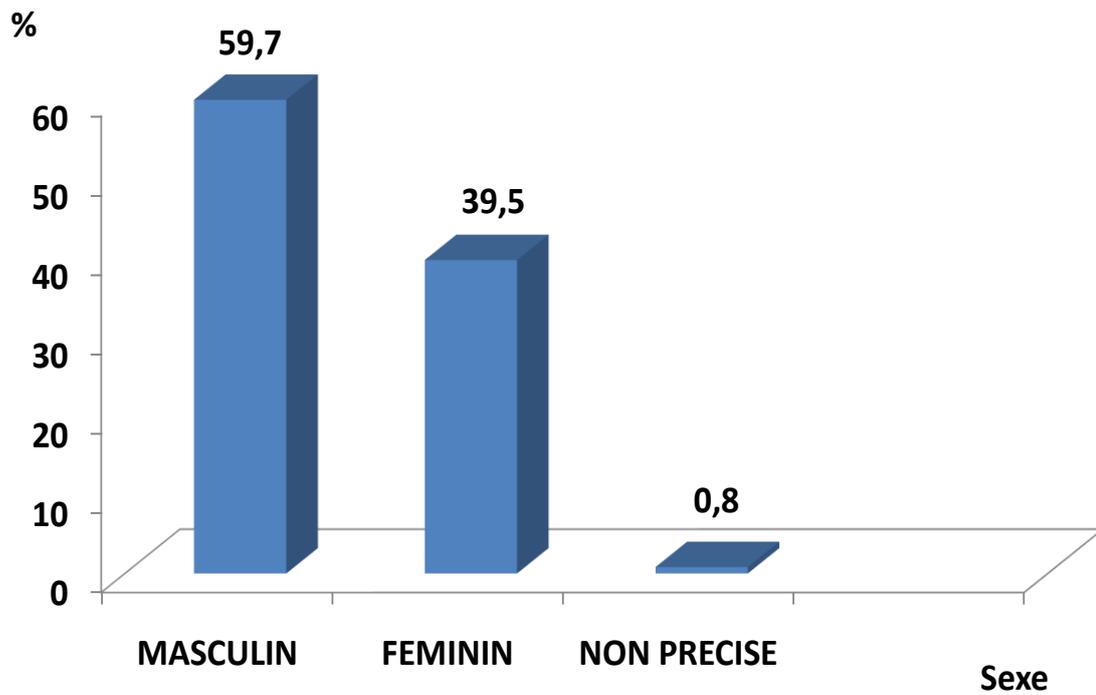


Figure 6: Répartition de la population d'étude selon le sexe

V.3.2 Répartition selon l'âge

L'âge de la population d'étude est compris entre 6 mois et 97 ans. Cette population est répartie en tranches d'âge de 10 ans.

Les personnes âgées entre 21 et 30 ans et celles entre 31 et 40 ans constituent les tranches d'âge les plus représentatives avec respectivement 18% et 16% de la population d'étude.

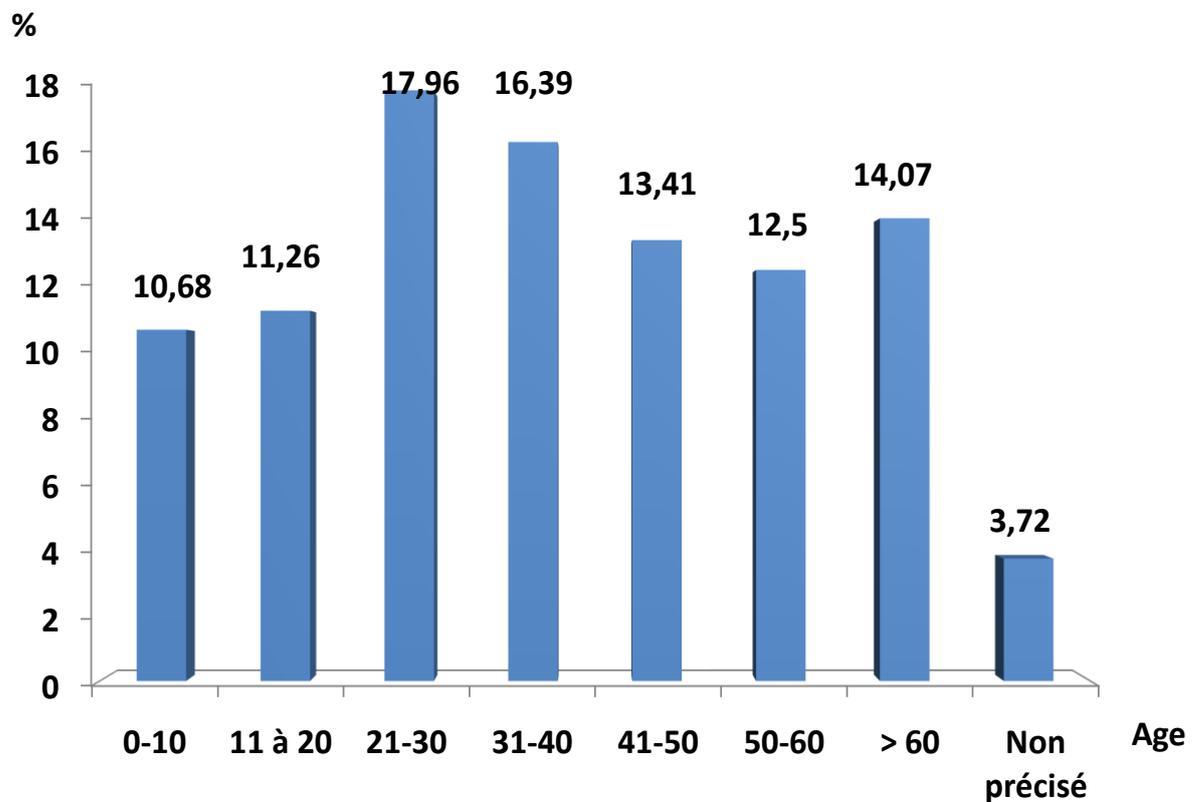


Figure 7: Répartition Population d'étude selon l'âge

V.3.3 Répartition selon le statut

Les patients étaient pour la plupart des cas de nouveaux malades (93%).

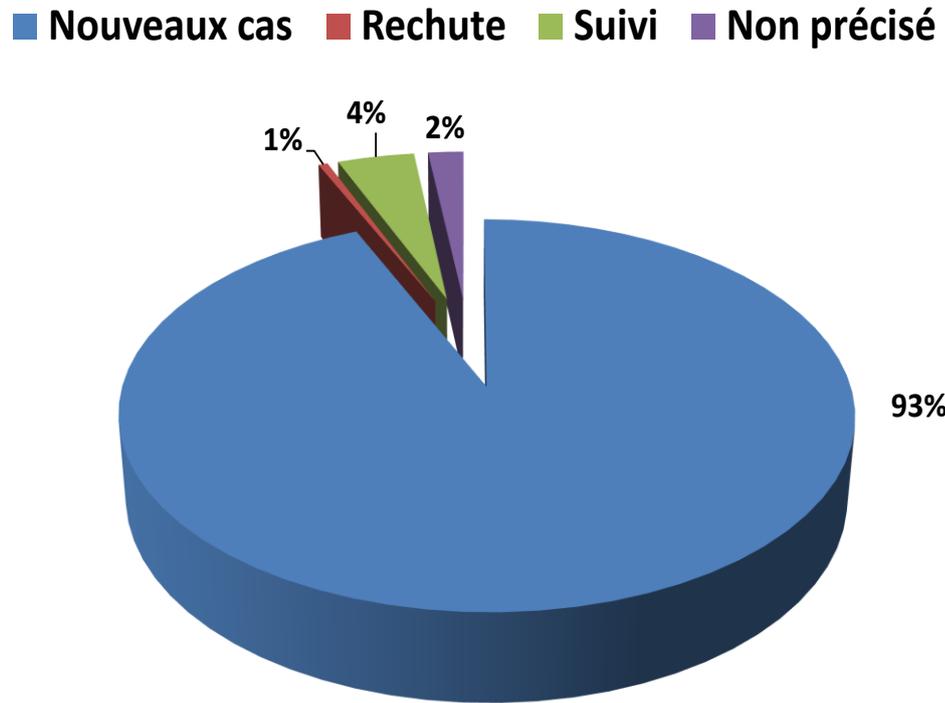


Figure 8: Statut des patients selon le diagnostic

V.4 Données bactériologiques

V.4.1 Résultats globaux

Nous avons obtenu 263 cultures positives soit 21,7% et 7,7% de culture souillées. La bacilloscopie est positive pour 11,4 % des échantillons.

Tableau VIII : Résultats globaux de la bacilloscopie et de la culture

Bacilloscopie	Bacilloscopie négative		Bacilloscopie positive		Total	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Culture négative	825	68,3	28	2,3	853	70,6
Culture positive	159	13,2	104	8,6	263	21,7
Culture souillée	87	7,2	6	0,5	93	7,7
Total	1071	88,6	138	11,4	1208	100

La bacilloscopie est négative dans 88% des échantillons. Cependant on a noté 13% de cultures positives avec une bacilloscopie négative.

Nous avons obtenu dans notre étude 21,7% de cultures positives.

.

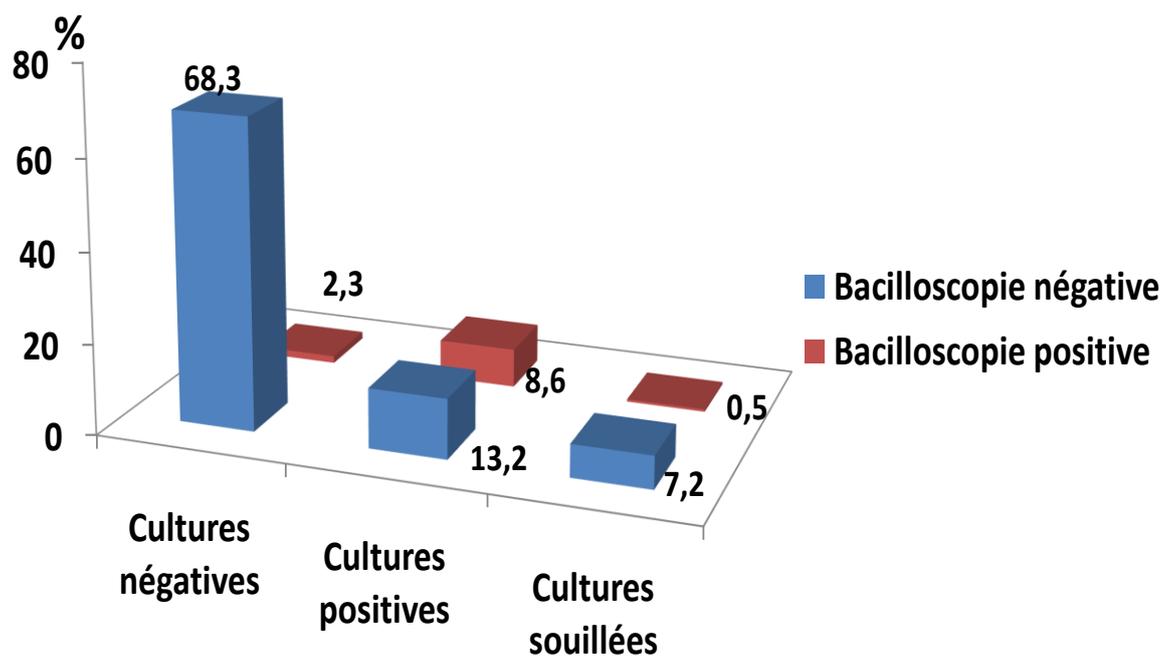


Figure 9: Résultats de la bacilloscopie et de la culture

V.4.2 Cultures positives

Nous avons obtenu sur les 1208 prélèvements de notre étude, 263 cultures positives soit 21,7% des cultures.

Le sexe ratio est de 1,63 en faveur des hommes avec 163 patients et 100 patients de sexe féminin.

V.4.2.1 Cultures positives au complexe *Mycobacterium tuberculosis* et mycobactéries atypiques

Nous avons identifiés 196 cultures comme des souches du complexe tuberculosis. Les mycobactéries atypiques représentent dans notre étude 5,5% des prélèvements reçus et 25,4% du total des cultures positives.

Une grande partie des cultures positives aux mycobactéries atypiques (79 %) sont à bacilloscopie négative.

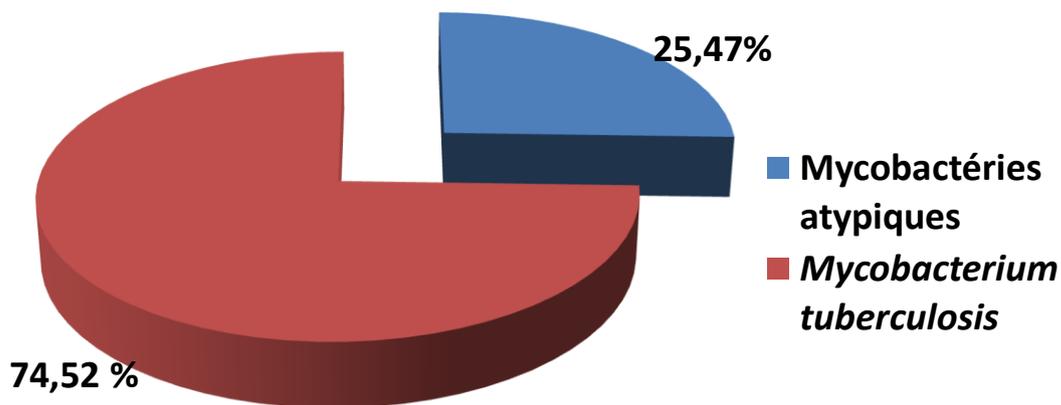


Figure 10: Cultures positives selon l'espèce isolée

V.4.2.3 Provenance des cultures positives

La majeure partie des cultures positives provenait de patients reçus à l'hôpital Aristide le Dantec (70,3%) et à l'hôpital de FANN (16,3%). Le service de médecine interne occupe la première place concernant les cultures positives avec 34% suivi par les patients d'origine externe 29,6%, la pédiatrie 11% et la pneumologie 10%.

Tableau IX : Provenance des cultures positives selon les hôpitaux

Hôpital	Nombre	Pourcentage (%)
Dantec	185	70,3
FANN	43	16,3
HOGGY	01	0,4
Principal	02	0,7
Structures périphériques	20	7,6
Structures Privées	05	1,9
Albert Royer	03	1,1
Non précisé	04	1,5
Total	263	100

Tableau X : Provenance des cultures positives selon les services hospitaliers

Services	Nombre	Pourcentage (%)
Médecine interne	89	33,8
Pédiatrie	30	11,4
Pneumologie	27	10,2
Maladies infectieuses	01	0,4
Cardiologie	10	3,8
Dermatologie	02	0,7
Chirurgie et spécialités chirurgicales	16	6,1
Externes	78	29,6
Non précisés	05	1,9
Autres	05	1,9
Total	263	100

Autres : Marine, Pavillon spécial, CTA

V.4.2.4 Nature des cultures positives

Les expectorations constituent la majorité des cultures positives avec 74% suivies par les tubages gastriques (16%).

Tableau XI: Origine des échantillons à culture positive aux mycobactéries

Prélèvement	Nombre	Pourcentage (%)
Expectorations	193	73,3
Tubages gastriques	43	16,3
Pus	14	5,3
Urines	04	1,5
Liquides d'épanchement	05	1,9
Prélèvement bronchique	01	0,4
Ponction ganglionnaire	01	0,4
LCR	01	0,4
Pièce opératoire	01	0,4
Total	263	100

V.4.3 Cultures positives aux mycobactéries atypiques

V.4.3.1 Provenance des cultures positives aux mycobactéries atypiques

L'essentiel des échantillons positifs aux mycobactéries atypiques provenait des patients de l'hôpital Aristide Le Dantec (75,4%) et de FANN (18%). Les échantillons positifs aux mycobactéries atypiques provenaient surtout du service de médecine interne avec 41,8%.

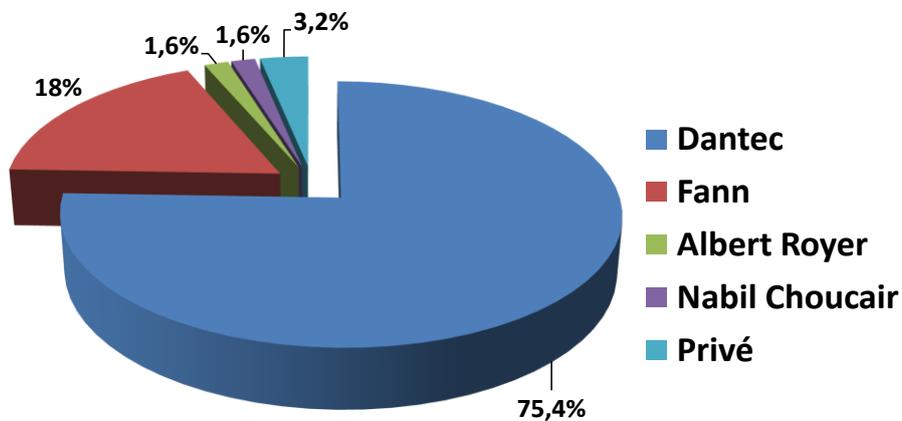


Figure 11: Repartition des cultures positives aux Mycobactéries atypiques selon les structures de santé

Tableau XII: Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon les services hospitaliers

Services hospitaliers	Nombre	Pourcentage (%)
Médecine interne	28	41,8
Pneumologie	06	8,9
Pédiatrie	11	16,4
Cardiologie	02	2,9
Dermatologie	01	1,5
Ombredanne	01	1,5
Pavillon spécial	01	1,5
Ophthalmologie	01	1,5
Orthopédie	01	1,5
Cancérologie	2	2,9
Externes	13	19,4
Total	67	100

V.4.3.2 Cultures positives aux mycobactéries atypiques selon l'âge et le sexe des patients

L'âge des patients à culture positive aux mycobactéries atypiques varie de 11mois à 87 ans avec une prédominance des patients adultes. Le sexe ratio est en faveur des hommes avec 52 % des cultures positives aux mycobactéries atypiques.

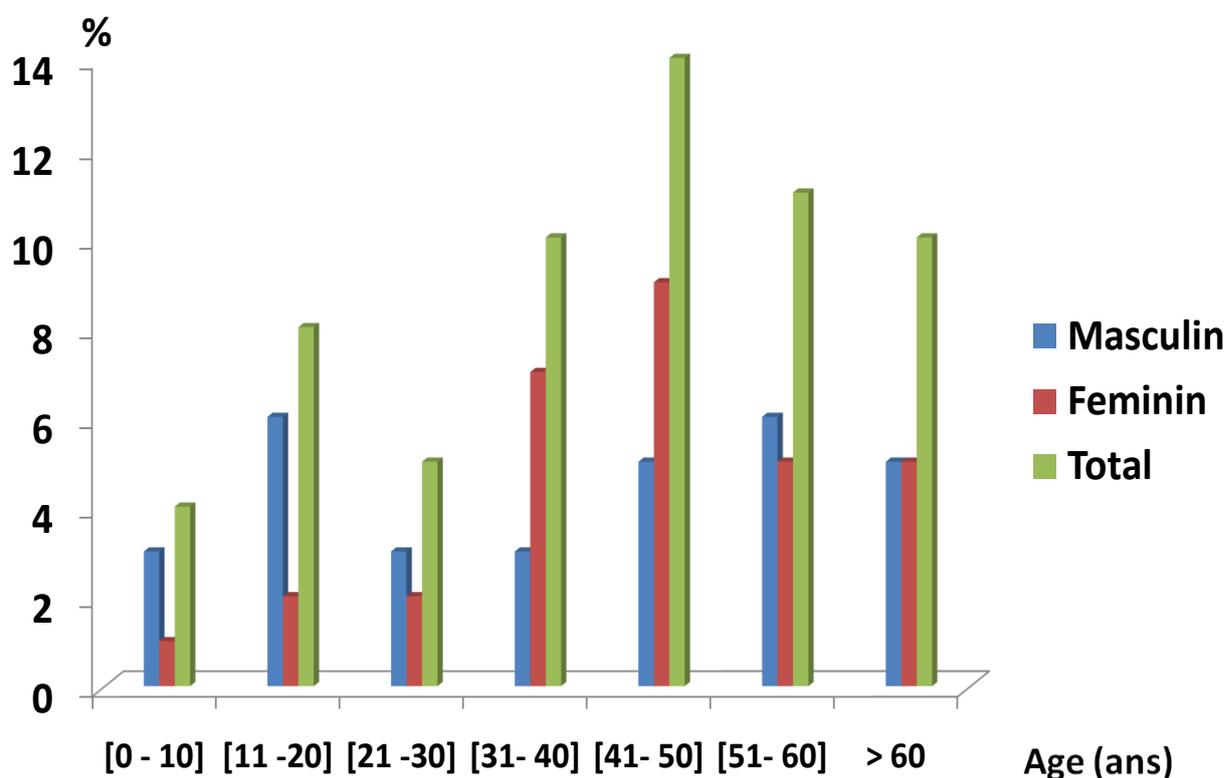


Figure 12: Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon l'âge et le sexe

V.4.3.3 Cultures positives aux mycobactéries atypiques selon le statut

Nous avons 57 nouveaux malades sur 67 soit 85% des cas, 6 patients pour examen de suivi, 1 patient pour rechute et 3 patients dont le statut n'est pas précisé.

V.4.3.4 Cultures positives aux mycobactéries atypiques selon la nature du prélèvement

Les échantillons positifs aux mycobactéries atypiques sont constitués d'expectorations (79%), de tubages gastriques (19,3%) et d'urines (1,6%).

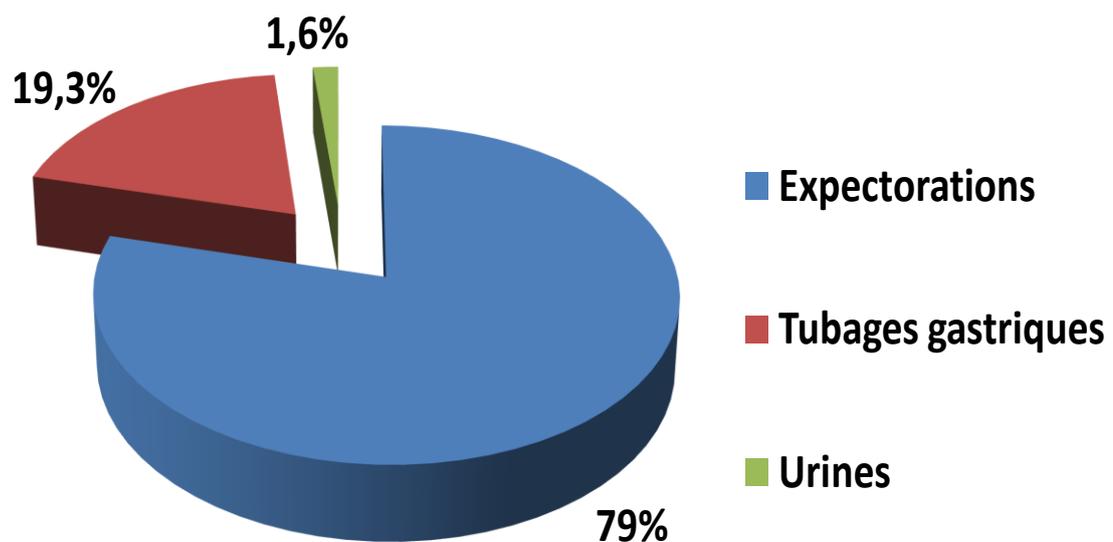


Figure 13: Nature des prélèvements positifs aux mycobactéries atypiques

V.4.3.5 Les différentes espèces identifiées

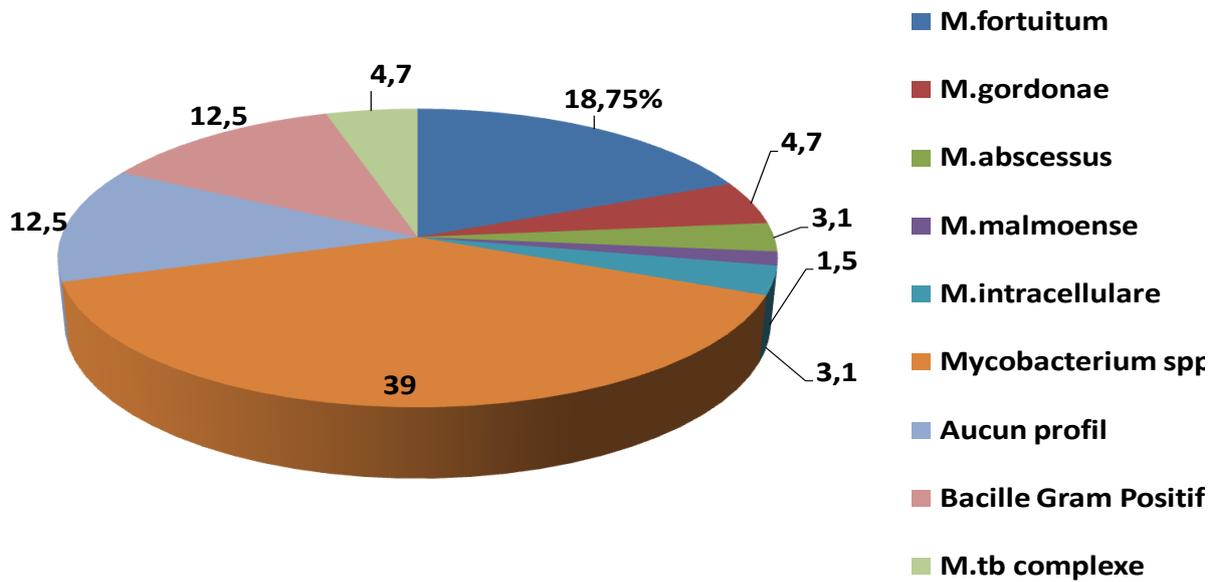


Figure 14 : Répartition des espèces de mycobactéries atypiques identifiées

M. fortuitum est l'espèce la plus présente dans notre étude. Cependant 39% des mycobactéries atypiques n'ont pas pu être identifiées par le kit utilisé et 12% ne présentaient aucun profil.

Les autres espèces de mycobactéries atypiques identifiées sont : *M. gordonae* (4,7%) ; *M. abscessus* (3,1%) ; *M. intracellulare* (3,1%) et *M. malmoense* (1,5%).

DISCUSSION

1. Echantillons colligés

1.1 Nombre

Nous avons obtenu entre Janvier 2011 et Juin 2012, 1208 prélèvements adressés à la sous unité de mycobactériologie pour recherche de BAAR.

Les cultures contaminées, aussi bien sur milieux liquides et solides, représentaient 7,7% et n'ont pu être exploitées. Ces cultures ont été redécontaminées et réensemencées mais généraient toujours après une croissance des contaminants. Ce pourcentage est en dessus des normes admises (2 à 3%) pour les cultures sur milieux solides Lowenstein Jensen [27].

Cependant ce nombre est en forte baisse comparée à une étude réalisée dans le même laboratoire entre Janvier 1998 et Juin 1999 qui avait donné 11,6% de cultures rejetées à cause des contaminations uniquement sur milieux solides [18].

1.2 Nature des échantillons

La nature des prélèvements reçus au laboratoire est dominée par les expectorations et tubages gastriques (84.5%). Ces prélèvements proviennent surtout des services de médecine interne et de pédiatrie. La localisation pulmonaire de la tuberculose fait que la demande d'examen des expectorations est très importante. Les prélèvements extrapulmonaires (15.5%) sont caractérisés par une grande hétérogénéité dans notre population d'étude et sont constitués de liquides d'épanchement, d'urines, de pus, de LCR, de ponction hépatique et ganglionnaire, de pièce opératoire. Ceci témoigne de la localisation multifocale de la tuberculose.

Dans les travaux de Sakho M.A, les expectorations représentaient 96,6% des prélèvements [70].

2. Données épidémiologiques

Les tranches d'âge les plus représentatives sont celles des adultes de 21-30 et 31-40ans avec 34,35%. Ces tranches d'âge représentent la population

active. Ces données sont similaires à celles retrouvées dans les travaux de **Sakho M.A.** Le sexe ratio est en faveur des hommes avec les 3/5 des prélèvements colligés, ce qui est aussi similaire avec les travaux de **Sakho M.A** qui avait trouvé 61,2% en faveur des hommes [70].

3. Résultats bacilloscopie et culture

Dans notre étude, la bacilloscopie a été négative dans 86% et positive dans 11% des frottis observés. Les prélèvements négatifs à la bacilloscopie et à la culture représentaient 63,6%. Une étude réalisée dans le même laboratoire en 1999 avait donné 72% d'échantillons négatifs à la bacilloscopie et à la culture [18]. Cependant la tuberculose à bacilloscopie négative a été décrite par plusieurs auteurs [71].

Les cultures positives aux mycobactéries étaient à 21,7%.

Nos résultats sont concordants avec ceux d'une étude faite en Shanghai entre 2005 et 2008 et qui a donné 22,9% de culture positive aux mycobactéries [84].

Une étude menée en Israël a donné un pourcentage de 3,5% de cultures positives aux mycobactéries [95].

Une autre étude réalisée en Taiwan fait état de 5,6% de cultures positives aux mycobactéries [50].

Il faut noter que dans 13,1% des cas, la bacilloscopie était négative tandis que la culture était positive, ce qui démontre la sensibilité de la culture par rapport à la bacilloscopie. Cette faible sensibilité de la bacilloscopie explique l'importance des méthodes de diagnostic rapide dans les nouveaux algorithmes.

On note aussi des cultures négatives à bacilloscopie positive soit 1,5%.

Il peut s'agir de faux positifs, de mycobactéries atypiques plus exigeantes (*M.haemophilum*) ou poussant à des températures autre que 37°C (*M.marinum*).

Il peut s'agir aussi de mycobactéries stressées par la technique de décontamination.

Mais il ne faut pas aussi perdre de vue que le frottis est fixé et l'examen direct ne permet pas alors d'apprécier la viabilité du germe, ainsi donc un échantillon peut être bel et bien à bacilloscopie positive et négatif à la culture : cas des malades sous traitement antituberculeux à bacilles non viables.

Nous avons noté également un certain nombre de cultures souillées soit 7%.

Ces cultures ont été redécontaminées puis réensemencées mais restent toujours souillées.

La même méthode de décontamination avec les mêmes concentrations de décontaminants ont été utilisées.

Les cultures positives au complexe *Mycobacterium tuberculosis* représentaient 74% des cultures positives et 16% des prélèvements colligés.

Les cultures positives proviennent en majorité des hôpitaux Aristide Le Dantec avec 70,3% et FANN avec 16,3%.

Les services les plus concernés par les cultures positives sont la médecine interne 34%, la pédiatrie 11% et la pneumologie 10%.

Concernant l'origine des cultures positives, elle est dominée par les prélèvements d'origine pulmonaire (expectorations avec 73,7%, tubages gastriques 16,3%)

Les autres prélèvements extrapulmonaires sont dominés par les pus 5,3%, les liquides d'épanchement 1,9%, les urines 1,5%.

4. Cultures positives aux mycobactéries atypiques

4.1 Nombre

Nous avons obtenu parmi les 1208 échantillons colligés, 67 mycobactéries atypiques, ce qui représente 5,5% des cultures des échantillons reçus au laboratoire durant notre période d'étude. Dans une étude réalisée en Iran sur 6472 patients suspects de tuberculose, les cultures positives aux mycobactéries atypiques représentaient 1,3% [2] alors que ce taux était de 2,1% pour une étude

similaire faite en Turquie entre 2004 et 2009 et portant sur 45891 échantillons [90].

Les mycobactéries atypiques représentent 25,4% des cultures positives dans nos travaux alors qu'une étude menée en Israël avait comme résultat 72% de Mycobactéries atypiques isolées des cultures positives contre 28% pour le complexe *Mycobacterium tuberculosis* [85]. Une étude similaire faite au Brésil sur 1812 cas suspectés de tuberculose pulmonaire, les mycobactéries atypiques isolées représentaient 16,9% des prélèvements [28].

4.3 Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon l'âge et le sexe

Les hommes sont plus touchés par les cultures positives aux mycobactéries atypiques avec 52%. Cependant la différence n'est pas statistiquement significative (Fisher : $p=0,430$).

Cette prédominance masculine est rapportée par d'autres études avec 63% en faveur des hommes [2], 53% dans une autre étude faite en Shanghai [84] et 64,5% dans une étude faite au Brésil [28].

Dans notre étude l'âge des patients à culture positive aux mycobactéries atypiques varie de 11mois à 87 ans. La tranche d'âge la plus touchée est celle des personnes âgées entre 41- 50 ans avec 20,90% et la moins touchée est celle des enfants âgés de 0-10 ans avec 5,9%.

Une étude en Iran a donné la tranche d'âge 40-49 ans comme la plus touchée avec 23% des patients dont les cultures sont positives aux mycobactéries atypiques [2]. De même qu'une autre étude menée en Shanghai qui avait montré que 67% des mycobactéries atypiques isolées provenaient de patients d'âge supérieur à 56 ans [84]. Une autre étude faite en Arabie Saoudite a aussi confirmé cette tendance avec 41% des patients, dont les prélèvements sont positifs aux mycobactéries atypiques et qui étaient âgés de plus de 60 ans [6].

Les résultats d'études menées aux Etats unis ont aussi révélé une prévalence plus élevée de mycobactéries atypiques chez les personnes âgées [15].

M. fortuitum est retrouvé plus chez les patients âgés entre 41 et 50 ans (45,4%) et ceux de plus de 60 ans (27,2%). Cependant une souche de *M. fortuitum* a été isolée chez un enfant de 11 mois.

4.4 Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon la nature des prélèvements

Par rapport à la nature des prélèvements, les mycobactéries atypiques isolées dans notre étude, provenaient principalement des prélèvements d'origine pulmonaire à savoir les expectorations et les tubages gastriques. De même, les espèces identifiées provenaient en grande partie de prélèvements pulmonaires. Ainsi, *M. fortuitum* a été isolé dans 91,6% des prélèvements d'origine pulmonaires et 8,3% sont isolées à partir d'urines. Les autres espèces identifiées (*M. gordonae*, *M. abscessus*, *M. intracellulare*, *M. malmoense*) sont toutes isolées à partir de prélèvements d'origine pulmonaire.

Les échantillons des cultures positives aux mycobactéries atypiques sont des expectorations 79%, des tubages gastriques 19,3% et des urines 1,6%. Il faut noter qu'aucun des autres prélèvements (pus, liquides d'épanchement ...) n'a été positif aux mycobactéries atypiques. Ce qui suggère une implication faible des mycobactéries atypiques dans la tuberculose extra pulmonaire.

Une publication du CDC (Centers for Diseases Control and Prevention) donne l'origine des isolements des mycobactéries atypiques avec 75% d'origine pulmonaire, 5% sanguine, 2% cutanée et tissus mous et 0,5% lymphatique [15].

Dans une étude faite en Corée, les résultats sont conformes avec les nôtres, avec prédominance des expectorations 89% [88] de même que l'étude faite en en Arabie Saoudite avec 67% prélèvements pulmonaires avec 67% [6]

4.5 Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon le motif de prescription

Les motifs de prescription sont très divers, mais restent dominés par les bilans et les syndromes pulmonaires notamment les toux chroniques ou persistantes, pneumopathies ou hémoptysie.

La seule souche de *M. malmoense* identifiée est isolée chez un enfant de 4 ans souffrant de pneumopathie bilatérale. *M. intracellulare* a été isolée chez deux patients âgés de plus de 60 ans et suspectés de MDR. *M. abscessus* a été isolée chez deux patients souffrant de pneumopathie et âgés de plus de 60 ans.

Les trois souches de *M. gordonae* identifiées ont été isolées chez des patients diagnostiqués pour pneumopathie interstitielle, altération de l'état général sur diabète insulino-dépendant.

Ces résultats sont en concordance avec ceux publiés à travers le monde et qui montrent l'implication significative des Mycobactéries atypiques dans les maladies respiratoires [87], [6].

4.6 Répartition des cultures positives aux mycobactéries atypiques selon l'espèce

M. fortuitum est l'espèce de mycobactérie atypique la plus retrouvée dans notre échantillon (12%), suivie de *M. gordonae* (4,7%). *M. abscessus* et *M. intracellulare* ont été retrouvés à raison de 3,1% pour chacune et *M. malmoense* 1,5%.

Cependant il faut noter que le kit Génotype Mycobacterium CM ne nous a pas permis d'identifier toutes les espèces de mycobactéries.

Une étude réalisée en Turquie donne *M. gordonae* 21,1% ; *M. intracellulare* 15,6%, *M. avium* 5,2% et *M. fortuitum* 14,9% [7].

Les résultats d'une étude réalisée au Nigeria entre 2007 et 2009 est en concordance avec ceux de notre étude avec *M. fortuitum* l'espèce de mycobactéries atypiques la plus retrouvée 42,85% suivie de *M. intracellulare* et *M. chelonae* 28,57% chacune [59].

Les espèces les plus isolées chez des patients suspects de tuberculose dans une étude menée en Arabie saoudite entre 2010 et 2011 étaient: *M. abscessus* 30,5% ; *M. fortuitum* 29,7% ; *M. intracellulare* 12,6% [6]. De même l'étude faite en Shanghai entre 2005 et 2008 montrait que les mycobactéries atypiques les plus retrouvées étaient : *M. chelonae* 26,7% ; *M. fortuitum* 15,4% ; *M. kansasii* 14,2% ; complexe *M. avium intracellulare* 13,1% ; *M. terrae* 6,9% [84]. Cependant de nombreuses publications montrent le complexe *M. avium intracellulare* comme l'espèce la plus isolées [11 ; 46 ; 73].

Dans notre étude *M. abscessus* a été isolée chez deux patients souffrant de pneumopathie. Cette espèce a été isolée chez des patients présentant certaines infections : infections pulmonaires chroniques [45], cutanées [23], osseuses [5], viscérales après traumatisme [28].

Les mycobactéries atypiques bien qu'étant considérés comme ayant un pouvoir pathogène faible, peuvent être associées à des maladies sévères dans certaines circonstances et peuvent même impacter sur la morbidité et la mortalité : au niveau de la péritonite chez un patient en dialyse péritonéale ambulatoire continue [16 ; 39 ; 61], au niveau de la moelle osseuse [39], chez les transplantés cardiaques [52].

CONCLUSION

Les mycobactéries atypiques sont des germes ubiquitaires de l'environnement. Cependant ils peuvent avoir un rôle pathogène chez l'homme et certaines même sont reconnues comme étant très pathogène chez l'homme. Un travail de recherche sur les mycobactéries atypiques dans l'environnement de la région de Dakar a été réalisé et avait trouvé des espèces saprophytes de l'environnement mais aussi des espèces reconnues potentiellement pathogènes. [17].

Avec l'avènement du SIDA, on assiste à une recrudescence des infections opportunistes.

Toutes ces raisons avaient suscité notre travail qui avait comme objectifs de :

- Faire le point sur les mycobactéries atypiques isolées au laboratoire durant notre période d'étude.
- Donner les caractéristiques épidémiologiques de ces mycobactérioses.

Entre Janvier 2011 et Juin 2012, 1208 prélèvements ont été reçus à la sous unité des mycobactéries du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'hôpital Aristide le Dantec en vue de la recherche de BAAR par microscopie et culture. Ces prélèvements provenaient pour l'essentiel des hôpitaux de Dakar Aristide le Dantec et FANN et plus des services de médecine interne, de pédiatrie, de Pneumologie mais aussi des autres hôpitaux et structures de santé périphériques notamment les centres et postes de santé.

La coloration des lames pour la microscopie a été faite par la technique de Ziehl-Neelsen. La technique de décontamination de Kubica modifiée a été utilisée pour décontaminer les échantillons avant leur ensemencement sur milieu Lowenstein Jensen et sur milieu liquide. La présence de BAAR sur un milieu de culture est confirmée par la microscopie.

L'identification de la souche est faite sur la base des examens microscopiques et macroscopiques de la culture et des tests rapides d'identification avant que l'extraction de leur ADN ne soit faite pour

l'identification moléculaire avec le kit de Hain CM/AS. La gestion et l'exploitation des données ont été faites grâce aux logiciels informatiques : File make pro v.6, Excel et Epi info 3.5.1.

Le nombre de prélèvements colligé était de 1208.

Le sexe ratio était à 1, 5 en faveur des hommes.

Les adultes sont plus représentatives avec les tranches d'âge de [21-30] (17,96%) et de [31-40] (16,39%).

L'étude des caractères épidémiologiques des patients à culture positive a donnée 263 patients dont 163 hommes, 100 femmes. La majeure partie de ces cultures positives sont des expectorations avec 74% et tubages gastriques 16%. On a obtenu aussi un pourcentage non négligeable de pus donnant des cultures positives 5,3%.

Concernant les mycobactéries atypiques, 67 patients sont à culture positive composés de 35 hommes et 32 femmes mais la différence n'est pas significative ($p=0,430$).

L'âge des patients concernés variait de 11mois à 97 ans. Les enfants de 0 à 10 ans constituent la tranche d'âge la moins touchée avec un pourcentage de 5,9%, par contrairement aux patients âgés de 41 à 50 ans plus touchés avec 20,9% des cultures positives aux mycobactéries atypiques. La nature des prélèvements positifs aux mycobactéries atypiques est largement dominée par les expectorations (80,6%), suivies des tubages gastriques (17,9%) et urines (1,5%). Il faut noter que les autres types de prélèvements, n'ont donné aucune culture positive aux mycobactéries atypiques.

M. fortuitum est l'espèce la plus isolée dans notre étude avec 12%. Elle est suivie par *M. gordonae* ; *M. abscessus* ; *M. intracellulare* et *M. malmoense*.

La plupart de ces mycobactéries atypiques étaient isolées de patients souffrant de maladies respiratoires et méritent qu'on leur accorde une attention particulière dans le rôle qu'elles peuvent jouer dans ces infections et dans le traitement de ces maladies opportunistes.

Certains espèces comme *M. intracellulare* a été isolée chez deux patients atteints de tuberculose et résistants au traitement de première ligne et mériterait une étude plus approfondie pour voir leur implication dans l'acquisition de ces résistances.

RECOMMENDATIONS

Au niveau du laboratoire,

Vu cette augmentation importante du nombre de mycobactéries atypiques isolées chez les patients entre 1999 (thèse de Diop Ndiaye H.), 2006 (thèse de Sakho M. A) et 2012 (notre étude), nous recommandons de faire l'identification de ces germes.

Nous suggérons aussi d'autres études sur les mycobactéries atypiques couplées à la clinique et à l'environnement pour pouvoir déterminer l'impact réel de ces germes sur les différentes pathologies auxquelles ils sont associés, mais aussi la sensibilité aux antibiotiques proposés dans le traitement de ces infections.

Nous recommandons également la mise sur place de tests rapides permettant l'identification des mycobactéries atypiques.

Aux cliniciens et aux biologistes,

L'instauration plus effective d'un dialogue clinico-biologique pour une meilleure prise en charge, un bon suivi des patients souffrant d'infections respiratoires et une interprétation correcte des infections dues à ces bactéries qui sont aussi rencontrées dans l'environnement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Agne's M.

Spondylitis due to *Mycobacterium xenopi* in a human immunodeficiency virus type I infected patient: case reported end review literature.

J. Clin Microbiology, 2005, 43, 3, p.1465-1466.

2. Ahmad R. Bakhmand and al.

Detection and Identification of non tuberculosis Mycobacterial Infections in 6,4772 Tuberculosis Suspected patients.

Scand J Infect Dis, 1996, 28, p. 275-278.

3. Ali Mohammed Somily.

Mycobacterium chelonae complex bacteremia from a post renal transplant patient : case reported and literature review.

Jpn.J.Infect.Dis 2010, 63, p. 61-64.

4. Avril.L.J, Dabernat.H, Denis F, Monteral.H.

Bactériologie Clinique.

Ellipse 2 édition 1992, p. 389-422.

5. Bar T, et al:

Osteomyelitis of the mandible due to *Mycobacterium abscessus*: a case report.

J Oral MaxillofacSurg 2005, 63, 6, p.841–844.

6. Bright Varghese1, Ziad Memish, Naila Abuljadayel and al

Emergence of Clinically Relevant Non-Tuberculous Mycobacterial Infections in Saudi Arabia.

PLOS Neglected Tropical Diseases, 2013, 7, 5, p.2234.

7. Can Bicmen, Meral Coskun, Ayriz T. Gunduz, Gunes Senol and al
Nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary specimens between
2004 and 2009: causative agent or not?
New microbiologica, 2010, 33, p. 399-403.

8. Ched Kim. HO.

Mycobacterium avium complex infectious presenting as an endobronchial mass
in patient with acquired immune deficiency syndrome.
Korean Journal of Internal medicine 2007, 22, p. 215-219.

9. Christain Emmanuel Sopoh.

Family relationship water content and occurrence of Buruli ulcer in Benin.
Plos Neglected tropical diseases, 2010, 4, 7, p.746.

10. Christine Y.

Mycobacterium avium in the post genomic Era.
Clinical bacterial reviews, 2007, 20, 2, p.205-220.

11. Chun-Ta Huang a, Yi-Ju Tsai b, Chin-Chung Shu.

Clinical significance of isolation of non tuberculous mycobacteria in pulmonary
tuberculosis patients.
Respiratory Medicine, 2009, 103, p.1484-1491.

**12. Cleoni A. M. de Lima, Harrison M. Gomes, Maranibia A. C. Oelemann,
and al.**

Non tuberculous mycobacteria in respiratory samples from patients with
pulmonary tuberculosis in the state of Rondônia.
Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013, 108, 4, p. 457-462.

13. Cory D Cowan, John J Hawboldt, and Mazen Bader.

Pulmonary Infection Due to *Mycobacterium malmoense* in a Patient with Crohn Disease.

JCPH, 2009; 62, 6, p.496.

14. Curtis H Weiss and Jeffrey Glassroth.

Pulmonary disease caused by non tuberculous mycobacteria.

Expert Rev. Respir. Med. 2012, 6(6), p. 597–613.

15. David E. Griffith, Timothy Aksamit, Barbara A. Brown-Elliott et al.

An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases.

Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175, p. 367–416.

16. De Groote, M.A and Huitt.

Infections due rapidly growing mycobacteria.

Clin. Infect. Dis, 42, p. 1756-1763.

17. Diao Astou.

Recherche de Mycobactéries atypiques dans l'environnement de la région de Dakar. Thèse pharma, Dakar : UCAD, 1999.

18. Diop Halimatou.

Identification et sensibilité des souches de Mycobactéries isolées au laboratoire de bactériologie-virologie du CHU Aristide Le Dantec de Dakar.

Thèse pharma, Dakar : UCAD, 1994.

19. Dixmier. A

Les infections pulmonaires à *Mycobacterium xenopi* en dehors du SIDA: étude rétrospective sur dix cas.

Rev Mal Respir, 2007, 24, p.299-3083.

20. Erica Patters

Reliable identification of mycobacterial species by PCR Restriction enzymes Analysis (PRA) hsp65 in a reference laboratory and elaboration of sequence based extended algorithm of PRA-hsp65 patters.

BMC microbiology, 2008, 8, p.48.

21. Fabienne Rigothi

Non tuberculous mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*.

Plos one, 2009, 4, 6, p.5660.

22. Firidure. M

Atteintes pulmonaires à *Mycobacterium xenopi* en dehors du SIDA.

Rev Mal Respir, 2000, 17, p. 481-487.

23. Fitzgerald DA, et al:

Cutaneous infection with *Mycobacterium abscessus*.

Br J Dermatol 1995, 132(5) p.800–804.

24. François Denis

Bactériologie médicale, techniques usuelles.

Elsevier Masson 2007 p. 467-488.

25. Françoise Portaels

First cultivation and characterization of *Mycobacterium ulcerans* from the environment.

Plos. Neg. Dis. 2008, 2, 3, p.178.

26. Greg D. Appleyard and Edward E. Clark

Histology and Genotype characterization of a novel mycobacteria species found in three cats.

Journal of microbiology, 2002, 40, 7, p.2425-2300.

27. Grosset J., Borvet. Truffut-Pernot C.

Mycobacteries. In: Le Minor L, Véron M., ed. Bactériologie médicale. Flammarion ; 1990, p. 65-1017, Paris.

28. Hanan I Hakami, Alaa A Alhazmi, Abdulrahman A Alrajhi

Mycobacterium abscessus peritonitis associated with laparoscopic gastric banding.

BMC Infectious Diseases 2013, 13, p.323.

29. <http://membres.multimania.fr/microbio/systematique/mycobacteries.htm> consulté le 20/06/2012.

30. <http://web.ccr.jussieu.fr/ccln/gardes/xeno> consulté le 25/08/2010

Recommandations pour le diagnostic et le traitement des infections ostéo-articulaires à *Mycobacterium xenopi*.

31. Hye Yun Park

Pulmonary disease caused by *Mycobacterium xenopi*: the first case in Korea. *Yonsei Med J*, 2007, 48, 5, p.871-875.

32. Isabelle Pagnia

Emerging Mycobacterium spp in cooling towers.
Emerging infectious diseases, 2009, 15, 1.

33. Jacob Amir MD.

Non Tuberculous Mycobacteria lymphadenitis in children: Diagnosis and treatment.
IMAJ, 2010, 12.

34. Jason E. Stout

Association between 16S-23S internal transcribed spacer sequence groups of *Mycobacterium avium* complex and pulmonary disease.
J. Clin Microbiology, 2008, 46, 8, p.2790-2793.

35. Jean Loup

Bactériologie Clinique 2 édition p. 389-422.

36. Jeffrey S Schorey and Lindsay Sweet

The mycobacterial glycopeptidolipids; structure, function, and their role in pathogenesis.
Glycobiology 2008, 18, 11, p 832-841.

37. Jerome A and al.

Cervicofacial lymphadenitis in children caused by *Mycobacterium haemophilum*.
CID, 2005, p.41-1569.

38. Jerome A., Lindeboom ED J. Kappa

Tuberculin Skin testing is useful in the screening for Non Tuberculous Mycobacteria cervicofacial lymphadenitis in children.

CID, 2006, 43.

39. Jin-Won Chung, Young-Ju Cha, and Dong-Jin Oh

Disseminated *Mycobacterium avium* Complex Infection in a Non-HIV-infected Patient Undergoing Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis.

Korean J Lab Med 2010; 30 p.166-170.

40. John Hermon Taylor and Tim Bull

Crohn's disease caused by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: a public health tragedy whose resolution is long overdue.

J.Med Microbiol, 2002, 15, 5, p. 3-6.

41. Juin Won Chung

Disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in a non HIV infected patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis.

Lab Med 2010, 30, p.166-170.

42. Kapay Kibaddi

Response to treatment in a prospective cohort of patients with large ulcerated lesions suspected to be buruli ulcer (*Mycobacterium ulcerans* disease).

Plos Neglected Tropical Diseases, 2010, 4, 7, p.736.

43. Kerbirou L.

Human Immunodeficiency Virus type I related pulmonary *Mycobacterium xenopi* infection: a need to treat?

CID, 2003, p.37.

44. Kevin L Winthrop

Pulmonary disease due to non tuberculous mycobacteria: an epidemiologist's view.

Future Microbial 2010, 5(3), p.343-345.

45. Kötz K, Lindblad MGA:

Infection with *Mycobacterium abscessus* deteriorates lung function dramatically in CF patients.

J of Cystic Fibrosis 2008, 7, p.58.

46. Krishnamoorthy Gopinath, Sarman Singh

Non-Tuberculous Mycobacteria in TB-Endemic Countries: Are We Neglecting the Danger?

PLoS Negl. Dis, 2010, 4(4), p.615.

47. Ialoy E. et Vonaesch P.

Petites métabolites lipidiques et virulence chez les mycobactéries.

48. Laurence Ahoua

Facteurs de risque de l'ulcère de Buruli en Cote d'Ivoire : résultats d'une enquête réalisée en Aout 2001.

Thèse med : Université Créteil 2002.

49. Le´a Lebrun, Francis-Xavier Weill, Leila Lafendi, and al

Use of the inno-lipa-mycobacteria assay (Version 2) for identification of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates.

J. clin. microbiol, 2005, 43, 6, p. 2567–2574.

50. Lee Andie S., Peter Jelfs, Vitali Sintchenko, and Gwendolyn L. Gilbert

Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing.

Journal of Medical Microbiology (2009), 58, p. 900–904.

51. Lesla E.S. Brugnesteijn Van Cppenraet

Mycobacterium haemophilum and lymphadenitis in children.

Emerging infectious diseases, 2005, 11, 1.

52. Lior Sagi, Eyal Leishem, Aviv Barzalai, Sharon Baum

Mycobacterium haemophilum Infection Presenting as Bilateral Cellulitis and Annular Lesion in a Heart Transplant Recipient.

IMAJ, 2010, 12.

53. Louise Seagar .A, Carmel Prendergast, F. Xavier Emmanuel and al

Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for the simultaneous detection of the Mycobacterium tuberculosis complex and four atypical mycobacterial species in smear-positive respiratory specimens.

Journal of Medical Microbiology, 2008, 57, p.605–611.

54. Marina Keller

Mycobacterium haemophilum epididymal abscess in a renal transplant patient.

J. Clin. Microbiology, 2008, 46, 7, p.2459-2460.

55. Michael Kaser

Evolution of two distinct phylogenetic lineages of the emerging human pathogen *Mycobacterium ulcerans*.

BMC Evolutionary Biology, 2007, 7, p.177.

56. Michael Klisser

Single nucleotide polymorphisms on the road to strain differentiation in *Mycobacterium ulcerans*.

J. Clin. Microbiology, 2009, 47, 11, p.3647-3652.

57. Mohamed E. Hamid, Andreas Roth, Olfert Landt, Reiner M. and al

Differentiation between *Mycobacterium farcinogenes* and *Mycobacterium senegalense* Strains Based on 16S-23S Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Sequences.

J. Clin. Microbiology, 2002, 40, 2, p. 707–711.

58. Nicolas Vezirs

Actualités thérapeutiques et épidémiologiques sur les mycobactéries atypiques : immunodéprimés et non immunodéprimés.

59. Olusoji Daniel, Eltayeb Osman, Peter Adebisi.

Non tuberculosis mycobacteria isolates among new and previously treated pulmonary tuberculosis patients in Nigeria.

Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2011 p.113-115.

60. Perng Cherng-Lih, Chen Hsing-Yu, Tzong-Shi Chiueh and al.

Identification of non-tuberculous mycobacteria by real-time PCR coupled with a high-resolution melting system.

Journal of Medical Microbiology, 2012, 61, p.944–951.

61. Phillips, M.S and Von Reyn

Nosocomial infections due to mycobacteria.

Clin. Infect. Dis, 33, p.1365-1374.

62. Po-Liang Lu, Yuan-Chieh Yang, Su Chiao Huang and al.

Evaluation of the Bactec MGIT 960 System in Combination with the MGIT TBc Identification Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Respiratory Specimens.

J. Clin. Microbiology, 2011, 49,6, p. 2290–2292.

63. Portaels. F

Epidémiologie des ulcères à *Mycobacterium ulcerans*.

Ann soc. Med Trop 1989, 69, p.91-103.

64. Reinout M.Swart

Non tuberculous *Mycobacterium* infectious and tumor necrosis factor α antagonists.

Emerging infectious diseases, 2009, 15, 10.

65. REMIC 2010

Référentiel en microbiologie médicale 4 édition 2010.

66. Richard C. Huard, Luiz Claudio Lazzarini, W. Ray Butler and al

PCR-Based Method To Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions.

J. Clin Microbiology, 2003, 41, 4, p. 1637–1650.

67. Richard J.Wallace

Polyphagic characterization reveals that the human pathogen *Mycobacterium perigrinum* type II belongs to the bovine pathogen species *Mycobacterium senegalense*.

J. Clin Microbiology, 2005, 43, 12, p. 5925-5935.

68. Sacha J.Pilot

Mycobacterium ulcerans and other mycolactone producing mycobacteria should be considered a single species.

Plos Neglected Tropical Disease, 2010, 4, 7, p. 663.

69. Said Halima M., Ismail Nazir, Osman Ayman and al.

Evaluation of TBc Identification Immunochromatographic Assay for Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Samples from Broth Cultures.

J. Clin Microbiology, 2011, 49, 5, p. 1939–1942.

70. Sakho M.A.

Diagnostic au laboratoire de la tuberculose à Dakar (Sénégal): résultats de la bacilloscopie et de la culture de 6856 échantillons traités de 2003 à 2007 et identification par typage moléculaire de 149 souches.

Thèse pharma, Dakar : UCAD, 2008.

71. Samb B. et al.

Methods for diagnosing tuberculosis among in-patients in Eastern Africa whose sputum smears are negative.

Int J Tuberc Lung Dis 1997, 1 (1), p.25-30.

72. Sameer Elsayed and Ron read

Mycobacterium haemophilum osteomyelitis: case reported and review literature.

BMC infectious and disease 2006, 6, p.70.

73. Sami Simons

Non tuberculous Mycobacteria in Respiratory tract infections, Eastern Asia. Emerging infectious diseases, 2011, 17, 3.

74. Sandrac Smli

Clinical and epidemiological correlates of genotypes within the *Mycobacterium avium* complex defined by restriction and sequence analysis of hsp65.

J. clin Microbiology 2002, 40, 9, p.3374-3380.

75. Sang Hoon Han

Disseminated *Mycobacterium kansasii* infection associated with skin lesions: a case report and comprehensive review of literature.

J.Korean Med sci 2010, 25, 8, p.304.

76. Soroush Sharbati

Characterization of porine genes from *Mycobacterium fortuitum* and their impact on growth.

BMC microbiology 2009, 9, p.31.

77. Stephanie Smith

Chronic cutaneous *Mycobacterium haemophilum* infection acquired from coral injury.

CID, 2003, p. 37.

78. Sylvia Cardoso

Characterization of mycobacterium from a major Brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae-M.abcessus* Group I needed.

J. Clini Microbiology, 2009, 47, 9, p. 2692-2698.

79. Sylvia Cardoso Leao, Enrico Tortoli, Cristina Viana-Niero

Characterization of mycobacteria from a major brazilian outbreak suggests that revision of the taxonomic status of members of the *Mycobacterium chelonae*-*M. abscessus* group is needed.

J. Clin Microbiology, 2009, 47, 9, p. 2691–2698.

80. Tan HH.

Cutaneous *Mycobacterium haemophilum* infectious immunocompromised patients in dermatology clinic in Singapore.

Ann Acad Med Singapore 2004, 33, 11, p. 532.

81. Thomas A. Piettras

Coexistent Kaposi sarcoma, cryptococcosis and *Mycobacterium avium-intracellulare* in a solitary cutaneous nodule in a patient with AIDS: report of a case and literature reviews.

J AM ACAD Dermatol, 2010, 62, 4.

82. Varad K.G.

Pulmonary *Mycobacterium xenopi* infection in non HIV infected patients: a systematic review.

INT J Tuberc Lung DIS IJ, 2009, 10, p.1210-1218.

83. W. Hoefsloot, J. van Ingen, W.C.M. de Lange and al.

Clinical relevance of *Mycobacterium malmoense* isolation in the Netherlands.

Eur Respir J 2009, 34, p.926–931.

84. Wang Hong xiu

Non Tuberculosis Mycobacteria: susceptibility patten and prevalence rate in Sanghai from 2005 to 2008.

Chir Med J 2010, 123, 2, p.184-187.

85. Wang S. X., Sng L. H., Leong H. N., and Tan B. H.

Direct Identification of *Mycobacterium haemophilum* in Skin Lesions of Immunocompromised Patients by PCR-Restriction Endonuclease Analysis
J. Clin Microbiology, 2004, 42, 7, p. 3336–3338.

86. Weihong Qi

Genomic diversity and evolution of *Mycobacterium ulcerans* revealed by next generation sequencing.
Plos pathogens, 2009, 5, 9, p.1000580.

87. Wing-Cheong Yam, Kwok-Yung Yuen, Sin-Yee Kam

Diagnostic application of genotypic identification of Mycobacteria.
Journal of Medical Microbiology, 2006, 55, p.529–536.

88. Won-Jung Koh, MD; O. Jung Kwon, MD; Kyeongman Jeon and al.

Clinical Significance of Non tuberculous Mycobacteria Isolated from Respiratory Specimens in Korea.
CHEST, 2006, 129, 2.

89. Yang Huai, Nijuan Xiang, Lei Zhou

Mycobacterium haemophilum infection after alemtuzumab treatment.
Emerging infectious disease CDC 2008, 14, 11.

90. Yishai Haini Cohen

Mycobacterium haemophilum and lymphadenitis in immunocompetent children.
Emerging infectious diseases, 2008, 14.

91. Yoav Mazor MD

Mycobacterium kansasii disseminated disease.

IMAJ, 2010, 12.

92. Yoder S.

PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and food; applied and environmental microbiology.

Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65, 6, p.22650-2653.

93. Yuji Miyambo

Characterization of the fucosylation pathway in the biosynthesis of glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* complex.

Journal of bacteriology, 2007, 180, 15, p.5515-5522.

94. Yukiko Nishiuchi and al

The recovery of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) from the residential bathrooms of patients with pulmonary MAC.

CID 2007,347, p. 45.

95. ZMIRA SAMRA, LEA KAUFMAN, SILVIO PITLIK and al.

Emergence of *Mycobacterium simiae* in respiratory specimens

Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2005, 37, p.838-841.

ANNEXES

Annexe 1 : Préparation colorants pour BAAR

Fuschine phéniqué :

Dissoudre 3g de fuschine dans 100ml d'alcool 95°

Dissoudre 50g de phénol dans 950ml d'eau distillée

Mélanger

Mettre la préparation dans un bain marie chauffant pour dissoudre la fuschine

Bleu de méthylène 0,3% :

Dissoudre 3g de bleu de méthylène dans 1l d'eau distillée

Acide sulfurique dilué :

Diluer au $\frac{1}{4}$ un volume V d'acide sulfurique avec de l'eau distillée

Annexe 2 : Extraction d'ADN par la méthode au chloroforme

Extraction en milieu solide :

Au premier jour d'extraction

- Sélectionner des cultures avec suffisamment de colonies pour être extraite ; les placer dans un ordre bien défini, noter le numéro correspondant à la culture sur la feuille de paille (feuille d'extraction) et mettre le même numéro sur les tubes Eppendorf de 2ml
- Allumer le block chauffant à 99°C dans la hotte
- Dispenser 450 μ l de Tris EDTA dans tous les tubes et y mettre assez de colonies de cultures de Mycobactéries à l'aide d'une anse calibrée stérile
- Tuer les cellules à 99°C pendant au moins 20 minutes
- Laisser les tubes refroidir à température ambiante avant d'ajouter le lysozyme
- Ajouter 50 μ l de 10mg/ml de lysozyme (utilisé pour lyser les cellules), diluer cet extrait avec l'embout (ne pas mettre au vortex) et laisser à 37°C toute la nuit sur l'agitateur

Au deuxième jour d'extraction :

- Allumer le bain marie à 65°C et y placer le CTAB
- Ajouter 100ul de 20% de SDS et mélanger doucement
- Ajouter encore 10ul de protéinase K, mélanger doucement et incubé pendant 40 minutes à 60°C. On évitera les températures supérieures à 65°C car la protéinase K perd rapidement son activité enzymatique
- Ajouter 100ul de 5M NaCl et mélanger doucement
- Ajouter 100ul de la solution NaCl/CTAB et mettre au vortex jusqu'à ce que le mélange soit laiteux ; incubé à 65°C pendant 10min
- Ajouter 750 µl de chloroforme : alcool iso amylique (24 :1) et mettre au vortex pendant 10 secondes
- Centrifuger pendant 8 min à 11000 trs/mn

A ce stade, une interface blanche sera visible, éviter l'interface le plus possible (laisser quelques millimètres en dessus de la membrane de l'interface), transférer la phase aqueuse contenant l'ADN dans les nouveaux tubes de 1,5ml en pipétant un petit aliquote (utiliser un p200 à la graduation 180)

- Vérifier les numéros avant de faire le transfert ; si la membrane blanche est touchée lors du pipetage, jeter cette partie contenue dans l'embout ou remettre dans le tube cette phase aqueuse et centrifuger à nouveau pendant 8min à 11000 trs/min
- Numéroter les tubes correctement et transférer la phase aqueuse aux nouveaux tubes
- Ajouter 5ml de Glycoblue
- Ajouter 550ul d'isopropanol froid (-20°C)
- Inverser le tube doucement plusieurs fois jusqu'à ce que l'ADN soit visible. Ecrire sur la feuille de paillasse la quantité estimée (pas d'ADN vs 1+, 2+, 3+) ou sur le tube directement dans le but d'estimer le volume de TE à ajouter après
- Mettre le portoir contenant les tubes au congélateur à -20°C pendant 1hr ou toute la nuit

Au troisième jour :

Pour cette dernière étape d'extraction, il s'agira durant toutes les étapes de centrifugation de s'assurer que l'emplacement de la charnière du couvercle des tubes est bien correct de sorte qu'on puisse connaître la position de la masse d'ADN

- Centrifuger pendant 1min à 1000 tours/min suivi d'une centrifugation de 15min à 11000trs/min et ensuite enlever le surnageant en inversant le tube jusqu'à voir la masse d'ADN, laisser jusqu'à 20ul (3mm de hauteur)
- Ajouter 1ml d'éthanol 70° froid (-20°C) et inverser le tube plusieurs fois pour rincer tout l'isopropanol. Centrifuger 5min à 11000 tours/min et enlever le surnageant, laisser environ 20ul
- Centrifuger 1min à 11000trs/min, enlever le reste en dessus de la masse avec une p20. Permettre à la masse de sécher à la température ambiante pendant 15min. Vérifier si toute l'éthanol est évaporé, sinon rallonger la durée de séchage.
- Remettre en suspension la masse avec du TE comme estimée en haut c'est-à-dire si pas d'ADN visible : 20ul de TE

1+ (petit précipité) d'ADN visible : 35 µl

2+ (précipité moyen) d'ADN visible : 50 µl

3+ (grand précipité) d'ADN visible : 50 µl

La dissolution de l'ADN peut prendre du temps quelques fois donc il est meilleur de laisser les tubes dans le réfrigérateur au moins toute la nuit avant de quantifier.

Extraction à partir d'un milieu liquide :

Cette technique d'extraction en milieu solide peut également s'effectuer avec des cultures positives en milieux liquides et toutes les étapes sont identiques sauf pour le premier jour ou il s'agit de :

- Placer 1,5 ml à 1,8 ml de culture positive en milieu liquide
- Tuer les cellules bactériennes dans le bain à sec pendant au moins 20min à 99°C
- Centrifuger pendant 5min à 9000trs/min
- Enlever le surnageant liquide et remettre en suspension dans 450 µl de TE

Le reste de la procédure d'extraction demeure identique au processus décrit ci-dessus.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des pharmaciens 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 et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

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

PERMIS D'IMPRIMER

Vu :
Le président du jury

Vu :
Le Doyen.....

Vu et Permis d'imprimer
Pour le recteur, le Président de l'assemblée d'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et par
délégation
Le Doyen