

UNIVERSITE NAZI BONI
BOBO-DIOULASSO

INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES
NATURELLES ET AGRONOMIQUES**



Année académique 2018– 2019

THESE UNIQUE

Présentée et soutenue publiquement le **xx xxxx 2019**

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université NAZI BONI de Bobo-Dioulasso

En

Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques

Spécialité : **Microbiologie**

Par

Sidbéwendé Antoinette ILBOUDO/ KABORE

Contribution à l'amélioration de la qualité du diagnostic de la tuberculose pulmonaire au Burkina Faso par la technique de la culture sur milieu de Lowenstein-Jensen : Etude des facteurs influençant les contaminations des cultures.

Directeur de thèse

Lassana SANGARE, Professeur titulaire,
Université Pr Joseph Ki-Zerbo, Ouaga 1, Burkina
Faso

Co-Directeurs

Nicolas MEDA, Professeur titulaire, Université
Joseph KI-ZERBO, Ouaga 1, Burkina Faso

Juliette TRANCHOT-DIALLO, Maître
assistante, Université Nazi BONI, Bobo-
Dioulasso, Burkina Faso

Président du Jury

Séverin Y. ANAGONOU, Professeur titulaire,
Université d'Abomey Calavi, Bénin

Rapporteurs et membres

DEDICACES

DEDICACES

Au **Seigneur**, le miséricordieux,

A mon **époux Guillaume** et à nos **filles : Mélaine et Audrey**, merci d'être là,

A mes parents **Gabriel** et **Hélène TIENDREBEOGO**,

A **Nadine** ma belle-sœur qui nous a quitté prématurément, paix à son âme,

A **mes frères et sœurs** : Camille, Sidonie, Viviane et Sylvestre,

A toute **ma grande famille et belle Famille**.

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse réalisé au Laboratoire de Mycobactériologie du centre MURAZ a été rendu possible grâce à l'effort conjoint de plusieurs personnes et au soutien financier :

- i) de l'Agence Nationale de recherche sur le sida et les hépatites (ANRS) relative à l'étude intitulée « **Impact de la co-infection VIH/*Mycobacterium tuberculosis* sur la dynamique de la transmission de la tuberculose au Burkina Faso** » (**DYTRAVIHT ; ANRS 12224**), et à l'arbitrage avisé des responsables du centre MURAZ notamment le Pr Nicolas Méda et le Dr Hervé Hien qui a permis la réalisation de la première partie de cette thèse,
- ii) et de l'Institut des Maladies Tropicales (IMT) d'Anwers qui à travers le projet « Strategic Network TB » a permis un financement complémentaire de cette thèse.

C'est donc tout naturellement que je me dois de remercier :

Professeur Lassana Sangaré, Professeur titulaire et Directeur de la thèse.

Déjà au DEA, j'ai pu apprécier votre aisance dans l'art oratoire, vos talents d'enseignant passionné hors norme qui fait votre réputation dans le milieu étudiant, mais surtout qui impacte et impactera durablement sur la qualité de l'enseignement au Burkina Faso. C'est en m'inspirant de la rigueur de vos raisonnements scientifiques et la pertinence de vos points de vue sur les questions scientifiques en général mais aussi et surtout sur les nombreuses hypothèses autour de cette séculaire problématique des contaminations qui a fait l'objet de la thèse que j'ai pu progresser à chaque moment décisif. Merci également de vos conseils avisés et vos encouragements permanents. Merci pour la révision des manuscrits et la correction de ce document. Merci pour votre bienveillance.

Professeur Nicolas Méda, Professeur titulaire et Co-directeur de la thèse.

Vous m'avez fait confiance, inspiré et conseillé. Vous avez initié la collaboration avec le Professeur Sangaré pour la direction de cette thèse et contribué de manière efficace, notamment sur les aspects méthodologiques. Vous n'avez pas hésité à signer de nombreuses lettres de recommandation et autorisations pour faciliter l'inscription en Master et ou thèse des Pharmaciens et Médecins, mais aussi des ingénieurs et TBM de l'INSP/ Centre MURAZ. Je voudrais vous exprimer toute ma gratitude. Au-delà de l'évolution des carrières individuelles de toutes ces personnes que vous avez soutenu c'est la nation entière qui gagne en niveau d'éducation et je l'espère en maturité.

Docteur Juliette Tranchot-Diallo, Maître assistante et co-Directrice de la thèse.

Vous m'avez fait l'honneur une fois déjà en participant à mon jury de DEA et vous avez cette fois encore spontanément accepté la proposition du Professeur Lassana Sangaré et du Professeur Nicolas Méda de codiriger ce travail de thèse. Votre logique imparable, la cohérence de vos raisonnements et vos reflexes de scientifique avisée m'ont permis de progresser dans les travaux de la thèse. Je voudrais également vous remercier pour la révision des articles et surtout la correction de ce document de thèse. Merci pour vos précieux conseils notamment ceux sur l'autosuggestion, merci pour vos encouragements permanents et les poses que vous m'avez obligé à prendre au cours de cet exercice. Au-delà de la thèse, j'ai pu également apprécier vos nombreuses qualités humaines. Merci de votre bienveillance.

Docteur Hervé Hien, Maître Assistant et Directeur Générale de l'Institut Nationale de Santé Publique (INSP).

Avant la direction de l'INSP, vous avez été à la direction du Centre MURAZ et avant cela vous avez dirigé l'équipe tuberculose où j'ai pu participer à vos côtés à la mise en œuvre de projets de recherche. Nos échanges sur les nombreuses difficultés qu'engendraient les contaminations des cultures principalement au cours de l'étude DYTRAVIHT et surtout vos reflexes de spécialiste en santé publique / système de santé, ont tout naturellement conduit à ce que nous identifions ce problème comme étant prioritaire pour le contrôle de la tuberculose au Burkina Faso. J'ai pu également apprécier votre disponibilité et votre patience. Vous avez toujours une solution à tout et malgré vos apparences de va en guerre, vous êtes d'une grande bonté. Merci de votre bienveillance.

Docteur Dezemon Zingué.

Responsable du Laboratoire Central de Référence (LCR). Pendant que vous étiez à Marseille pour votre thèse, vous avez trouvé du temps pour réaliser les analyses de mes souches au MALDI-TOF et une fois de retour à Bobo vous n'avez ménagé aucun effort pour m'accompagner dans cet exercice difficile qu'est la thèse. Merci surtout pour nos enrichissants échanges qui m'ont rendue meilleure, merci pour tes précieux conseils, et la révision des manuscrits.

Docteur Adama Sanou.

Responsable de l'unité de recherche des mycobactéries et voisin de bureau. Avec vous les échanges et les discussions scientifiques et même politiques ont été autant de moments de réel enrichissement. La recherche du financement complémentaire pour la thèse s'est faite dans une action conjointe par l'équipe du laboratoire des mycobactériologies ; mais vous avez défendu le dossier auprès du réseau « Strategic Network TB », permettant ainsi de décrocher ce financement complémentaire pour la mise en œuvre des travaux de cette thèse. Merci pour cela et merci également pour la révision des manuscrits, le rappel des documentaires

scientifiques à suivre sur la chaîne ARTE et sur Science et vie, et surtout merci de m'avoir prévenu de tenir les tasses de café à bonne distance de mon PC.

Professeurs Georges Anicet Ouédraogo, Rock Dabiré, Tarnagda Zékiba, Diabaté Abdoulaye et Tinto Alidou.

Je n'ai pas travaillé sur la lutte antivectorielle, ni sur le vaccin contre le paludisme, encore moins sur les gripes mais l'universalité de la science fait que j'ai pu bénéficier des expériences, des nombreux conseils avisés et des encouragements permanents de chacun d'entre vous.

Docteurs Clément Meda et Abdoulaye Ouédraogo.

Vous avez facilité la mise en œuvre des études en délivrant les autorisations et les avis nécessaires.

Docteur Dramame Kania responsable du Département des Sciences Biomédicale (DSB) **Docteur Thérèse Kagoné** chef du Laboratoire Nationale de Référence des Fièvres Hémorragiques Virales (LNR/ FHV), **Docteurs Diane Valéa, Michel Gomgnimbou, Armel Sanou, Moussa Namoutougou, Cissé Mamadou, Amadou Maiga, Aristide Hien, Ouangrawa soumeya, Léa Bonkian, Dr. Aline Ouoba, Etienne Bilgo,** pour nos échanges enrichissants, la documentation fournie, les soutiens multiformes et l'ambiance bon enfant qui règne dans les couloirs des laboratoires et des bureaux du Département.

Mention spéciale au **Docteur Cissé Mamadou**, votre aide en analyses des données et en utilisation de Mendeley m'a été précieuse. Merci également pour vos encouragements permanents.

Tout le **Personnel de l'INSP/ Centre Muraz**, particulièrement le personnel de la Mycobactériologie, de la Bactériologie classique, du LNR/ FHV, de la virologie, de la laverie et les stagiaires pour l'appui apporté. Mention spéciale à Mounini Nouctara, Kabré Eli, Kobo Gnada et Mamoudou Ouédraogo, Ousséni Bandaogo, Ousseni Zouré, Louis Belem qui ont participé aux analyses de laboratoire ou apporté des solutions aux difficultés que nous avons rencontrées.

Le personnel du **Programme National de Lutte contre la Tuberculose**, le personnel du **CRLAT** ainsi que ceux des différents **Centres de Diagnostic de Traitement de la Tuberculose** pour leurs collaborations et/ou participation aux différentes études. Mention spéciale à **Mme Koutou Félicité, Edouad Kalmogo**, pour nos échanges fructueux, l'enrôlement des patients et la collecte des échantillons.

Toutes les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail. Recevez ici ma profonde gratitude

Enfin **tous les patients** qui ont consentie à participer aux différentes études.

Remerciements aux membres du jury et aux rapporteurs

TABLE DES MATIERES

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| DEDICACES | 2 |
| DEDICACES | 2 |
| | 2 |
| REMERCIEMENTS | 3 |
| | 12 |
| SIGLES ET ABREVIATIONS | 13 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS | 14 |
| LISTE DES FIGURES | 15 |
| LISTE DES TABLEAUX | 17 |
| LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS | 19 |
| RESUME | 22 |
| CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE | 24 |
| I. Contexte et problématique | 25 |
| II. Objectifs et organisation de la thèse | 29 |
| II.1. Objectif général | 29 |
| II.2. Objectifs spécifiques | 29 |
| III. Organisation de la thèse | 29 |
| CHAPITRE 2 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE | 31 |
| I. Histoire et dates marquantes de la tuberculose | 32 |
| II. Épidémiologie de la tuberculose | 34 |
| II.1. Dans le monde | 34 |
| II.2. Dans la sous région | 35 |
| II.3. Au Bukina Faso | 37 |
| II.4. Strategies de l'OMS pour lutter contre la tuberculose | 38 |
| III. Modes de transmission et pathogénèse de la tuberculose | 39 |
| IV. Caractères bactériologiques des mycobactéries | 41 |
| IV.1. Classification | 41 |
| IV.2. Morphologie et structure | 42 |
| IV.3. Caractères cultureux | 44 |
| IV.3.1. Conditions de culture | 44 |
| IV.3.2. Milieux de culture | 44 |
| IV.3.3. Caractéristiques des cultures | 44 |
| IV.4. Caractères biochimiques | 45 |

| | |
|--|-----------|
| IV.5. Caractères antigéniques _____ | 46 |
| IV.6. Propriétés physico-chimiques _____ | 46 |
| V. Diagnostic au laboratoire de la tuberculose _____ | 49 |
| V.1. Diagnostic direct _____ | 50 |
| V.1.1. Prélèvement des échantillons _____ | 50 |
| V.1.2. Conservation des expectorations _____ | 50 |
| V.1.3. Transport des expectorations _____ | 51 |
| V.1.4. Examen microbiologique _____ | 51 |
| V.1.4.1. Examen microscopique _____ | 51 |
| V.1.4.2. Mise en culture des expectorations _____ | 54 |
| V.1.4.3. Identification biochimique _____ | 58 |
| V.1.4.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques _____ | 59 |
| V.1.4.5. Contaminations des cultures et cultures négatives avec une microscopie positive _____ | 61 |
| V.1.5. Diagnostic moléculaire de la tuberculose _____ | 64 |
| V.1.5. 1. Diagnostic à partir de cultures positives _____ | 64 |
| V.1.5. 2. Diagnostic moléculaire à partir de l'échantillon clinique _____ | 69 |
| V.2. Diagnostic indirect _____ | 72 |
| V.2.1. Tests IGRA _____ | 72 |
| V.2.2. Test de l'intradermo-réaction à la tuberculine _____ | 72 |
| VI. Traitement de la tuberculose _____ | 73 |
| VII. Prophylaxie _____ | 74 |
| CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES _____ | 76 |
| I. Cadre et sites d'étude _____ | 77 |
| II. Population et période d'étude _____ | 78 |
| III. Critères d'inclusion et de non inclusion _____ | 78 |
| III.1. Critères d'inclusion _____ | 78 |
| III.2. Critères de non inclusion _____ | 79 |
| IV. Echantillonnage et inclusion des patients _____ | 79 |
| IV.1. Echantillonnage _____ | 79 |
| IV.2. Inclusion des patients _____ | 79 |
| V. Collecte, conservation et acheminement des expectorations au laboratoire de Mycobactériologie. _____ | 79 |
| VI. Analyses des échantillons d'expectorations au laboratoire _____ | 80 |
| VI.1 Préparation des milieux de culture de L-J _____ | 80 |
| VI.2. Biosécurité _____ | 82 |
| VI.3. Mise en culture des expectorations _____ | 83 |
| VI.3.1. Décontamination des expectorations _____ | 83 |
| VI.3.2. Inoculation des culots de décontamination et examen des cultures _____ | 84 |
| VI.3.3. Contrôle de qualité des cultures _____ | 85 |
| VI.4. Considérations éthiques _____ | 86 |
| CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSIONS _____ | 87 |
| Partie1 relative à l'article 4 _____ | 88 |
| Titre : « Comparaison de deux méthodes de décontamination des expectorations pour la culture des mycobactéries au Burkina-Faso : Acide oxalique5% versus NaOH 4% ». _____ | 88 |
| I. Introduction _____ | 90 |
| II. Matériel et Méthodes _____ | 91 |
| II.1. Type d'étude _____ | 91 |
| II.2. Cultures des expectorations et identification des mycobactéries _____ | 91 |
| II.3. Analyse des données _____ | 91 |

| | |
|---|------------|
| III. Résultats | 91 |
| IV. Discussion | 93 |
| V. Conclusion | 93 |
| Partie 2 relative l'article 1 | 94 |
| Titre : « Analyse de l'influence des facteurs pré-analytiques température et durée de conservation des expectorations sur les contaminations de cultures de mycobactéries ». | 94 |
| I. Introduction | 96 |
| II. Matériel et méthodes | 96 |
| III. Résultats | 97 |
| III.1. Caractéristiques de la population d'étude | 97 |
| III.2. Application des recommandations concernant les modes et les durées de conservation des expectorations | 98 |
| III.3. Association de la température et de la durée de conservation des expectorations aux contaminations des cultures | 99 |
| IV. Discussion | 101 |
| V. Conclusion | 104 |
| Partie 3 relative à l'article 2 | 104 |
| Titre : « Effet d'un bain de bouche antiseptique à base de la Chlorhexidine sur les contaminations de cultures des mycobactéries au Burkina Faso ». | 104 |
| I. Introduction | 106 |
| II. Matériel et Méthodes | 107 |
| II.1. Cadre et type d'étude | 107 |
| II.2. Inclusion des patients et collecte des expectorations | 107 |
| II.3. Détermination des taux de contaminations et des scores CFU des cultures positives | 108 |
| II.3.1. Mise en culture et détermination des contaminations | 108 |
| II.3.2. Détermination des scores CFUs de cultures positives | 108 |
| II.4. Caractérisation morphologique des types de contaminants résiduels | 109 |
| II.5. Analyses statistiques | 109 |
| III. Résultats | 110 |
| III.1. Caractéristiques de l'échantillon | 110 |
| III.2. Effet du bain de bouche à base de la chlorhexidine sur les contaminations de cultures | 111 |
| III.3. Effet du bain de bouche à base de la chlorhexidine sur les scores des colonies de mycobactéries | 112 |
| III.4. Caractérisation morphologique et comparaison des fréquences des types de microorganismes contaminants résiduels | 113 |
| IV. Discussion | 116 |
| V. Conclusion | 119 |
| Partie 4 relative à l'article 3 | 120 |
| Titre : « Identification des bactéries sporulant isolées des cultures contaminées de Lowenstein Jensen et efficacité de la Vancomycine à réduire les contaminations de cultures des mycobactéries au Burkina Faso ». | 120 |
| I. Introduction | 122 |
| II. Matériel et Méthodes | 123 |
| II.1. Echantillon | 123 |
| II.2. Subcultures et caractérisation morphologique des isolats | 124 |
| II.3. Identification des bactéries sporulantes | 125 |
| II.3.2. Contrôle de qualité externe des identifications | 126 |

| | |
|--|------------|
| II.4. L'Efficacité des milieux LJ supplémentés de VCNT sur les contaminations de culture des expectorations | 128 |
| II. 5. Tolérance des mycobactéries et susceptibilité des bactéries sporulantes au VCNT | 129 |
| III. Résultats | 130 |
| III.1. La caractérisation morphologique | 130 |
| III.2. Identification des bactéries sporulantes | 133 |
| III.3. L'Efficacité des milieux LJ supplémentés de VCNT sur les contaminations de culture des expectorations | 135 |
| III.4. Tolérance des mycobactéries et susceptibilité des bactéries sporulantes au VCNT | 135 |
| III.4.1. Tolérance des mycobactéries au VCNT | 135 |
| III.4.2. Susceptibilité des bactéries sporulantes au VCNT | 136 |
| IV. Discussion | 140 |
| V. Conclusion | 145 |
| Partie 5 relative à l'article 5 | 146 |
| CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE | 147 |
| CHAPITRE 6 : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 156 |
| | 156 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 157 |
| CHAPITRE 7 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 159 |
| | 159 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 160 |
| CHAPITRE 8 : ANNEXES | 178 |
| ANNEXES | 179 |
| ANNEXE 1 : FICHE DE COLLECTE DES DONNEES 1 | 182 |
| ANNEXE 2 : FICHE DE COLLECTE DES DONNEES 2 | 183 |
| ANNEXE 3 : PROFIL API DE FERMENTATION DES DIFFERENTS GROUPES DE BACTERIES SPORULANTES | 184 |
| ANNEXE 4: CURRICULUM VITAE | 185 |

SIGLES ET ABBREVIATIONS

SIGLES ET ABREVIATIONS

| | |
|---------------|--|
| ADN : | Acide DésoxyriboNucléique |
| ARN : | Acide RiboNucléique |
| ATS | American Thoracic Society |
| BCG : | Bacille de Calmette et Guérin |
| BCP | Bromure de cétylpyridinium |
| CCP | Chlorure de cétylpyridinium |
| CDT : | Centre de Dépistage et de Traitement |
| CRLAT : | Centre Régional de Lutte Antituberculeuse |
| DOTS | Directly Observed Therapy Strategy (DOTS) |
| DYTRAVIHT : | Impact de la coinfection VIH/MTB sur la dynamique de la transmission de la tuberculose |
| FDA : | Food and Drug Administration |
| HAS : | Haute Autorité de Santé |
| IGRA : | IFN-Gamma Release Assays |
| L-J : | Löwenstein- Jensen |
| LPA : | Line Probe Assays |
| MALDITOF-MS : | Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrom |
| MNT : | Mycobacteries non tuberculeuse |
| MTBc : | Complexe mycobacterium tuberculosis |
| NAAT: | Tests d’Amplification des Acides Nucleiques |
| OADC | Oléique acid, bovine albumin, dextrose and catalase. |
| OMS : | Organisation mondiale de la santé |
| ONU : | Organisation des Nations Unies |
| PANTA : | Polymixin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim et Azlocillin |
| PNT: | programme National Tuberculose |
| RR : | Rifampicine Résistant |
| TB-MDR/ RR: | Tuberculose Multi Résistants ou RIF Résistant |
| Tb-UR | Tuberculose Ultra résistante |
| TCB | Tuberculose confirmé Bactériologiquement |
| TDC | Tuberculose diagnostiqué cliniquement |
| VCNT | Vancomycine, Colistine, Nystatine, Trimethoprim |
| VIH : | Virus de l’Immunodéficience Humaine |
| WHO : | World Health Organization |
| ZN : | Ziehl-Neelsen |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Sanatorium de Pineta del Carso (Leão et Portaels, 2007) | 33 |
| Figure 2 : Incidence de la tuberculose dans le monde en 2017(WHO, 2018) Erreur ! Signet non défini. | |
| Figure 3 : Profil épidémiologique de la tuberculose au Burkina Faso (WHO, 2018) Erreur ! Signet non défini. | |
| Figure 4 : Différents scénarios et mécanismes immunitaires sous-jacents de l'infection à M. tuberculosis (Hoffmann et al., 2005) | 40 |
| Figure 5 : Structure du granulome tuberculeux, Adapté de Gil et al. (2010)..... | 41 |
| Figure 6 : Systématique des espèces du genre Mycobacterium..... | 42 |
| Figure 7 : Schéma de l'enveloppe des mycobactéries (Daffé et al. 1998)..... | 43 |
| Figure 8: Classification des microorganismes selon leurs sensibilités aux biocides (McDonnel et Russell, 1999)..... | 48 |
| Figure 9: Aspect des BAAR après coloration de Ziehl-Neelsen (A) et après coloration à l'auramine (B) (PNT, 2016). | 52 |
| Figure 10 : Schéma de réalisation des tests d'hybridation des sondes d'acide nucléiques (Caulfield et al., 2016)..... | 65 |
| Figure 11 : Schéma des sondes hybridées sur bande de nitrocelluloses, test de Genotype MTBC, Hain Liefescience (Caulfield et al., 2016) | 66 |
| Figure 12: MALDI-TOF mass spectrometry operation schematic (Caulfield et al., 2016)..... | 68 |
| Figure 13 : Système Xpert et cartouche du test MTB/RIF pour la détection des MTBc et les mutations associées aux résistances à la RIF (Caulfield et al., 2016)..... | 70 |
| Figure 14 : Réaction à la tuberculine (Singh et Espitia, 2007) | 73 |
| Figure 15 : Carte des sites d'évaluation de l'étude. | 78 |
| Figure 16: Crachoir stérile avec bouchons à vis. | 80 |
| Figure 17: Friocell (Photo KA)..... | 82 |
| Figure 18: Technologiste biomédicale inoculant les milieux de L-J sous un poste de sécurité microbiologique de classe II et portant les équipements de protection Individuelle (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ). | 83 |

| | |
|---|------------------------------------|
| Figure 19: Consommables et petits équipements de laboratoire utilisés dans le processus de mise en culture : (A) Tubes Falcon ; (B) Agitateur de Khan ; (C) Centrifugeuse réfrigérée ; (D) Pipettes pasteur (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ). | 84 |
| Figure 20: Quelques étapes de l'inoculation des milieux de culture (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ). | 85 |
| Figure 21: Contamination des cultures selon de la temperature et de la durée de conservation des expectorations | 101 |
| Figure 22 : Microscope optique Olympus BX53 connecté à son ordinateur (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ). | 109 |
| Figure 23: Flow chart résumant la collecte et le traitement des expectorations. | 111 |
| Figure 24 : Fréquences des contaminants résiduels issues des milieux de L-J contaminés..... | 114 |
| Figure 25 : Bactéries sporulantes au microscope BX 53 (x 1000) (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ). | 115 |
| Figure 26 : Microscope Leica EZ4HD connecté à un ordinateur (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ). | 125 |
| Figure 27 : Profil de fermentation sur API50CH/B d'une souche de Bacillus cereus (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ). | Erreur ! Signet non défini. |
| Figure 28 : Protocole d'identification par la galerie API 50CH/B | Erreur ! Signet non défini. |
| Figure 29 : Protocole d'identification des bacteries contaminants par le MALDI-Tof/MS. | 128 |
| Figure 30 : Cellules et colonies de B. cereus, B. licheniformis et Paenibacillus (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ). | 132 |
| Figure 31 : profils de fermentation des hydrates de carbones par les bactéries sporulantes..... | 133 |
| Figure 32 : Photo de colonies dénombrable sur milieux de L-J supplémentés de VCNT | 136 |
| Figure 33: Susceptibilité des bactéries sporulantes au VCNT à differentes concentrations de vancomycine. | Erreur ! Signet non défini. |
| Figure 34 : Aspects des contaminations sur les milieux de LJ (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ). | 139 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau 1: Estimation du fardeau de la tuberculose dans la sous-région (OMS, Profils pays)..... | 36 |
| Tableau 2: Indicateurs clés extraits des données profils de la tuberculose dans les pays de la sous-région | 37 |
| Tableau 3: Aspect des colonies et caractéristiques biochimiques des espèces du complexe M. tuberculosis (Adapté de De Waard et Robledo, 2007)..... | 45 |
| Tableau 4: Sensibilité des mycobactéries aux désinfectants..... | 47 |
| Tableau 5 : Modalités de réponse standardisée pour la lecture des examens microscopiques | 53 |
| Tableau 6 : Synthèse des études sur les contaminations ou les recouvrements de cultures des mycobactéries entre 2009 à 2019 dans les pays à ressources limitées..... | 63 |
| Tableau 7 : Résultats des cultures selon les différentes méthodes de décontaminations..... | 92 |
| Tableau 8 : Répartition des expectorations selon la température et durée de conservation en fonction des sites de collectes | 99 |
| Tableau 9 : Association de la température et de la durée de conservation des expectorations aux contaminations des cultures | 100 |
| Tableau 10 : Scores des colonies de mycobactéries | 108 |
| Tableau 11 : Effet du bain de bouche à base de la chlorhexidine sur les contaminations de cultures | 112 |
| Tableau 12 : Effect de la chlorhexidine sur le score des colonies de mycobactéries | 113 |
| Tableau 13: Caractères morphologiques des bacteries sporulantes isolées des cultures contaminées de Löwenstein-Jensen | 131 |
| Tableau 14 : Identification des espèces de bactéries sporulantes isolées des cultures contaminées de L-J | 134 |
| Tableau 15: Comparaison des résultats des cultures d'expectorations sur LJ avec ou sans VCNT | 135 |

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

LISTE DES PUBLICATIONS

Kabore A, Hien H, Sanou A, Zingue D, Daneau G, Ganame Z, et al. **Impact of pré-analytical factors on mycobacterium cultures contaminations rates in Burkina Faso**, West Africa. Pan Afr Med J. 2014; 19:39.

Kabore A, Tranchot-Diallo J, Sanou A, Hien H, Daneau G, Gomgnimbou MK et al. **Why Oral antiseptic mouth rinsing before sputum collection cannot reduce contamination rate of mycobacterial culture in Burkina-Faso**. Afri Health Sci. 2019;19(1): 1321-1328. <https://dx.doi.org/10.4314/ahs.v19i1.3>

Kaboré A, Tranchot-Diallo J, Hien H, Zouré O, Zingué D, Sanou A et al. **Identification of spore-forming bacteria isolated from contaminated Lowenstein Jensen media and effectiveness of Vancomycin to reduce Mycobacterial culture contamination in Burkina-Faso**. Scientific Reports 2019 ; 9(1) DOI: 10.1038/s41598-019-43662-0

Kaboré A, Zingué D, Tranchot-Diallo J, Sanou A, Hien H, Nouctara M et al. **Comparison of two decontamination methods for the cultivation of mycobacteria from sputum sample in Burkina Faso: 5% oxalic acid vs 4% NaOH**. Revue Africaine de Biologie clinique (in press).

LISTE DES COMMUNICATIONS

Kabore A, Hien H, Sanou A, Zingue D, Daneau G, Ganame Z, et al. **Impact des facteurs pré-analytiques sur les contaminations de cultures des mycobactéries au cours du diagnostic de la tuberculose pulmonaire au Burkina Faso.** Communication orale (CO117) 17^{ème} journées des sciences de la santé de Bobo (Burkina Faso), 06 Mai- 09 Mai 2014.

Kabore A, Hien H, Sanou A, Diallo-Tranchot J, Zoure O, Gomgnimbou MK et al. **Les bains de bouche à base de la Chlorhexidine avant le recueil des expectorations ne permettent pas la réduction des contaminations de culture des mycobactéries au Burkina-Faso.** Communication affichée p28, 1^{ère} Journées Scientifiques du CERMES, Niamey, Niger, 14-16 novembre 2017.

Kaboré A, Tranchot-Diallo J, Hien H, Zouré O, Zingué D, Sanou A et al. **Phenotypical identification of spore-forming bacteria strains isolated from contaminated Lowenstein Jensen media.** Communication orale, 2^{ème} Forum International de la Biologie en Afrique (FIBAfrica) Dakar (Sénégal), 08 - 10 Mai 2018.

Kaboré A, Tranchot-Diallo J, Hien H, Zouré O, Zingué D, Sanou A et al. **Caractérisation de bactéries sporulant isolées des cultures contaminées de Lowenstein Jensen à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso).** Communication orale, 4^{ème} Journées de Biologie Clinique du Burkina-Faso (JBCB), Ouagadougou (Burkina Faso), 19-20 Juillet 2018.

Kabore A, Zingué D, Tranchot-Diallo J, Sanou A, Hien H, Nouctara M et al. **Comparaison des méthodes de Petroff modifiée et de l'acide oxalique pour la décontamination des expectorations au Centre MURAZ, Bobo-Dioulasso.** Communication orale, 4^{ème} Journées de Biologie Clinique du Burkina-Faso (JBCB), Ouagadougou (Burkina-Faso), 19-20 Juillet 2018.

Kabore A, Tranchot-Diallo J, Hien H, Zingué D, Sanou A Meda N, Sangaré L. **Characterization of Spore-forming bacteria isolated from contaminated Lowenstein Jensen media and effectiveness of vancomycin to Rreduce mycobacterial culture contamination in Burkina-Faso.** Communication affichée P150, 13^{ème} International conference on HIV treatment, Pathogenesis and Prevention Research on Resources-limited settings (Interest), Accra (Ghana), 14-17 Mai 2019.

RESUME

RESUME

La tuberculose (TB) est l'une des dix premières causes de mortalité dans le monde, la première cause de mortalité due à un agent infectieux unique et 1/3 de la population mondiale en est infecté. Elle existe sous plusieurs formes anatomiques et cliniques dont la plus fréquente et la plus contagieuse est la forme pulmonaire qui représente plus de 80% des cas de TB. Malgré l'évolution des méthodes de diagnostic par culture, depuis celle de Petroff en 1915 à nos jours, le diagnostic par la culture des expectorations demeure entravé par des taux élevés de contaminations aux nombreuses conséquences en santé publique particulièrement au Burkina-Faso. Cette technique de diagnostic requiert une étape de décontamination visant à éliminer la flore commensale tout en préservant les mycobactéries. L'efficacité de la décontamination peut être influencée par des facteurs analytiques et pré analytiques qui ont fait l'objet d'études au cours de cette thèse, et dont le but est d'améliorer la qualité du diagnostic afin de contribuer au contrôle de la tuberculose voir à son éradication à terme.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'impact des facteurs température et durée de conservation des expectorations avant leur mise en culture sur la contamination des cultures des mycobactéries. Nous avons montré que la non-application des recommandations concernant ces facteurs contribuait à l'augmentation des contaminations de cultures. C'est principalement la conservation à température ambiante des expectorations, qui est le facteur associé le plus à la contamination, comparativement à la durée de conservation. Il apparaît aussi que même le suivi de ces recommandations ne permet pas d'aboutir à des taux de contaminations proches des seuils acceptables, suggérant ainsi l'implication d'autres facteurs.

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet de la réduction en amont de la charge microbienne buccale (CMB) avant le recueil des expectorations, par l'utilisation d'un bain de bouche antiseptique à base de la Chlorhexidine, sur les contaminations de cultures. Pour cette étude, chaque patient était son propre contrôle et a fourni à la fois les expectorations contrôles et expérimentales. Etonnamment, le taux de contamination de culture du groupe expérimental n'était pas différent de celui du groupe contrôle (39% contre 41%, $p=0,58$). Toutefois, la mise en évidence de bactéries sporulantes, comme étant les contaminants résiduels majeurs au cours de cette étude, a fourni pour la première fois de solides arguments justifiants et permettant une meilleure compréhension de la source de contaminations.

Ensuite, nous avons caractérisé les contaminants résiduels majeurs des cultures afin d'obtenir des informations qui permettront non seulement de mieux comprendre et de connaître l'origine probable des contaminations, mais aussi et surtout de proposer des solutions aux problèmes de contamination des cultures. Les techniques d'identification API 50CH/B et le MALDI-TOF MS utilisées ont montré que ces contaminants appartenaient aux genres *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* et *Lysinibacillus* et comprenaient huit espèces dont les plus importantes étaient *B. cereus* (30%) et *B. licheniformis* (21%). Cette identification a permis de mettre en exergue des similarités avec des isolats identifiés dans d'autres domaines d'étude comme la microbiologie alimentaire. La première était en lien avec les bactéries couramment isolées dans les aliments traditionnels fermentés, suggérant au moins en partie un lien avec l'alimentation. La deuxième l'était avec les bactéries régulièrement incriminées dans les intoxications alimentaires et les infections pulmonaires exhortant à la prudence quant au rôle éventuel d'agents infectieux que joueraient également ces contaminants.

Dans un dernier temps, la mise en évidence de ces contaminants majeurs a permis d'orienter nos recherches sur l'évaluation de l'efficacité d'un milieu sélectif à base de VCNT sur la réduction des contaminations. Cette étude a montré que le milieu sélectif à base de VCNT à 10% de vancomycine pourrait être une méthode alternative et/ou complémentaire permettant de réduire les contaminations de cultures par les bactéries sporulantes en attendant le développement de méthodes plus efficaces axées sur l'élimination de leur talon d'Achille que sont les formes végétatives des bactéries.

En conclusion, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont contribué à une meilleure compréhension de la séculaire problématique des contaminations et ont permis d'améliorer la qualité du diagnostic de la tuberculose pulmonaire par l'utilisation de milieu sélectif de LJ à base de VCNT. Enfin, ces travaux nous obligent à amorcer un changement de paradigme dans la recherche de nouvelles stratégies de décontamination.

Resumé en anglais

CHAPITRE 1: INTRODUCTION GENERALE

I. Contexte et problématique

La tuberculose est une maladie infectieuse, contagieuse, commune à l'homme et aux mammifères, causée par *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) et les mycobactéries apparentées au sein du complexe *M. tuberculosis* (MTBc) (Ghodbane *et al.*, 2013). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près d'un tiers de la population mondiale en est infecté. Elle existe sous plusieurs formes anatomiques et cliniques dont la plus fréquente et la plus contagieuse est la forme pulmonaire qui représente plus de 80% des cas de TB (WHO, 2014). D'après les estimations de l'OMS, 10 millions de personnes auraient contracté la TB en 2017 et 1,6 million de personnes en seraient décédés (WHO, 2018). C'est une maladie grave qui peut être guérie lorsqu'elle est diagnostiquée.

L'ère du diagnostic microbiologique a commencé avec la découverte par Robert Koch en 1882, de la cause microbienne de la tuberculose. Il existe aujourd'hui de nombreux outils de diagnostic de la tuberculose, tous souvent développés pour répondre à des problèmes spécifiques liés au diagnostic. Chaque outil arbore ainsi des avantages et des inconvénients, rendant difficile le diagnostic microbiologique de la tuberculose. Bien que l'examen microscopique soit la méthode de diagnostic la plus simple, la moins coûteuse, la plus répandue et parfois la seule disponible dans les centres de diagnostic, il présente une faible sensibilité, une faible spécificité, et ne fournit pas d'information sur la viabilité ou la résistance des bacilles détectés. La culture est la méthode la plus sensible, qui permet d'isoler les bacilles viables et d'effectuer des tests de sensibilité aux antibiotiques nécessaires pour instaurer un traitement efficace. Mais le faible taux de multiplication des mycobactéries implique une incubation des cultures de plusieurs semaines (2-8 semaines) entraînant une lenteur dans le diagnostic. L'avènement des systèmes automatisés de culture (Middlebrook *et al.*, 1977) ont réduit considérablement le délai de détection de la croissance de *M. tuberculosis* (Rageade *et al.*, 2014), mais la diffusion de ces systèmes dans les laboratoires des Pays à Ressources Limitées (PRL) reste freinée par leurs coûts élevés. Quant aux méthodes moléculaires, bien que très rapides, elles font face à plusieurs inconvénients : un coût élevé, une sensibilité inférieure à celle de la culture et l'incapacité de discriminer entre les bacilles vivants et morts (Drobniewski *et al.*, 2015). En définitive, quel que soit la méthode utilisée, elle est souvent associée à la culture sur milieu solide qui demeure la méthode Gold standard du diagnostic de la TB (Ninet *et al.*, 2011). Cette méthode requiert une étape préalable de fluidification-décontamination pour les

prélèvements poly-microbiens tels que les expectorations. Son efficacité prouvée dans les pays développés connaît deux inconvénients majeurs dans les pays à ressources limitées. En effet, de récentes études ont rapportées des taux élevés de contaminations compris entre 15% et 41%. (**Ethel et al., 2009** , **Muzanye et al., 2009** ; **Ouassa et al., 2011** ; **Peres RL et al., 2011** ; **Kalema et al., 2012** ; **Sharma et al., 2012** ; **Boum et al., 2013** ; **Kassaza et al. 2014** ; **Redy et al., 2014** ; **PNT, 2015** ; **Okumu et al., 2017** ; **Azam et al., 2018** ; **PNT, 2018** ; **Zallet et al., 2018**), par la méthode de culture sur milieu de L-J ou d'Ogawa après différents types de décontaminations (Hydroxyde de sodium :NaOH ou N-acetyl-cystein + NaOH : Nalc-NaOH). D'autres aux contraire ont rapportés des taux de contaminations relativement faibles voir acceptables dans certains cas (2-3% pour les échantillons frais et 5-10% pour les échantillons conservés). Malheureusement, ces faibles taux de contamination n'ont pas été accompagnés d'une amélioration du taux de recouvrement des mycobactéries, mais plutôt d'une augmentation du taux culture faussement négative (microscopie positive avec une culture négative) compris entre 12-70% pour la majeure partie de ces études (**Chatterjee et al., 2013** ; **Gitteh et al., 2016** ; **Diriba et al., 2017** ; **Hiza et al., 2017** ; **Zallet et al., 2018** ; **Affolabi et al., 2018**). Dans ces deux cas de figure, cela se traduit par une insuffisance de recouvrement des mycobactéries, hypothéquant l'efficacité du diagnostic de la tuberculose pulmonaire par la technique de la culture.

Des facteurs pré-analytiques et analytiques peuvent influencer les contaminations des cultures. Ils se définissent comme étant des facteurs déterminants qui influencent un échantillon avant ou pendant son examen au laboratoire.

Pendant longtemps, un des facteurs analytiques majeurs à savoir la méthode de décontamination a été largement étudiée. En effet, depuis la méthode de décontamination de Petroff en 1915, plusieurs dizaines de méthodes de décontamination à base d'hydroxyde de sodium (seul ou en association avec des fluidifiants : N-acetyl-cystein), d'acide, de chlorhexidine, de chlorure de cétypyridinium (CCP) ont été développées (**Kubica et al., 1963** ; **Bioforma , 2003**; **Ferroni et al., 2006** ; **Zingué et al., 2013** ; **Shady et al., 2015**). Mais du fait qu'aucune de ces méthodes ne fasse l'unanimité, l'OMS recommande que chaque laboratoire choisisse la technique qui lui permet d'aboutir à des taux de contaminations acceptables (**Navaiz de Kantor et al., 1998**). De plus, le développement récent de la méthode de décontamination commerciale OMNIgene-Sputum évaluée dans plusieurs études avec des résultats mitigés (**Hiza et al., 2017** ; **Zallet et al., 2018** ; **Affolabi et al., 2018** ; **Azam et al., 2018**), constitue une preuve supplémentaire de la nécessité d'une amélioration des méthodes de décontamination pour les laboratoires des pays à ressources limitées utilisant la culture pour le diagnostic et la surveillance de la tuberculose et de la TB-MDR.

L'intérêt de la recherche sur les facteurs pré-analytiques influençant les contaminations des cultures, remonte aux années 1980. En effet, avec l'avènement du VIH et les résistances aux antituberculeux, la tuberculose qui était une maladie presque oubliée dans les pays industrialisés après le milieu du 20^{ème} siècle, a refait surface et avec elle les difficultés de diagnostic, la persistance des problèmes de contaminations malgré le développement de plusieurs dizaines de méthodes de décontamination. Dans la littérature, nous avons noté l'évaluation de trois pertinents facteurs préanalytiques (**Paramasivan et al., 1983 ; Muzanye et al., 2009 ; Mclain et al., 2011**).

Le premier facteur concerne la conservation (température et durée) des expectorations avant leur traitement. La conservation à température ambiante et les longs délais avant le traitement des expectorations ont été associés dans quelques études aux contaminations des cultures (**Paramasivan et al., 1983 ; Ethel et al., 2009 ; Redy et al., 2014 ; Azam et al., 2018**). Dans l'objectif de réduire ces contaminations, l'OMS et le Programme National de lutte contre la Tuberculose (PNT) recommandent pour les expectorations qui ne peuvent pas être traité immédiatement, une conservation au frais (4°C et 8°C) et un court délai entre le recueil et le traitement des expectorations : 3-4 jours (**OMS, 2015**), une fois par semaine (**Navaiz de kantor et al., 1998**) ou le plutôt possible selon le PNT (**PNT, 2011**). A défaut, il est recommandé d'utiliser un milieu de transport (**Rider, 2007 ; De Waard et Robledo, 2007 ; OMS, 2015**). Au Burkina Faso, trois structures du ministère de la santé, à savoir le Centre National de lutte Antituberculeuse (CNLAT), le Centre Hospitalier Universitaire Sanou Sourro (CHU-SS) et le centre MURAZ pratiquent de manière continue ou intermittente, la culture des mycobactéries sur milieux solides de L-J dans le cadre de la surveillance des résistances aux antituberculeux d'une part, et du diagnostic de la TB chez certain groupes à risque et des programmes de recherche d'autre part. Selon le PNT, des taux de contaminations des cultures de l'ordre de 25% et 32% ont été observés au cours des activités de surveillance de la tuberculose (PNT, 2016 ; PNT, 218). De même, au Centre Muraz, nous avons été confrontés à des taux de contamination de culture de l'ordre de 45%. Ce taux, observé au cours de l'étude sur les résistances primaires et secondaires aux antituberculeux (Etude PNT 2009-2011) n'a pas été publié pour des raisons juridiques. Bien que nous ayons connaissance de la non-application des recommandations concernant les conditions de conservation des expectorations, nous en ignorions le niveau réel et son impact sur les contaminations des cultures.

Le deuxième facteur est la charge microbienne buccale. Dans les années 2009-2012, la réduction de la charge microbienne buccale par l'utilisation de bain de bouche à l'eau ou avec un antiseptique fut évaluée dans quelques études dans le but de réduire les contaminations (**Muzanye et al., 2009 ; Kalema et al., 2012 ; Peres et al., et 2011**). En effet, la concentration en

microorganismes est un facteur d'influence de l'efficacité des désinfectants et des décontaminants (**Prescott, 2003**). Cela est dû au principe d'élimination logarithmique des germes en fonction de la durée d'application des agents désinfectants. Ainsi, une antiseptie de la bouche avant le recueil des expectorations permet une réduction de la charge microbienne buccale et favoriserait le recueil d'expectorations moins contaminées, ce qui aurait pour effet l'amélioration en aval de l'efficacité de la décontamination lors de la phase analytique au laboratoire. Des auteurs comme **Peres et al.** en 2011 et **Kalema et al.** en 2012 ont montré que le recueil des expectorations après le rinçage de la bouche avec un antiseptique permettait une importante réduction des taux de contaminations des cultures (**Peres et al., 2011 ; Kalema et al., 2012**). Du fait que l'hygiène buccodentaire soit insuffisante au Burkina Faso (**Petersen et al., 2006**), évaluer les effets d'un bain de bouche antiseptique avant la collecte des expectorations sur les contaminations de culture s'avérerait dès lors nécessaire.

Le troisième et dernier facteur étudié est la nature des microorganismes contaminants résiduels présents dans les cultures contaminées de L-J. Son évaluation est encore plus récente que les deux précédents facteurs et enregistre également quelques études à notre connaissance, notamment celles réalisées par **McClain et al. (2011)** et **Kassaza et al. (2014)**. En effet, de par leur nature, principalement la structure de leurs parois, les microorganismes ont une sensibilité vis-à-vis des désinfectants et des antiseptiques qui varient (**Prescott, 2003**). Par analogie, la nature des microorganismes présents dans les expectorations peuvent influencer l'efficacité des agents décontaminants. Principalement, la présence de microorganismes tels que les spores, résistants à de nombreux agents de décontamination physiques et chimiques peuvent influencer l'efficacité de la décontamination. La présence des spores a été notée de façon sporadique au début des isolements des mycobactéries par la méthode de Petroff en 1915 (**Keilty et al., 1915**) puis en 1981 par Rothlauf et al., et enfin plus récemment en 2008 et 2011 (**Otu et al., 2008 ; McClain et al., 2011**). La connaissance de la nature des microorganismes contaminants résiduels serait un atout pour mieux comprendre la problématique des contaminations et élaborer ainsi des stratégies efficaces de décontaminations. Malgré l'importance que revêt ce sujet, très peu d'études ont concerné l'identification des contaminants et aucune n'a été réalisée au Burkina Faso.

Dans le but de combler ces lacunes, afin d'améliorer l'efficacité du diagnostic par la culture sur milieu solide de la tuberculose pulmonaire au Burkina Faso, nous avons orienté nos travaux de thèse sur quatre axes majeurs dénommés « parties », incluant : (i) L'évaluation de la méthode de décontamination des expectorations par l'acide oxalique à 5% recommandée pour les échantillons à forte teneur de contaminants, (ii) la détermination du niveau réel d'application des

recommandations concernant la température et la durée de conservation des expectorations ainsi que son impact sur les contaminations de cultures des mycobactéries, (iii) l'évaluation de l'effet des bains de bouche antiseptiques sur les contaminations de cultures des mycobactéries, et (iv) la caractérisation des contaminants résiduels majeurs isolés des cultures contaminées de L-J, ainsi que l'élaboration d'une stratégie efficace pour réduire les contaminations de culture des mycobactéries.

II. Objectifs et organisation de la thèse

II.1. Objectif général

Améliorer la qualité du diagnostic de la tuberculose pulmonaire par la culture dans les pays à ressources limités.

II.2. Objectifs spécifiques

- Evaluer les influences de la température et de la durée de conservation des expectorations avant leur traitement sur les contaminations de cultures des mycobactéries dans la région des Haut-Bassins ;
- Evaluer l'effet d'un bain de bouche à base de chlorhexidine sur les contaminations de cultures des mycobactéries ;
- Caractériser les microorganismes contaminants résiduels majeurs des cultures sur milieu de L-J ;
- Elaborer des nouvelles stratégies pour la réduction des contaminations en cohérence avec les connaissances acquises.

III. Organisation de la thèse

La présentation du travail se fera selon le plan suivant :

- un premier chapitre « **Introduction générale** »,
- un deuxième chapitre « **Revue Bibliographique** » présentant un résumé de l'état des connaissances sur l'historique et l'épidémiologie de la tuberculose, les mycobactéries et le diagnostic de la tuberculose, enfin, le traitement de la prévention,
- un troisième chapitre « **Méthodologie générale** » résumant le matériel et les méthodes utilisés,
- un quatrième chapitre « **Résultats et Discussions** » subdivisé en 4 sections dénommées « Parties ». **Les quatre premières** brièvement décrites ci-dessous représentent chacune un article publié ou accepté pour publication. Elles sont structurées en introduction, matériel et méthodes utilisés, résultats, discussion et conclusion,

- une discussion générale et une conclusion générale suivie de perspectives constituent les chapitres 5 et 6 et enfin, les références bibliographiques et les annexes constituent respectivement les chapitres 7 et 8.

La partie 1, « Evaluation de la méthode de décontamination des expectorations par l'acide oxalique à 5% pour la culture des mycobactéries » compare la méthode de décontamination de Petroff utilisée dans notre laboratoire à celle de l'acide oxalique 5% recommandée pour les échantillons à forte teneur de contaminants.

La partie 2, « Impact des facteurs pré-analytiques température et durée de conservation des échantillons d'expectorations sur les contaminations de cultures des mycobactéries », détermine le niveau réel d'application des recommandations de l'OMS et du PNT concernant ces facteurs, et évalue leurs associations aux contaminations de cultures des mycobactéries.

La partie 3, « Etude de l'effet d'un bain de bouche à base de chlorhexidine avant le recueil des expectoration sur les contaminations de cultures des mycobactéries» compare les taux de contaminations de cultures des expectorations recueillies avant et après utilisation d'un bain de bouche antiseptique à base de la Chlorhexidine et décrit les caractéristiques morphologiques des cellules des populations de microorganismes contaminants résiduels présents dans les culots de décontamination et dans les cultures contaminées de L-J.

La partie 4, « Identification des bactéries sporulantes isolées des cultures contaminées de Lowenstein Jensen et évaluation de l'efficacité d'un milieu sélectif à base de VCNT à 10% de vancomycine sur la réduction des contaminations de cultures des mycobactéries», identifie les bactéries sporulantes isolées des milieux de L-J contaminés, détermine leur susceptibilité au VCNT et teste l'efficacité d'un milieu sélectif à base de VCNT sur les contaminations de culture.

Ce travail apportera des connaissances sur le rôle des facteurs pré-analytiques sur les contaminations de culture des mycobactéries au Burkina Faso. Il permettra d'améliorer la qualité du diagnostic et d'ouvrir d'autres voies dans la recherche de nouvelles méthodes de décontaminations en cohérence avec les connaissances acquises, toute chose qui contribuera à la compréhension de la problématique des contaminations de culture et au contrôle de la tuberculose.

CHAPITRE 2: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Histoire et dates marquantes de la tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse touchant les populations humaines depuis l'antiquité. En effet, l'ancêtre du complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBc) serait apparu il y a 40 000 ans (**Wirth et al., 2008**). La présence exclusive de certaines lignées du MTBc sur le continent africain suggère que le MTBc aurait émergé en Afrique de l'Est, puis aurait co-évolué avec l'homme et se serait répandu dans le monde entier par le biais des migrations humaines en Europe, en Asie et en Afrique continentale. Les populations de mycobactéries tuberculeuses étant inféodées à une zone géographique, elles se sont adaptées à la population locale (**Gutierrez et al., 2005; Djelouadji et al., 2011; Wirth et al., 2008**). Les avancées technologiques dans le domaine de la génétique moléculaire, la réaction en chaîne par polymérase (PCR) ont permis de mettre en évidence des traces d'ADN du MTBc sur des ossements humains datant de la préhistoire ou de l'antiquité (les plus anciens ont 9000 ans) (**Herskovitz et al., 2008**).

La tuberculose a connu plusieurs noms et qualificatifs dans l'histoire et selon les sociétés concernées qui traduisent la perception de cette maladie dans les populations. L'appellation la plus connue est celle utilisée par les Grecs « phtisie » ou peste blanche ou consommation (suite au dépérissement des malades). Les écrits d'Hippocrate (V^{ème} siècle avant J-C) sont les premiers à décrire la symptomatologie et les différentes formes de la tuberculose. Au XV^{ème} siècle Fracastor suggère le caractère héréditaire de la maladie, mais place la phtisie dans les maladies contagieuses. Cette hypothèse a été reprise en 1722 par Marten, puis par Villemin en 1865 qui a montré que la maladie est infectieuse, contagieuse et inoculable (**Dutau et al., 2005**). En 1882 Robert Koch identifie l'agent bactérien responsable de la tuberculose. A la fin du XVIII^{ème} siècle et au début du XIX^{ème} siècle, la tuberculose est la première cause de mortalité en Europe de l'Ouest et en Amérique. La maladie, les conditions de vie insalubres des taudis de banlieues, la promiscuité et la pauvreté accélèrent l'endémie et à cette époque environ une personne sur 4 est atteinte de tuberculose.

Avant l'ère des antituberculeux, plusieurs traitements aux efficacités controversées ont été utilisés. Au nombre de ces traitements il y a : l'air frais, les voyages en mer ou en montagnes, le bain avec l'urine humain, la prise de foie de loup, le sang d'éléphant et surtout le toucher royal (imposition des mains des monarques) débuté au moyen âge en 446 par Clovis (**Daniel et al., 2006**). Les sanatoriums, dont les premiers ont vu le jour à partir des années 1857 et représenté par **la figure**

1 (lieux construits à l'écart des villes où les malades se reposaient et recevaient une bonne alimentation) ont permis d'améliorer l'état des malades par l'hygiène de vie et d'éviter la transmission communautaire de la tuberculose. La fin du XIX^{ème} siècle et le début du XX^{ème} siècle voient se succéder les découvertes à un rythme effréné qui ont favorisées la mise en place de véritables mesures de santé publique. Les principales sont la découverte de la tuberculine par Louis Pasteur en 1907 avec son utilisation dans le diagnostic humain, le développement du vaccin de Bacille de Calmette et Guérin (BCG) contre la tuberculose (souche atténuée *M. bovis*) par Calmette et Guérin en 1921 et le début de la vaccination en 1924. Le traitement efficace de la tuberculose a été rendu possible par la découverte de la streptomycine (S) en 1944. Cette découverte a été suivi par une cascade d'autres découvertes : l'isoniazide (INH) en 1952, l'éthambutol (EMB) en 1960 la pyrazinamide (PZA) en 1980 (Mitchison, 2005). Cette période marqua ainsi une nouvelle ère du traitement de la tuberculose (Papp D, 1954 ; Sakula et Koch, 1983 ; Daniel et al., 2006).



Figure 1 : Sanatorium de Pineta del Carso (Leão et Portaels, 2007)

L'ère du diagnostic microbiologique a commencé par la découverte de Robert Koch qui en utilisant un milieu solide à base de sérum de bœuf coagulé obtient des cultures de mycobactéries. Ces cultures de mauvaises qualités ont été successivement améliorées avec notamment la supplémentation au glycérol à 5% par Nocard et Roux en 1887 et l'introduction en

1902 de la gélose glycinée au jaune d'œuf de Dorset (**Goodman et Moore, 1922**). Du fait de la présence constante des microorganismes contaminants dans les cultures, les bactériologistes s'ingénierent à trouver des solutions. C'est ainsi que Petroff en 1915 préconisa le traitement préalable des expectorations par de l'hydroxyde de sodium et l'inoculation des culots de décontaminations sur le milieu de Dorset permettant ainsi d'obtenir des cultures pures de mycobactéries (**Petroff, 1915**). Cette méthode fut améliorée par Lowenstein en 1931 avec l'incorporation du rouge du Congo et le vert-malachite dans le milieu pour l'inhibition des contaminants (**Lowenstein, 1931 ; Wheeler et al., 1951**). La formule actuelle, mise au point par Jensen en 1932 a une teneur légèrement différente en citrate et en phosphate, ne contient pas de rouge Congo et a une concentration accrue de vert de malachite (**Jensen, 1932 ; Becton Dickinson, 2011**).

II. Épidémiologie de la tuberculose

II.1. Dans le monde

La tuberculose est l'une des 10 premières causes de mortalité dans le monde et la première cause de mortalité due à un agent infectieux unique devant le VIH/SIDA. D'après les estimations de l'OMS, 10 millions de personnes auraient contracté la tuberculose en 2017, soit une incidence globale de 133 cas (120–148) pour 100 000 habitants. Il a été estimé à 1,3 million (1,2 à 1,4 million) le nombre de décès lié à la tuberculose chez les personnes non porteuses d'anticorps anti-VIH et à 300 000 décès supplémentaires (266 000 à 335 000) chez les personnes porteurs d'anticorps anti-VIH (**WHO, 2018**). Aucun pays ni aucune tranche d'âge n'est épargné par la tuberculose, mais globalement 90% était des adolescents et des adultes (âge ≥ 15 ans), 9% était des patients porteurs d'anticorps anti-VIH. Les 30 pays à forte charge de morbidité représentaient 87 % de tous les cas incidents estimés dans le monde. Ces cas sont survenus dans des régions OMS de l'Asie du Sud-Est (44 %), de la région Africaine (25 %) et de la région du Pacifique Occidental (18 %). **La figure 2** présente la variation de l'incidence d'un pays à l'autre. Dans la plupart des pays à revenu élevé, il y avait moins de 10 cas incidents pour 100 000 habitants, et 150 à 400 cas dans la plupart des 30 pays à forte charge de morbidité.

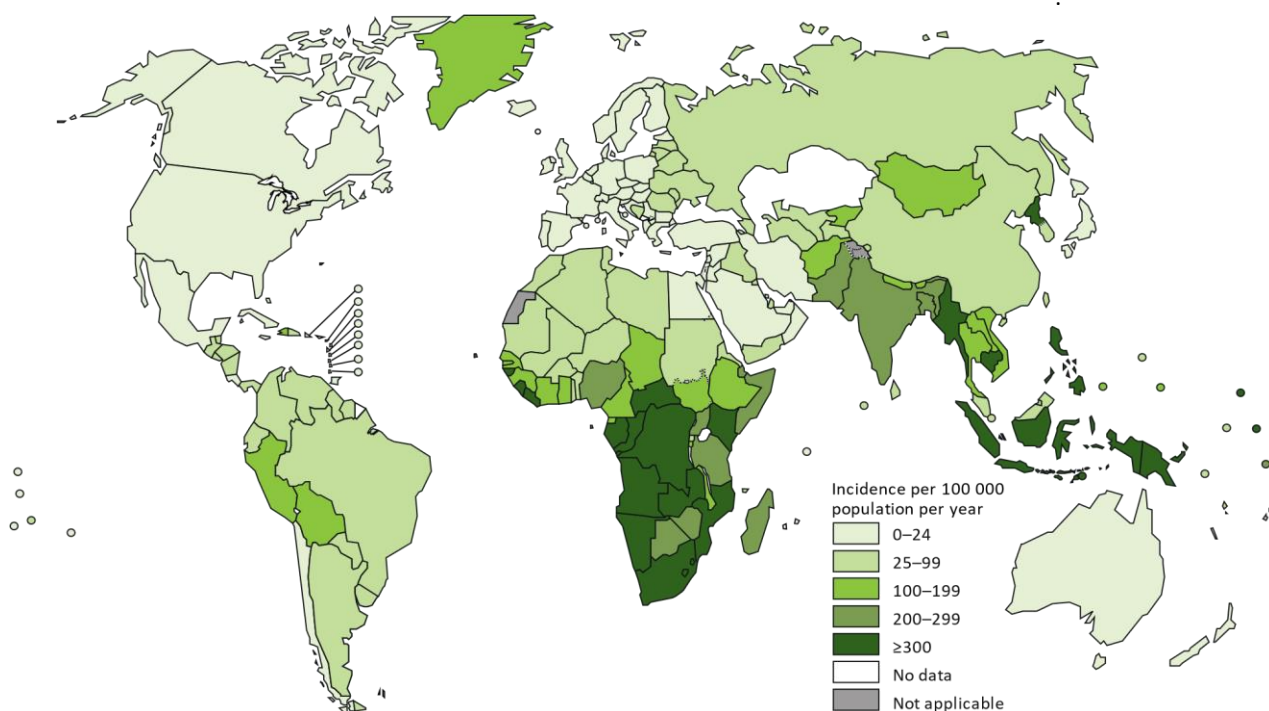


Figure 2 : Incidence de la tuberculose dans le monde en 2017 (WHO, 2018)

La tuberculose pharmacorésistante (TB-MDR/RR) est une menace constante. En 2017, le nombre de cas de TB-MDR/RR a été estimé à 3,5 % (2,5 à 4,7 %) parmi les nouveaux cas et à 18 % (6,3 à 34 %) parmi les cas déjà traités (WHO, 2018). Le nombre de cas incident de TB-MDR/RR a été estimé à 558 000 (483 000 à 639 000). La Chine, l’Inde et la Fédération de Russie regroupent à elles seules 47 % des cas (WHO, 2018).

II.2. Dans la sous région

D’après les estimations de l’OMS, dans la région africaine, 2,5 millions de personnes auraient contracté la tuberculose en 2017, soit une incidence globale de 237 cas (211–263) pour 100 000 habitants. Il a été estimé à 665000 cas le nombre de décès lié à la tuberculose chez les personnes porteuses et non porteuses d’anticorps anti-VIH (WHO, 2018). Les cas notifiés de tuberculose toutes formes confondues étaient de 1323450 personnes. Parmi ces cas 86% connaissait leur statut VIH, 84% était des cas de tuberculoses pulmonaires et 66% parmi les cas de tuberculoses pulmonaires était confirmé bactériologiquement. Le nombre de cas de TB-MDR/RR était de 39000 avec 2,5% qui représentait les nouveaux cas de tuberculose et 14% les cas déjà traités. Seize pays de cette région africaine dont 03 en Afrique de l’Ouest figurent parmi les 30 pays à forte charge de morbidité liée à la tuberculose. Aucun pays de la sous-région (Cote d’Ivoire, Mali, Niger, Bénin, togo Ghana) n’y figure. L’insidence globale de la tuberculose, de la TB-MDR/RR et la mortalité liée à la tuberculose de ces pays sont résumées dans le **tableau 1**. De même, les détails des

indicateurs clés, des profils de la tuberculose et de la TB-MDR/ RR de ces pays (cas estimés, notifiés, confirmés) sont présentés dans le **tableau 2**.

Tableau 1 : Estimation du fardeau de la tuberculose dans la sous-région (OMS, Profils pays)

| Pays (Population en million d'habitants) | Incidence estimée de la tuberculose (pour 100000 habitants) | Incidence estimée de TB-MDR/RR (pour 100000 habitants) | Mortalité (pour 100000 habitants) | |
|--|---|--|-----------------------------------|--------------------|
| | | | Cas de VIH-négatif | Cas de VIH-positif |
| Cote d'ivoire (24) | 148 (95-212) | 8,7 (4,3-15) | 23 (14-35) | 11 (6,8-16) |
| Mali (19) | 55 (36-77) | 1,8 (0,8-3,2) | 8,6 (5,2-13) | 2,1 (1,3-3) |
| Niger (21) | 90 (58-128) | 2,8 (1,2-5,1) | 18 (11-28) | 1,5 (0,96-2,2) |
| Bénin (11) | 58 (37-82) | 0,84 (0,15-2,1) | 10 (6-15) | 3,4 (2,1-4,9) |
| Togo (7,8) | 41(33-49) | 0,82 (0,41-1,3) | 3,6 (2,4-5,1) | 1,5 (1,1-1,2) |
| Ghana (29) | 152 (73-258) | 3,4 (1,4-6,4) | 36 (16-63) | 18 (8,5-31) |
| Burkina Faso (19) | 49 (32-71) | 1,5 (0,82-2, 5) | 8,7 (5,2-13) | 1,6 (1-2,3) |

Tableau 2 : Indicateurs clés extraits des données profils de la tuberculose dans les pays de la sous-région

| Pays (Population en million d'habitants) | Cas estimés de TB N | Cas notifiés de TB N | Statut VIH connu % | TB pulmonaire % | Cas Confirmés % | TB- MDR/RR Estimés* | Cas TB- MDR/RR Notifiés et testés** % | | TB- MDR/RR confirmés N |
|---|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|--|----------------|---------------------------------|
| | | | | | | | Nx cas | Déjà traité | |
| Côte d'Ivoire (24) | 36000 | 21307 | 99 | 80 | 86 | 1100 (4,6 ; 24) | 5 | 94 | 368 |
| Mali (19) | 10000 | 6605 | 65 | 81 | 85 | 180 (2,5 ; 14) | 5 | 76 | 34 |
| Niger (21) | 19000 | 10619 | 76 | 87 | 92 | 280 (2,5 ; 14) | 1 | 93 | 79 |
| Bénin (11) | 6400 | 3662 | 97 | 91 | 91 | 51 (1,2 ; 5,4) | 72 | 98 | 18 |
| Togo (7,8) | 3200 | 2633 | 100 | 89 | 94 | 53 (1,5 ; 9,7) | 13 | 92 | 27 |
| Ghana (29) | 44000 | 14550 | 91 | 92 | 65 | 330 (1,5 ; 17) | 58 | 100 | 209 |
| Burkina Faso (19) | 9500 | 5839 | 92 | 85 | 81 | 170 (2,1 ; 14) | 15 | 64 | 63 |

N= Nombre

Nx= Nouveaux cas

*= TB-MDR/RR estimé parmi les cas de tuberculose pulmonaire notifiés (% chez les nouveaux cas ; % chez les cas déjà traités).

**= % des cas de TB-MDR/RR notifiés et testés parmi les nouveaux cas et les cas déjà traités.

II.3. Au Burkina Faso

Avec 9500 cas estimés de tuberculose, soit une incidence de 49 cas (32-71) pour 100 000 habitants, le Burkina Faso a enregistré 5839 cas de tuberculoses toutes formes confondues au cours de l'année 2017. Selon le PNT, ces cas notifiés variaient d'une région à une autre et les taux les plus élevés ont été enregistrés dans les régions du Sahel, des Hauts-Bassins et du Sud-Ouest (**figure 3**). Parmi ces cas notifiés, 85% était des tuberculoses pulmonaires et 81% était confirmés bactériologiquement (**Tableau 2**). Le nombre de décès a été estimé à 1700 personnes (999 à 2500) parmi les personnes non porteuses d'anticorps anti-VIH, et plus 310 décès supplémentaires (200 à 450) chez les personnes porteuses d'anticorps anti-VIH. Le taux de mortalité, toutes formes confondues était de 10,3 pour 100000 habitants. La tuberculose pharmaco-résistante est une préoccupation avec une estimation de 170 cas (120 à 220) de TB-MDR/RR parmi les cas de tuberculoses pulmonaires notifiés. Les nouveaux cas de TB-MDR/RR représentaient 2,1% des cas de TB et les cas déjà traités 14% avec respectivement 15% et 64% des cas confirmés au laboratoire (**WHO, 2018**).

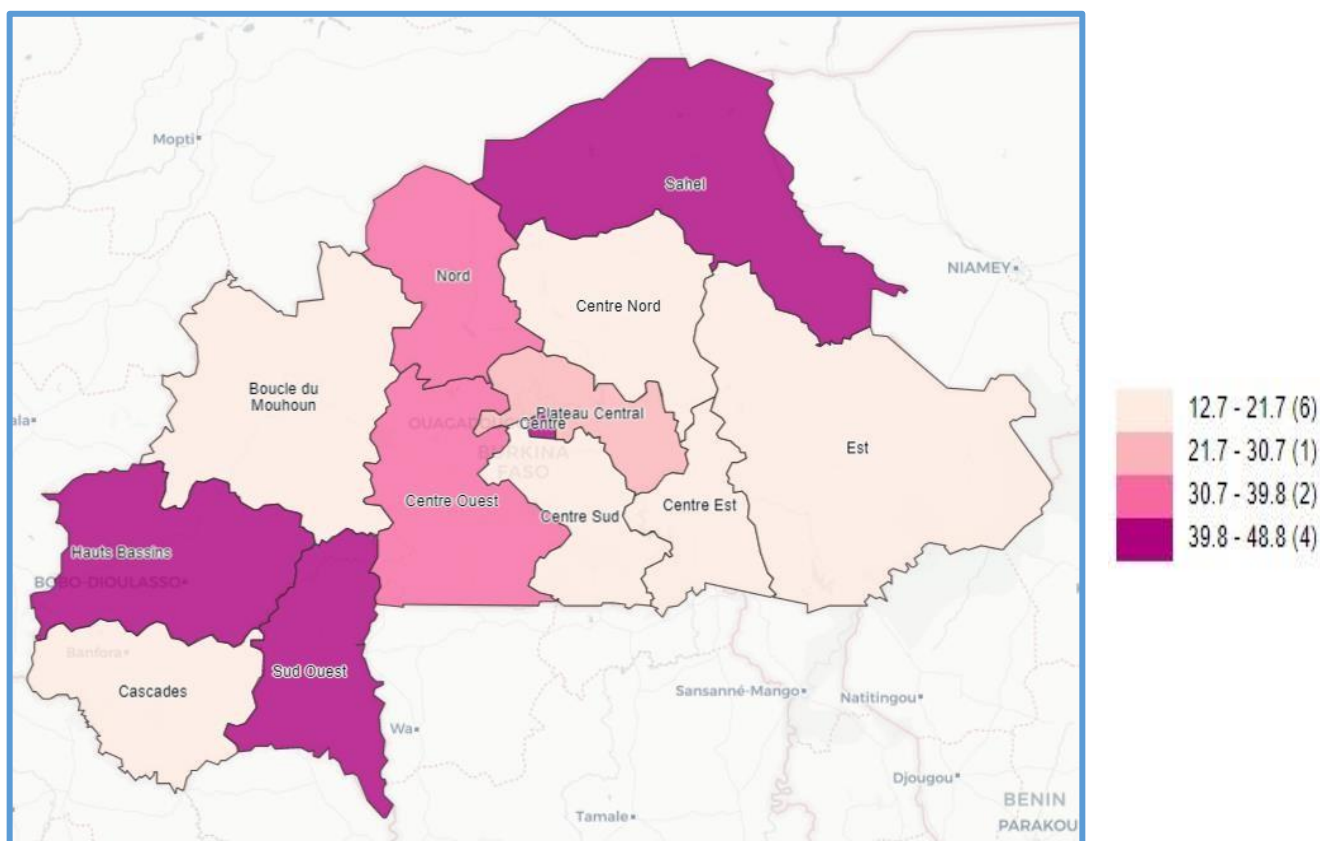


Figure 3: Taux de notification de la tuberculose (nouveaux et rechutes, toutes formes confondues) pour 100 000 habitants au Burkina faso (PNT, 2018)

II.4. Strategies de l’OMS pour lutter contre la tuberculose

Entre 2000 et 2017 l’épidémiologie de la TB a évolué lentement mais positivement avec une incidence mondiale qui a diminué en moyenne de 1,5%. Au cours de cette même période, le traitement de la tuberculose à lui seul a permis d’éviter 45 millions de décès parmi les personnes non porteuses d’anticorps anti-VIH et 9 millions de décès supplémentaires parmi les personnes séropositives sous traitement antirétroviraux (WHO, 2018). Cela est dû à l’impact des différentes stratégies adoptées par l’OMS pour lutter contre la tuberculose. Il s’agit notamment de la Directly Observed Therapy Strategy (DOTS) mise en place en 1995 et renforcée entre 2000 et 2015 par le plan mondial « Halte à la TB ». A partir de 2015, le but de l’OMS a été de mettre un terme à l’épidémie mondiale de la tuberculose avec la stratégie « End TB ». Adoptée par l’Assemblée Mondiale de la Santé en mai 2014 et assortie de cibles liées aux nouveaux objectifs de développement durable, la stratégie propose aux pays des pistes pour réduire le nombre de décès par la tuberculose de 90 % d’ici à 2030 (par rapport au niveau de 2015), réduire le nombre de nouveaux cas de 80 % et faire en sorte qu’aucune famille ne supporte de coûts catastrophiques liés à la TB (WHO, 2018).

III. Modes de transmission et pathogénèse de la tuberculose

La transmission de la TB est interhumaine et aérienne, et l'homme en est le principal réservoir. La contamination d'une personne saine se fait par inhalation d'aérosols contenant des MTBc ou « gouttelettes de Flügge » de taille inférieure à 5µm émises par les patients souffrant d'une TB pulmonaire active, lorsqu'ils toussent, crachent, parlent ou éternuent (**figure 4**). Plus l'examen microscopique du malade est fortement positive plus la transmission est importante. Des transmissions en milieux de soins peuvent aussi avoir lieu lors de la prise en charge des patients ou au cours de manipulations de produits biologiques contenant des BK ou du matériel souillé dans les laboratoires (**Kao et al., 1997 ; Singh, 2009 ; Malangu et Legothoane, 2012 ; Wang et al., 2018**)

Dans la majorité des cas, les bacilles tuberculeux sont arrêtés au niveau des narines et des bronches et bronchioles. Ils sont par la suite entraînés par les mucus vers le pharynx puis déglutis et détruits par l'acidité de l'estomac. Mais dans certain cas, ils sont ingérés par les macrophages, transportés au niveau des alvéoles pulmonaires et les ganglions lymphatiques adjacents ou ils vont se multiplier et être à l'origine de la primo-infection tuberculeuse. C'est à partir de ce point que va se déclencher une cascade de réactions de l'immunité innée puis adaptative aboutissant à la formation de granulomes tuberculeux centre de l'immunopathogénèse de l'infection par MTBc. Il s'agit d'une structure compacte qui se forme autour des macrophages infectés constituée d'un agrégat de macrophages activés et d'autres cellules de l'immunité (lymphocytes, cellules dendritiques, cellules endothéliales) (**Guirado et al., 2013 ; Cambier et al., 2014**) (**Figure 5**). L'ensemble des réactions immunitaires protectrices déclenchées peut restreindre la croissance bactérienne et empêcher chez 90% des personnes infectées, la survenue d'une tuberculose maladie au cours de leur vie. Le MTBc peut cependant survivre plusieurs décennies dans les granulomes. Dans de nombreuses circonstances (Infection à VIH, diabète, cancer, malnutrition, etc...) il peut y avoir une réactivation. Les macrophages infectés du granulome peuvent subir une nécrose, formant un noyau nécrotique susceptible de se ramollir, se rompre, et libérer les mycobactéries dans cette zone nécrotique qui est bien oxygénée et qui constitue un milieu de culture idéal pour soutenir la croissance bactérienne et la transmission à l'hôte (**figure 5**).

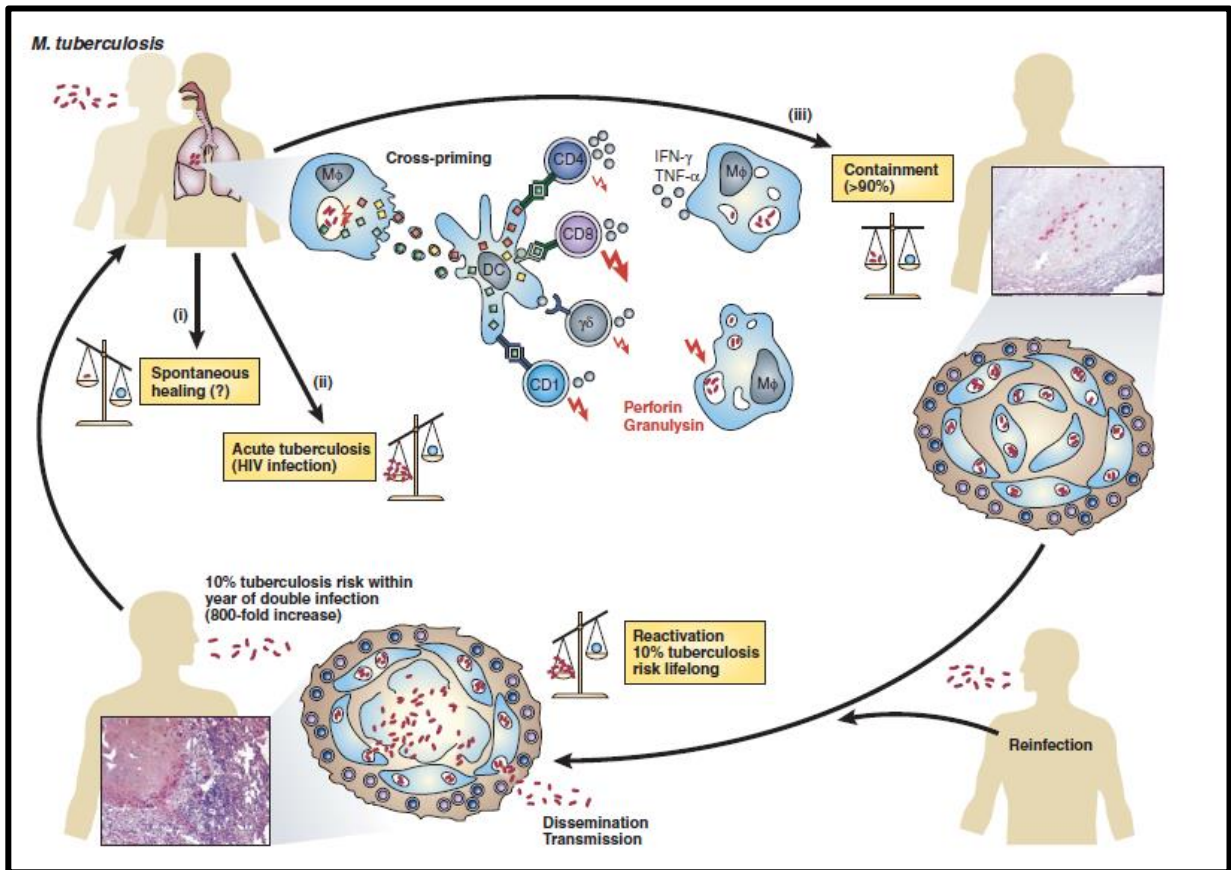


Figure 4 : Différents scénarios et mécanismes immunitaires sous-jacents de l'infection à *M. tuberculosis* (Hoffmann et al., 2005)

M. tuberculosis infecte son hôte par les aérosols provenant de la toux d'un individu présentant une tuberculose active. La bactérie induit ensuite le recrutement de macrophages qui vont la phagocyter et lui permettre d'atteindre les voies aériennes inférieures. Les granulomes se forment ensuite pour confiner les mycobactéries et contrôler leur croissance. Sous certaines conditions, les granulomes peuvent se rompre et libérer les bactéries qui vont pouvoir infecter un nouvel hôte.

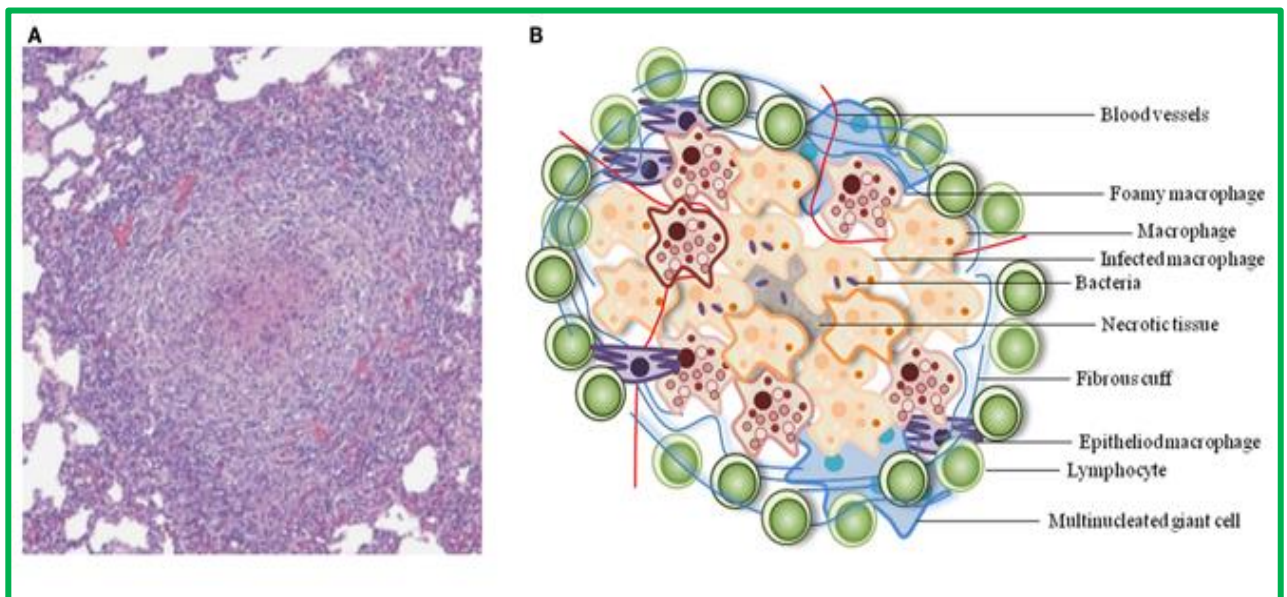


Figure 5 : Structure du granulome tuberculeux, Adapté de Gil et al. (2010).

(A) coupe histologique de granulome avec nécrose central coloré à hematoxylin-eosin.

(B) Schéma représentatif d'un granulome tuberculeux avec les diverses cellules constituantes.

IV. Caractères bactériologiques des mycobactéries

IV.1. Classification

Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des Actinomycétales, sous-ordre des Corynebacterineae et à la famille des Mycobacteriaceae qui ne comprend qu'un seul genre : le genre *Mycobacterium* (Garrity *et al.*, 2004). Ce genre regroupe actuellement plus de 120 espèces différentes (Shinnick et Good, 1994; Tortoli, 2006), classées en :

- **complexe *Mycobacterium tuberculosis*** (MTBc : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium pinnipedii* et *Mycobacterium caprae*) qui regroupe les agents de la TB humaine et animale,
- **mycobactéries non tuberculeuse (MNT)** avec plus de 170 espèces répertoriées et dont certaines comme *M. Avium*, *M. Kansasii* et *M. xenopi* sont fréquemment responsables de Mycobacterioses principalement chez l'immunodéprimé (SIDA),
- et ***Mycobacterium leprae*** (Bacille de Hansen), et ***Mycobacterium ulcerans***, agents responsables respectivement de la lèpre et de l'ulcère de Buruli.

La systématique des espèces du genre *Mycobacterium* est synthétisée sur la **figure 6**.

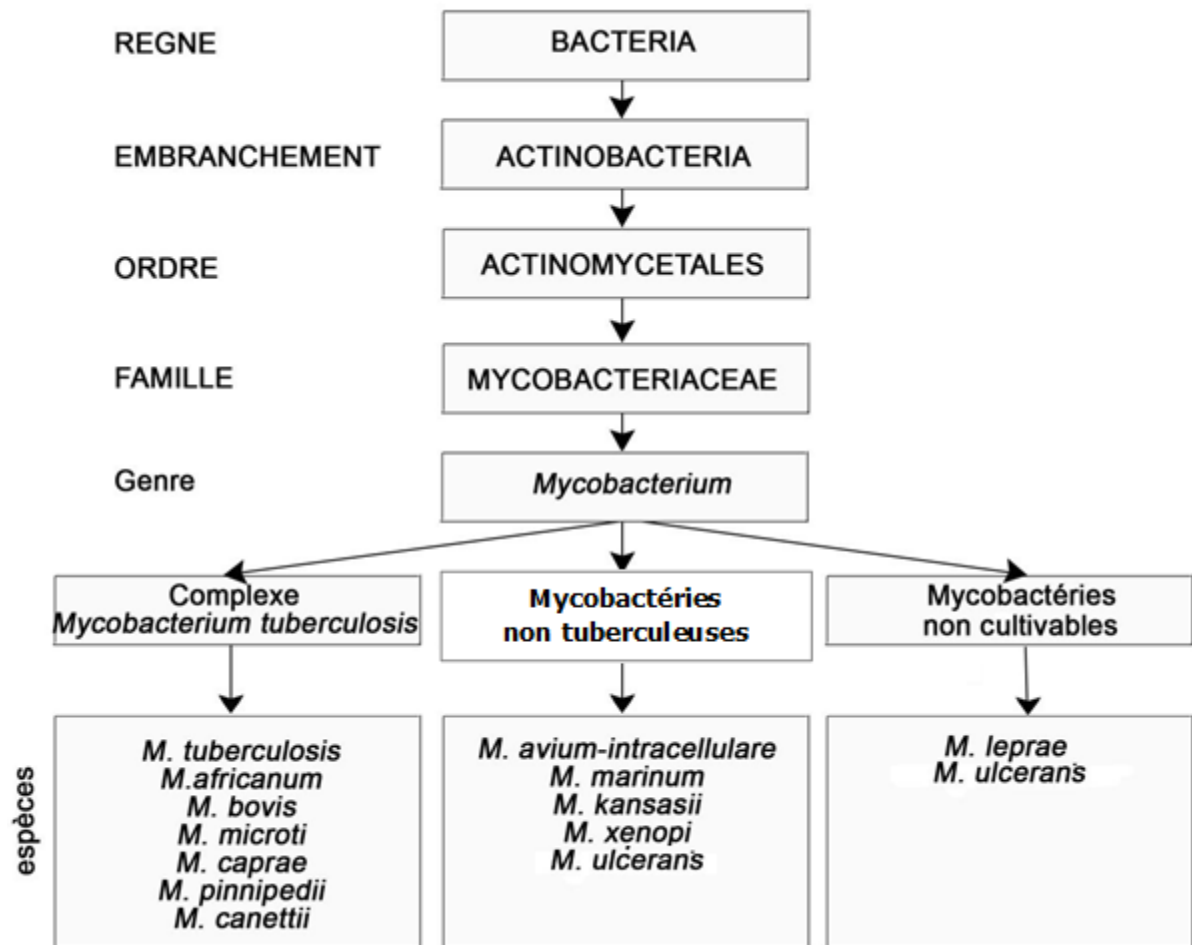


Figure 6 : Systématique des espèces du genre *Mycobacterium* (Adapté de Rotavonirina, 2017)

IV.2. Morphologie et structure

Les bactéries du genre *Mycobacterium* se présentent sous forme de bâtonnets droits ou légèrement incurvés parfois ramifiés, d'environ 0,2- 0,6µm de large et 1,0-10µm de long, non mobiles, aérobies, acido-alcool-résistantes avec une teneur en GC comprise entre 60-72% et ne sporulant pas. La non-sporulation des mycobactéries est admise par la majorité des chercheurs (Traag *et al.*, 2010), mais cette idée est de plus en plus controversée par des scientifiques qui ont montré la capacité de certaines mycobactéries à former des spores au cours de leur état latent (Ghosh *et al.*, 2009 ; Lamont *et al.*, 2012).

Au niveau structurelle, l'enveloppe cellulaire mycobactérienne, représentée schématiquement par la figure 07 a une structure plus complexe que la paroi classique des bactéries Gram positif (Brennan et Nikaido, 1995; Daffe et Drapper, 1998). Elle est constituée de l'intérieur (depuis le cytoplasme) vers l'extérieur, d'une membrane plasmique caractérisée par une bicouche lipidique principalement composée de phospholipides et de protéines, semblable aux

membranes plasmiques d'autres organismes vivants (Daffe, 2008; Kaur et al., 2009) (Figure 07). Un espace périplasmique sépare la membrane plasmique du squelette pariétal, organisé en trois couches superposées.

Une première couche est constituée de peptidoglycane, ensemble d'unités répétées d'acides N-acétylglucosamine et de N-acétyl/glycolyl muramique, liés par des peptides courts. Le peptidoglycane est lié de façon covalente à la deuxième couche, l'arabinogalactane, un complexe d'hétéro-polysaccharides.

La dernière couche est quant à elle composée d'acides mycoliques, acides gras à très longues chaînes α -ramifiés et β -hydroxylés, liés aussi de façon covalente à l'arabinogalactane (figure 07). La surface hydrophobe que constitue la couche d'acides mycoliques permet l'ancrage d'autres lipides, dits extractibles car ils peuvent être récupérés après traitements par des solvants organiques du fait de l'absence de liaisons covalentes. L'ensemble des acides mycoliques et des lipides extractibles forment la membrane externe de la paroi mycobactérienne. Les deux composantes de l'enveloppe sont surmontées d'une structure appelée la capsule (figure 07). Cette structure se compose principalement de polysaccharides (glucanes, arabinanes et arabinomannanes) et de protéines chez *M. tuberculosis* (Daffe et Draper, 1998).

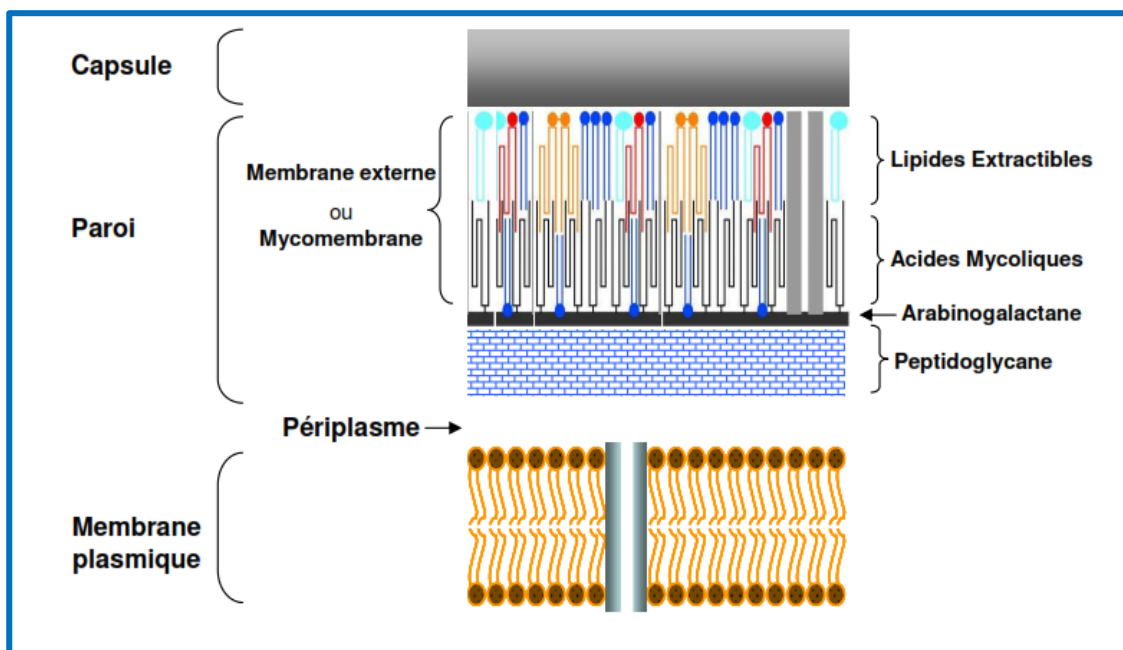


Figure 7 : Schéma de l'enveloppe des mycobactéries (Daffé et al. 1998)

C'est cette enveloppe particulière, très riche en lipides (60%), qui confère à la bactérie une faible perméabilité jusqu'à 100 fois inférieure à celle d'autres espèces (Jarlier et Nikaido, 1990). Cette propriété rend les échanges de nutriments difficiles, ayant pour conséquence une croissance

moins rapide que d'autres espèces. Elle confère également à la bactérie de nombreuses résistances naturelles. Cette propriété serait également à l'origine des difficultés des mécanismes de défenses de l'hôte à altérer les mycobactéries (**Daffe, 2008**).

IV.3. Caractères cultureux

IV.3.1. Conditions de culture

Les mycobactéries présentent un métabolisme strictement aérobies, mais quelques espèces tolèrent de faibles pressions d'oxygène, notamment *M. bovis* et *M. tuberculosis*. Leurs températures optimales de pousse se situent entre 36 et 37°C. Le pH optimal est de 6.7 à 6.8.

IV.3.2. Milieux de culture

Les substrats utilisés comme sources de carbone et d'azote varient considérablement entre les espèces et peuvent servir pour leur identification. La majorité des espèces croit sur des milieux de culture usuels, mais pour certaines mycobactéries d'importance clinique, la culture est améliorée par l'utilisation de milieux à l'œuf (Lowenstein-Jensen et Coletsos), ou de milieu Middlebrook (7H10, 7H11), ainsi que par un enrichissement des milieux (en glycérol pour *M. tuberculosis*, en pyruvate pour *M. Bovis* et *M. Africaum*) (Cf chapitre2, paragraphe V.1.2.1). Les mycobactéries responsables de la lèpre sont cultivées sur tissus vivants (coussinets de souris, peau de tatou) et se multiplient très difficilement sur les milieux synthétiques.

IV.3.3. Caractéristiques des cultures

Les mycobactéries ne poussent pas sur les milieux de cultures ordinaires. Parmi les nombreux milieux de cultures qui ont été proposées, c'est celui de Lowenstein –Jensen qui est couramment employé. Trois critères sont appréciés après inoculation et incubation sur ces milieux de cultures. Ces critères interviennent dans la différenciation des espèces (**Brossard et Terry, 1989**). Il s'agit du délai d'apparition des colonies, de l'aspect des colonies et de la production ou non de pigments. Ce sont ces critères qui sont utilisés dans la classification des mycobacteries par Runyon. Le délai d'apparition des colonies qui permet de subdiviser les mycobactéries en mycobactéries à croissance rapide (moins de 5 jours) et les mycobactéries à croissance lente (pousse en 8-10 jours ou plus). Les bactéries du MTBc sont toutes des mycobactéries à croissance lente avec des temps de génération élevés, de 14 à 15h pour *M. tuberculosis* et environ 20h pour *M. bovis*. Les MNT regroupent des mycobactéries à croissance rapide et à croissance lente avec des temps de génération extrêmes variables, allant de 2 heures pour les bactéries à croissance rapide comme *M.*

smegmatis à 21h. L'aspect des colonies qui prend en compte la consistance, la taille et l'évolution des colonies dans le temps qui permet de distinguer les colonies eugoniques (petites colonies qui s'étalent progressivement pour atteindre 1cm de diamètre) et dysgoniques (colonies de petites tailles quelle que soit la durée de l'incubation). Certaines colonies ne sont jamais pigmentées, il s'agit des souches achromogènes comprenant les bactéries du MTBc. D'autres par contre sont pigmentées en jaunes ou orange, il s'agit des souches chromogènes comprenant une partie des MNT.

IV.4. Caractères biochimiques

Classiquement, les espèces cultivables se différencient entre elles par leurs caractères biochimiques ou leur résistance ou sensibilité à certaines substances. Quatre principaux caractères sont répertoriés. Il s'agit de la présence d'une catalase thermolabile ou thermostable, de la production de niacine, de la présence ou non d'une nitrate réductase et de leur comportement vis à vis des substances comme l'acide para-amino salicylique (PAS), l'hydrazide de l'acide thiophène carboxylique (TCH) et la cyclosérine (**Brossard et Terry, 1989**). Le tableau 3 présente les caractères de différenciation entre les espèces du MTBc. Le principal caractère qui différencie les MTBc et les MNT, est la catalase thermolabile.

Tableau 3: Aspect des colonies et caractéristiques biochimiques des espèces du complexe *M. tuberculosis* (Adapté de De Waard et Robledo, 2007)

| Tests | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis BCG</i> | <i>M. africanum</i> | <i>M. microti</i> | " <i>M. canettii</i> " |
|--|------------------------|-----------------|---------------------|---------------------|-------------------|------------------------|
| Morphologie | rugeux | rugeux | rugeux | rugeux | rugeux | lisse |
| Pyruvate au lieu du glycerol comme source de carbone | - | + | + | - | - | - |
| Pyrazimidase | + | - | - | + | + | + |
| Niacine | + | - | - | +/- | + | - |
| Nitrate réductase | + | - | - | +/- | - | + |
| Uréase | +/- | - | + | +/- | +/- | + |
| Susceptibilité au TCH | R | S | S | S | S | R |
| Besoin en O ₂ | aérophile | micro-aérophile | aérophile | micro aérophile | micro-aérophile | inconnu |

R= resistant, S= susceptible, TCH= Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, + = positive test, - = negative test; +/- = test pouvant être positif ou négatif.

IV.5. Caractères antigéniques

Les acides mycoliques des mycobactéries se caractérisent par de longues chaînes d'atomes de carbone (environ 88) isolées de la fraction lipidique après une saponification prolongée (80 heures). Ils sont porteurs de fonctions oxygénées (groupes méthoxyl et hydroxyl) et constituent le support moléculaire de l'acidoalcoolo résistance (**Butler et Guthertz, 2001**). La connaissance du profil des acides mycoliques mycobactériens peut avoir un intérêt diagnostique. En effet, l'acide tuberculo-stéarique (acide R-10méthyl octadécanoïque) est recherché à partir des crachats par chromatographie gazeuse avec spectrométrie de masse couplée à la surveillance ionique, ou dans le sang par HPLC à partir du sang.

Les glucides présents sous forme de polysaccharides jouent un rôle important dans la formation des anticorps circulants, qui sont dépourvus de rôle immunitaire. Par contre, les glycolipides et les tréhaloses sont utilisés dans la détection des cas de tuberculose. Par exemple, certains antigènes tels la lipoarabinomannan (LAM) ont un rôle diagnostique. C'est un polysaccharide de 19 kDa composant majoritaire de la paroi bactérienne mais qui n'est pas spécifique pour le MTBc (**Lawn et al., 2012 ; Guillet-Caruba et al., 2014**). Cet antigène est détecté dans les urines et les expectorations de patients tuberculeux par ELISA (antigène capture ELISA).

Les protéines, mal connues, sont le support de l'activité de la tuberculine ou PPD (purified protein derivative). L'antigène MPT64 est une des protéines majeures sécrétée par les MTBc et incriminée dans leur virulence (**Kumar et Srinivasa, 2015**). Il est utilisé dans le développement des tests MPT64 TB antigène (SD Bioline Kit, Standard Diagnostics, Inc., SouthKorea). Deux nouvelles protéines "early secretory antigenic target 6" (ESAT-6) et "culture filtrate protein 10" (CFP-10) ont été découvertes. Compte tenu de l'importance de leurs propriétés antigéniques, elles sont utilisées dans le développement des tests Quantiferon-TB[®]-TB Gold In-Tube (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australie) et du T-SPOT-TB[®] (Oxford Immunotec, Oxford, R.U.). Toutefois, elles ne sont pas spécifiques de *M. tuberculosis* (**Blanc et al., 2007; Okamba et al., 2008 ; Ninet et al., 2011**).

IV.6. Propriétés physico-chimiques

Bien que les bacilles tuberculeux ne soient pas des bactéries qui sporulent, ils ont une capacité remarquable à survivre dans les conditions défavorables. Les bacilles tuberculeux résistent à de nombreux désinfectants (**tableau 4**). Selon **Russell et al. en 1999**, ils sont plus résistants aux biocides que la majorité des microorganismes mais moins résistants cependant que les spores et le prion (**figure 08**) (**McDonnel et Russell, 1999**). Ils résistent aussi aux antibiotiques hydrophiles, et

peuvent survivre dans de microenvironnement alcalin ou acide comme à l'intérieur des macrophages (Armstrong et Hart, 1975 ; Armstrong et Hart, 1971).

Tableau 4: Spectre d'activité des principales familles de désinfectants

| Familles | Spectre d'activité | | | | | | | |
|---|--------------------------------------|-----------|---------------|---------|-------------|-----------|------------------|--------|
| | GRAM + | GRAM - | Mycobactéries | Levures | Moisissures | Virus nus | Virus enveloppés | Spores |
| Halogénés chlorés (eau de Javel) | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Aldéhydes (glutaraldéhyde...) | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Oxydants (acide peracétique) | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Biguanides | + | + | +/- | + | +/- | +/- | + | - |
| Alcools | + | + | + | +/- | +/- | +/- | + | - |
| Phénols | Activité variable selon les composés | | | | | | | - |
| Tensio-actifs ammoniums quaternaires | + | +/- | - | + | + | +/- | + | - |

Légende :
 + Produits actifs
 +/- Produits inconstamment actifs
 - Produits inactifs

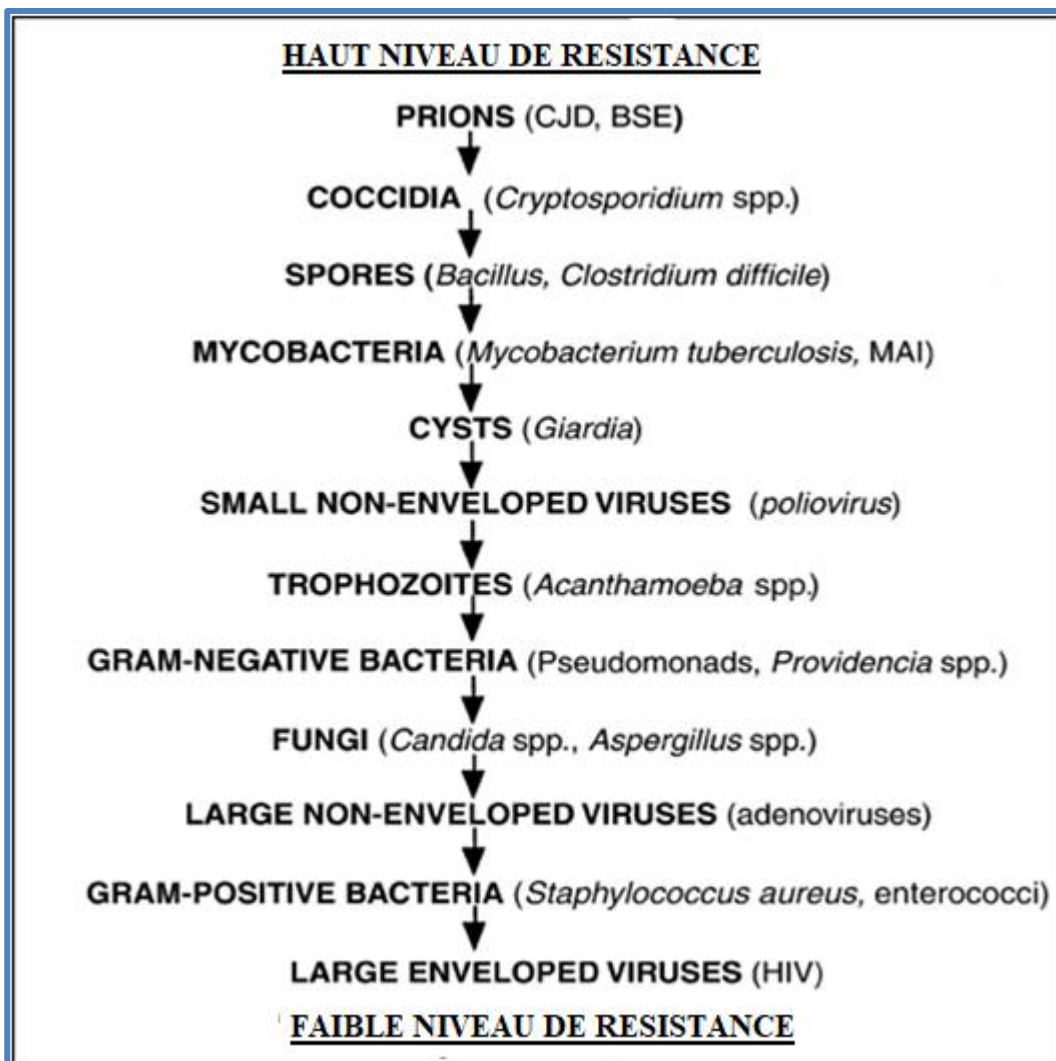


Figure 8: Classification des microorganismes selon leurs sensibilités aux biocides (McDonnel et Russell, 1999).

L'imperméabilité naturelle des mycobactéries aux agents antimicrobiens hydrophiles courants conférée par la nature hydrophobe de sa paroi est exploitée dans le laboratoire de mycobactériologie clinique. Quatre exemples peuvent être cités :

- l'utilisation du bromure de cétylpyridium comme agents de conservation des expectorations supposés contenir des mycobactéries et dont le traitement est différé,
- l'utilisation de certains antibiotiques à large spectre pour rendre selectif les milieux de culture destinés à isoler les mycobactéries,
- l'utilisation de solutions diluées d'acides, de base et autres biocides pour décontaminer les expectorations lors du processus de la culture,
- et enfin l'exemple le plus emblématique, la résistance à la décoloration par l'alcool-acide exploité dans le principe de coloration de Ziehl Nelsen pour la mise en évidence des mycobactéries.

De plus, *M. tuberculosis* tolère des conditions microaérophiles. Les bacilles peuvent survivre pendant de nombreuses années dans cet état, mais ont besoin d'une concentration minimale d'oxygène pour induire le changement dans un métabolisme fermentatif (**Wayne et Lin, 1982 ; Wayne et al., 1984**)

Concernant les agents physiques, les mycobactéries résistent aux températures très basses. Leur viabilité peut être de plus en plus préservée à long terme entre 2-4°C et -70°C (**Kim et Kubica, 1972 ; Kim et Kubica, 1973**). D'autre part, les bacilles sont très sensibles à la chaleur, à la lumière du soleil et à l'irradiation ultraviolette (UV). Dans les expectorations ou en suspension aqueuse, ils perdent progressivement leur viabilité entre 30 et 37 °C en une semaine (**Kubica et Kim, 1979**). Exposé à l'irradiation directe par UV, des charges modérées de bacilles tuberculeux meurent en quelques minutes (**Huber et al., 1970 ; Collins, 1971**).

V. Diagnostic au laboratoire de la tuberculose

Depuis la découverte du bacille de la tuberculose, les méthodes de diagnostic de la tuberculose ont évoluées de la microscopie et la culture sur milieu solide jusqu'à l'avènement de méthodes moléculaires en passant par l'automatisation des cultures. Cette évolution a été motivée principalement par les insuffisances de performances, la lenteur du diagnostic et les couts élevés des méthodes de diagnostic. Pour des raisons épidémiologiques, sanitaires (isolement du malade pour éviter la transmission) et thérapeutiques (mise en place d'une antibiothérapie adéquate), la mise en évidence des MTBc responsables de tuberculose s'accompagne de leur différenciation avec les autres mycobactéries, de l'identification précise de l'espèce du MTBc en cause ainsi que des éventuelles résistances aux antituberculeux. Il existe deux grands groupes de diagnostic que nous développerons dans les pages ci-dessous : Il s'agit du diagnostic direct qui met en évidence les mycobactéries elles-mêmes, ou une partie de celles-ci (antigènes ou fragment d'ADN) et le diagnostic indirect qui met en évidence la réponse immunitaire suite à un contact avec une mycobactérie du MTBc.

V.1. Diagnostic direct

Le diagnostic direct met en évidence soit les mycobactéries par des moyens microbiologiques (Observation microscopique après coloration, culture ou isolement) soit des antigènes ou des fragments d'ADN par des méthodes antigéniques ou moléculaires à partir d'échantillons ou de cultures.

V.1.1. Prélèvement des échantillons

Les prélèvements doivent être réalisés avant le début du traitement par les antituberculeux. Etant donné qu'environ 80% des cas de tuberculose sont des cas de tuberculose pulmonaires, les prélèvements sont souvent des sécrétions respiratoires (expectorations, expectorations induites, aspirations broncho-pulmonaires). Mais en cas de formes extra-pulmonaires pures ou associées à la forme pulmonaire, des prélèvements extra-pulmonaires (liquide de ponction, hémoculture, selles, urines, tissus, abcès...) peuvent aussi être réalisés (**Cambau et Herrmann, 2015**).

Des flacons stériles à usage unique et à fermeture hermétique (cap avis) doivent être utilisés pour le recueil des prélèvements. Pour produire un échantillon de bonne qualité, les patients doivent recevoir des instructions sur la façon de produire un crachat provenant des poumons ou des bronches (**OMS, 2007**). Les expectorations doivent provenir des bronches après une grande inspiration et une toux. Des aérosols renfermant *M. tuberculosis* peuvent se former lorsque le patient tousse pour produire l'échantillon d'expectoration. Les patients doivent donc produire les expectorations à l'extérieur à l'air libre, ou à distance des autres personnes présentes. La collecte des expectorations ne doit pas être effectuée dans des espaces confinés tels qu'une pièce du laboratoire, ni dans les toilettes (**OMS, 1998 ; OMS, 2009**).

V.1.2. Conservation des expectorations

Il y a plusieurs recommandations aux nuances plus ou moins prononcées, mais tous s'accordent déjà sur le fait que les prélèvements doivent être acheminés rapidement au laboratoire (moins de 2h) afin d'éviter la multiplication des bactéries commensales (**OMS, 1998 ; Rieder, 2007 ; OMS, 2009 ; Cambau et Herrmann, 2015**). Mais cela n'est pas toujours possible et des délais existent entre le recueil de l'échantillon et son traitement (**Rieder, 2007 ; Cambau et Herrmann, 2015 ;**). Selon le REMIC 2015, en cas de délai supplémentaire, le prélèvement sera conservé et ou transporté au laboratoire 24 à 48h à une température comprise entre +2°C et +8°C. (**Cambau et Herrmann, 2015**). Selon l'OMS dans « les lignes directrices relatives à la surveillance de la pharmacorésistance », les expectorations doivent être conservés au frais, de préférence dans un réfrigérateur à +4°C avant d'être transportés dans les LNR ou les laboratoires qui réalisent les

cultures dans un délai de 3-4 jours (OMS, 2015). Les délais de conservations ne sont pas précisés dans la version de 2009 (OMS, 2009). S'il est probable que les échantillons soient exposés à la température ambiante pendant des périodes prolongées entre leur recueil et leur traitement au laboratoire de culture, du bromure de cétylpyridinium (BCP) à 0,6 % ou du chlorure de cétylpyridinium (CCP) à 1 % doivent être utilisés pour prévenir les contaminations (OMS, 2009 ; OMS, 2015). Il faut noter que le BCP et le CCP sont strictement interdits dans les milieux liquides. En revanche dans son document « laboratory service in tuberculosis control » publié en 1998, l'OMS recommande que si les expectorations sont réfrigérées, alors ceux-ci peuvent être envoyés une fois par semaine dans les LNRs. Des conservateurs doivent cependant être utilisés si le transfert se fait à température ambiante (Narvaiz de Kantor et al., 1998). Quant à l'Union internationale contre la tuberculose et les maladies pulmonaires (l'Union), l'échantillon prélevé devrait être conservé dans un local aussi frais que possible et l'intervalle entre la collecte de l'échantillon et son traitement au laboratoire de référence ne devrait pas dépasser trois jours. Si 90% des prélèvements sont transférés dans des délais n'excédant pas 3 jours, l'utilisation de milieu de conservation n'est pas nécessaire. Par contre si le délai de conservation ou de transport de plus de 10% des prélèvements excède 3 jours, des milieux de conservation comme le CCP ou le BCP doivent être utilisés (Rider, 2007).

V.1.3. Transport des expectorations

En règle générale, les prélèvements doivent être emballés de manière à résister aux fuites, aux chocs, aux changements de pression et à d'autres conditions liées aux pratiques de manutention courantes. Des récipients rigides doivent être utilisés pour éviter qu'ils se cassent pendant le transport et ils doivent être munis d'un bouchon vissé étanche à col large pour éviter toute fuite ou contamination. Les récipients doivent être enveloppés dans du papier absorbant (ou matériau absorbant) qui absorbera toute fuite accidentelle. Les formulaires utilisés localement par les laboratoires pour accompagner les échantillons d'expectorations lors de l'expédition doivent être utilisés (OMS, 1998).

V.1.4. Examen microbiologique

V.1.4.1. Examen microscopique

Depuis plus de 125 ans, l'examen microscopique des prélèvements biologiques est la méthode de laboratoire la plus accessible pour détecter la présence des mycobactéries. Il est très utile pour identifier les cas de tuberculose les plus contagieuses (tuberculose pulmonaire bacillifère) et pour monitorer les patients sous traitement antituberculeux (small et al., 2010). Son principe repose sur les propriétés pariétales des mycobactéries riches en lipides, qui retiennent certains colorants (fuchsine, auramine) et qui résistent à la décoloration par l'alcool et l'acide (propriété d'acido-

alcoolo-résistance des mycobactéries). Plusieurs techniques de coloration existent, mais les plus utilisées sont la coloration à la fuchsine phéniquée de Ziehl-Neelsen et celle à l'auramine (Shoub, 1923).

Examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen

Il consiste à la réalisation d'un frottis (homogène et moyennement épais) du prélèvement biologique (habituellement les expectorations) sur une lame. Le frottis est ensuite séché, fixé puis coloré par une solution de fuchsine basique phéniquée. Cette étape de coloration peut se faire à froid ou à chaud. Après une décoloration avec un mélange d'acide-alcool, la lame est rincée puis contre-colorée par une solution aqueuse de bleu de méthylène. Enfin, elle est séchée et lue au microscope à l'objectif x1000. Les BAAR apparaissent en bâtonnets rouges sur un fond bleu clair (figure 9A). Deux prélèvements sont nécessaires pour l'examen, et le résultat est rendu selon les critères décrits sur le **tableau 5 (PNT, 2016)**. C'est cette technique qui est utilisée au Centre Muraz.

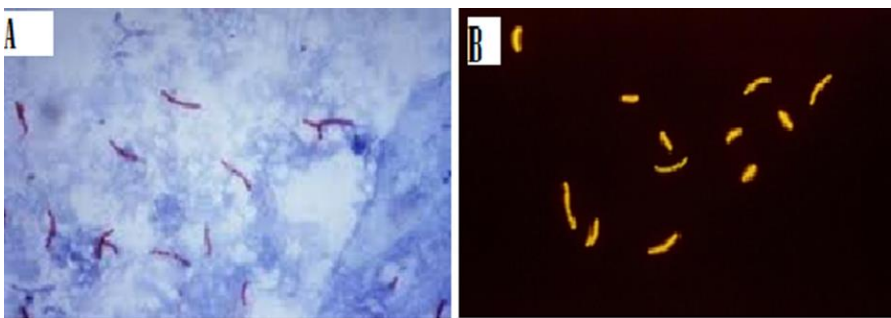


Figure 9: Aspect des BAAR après coloration de Ziehl-Neelsen (A) et après coloration à l'auramine (B) (PNT, 2016).

Tableau 5 : Modalités de réponse standardisée pour la lecture des examens microscopiques

| Nombre de BAAR compté | Résultats | Interprétation |
|---|---------------------------------|--------------------|
| 0 BAAR/ 100 champs | Négatif | Frottis négatif |
| 1-9 BAAR/ 100 champs | 1-9 (noter le chiffre exact) | Rares BAAR |
| 10-99 BAAR/ 100 champs | + | Frottis positif |
| 1-10 BAAR/ champ, dans au moins 50 champs | ++ | Frottis riche |
| >10 BAAR/ champ, dans au moins 20 champs | +++ | Frottis très riche |

BAAR= Bacille Acido-alcool Résistant

Examen microscopique après coloration à l'auramine

Le principe de cette coloration est le même que pour celle de ZN. Il consiste à colorer les frottis par une solution d'auramine O phéniqué, à les décolorer par un mélange alcool-acide et à les contre colorer par une solution de rouge thiazine. Les lames des frottis, rincées, séchées et recouvertes de lamelles sont observées à l'aide d'un microscope muni d'un dispositif à fluorescence, à l'objectif x 25. Les mycobactéries apparaissent en bacilles fluorescents jaune-vert sur un fond rouge (**figure 9 B**). La microscopie à fluorescence permet d'examiner environ 5 fois plus de lames que la microscopie à lumière transmise, dans le même temps et avec une sensibilité égale ou supérieure (**Kommareddi et al., 1984**). Son utilisation est efficace dans le cas des centres recevant un nombre de prélèvement quotidien supérieur à 15 (**PNT, 2016 ; Cambau et Herrmann, 2015**). La variante LED (Light Emitting Diode) est beaucoup plus avantageuse que le microscope à fluorescence classique : elle s'adapte à certains microscopes ordinaires et sa lampe a une durée de vie plus longue (**PNT, 2016**).

Le seul inconvénient de la fluorescence est qu'elle décroît et disparaît avec le temps et donc la lecture doit être faite dans les 24 heures ou alors conserver les lames à l'obscurité.

Quel que soit le type de coloration, l'examen microscopique à l'avantage d'être simple, rapide, moins coûteux, facile à réaliser (**Guillet-Caruba et al., 2014 ; Caulfield et al., 2016**). Il est souvent la seule méthode disponible dans les PRLs (**De Waard et Robledo, 2007**). Cependant, il présente plusieurs inconvénients dont un seuil de détection faible (seuil de l'ordre de 10^4 BAAR/ml

d'échantillon). En fonction du type de prélèvement sa sensibilité peut varier (10-20% pour les prélèvements extra pulmonaires et 65% pour les pulmonaires) (**Guillet-Caruba et al., 2014**). Il est aussi souvent négatif chez les enfants et les patients infectés par le VIH. Ainsi, un examen microscopique négatif n'élimine pas un diagnostic de tuberculose. De même il ne prédit pas une guérison dans le cadre d'un suivi du traitement antituberculeux (**Horne et al., 2010**), n'est pas spécifique de MTBc et donc ne permet pas de différencier les mycobactéries responsables de la tuberculose et celles responsables de mycobactériose. Par ailleurs, il ne renseigne pas sur le caractère vivant ou mort des bacilles, l'examen microscopique positif n'est pas un bon marqueur d'échec thérapeutique ou de rechute tuberculeuse (**Horne et al., 2010 ; Fitzwater et al., 2010**). Ces limites de la microscopie sont à la base de la réalisation concomitante de la culture afin d'améliorer le diagnostic, identifier les MTBc et tester la sensibilité aux antituberculeux.

V.1.4.2. Mise en culture des expectorations

- La décontamination

Une étape de décontamination est nécessaire lorsque les prélèvements biologiques à cultiver sont non stériles comme dans le cas des expectorations, afin d'éliminer la flore associée et permettre l'isolement des mycobactéries. Plusieurs méthodes de décontamination ont été développées. Les plus couramment utilisés sont celles à l'hydroxyde de sodium (NaOH) à différentes concentrations, au N-acetyl-cysteine-sodium-hydroxyde ou sodium chlorure (Nalc-NaOH ou NaCL), au cetylpyridinium chloride-sodium chloride (CPC-NaCl), à l'acide oxalique à 5% et celle d'Ogawa-Kudoh (**De Waard et Robledo, 2007**).

Pour les quatre premières méthodes, après une incubation des échantillons avec la solution de décontamination pendant un temps approprié (en général 15-30 minutes), le mélange est neutralisé à l'aide d'un tampon phosphate puis décanté par centrifugation, et les culots de centrifugation sont utilisés pour l'inoculation des milieux de culture. Pour le cas spécifique de la méthode de Petroff, le tampon de neutralisation peut être remplacé par des lavages répétés avec de l'eau distillée stérile suivie de centrifugation (**Rieder et al., 2007**). En terme de simplicité ces méthodes sont comparables, mais le NaOH à 4% est réputé être létal pour les mycobactéries (**Narvaiz de Kantor et al., 1998 ; Rieder et al., 2007**), le Nalc-NaOH a l'inconvénient d'être cher, et est rarement utilisé en routine dans les pays à ressources limités par rapport au NaOH (**De Waard Robledo, 2007**), quant à l'acide oxalique, son utilisation est restreinte aux prélèvements fortement contaminés, après

une première décontamination par le NaOH (**Bange et al., 1999**). Pour la méthode d'Ogawa-Kudoh, les échantillons sont imbibés dans du coton-tige, décontaminé par trempage pendant 2 minutes dans une solution de NaOH à 4% et inoculer directement sur le milieu d'Ogawa (pH6.4). Elle a l'avantage d'être simple mais ne s'utilise que sur le milieu solide et peut engendrer des taux élevés de contaminations (**Kudoh 1974 ; De Waard and Robledo, 2007**). Récemment, OMNIgene SPUTUM un nouveau kit de **transport/décontamination** a été mis sur le marché. Il consiste à incuber (entre 30 minutes et 8 jours) un mélange à volume égale du réactif OMNIgene et le spécimen à décontaminer, de le décanter par centrifugation puis d'inoculer les milieux de culture. Avec un coût unitaire de 2,84 dollars USD le test. Il permettrait une réduction des contaminations, une bonne préservation des mycobactéries pendant au moins 8 jours ainsi que le transport des spécimens à température ambiante, s'affranchissant ainsi d'un maintien de la chaîne de froid lors des transferts. Ses performances seraient comparables à celles du Nalc-NaOH (**Kelly-Cirino et al., 2017 ; Maharjan et al., 2016 ; Asandem et al., 2018**), mais il inhiberait la pousse des mycobactéries dans les milieux MGIT et pourrait ne pas être compatible pour ce système. Il rallongerait également le délai de détection des mycobactéries (**Azam et al., 2018 ; Asandem et al., 2018**). Cependant, pour d'autres auteurs OMNIgene est moins performant que le Nalc-NaOH, et augmenterait au contraire les taux de contamination (**Zallet et al., 2018**). Déjà en 1998, l'OMS recommandait que chaque laboratoire utilise la méthode de décontamination qui lui permette d'obtenir des seuils acceptables de contamination de culture (**Narvaiz de Kantor et al., 1998**). Aujourd'hui encore avec les données sur les nouvelles méthodes de décontamination, notamment OMNIgene-SPUTUM, qui nécessite des optimisations et des évaluations supplémentaires sur le terrain (**Azam et al., 2018**), il y a pas de preuves suffisantes à ce que cette recommandation soit revue.

- **Culture sur milieux solides**

Le diagnostic définitif de la tuberculose active est basé sur la culture, considérée comme le test de référence. Elle permet par l'isolement des souches l'identification des espèces de mycobactéries et la réalisation des tests de sensibilités aux antituberculeux afin d'initier une thérapie efficace (**Guillet-Caruba et al., 2014**). Au Burkina Faso, les indications de la culture dans le cadre du PNT sont les patients présumés TB-MR (patients en échecs de traitement, rechutes, contrôles positifs M3 1ere ligne, contacts de TB-MR, patients traités après avoir été perdus de vue) pour confirmer la résistance de *M. tuberculosis* ; les enfants et les cas de tuberculoses extrapulmonaires pour confirmer le diagnostic de tuberculose (**PNT, 2016**). La culture est utilisée également dans le cadre de la recherche.

Les milieux de cultures : La culture est traditionnellement réalisée sur le milieu solide de Löwenstein- Jensen (LJ). Ce milieu est composé d'acides aminés, de sels minéraux, de fécule de pomme de terre, de glycérine, œufs entier et d'un antiseptique, le vert de malachite pour éliminer la

flore associée. Certaines mycobactéries comme *M. Bovis*, *M. Microti* et *Africanum* dont la chaîne respiratoire est déficiente en enzymes fonctionnels (Glycérol kinase, pyruvate kinase) pour le métabolisme de la glycérine (Keating et al., 2005) poussent mal sur ce milieu. Aussi, la croissance sur ce milieu des autres MTBc est lente du fait de la faible perméabilité de leur paroi (2-6 semaines environ) (Guillet-Caruba et al., 2014 ; Caulfield et al., 2016 ; Pfyffer et al., 1997 ; Cruciani et al., 2004). De par le passé, dans le but d'optimiser la croissance des MTBc, des modifications successives du milieu de LJ ainsi que la recherche d'autres milieux par différents scientifiques avaient été réalisés (McNelly et Riddell, 1949; Liu et al., 1973). C'est aussi pour les mêmes raisons et parfois des raisons économiques qu'il y a eu des ajouts de pyruvate à la place du glycérol (milieu de Stonebrink), du jaune d'œuf à la place de l'œuf entier (milieu Colestos), le remplacement de l'asparagine par le glutamate de sodium disponible et moins cher (milieu d'Ogawa) et la mise au point de milieux gélosés semi-synthétiques comme le Middlebrook 7H10 et 7H11 (Bioforma, 2003 ; De Waard et Robledo, 2007). Ces milieux sont enrichis avec de l'OADC, mélange d'acide oléique, d'albumine bovine, de dextrose et de catalase. Leur manque de sélectivité a nécessité aussi l'ajout d'un cocktail d'antibiotiques, souvent composés de l'association d'une carboxypénicilline, de triméthoprime, de polymyxine B, et d'un antifongique (amphotéricine B) (Sweeney et al., 2007; Fine, O'Brien, et al., 2011). Le seuil de détection de la culture sur ces milieux solides est de 10 à 100 bacilles/ml d'échantillon biologique. Les milieux sontensemencés avec environ 0.2 ml de culot de prélèvement et incubés à 37°C pendant 8 semaines (voire 3 mois). Des conditions particulières d'incubation des cultures peuvent être nécessaires pour certain MNT. La contamination des milieux solides est d'environ 3 à 5% des cultures effectuées si l'acheminement des prélèvements et les protocoles de décontaminations sont suivis correctement. Ce taux est un des indicateurs de qualité du laboratoire de mycobactériologie (Cambau et Herrmann, 2015). L'inconvénient majeur de la culture sur milieu solide est la lenteur des pousses. Les cultures se positivent en 2 à 8 semaines, ce qui est assez long pour permettre une prise en charge rapide des patients.

- Culture sur milieux liquides

Les milieux liquides ont été développés pour pallier la croissance lente des mycobactéries sur les milieux solides, afin de confirmer précocement le diagnostic. Les milieux liquides actuellement utilisés de façon commerciale sont préparés à base d'un milieu de Middlebrook (7H9 ou 7H10) enrichis avec de l'acide oléique, d'albumine, de dextrose, et de catalase (l'OADC) et rendu sélectif par une combinaison d'antibiotiques tels le PANTA (Polymixin B, Amphotericin B, Nalidixic acid, Trimethoprim et Azlocillin) (antibiotic supplement Becton Dickinson, 2013). La combinaison polymixin B, vancomycine, nalidixic acid et azlocillin est également utilisée (PVNA)

(De Waard et Robledo, 2007 ; Cambau et Herrmann, 2015). Bien que connu pendant des décennies, ces milieux liquides pour la culture de mycobactéries n'avaient jamais attiré l'attention de microbiologistes du fait de leur susceptibilité aux contaminations (De Waard et Robledo, 2007). L'utilisation de combinaisons antimicrobiennes appropriées pour inhiber la croissance des microorganismes contaminants et l'usage des automates de culture avec incubateurs et lecteurs incorporés développés à la fin des années 1990 a été une avancée majeure dans le diagnostic de la tuberculose (De Waard et Robledo, 2007).

Ainsi Plusieurs automates commercialisés ont été mis au point et certains ont été recommandés par la Food and Drug Administration des Etats-Unis (FDA) (Piersimoni et al. 2006 ; Caulfield, 2019). Ces derniers au nombre de trois sont le Bactec MGIT960[®] (Becton Dickinson), le VersaTREK[®] (Trek Diagnostics) et le BacT/ALERT[®] (BioMérieux). Ces automates utilisent des systèmes de détection différents et la lecture se fait de manière continue. Pour le Bactec MGIT960[®] la croissance bactérienne est mise en évidence par des sels de ruthénium présents au fond du tube émettant une fluorescence après excitation à 365nm lorsque l'O₂ diminue. Au lieu d'utiliser la fluorescence, le Versa TREK[®] détecte la croissance bactérienne en mesurant la diminution de la pression dans le tube due à la consommation d'oxygène. Quant au système BacT/ALERT 3D, la mesure de la croissance bactérienne se base sur l'augmentation du CO₂ dans le milieu. Cette détection colorimétrique est basée sur la diminution du pH suite à la libération du CO₂. L'ensemencement s'effectue en introduisant 0.5 ml de culot de prélèvement dans les tubes ou flacon contenant les milieux qui sont ensuite incubés à 37°C dans l'automate. Le pourcentage acceptable de cultures contaminées en milieux liquide est en générale compris entre 5 et 10 %. Le temps d'incubation pour ces cultures sur milieux liquides est de 6 semaines avant de déclarer qu'elles sont négatives. En cas de culture positive, il faudra réaliser un examen microscopique afin d'établir qu'il s'agit bien d'une culture positive de mycobactéries. Leurs niveaux de performances sont comparables (Wyth et al., 2000 ; Falconi et al. 2008 ; Alcaide et al., 2000 ; Piersimoni et al., 2001). Mais comparé à la culture sur milieu solide, plusieurs études ont mentionné une amélioration de la sensibilité par le système MGIT. En effet, une meta analyse de 10 publications représentant 1381 souches obtenues de 14745 échantillons cliniques a montré une sensibilité globale de 81,5% et d'une spécificité de 99.6% comparé aux 67% et aux 100% respectivement pour la culture sur milieu solide (Rageade et al., 2014).

L'avantage des cultures sur milieu liquide réside surtout dans leur rapidité. Elles présentent toutes l'avantage de réduire significativement le délai de positivité de 10 à 14 jours en moyenne par rapport aux cultures en milieu solide (Parrish et al., 2011 ; Rageade, 2014) Les inconvénients de

ces systèmes résident dans leur coût très élevé, la nécessité d'une main-d'œuvre qualifiée, l'impossibilité d'observer la morphologie des colonies, la difficulté de détection des cultures mixtes de mycobactéries. Actuellement, au regard de ces avantages et inconvénients, il est recommandé d'inclure à la fois des milieux solides et des milieux liquides pour toute culture des mycobactéries (**Griffith, 2007**).

V.1.4.3. Identification biochimique

L'identification consiste dans un premier temps à la différenciation entre les MTBc et les MNT et dans un deuxième temps à la différenciation des espèces au sein du MTBc.

Identification classique

Classiquement, l'identification des mycobactéries se fait grâce à leurs caractéristiques phénotypiques et biochimiques. L'aspect caractéristique des colonies sur milieux à l'œuf associé à l'étude de quelques caractères biochimiques permet d'orienter l'identification vers une mycobactérie du MTBc ou une MNT. Il s'agit de la production de nitrate réductase, la présence d'une catalase thermolabile et le test de niacine positif. Les principaux tests biochimiques utilisés pour différencier les espèces du MTBc sont le test à la niacine (acide nicotinique), la réduction des nitrates, l'hydrolyse du Tween, la sensibilité au TCH (acide thiophène-2carboxylique), à la cyclosérine et au pyrazinamide (**Denis et al. 2007**). La réalisation de ces tests nécessite des cultures riches et ne sont donc pas réalisables avant 28 jours de croissance ou après une subculture. Ils ont l'inconvénient d'être chronophages et fastidieux et ont de ce fait été remplacés par les tests antigéniques (Ag MTP64) ou moléculaires (Hybridation, PCR).

Détection des antigènes

Deux marqueurs biologiques ont démontré leurs utilités pour le diagnostic de la tuberculose, l'un pour la recherche de tuberculose directement à partir de prélèvement chez le patient (le lipoarabinomannane), l'autre pour l'identification rapide des MTBc dès la positivité de la culture (Antigène MPT-64).

Le premier test détecte des antigènes par immunochromatographie directement sur les urines du patient suspecté de tuberculose et repose sur la détection de lipoarabinomannane (LAM), composant majoritaire de la paroi bactérienne des mycobactéries. Ce test peu coûteux, rapide et facile est utilisé dans les pays en voie de développement à forte incidence de co-infection tuberculose-VIH où il présente une valeur prédictive positive (VPP) de 80 %. Du fait de sa faible spécificité et d'un faible taux de prévalence, ce test ne peut être utilisé en France (**Lawn et al., 2012**). Le lipoarabinomannane est un glycolipide de haut poids moléculaire, résistant à la

température et présent dans la paroi cellulaire des mycobactéries. Cette molécule n'est pas spécifique du MTBc mais plusieurs groupes ont montré la présence de concentrations mesurables de lipoarabinomannane dans les expectorations (**Pereira Arias-Bouda et al., 2000**) ou dans les urines des patients atteints de tuberculose (**Boehme et al., 2005**). Des données préliminaires positives ainsi que l'avantage d'utiliser un simple test urinaire pour détecter une tuberculose ont rapidement conduit au développement d'un test Elisa commercial (Clearview TB, Inverness Medical Innovations, Waltham, MA, États-Unis). Des travaux récents ont montré des performances variables de cette approche et une sensibilité plus faible que celle espérée (**Daley et al., 2009 ; Mutetwa et al., 2009**). Ce test semblerait avoir une meilleure performance chez les patients VIH positifs avec une immunosuppression avancée (**Lawn et al., 2009**).

Le deuxième est un test immunochromatographique pour rechercher les MTBc à partir d'une culture positive sur milieu solide ou liquide. Il s'agit du test MPT64 TB antigen tests (SD Bioline Kit, Standard Diagnostics, Inc., South Korea) qui repose sur la détection de l'antigène MPT64, protéine sécrétée par les MTBc et incriminée dans leur virulence. Il permet en 15 min, d'identifier les MTBc sur des Kits unitaires. La sensibilité est de 97% et la spécificité est de l'ordre de 99 %. Il faut noter que quelques variantes des souches *M. Bovis* BCG sont faussement négatifs (**Cambau et Herrmann, 2015**).

V.1.4.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La résistance acquise aux antituberculeux chez les MTBc est toujours liée à des mutations de gènes chromosomiques. Dans une population bactérienne, il existe spontanément des bactéries mutantes résistantes à chacun des antituberculeux. Cette proportion de mutants résistants pour les souches sauvages varie de $1/10^5$ pour l'INH à $1/10^8$ pour la RIF. La survenue de chaque mutation étant indépendante, l'association de deux antituberculeux comme l'INH et la RIF empêche la sélection des mutants résistants. Les tests de résistance aux différents antituberculeux de première ligne sont bien standardisés et corrélés aux résultats des études cliniques (**Denis et al., 2011**). Ces tests sont nécessaires et recommandés pour une prise en charge thérapeutique adaptée des patients. Dans la réalité beaucoup de pays à faibles ressources comme le Burkina Faso, n'ont pas de laboratoires avec les capacités et les compétences nécessaires pour les réaliser de sorte que les patients sont traités, pour la plupart d'entre eux, de façon empirique sur la base des seuls résultats de la microscopie. Classiquement, trois méthodes phénotypiques à savoir la méthode des proportions, la méthode absolue des concentrations et la méthode de ratio de résistance (**Canetti et al., 1969, kent et Kubica al., 1985**) étaient utilisées pour la détection des résistances aux antituberculeux. Toutefois, en raison du travail laborieux que nécessitent ces méthodes et surtout les longs délais nécessaires pour le rendu des résultats, de nouvelles technologies et approches avec des délais d'exécution plus courts

et la possibilité d'application directe sur les échantillons cliniques ont été proposées au cours des dernières années (cf chap.2, paragraphe V.1.5.). Le paragraphe ci-dessous décrit les méthodes de proportions en milieux solides et liquides.

- **Méthode de proportion en milieu solide (décrit dans Denis et *al.*, 2011).**

C'est la méthode de référence et c'est celle qui est utilisée dans notre laboratoire. Elle détermine la proportion des mutants résistants aux antituberculeux à partir des milieux de L-J, 7H9 ou 7H10 dans lesquels sont incorporés des antituberculeux à des concentrations critiques. Cette méthode consiste à préparer une suspension bacillaire à partir de 5-10 colonies dans un tube contenant des billes en verre et 0.5 ml d'eau distillée stérile. Cette suspension est ensuite ajuster par opacimétrie avec de l'eau distillée stérile à 1mg/ml à l'aide d'un étalon BCG (0.5 Mac Farland). Trois séries de dilutions (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}) sont préparées à partir de la suspension calibrée, puis des volumes de 0,2 ml sont ensemencés dans les tubes de milieux contenant ou pas des antituberculeux. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C, une première lecture est réalisée au 21^{ème} jour et une deuxième au 42^{ème} jour. Le nombre de colonies apparues sur les différents tubes est compté et permet de déduire la proportion de bacilles résistants présents dans la souche. Celle-ci est déclarée résistante lorsque la proportion des colonies résistante est égale ou supérieure à la proportion critique (1% pour les antituberculeux majeurs ci-dessous cités). Les concentrations d'antibiotiques souvent utilisées sont les suivantes : Isoniazide (H) à 0,2 µg/ml, Rifampicine (R) à 40µg/ml, Ethambutol (E) à 2µg/ml et Streptomycine (S) à 4 µg/ml (correspondant aux standards recommandés par l'OMS). Le long délai du rendu des résultats constitue la limite de cette méthode. Cependant, c'est une méthode qui est simple à mettre en œuvre et pourrait être implanté dans les laboratoires de mycobactériologie clinique.

Il faut noter qu'en cas de rechute ou d'échec clinique, des antituberculeux de seconde lignes sont aussi testés bien que ceux-ci ne soit pas standardisés. De même la Pyrazinamide (antituberculeux de 1^{ère} ligne) est testé en seconde intention en raison des performances médiocres des milieux acide utilisés.

- **Détermination de la sensibilité aux antituberculeux sur milieu liquide.**

Bien que la méthode des proportions en milieu solide demeure la méthode de référence pour la détermination de la sensibilité aux antituberculeux de première intention, les antibiogrammes sont désormais le plus souvent réalisés en milieu liquide sur l'automate Bactec MGIT 960 ou VersaTREK. Ces antibiogrammes sont majoritairement effectués à partir d'un premier isolat obtenu en milieu liquide, soit en moyenne deux semaines après la prise en charge initiale du prélèvement. Cette méthode est analogue à celle réalisé en milieu solide et décrite dans le paragraphe ci-dessus.

En résumé pour le MGIT, un volume de 0,5 ml de la suspension de la souche à étudier est inoculée dans les tubes contenant les antituberculeux et 0,5 ml de supplément OADC. Un tube témoin (suspension diluée au 1/100^{ème}) est également inoculé puis incubés à 37°C pendant 12 jours au maximum. La lecture est réalisée entre le 3^{ème} et le 12^{ème} jour en lumière UV à 365 nm. Si dans les 48 heures qui suivent la positivité du tube témoin aucune fluorescence n'est détectée dans les tubes contenant les antituberculeux, alors la souche est déclarée sensible. Dans le cas contraire, elle est déclarée résistante pour l'antituberculeux concerné. Pour les automates (Bactec MGIT 960, VersaTREK), la mesure se fait de manière continue et automatique. En cas de résultat douteux, le milieu solide est recommandé.

L'avantage majeur de cette méthode repose sur la diminution significative du délai de rendu du résultat (10 jours en milieu liquide après une première culture, versus 3 à 4 semaines en milieu solide) (**Parrish et Carrol, 2008**). Des études montrent que des antibiogrammes sur milieux liquides peuvent être réalisés directement à partir d'échantillons avec examen direct positif permettant ainsi d'optimiser le délai de rendu de résultat (**Parrish et Carrol, 2008; Lin et al., 2009**). L'inconvénient majeur de cette méthode est le coût très élevé des automates utilisés de même que les milieux de culture.

Ces antibiogrammes en milieu liquide automatisé sont très performants (**Espasa et al., 2012**), à l'exception toutefois de la détermination de la sensibilité au pyrazinamide. Bien qu'il n'existe pas de standardisation, la sensibilité des antituberculeux de 2^e ligne peut également être testée en milieu liquide à l'aide du Bactec MGIT 960 pour ce qui est de l'amikacine, la capréomycine, l'éthionamide, la kanamycine, l'ofloxacine, la moxifloxacine, le linézolide, l'acide para-amino salicylique et la rifabutine (**Zhao et al., 2012 ; Sharma et al., 2011**).

V.1.4.5. Contaminations des cultures et cultures faussement négatives

Une revue de la littérature sur les contaminations des cultures de mycobactéries à partir d'expectorations et de prélèvements respiratoires publiés ces 10 dernières années, nous a permis de synthétiser les données de 17 études dont les objectifs étaient soit de réduire les contaminations de cultures des mycobactéries soit d'améliorer le recouvrement des cultures des mycobactéries dans le cadre du diagnostic de la tuberculose pulmonaire dans les pays à ressources limitées. Les cultures faussement négatives sont définies ici comme étant des prélèvements à examen microscopique positif avec des résultats de cultures négatives. Nous avons considéré les contaminations de culture et les cultures faussement négatives comme étant les deux faces d'une même pièce, car tous deux concourent à une insuffisance de diagnostic. Ces 17 études réparties en trois groupes selon les stratégies utilisées pour améliorer le recouvrement des cultures des mycobactéries étaient

constituées de 3 études d'évaluations de l'utilisation de bain de bouche avant la collecte des expectorations, de 9 études d'évaluations des méthodes de décontamination ou de transport/décontamination, et enfin de 5 études d'évaluation des milieux sélectifs pour la culture des mycobactéries. Les données extraites des différentes études sont présentées dans le tableau 6. Les différentes variables prises en compte étaient : les noms des auteurs, l'année et le pays de publication de l'article, la population cible, la taille de l'échantillon, les spécimens prélevés et analysés, les méthodes de décontamination, les types de milieux de culture utilisés les taux de contaminations et de recouvrements des cultures ainsi que les taux de cultures faussement négatives. Ces 17 études capitalisent au total 21 évaluations toutes stratégies confondues pour les bras standards ou contrôles (en gras dans le tableau) et 29 évaluations pour les bras expérimentaux (**tableau 6**).

En considérant les bras standards, 16 (16/21 soit 76%) évaluations avaient des taux de contaminations supérieurs aux taux acceptables. Ces taux étaient compris entre 11-36% et 10 (10/21 soit 48%) d'entre elles avaient des taux de contaminations supérieures ou égales à 15% (**tableau 6**). Seulement 5 (5/21 soit 24%) études avaient des taux de contaminations acceptables mais parmi elles 2 (2/21 soit 10%) avaient des taux de cultures faussement négatives de l'ordre de 30% et de 71% (**tableau 6**). En définitive, 86% des évaluations standards n'ont pas permis un bon recouvrement des mycobactéries soit parce que les taux de contaminations étaient élevés ou soit les taux de cultures faussement négatives étaient élevés.

Pour les bras expérimentaux, seulement 6 (6/29 soit 21%) évaluations avaient des taux de contaminations supérieurs aux taux acceptables et étaient compris entre 11% et 63% (**tableau 6**). Cependant, parmi les évaluations qui avaient des taux de contaminations acceptables, 7 (7/29 soit 24%) avaient des taux de cultures faussement négatives compris entre 10% et 57%. De plus, 4 (4/29 soit 10%) autres avaient conclu que le taux de recouvrement des cultures n'était pas différent entre le bras standard et expérimental malgré une réduction des contaminations. Pour les 13 évaluations restantes, 4 avaient des taux de contaminations acceptables et des taux de microscopie positive cultures négatives dans les normes alors que pour les 9 autres, il y avait une insuffisance de données sur le recouvrement des cultures et les taux de cultures faussement négatives qui ne permettaient pas de conclure. Néanmoins, malgré ce manque de données sur les 9 évaluations représentant 30% des évaluations expérimentales, 55% n'ont pas permis un bon recouvrement des cultures des mycobactéries.

Ces données traduisent indéniablement la nécessité d'une amélioration de la qualité du diagnostic de la tuberculose pulmonaire par la technique de la culture et expliquent les nombreuses stratégies qui sont évaluées pour tenter de les réduire.

Tableau 6 : Synthèse des études portant sur les contaminations ou les recouvrements de cultures des mycobactéries entre 2009 à 2019 dans les pays à ressources limitées

| Références (Pays) | Population d'étude | Types et taille d'échantillon et conditions de conservation | Méthode de décontamination et milieu de culture | Milieux de culture | Pourcentage de contamination | Pourcentage de cultures faussement négatives | Pourcentage de recouvrement des cultures |
|---|---|---|---|--|---|--|--|
| Evaluation des méthodes de décontamination | | | | | | | |
| Peres R L. et al, 2009 (Brésil) | Cas suspects tuberculose | Expectorations N=3990 T°=4°C Durée= DM | -NALC-NaOH (1% NaOH) - NALC-NaOH (1,25% NaOH) | Ogawa | -14% -11% | ND ND | 3 3 |
| Sharma et al., 2012 (Inde) | Cas suspects tuberculose | Expectorations N=30 T°=DM Durée=DM | -NaOH 4% -NALC -NaOH2% -inoculation directe | LJ | 23,1% 13,2% 79,2% | ND ND ND | |
| Chatterjee et al, 2012 Inde (Bengal) | Cas suspects tuberculose | 359 specimens dont 241 expectorations 147 M+ T°=DM Durée=30minutes | NaOH 4% NaOH 2% NALC 2% NaOH2% | LJ BLM KLM | 8 63 7 TSPS=5 | 71 16 26 TSPS=12 | ND ND ND |
| Addise D et al., 2016 (Ethiopie) | | Expectorations N=264 T°=4°C Durée=3-5Jours | NALC-NaOH (1% NaOH) NALC-NaOH (1,5% NaOH) | MGIT (Bactec 960) | 22 7 | ND ND | 20 20 |
| Ensa et al 2016 (Gambie) | Cas confirmés tuberculose et cas de microscopes négatifs | Expectorations (N= 42 M+ et N=26 M-) T°= DM Durée=DM | NALC-NaOH 0,7% CHX | LJ | 4% 2% | ND ND | 64 62 |
| Hiza et al. 2017 (Tanzanie) | Patients tuberculose confirmés | Expectorations N=200 T°=4-8°C Durée= chaque jour | NALC-NaOH (1,5 NaOH) CCP7jours + NALC-NaOH | LJ LJ | 20min=14 15min=16 10min=14 20min=2 15min=2 10min=0 | 20min=34 15min=16 10min=4 20min=8 15min=4 10min=6 | |
| Taglianie et al., 2017 (Albanie) | Cas suspects TB | Expectorations N=329 T°= DM Durée= même jour | NALC-NaOH OM-S | MGIT (Bactec960) MGIT (Bactec960) | 13 0 | ND ND | 13 14 |
| Affolabie et al., (Benin) | Patients tuberculose confirmés | Expectorations N=312 T°=DM Durée=même jour | NaOH4% CCP+ NaOH4% (5min) OM-S | LJ LJ LJ | 11 CCP8j=8 CCP28j=4 OM-S 8J=3 OM-S 28J=1 | 16 CCP8j=10 CCP28j=26 OM-S 8J=15 OM-S 28J=57 | |
| Asandem et al., 2018 (Ghana) | Patients tuberculose confirmés | Expectorations N=104 T°=DM Durée= DM | NALC-NaOH OM-S | LJ LJ | 13 4 | 13 17 | ND ND |
| Evaluation de l'utilisation de bain de bouche avant la collecte des expectorations | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---|--|--|--------------------------------|--|--|--------------------------|--|
| Muzanyé et al. 2009 (Ouganda) | Cas suspects tuberculose | Expectorations SBB*=1922 ABB**=1860 (utilisation de l'eau bouillie) T°=DM Durée=DM | NALC-Na-citrate | | SBB=22 ABB=7 | ND ND | ND ND |
| Peres et al. 2011 (Brésil) | Cas suspects tuberculose | SBB*=120 ABB**=120 (CHX 0,12% ; ou CCP 0,05%) T°=4°C Durée = 2H | NALC-NaOH | Ogawa MGIT (PANTA) | SBB*=9 ABB**=7 SBB*=18 ABB**=11 | ND ND ND ND | SBB*=23 ABB**=23 SBB*=29 ABB**=33 |
| Kalema N. et al 2012 (Ouganda) | Cas suspects tuberculose à majorité VIH+ | Expectorations N=110 (SBB) N=110 (ABB) T°=4°C Durée=3 heures | NALC-NaOH (1% NaOH) | LJ | SBB= 15 ABB=4 | ND ND | SBB= 53 ABB=48 |
| Evaluation de milieux selectifs à base de cocktail d'antibiotiques | | | | | | | |
| Ouassa et al., 2011 (Côte d'Ivoire) | Cas suspects tuberculose (VIH+) | Prélèvements respiratoires N=91 (dont 87 expectorations) T°=DM Durée=DM | Citrate-Na/NaOH4% | LJ 7H9 (Bactec 460) 7H9 (BACT /ALERT) | 36 2 1 | ND ND ND | 9 31 34 |
| Kassaza et al., 2014 (Ouganda) | Cas suspects tuberculose | Expectorations N=299 N=234 (LJ+PeniG) T°=DM Durée=DM | NALC-NaOH 2% | LJ LJ+PANTA SelectataB-MB LJ+ PeniG | 31 5 2 9 | ND ND ND ND | ND ND ND ND |
| Okumu et al., 2017 (Kenya) | Cas suspects tuberculose | Expectorations N=700 T°=DM Durée=DM | NALC-NaOH-Na-Citrate (NaOH 1%) | LJ LJ+ PACT | 16 7 | ND ND | 4 4 |
| Diriba et al., 2017 (Ethiopie) | Cas suspects tuberculose | Expectorations N=900 (111 M+) T°=2-8°C Durée=24-48 heures | NALC-NaOH | LJ MGIT LJ (M+) MGIT (M+) | 9 15 4 1 | ND ND 30 12 | ND ND ND ND |
| Boum et al., 2013 (Ouganda) | Cas suspects tuberculose | Expectorations N=671 T°=DM Durée=DM | NALC-NaOH (1,5% NaOH) | LJ MGIT | 22 20 | ND ND | ND ND |

SBB*= sans bain de bouche ; ABB**= après bain de bouche ; CHX =chlorhexidine ; ou CCP

M+ = Microscopie positive ; M- = Microscopie Négative ; N= nombre ; ND= non déterminé ; NA= Non applicable ;

DM = Données manquantes

V.1.5. Diagnostic moléculaire de la tuberculose

Le diagnostic moléculaire de la tuberculose peut se faire à partir de culture positive ou directement à partir des échantillons.

V.1.5. 1. Diagnostic à partir de cultures positives

Plusieurs tests de diagnostic sont utilisés pour identifier les mycobactéries à partir de cultures positives sur milieux solides ou liquides. Il s'agit :

- des tests d'hybridation à l'aide des sondes d'acide nucléiques,
- des tests d'hybridation inverse sur bandelettes ou Line Probe Assays en anglais (LPA),
- du MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrom),
- du séquençage de l'ADN (Pfyffer, 2015 ; Caulfield, 2019),
- et des tests d'hybridation des acides nucléiques ou nucleic acid amplification tests en anglais (NAAT).

Des tests commerciaux homologués par la FDA et l'OMS sont disponibles et permettent l'identification des MTBc, *M. avium complex*, *M. gordonae* et *M. Knasasii*. A partir des isolats de cultures, les acides nucléiques sont libérés après un traitement par la chaleur et la sonication. Ensuite des sondes d'ADN spécifiques d'espèces marquées par chimioluminescence sont ajoutées. Si les sondes sont complémentaires à l'ARN ribosomal 16S cible, il y'a hybridation et la chimioluminescence des hybrides ADN-ARNr peuvent être détectés et quantifiés (figure 10). Du fait que cette technique ne passe pas par une étape d'amplification, une grande quantité d'acide nucléique cible est requise et cela restreint la technique à la détection à partir de cultures positives. Cependant, cette technique est sensible et spécifique (seuils compris entre 95-100% selon les études), elle est simple d'utilisation et produit les résultats à environ 2H (Lebrun et al., 1992 ; Richter et al., 1999). Sa principale limite est qu'elle n'est disponible que pour 4 espèces ou complexe de mycobactéries.

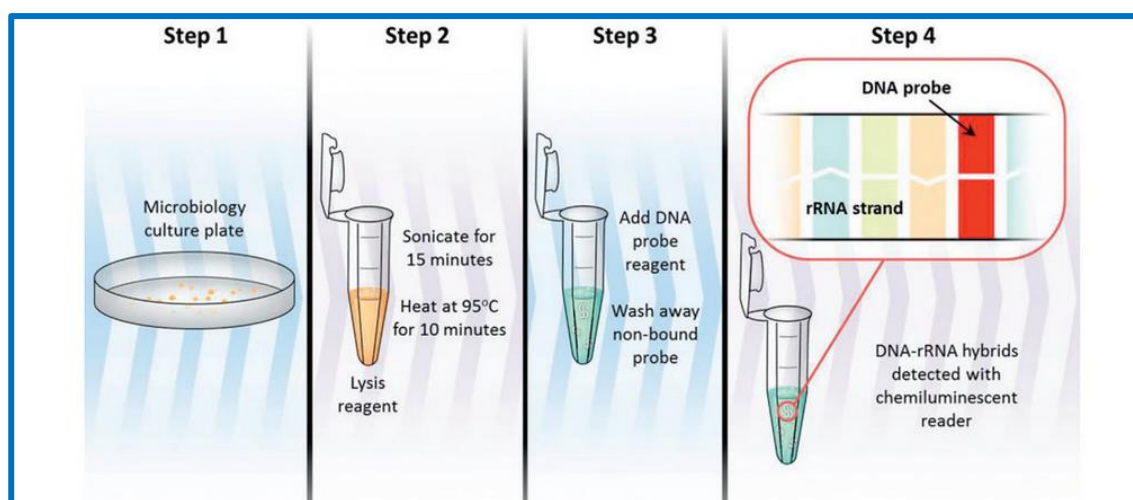


Figure 10 : Schéma de réalisation des tests d'hybridation des sondes d'acides nucléiques (Caulfield et al., 2016)

- Tests d'identification génétique ou Line Probe Assays (LPAs)

Les LPAs sont des techniques alternatives aux tests précédents. Cette technologie utilise des membranes de nitrocelluloses sur lesquelles sont fixées des sondes spécifiques du genre et de l'espèce des mycobactéries. Lorsque de l'ADN complémentaires est présent dans les lysats des isolats de culture, ceux-ci s'hybrident aux sondes et produisent des bandes colorées permettant l'identification des espèces (**figure 11**). Les LPAs commerciaux disponibles incluent les tests INNO-LiPA® Rif.TB (Innogenetics, Ghent, Belgium), et les tests Genotype MTBDR*plus* 2.0 et Genotype MTBDR*sl* (Hain® Life Science GmbH). Les sondes utilisées ciblent les différences de nucléotides dans la région de l'ARN 16 S ou l'ARN 23 S. Ils peuvent détecter les mycobactéries du MTBc et plusieurs MNT habituellement isolées ainsi que les résistances aux antituberculeux. La sensibilité et la spécificité des LPAs sont généralement au-dessus de 90% et les résultats disponibles en 2-4 heures (**Russo et al., 2006 ; Tortoli et al., 2003 ; caulfield, 2019**). Ils sont recommandés par l'OMS et largement utilisés mais ne sont pas approuvés par la FDA. Il existe des réactions croisées avec certains MNT non fréquents. Au Burkina Faso, le PNT recommande le test Genotype MTBDR*plus* 2.0 pour détecter les cas de TB- MDR et TB-UR chez les patients dont le contrôle M3 de première ligne de traitement est positif, chez les patients en échec de traitement, en rechutes ou perdu de vue, et enfin chez les cas contacts de TB MR (**PNT, 2016**).

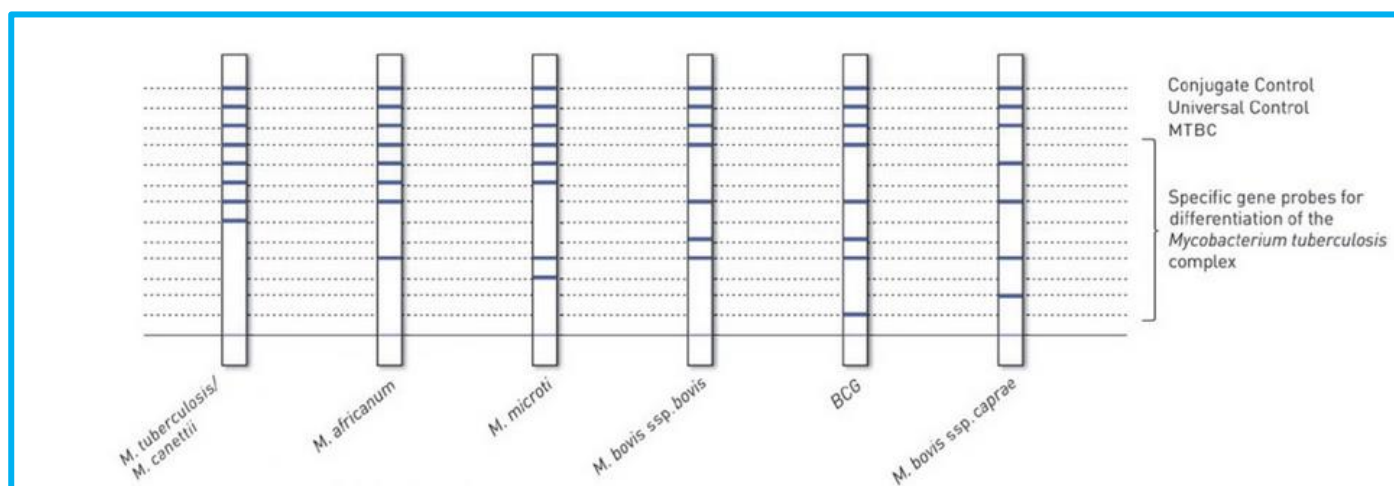


Figure 11 : Schéma des sondes hybridées sur bande de nitrocelluloses, test de Genotype MTBC, Hain Liefescience (Caulfield et al., 2016).

- Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF MS en microbiologie permet l'identification des microorganismes au niveau de l'espèce par analyse de leurs protéines (Bizzini et Greub, 2010). Ces dernières années, elle a été appliquée à l'identification des mycobactéries (Pignone et al., 2006 ; El-chéchine et al., 2011 ; ceysens et al., 2017). Les isolats issus des cultures sont soumis à un traitement à l'alcool ou à la chaleur avec agitation mécanique pour permettre la lyse des cellules. Les protéines sont extraites des lysats de cellules avec de l'acide formique et de l'acétonitrile. Pour des raisons de biosécurité, toutes les étapes d'inactivation et d'extraction de protéines doivent être effectuées en utilisant les précautions de laboratoire de sécurité biologique niveau 3. L'ajout d'une matrice chimique aux protéines extraites facilite l'ionisation au laser (figure 12). Les protéines ionisées sont séparées sur la base de leur rapport masse/charge (m/z) aboutissant à un spectre de masse servant d'emprunt pour la mycobactérie. Un logiciel associé au spectromètre compare le spectre obtenu à des spectres de référence dans une base de données. Plusieurs études ont documentées une bonne identification des mycobactéries par cette méthode (Lotz et al., 2010 ; Saleeb et al., 2011 ; El chéchine et al., 2011 ; Mather et al., 2014). Mais une revue systématique réalisée en 2018 sur 19 articles prenant en compte 2593 isolats de mycobactéries a montré une concordance des isolats au niveau genre de 85 % au niveau espèce de 71% avec la méthode de référence. Cela montre que son utilisation pour l'identification des mycobactéries pathogènes n'est pas satisfaisante à ce jour et nécessite une amélioration (Cao et al., 2018). Il a néanmoins l'avantage d'avoir des consommables moins chers et d'être rapide. L'inconvénient majeur du MALDI-TOF MS est le besoin de culture pure et le manque de résolution pour différencier des isolats proches y compris les membres du MTBc (Pfyffer, 2015 ; Caulfield, 2019).

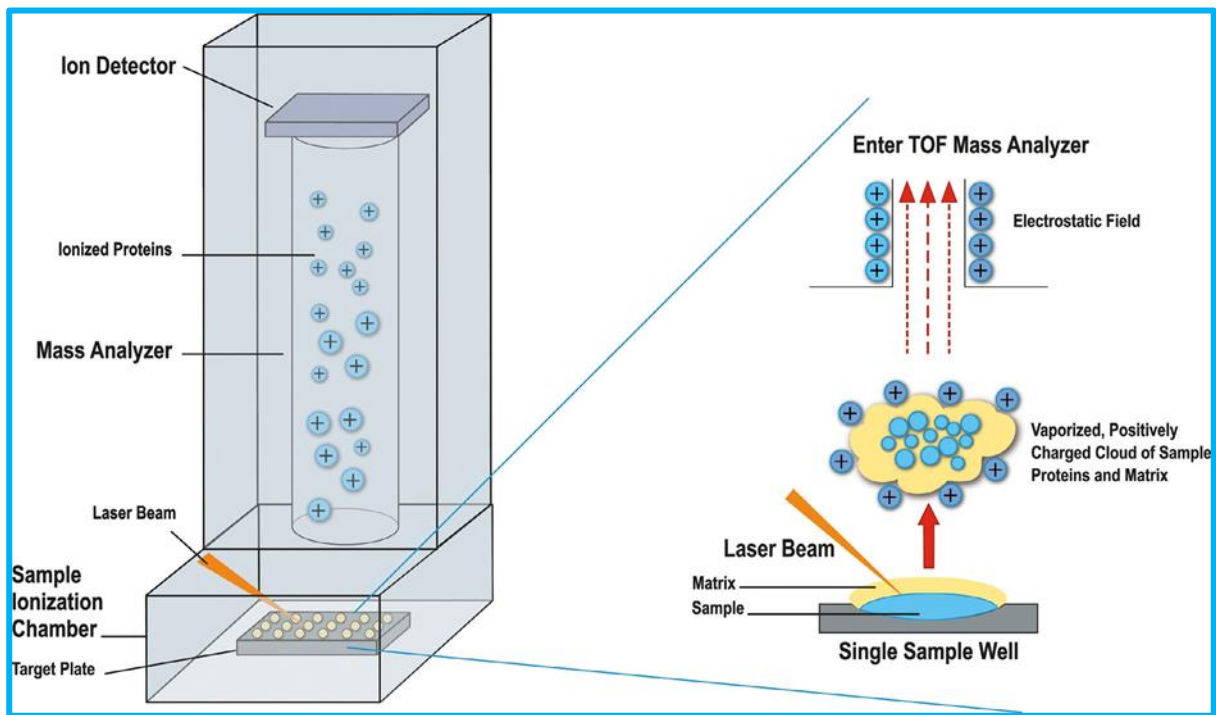


Figure 12: MALDI-TOF mass spectrometry operation schematic (Caulfield et al., 2016).

- Séquençage

Le séquençage génétique est aujourd’hui effectué à l’aide de séquenceurs automatiques qui le rend hautement reproductible. Il n’est souvent utilisé que lorsque les autres tests moléculaires échouent à donner une identification définitive de l’espèce. Les cibles potentielles pour le séquençage sont les régions génétiques fortement conservées et qui, en même temps, comprennent des séquences modérément variables comme l’ARN ribosomal 16S, ARN ribosomal 23S, hsp65 ou le rpoB (De Waard et Robledo et al., 2007). Les primers designés pour se lier aux séquences conservées permettent d’amplifier globalement l’ADN de toutes les espèces de mycobactéries et sont aussi positionné pour flanquer la région variable, ce qui est utile pour la différenciation des espèces. L’ADN amplifié est séquençé et les résultats sont comparés à des bases de données de séquences établies comme MicroSeq (Thermo Fisher Scientific) et SmartGene IDNS (SmartGene). L’avantage majeur du séquençage est qu’elle permet une identification objective d’une grande variété de mycobactéries au niveau espèce y compris les membres du MTBc avec un délai d’exécution qui est de 24 heures. Cependant cette technologie peut être limitée aux laboratoires de références et donc le délai de route doit être considéré. Elle nécessite aussi une main d’œuvre

qualifiée et des équipements et réactifs qui coûtent plus chers que les tests d'hybridations et le MALDI-TOF MS.

V.1.5. 2. Diagnostic moléculaire à partir de l'échantillon clinique

Du fait de la sévérité de l'infection tuberculose et de la transmission communautaire en milieu de soin un diagnostic précoce de la TB active est essentiel pour une prise en charge efficace du patient et la prévention de la transmission de la maladie. A cause de la lenteur de la croissance des mycobactéries, les méthodes se reposant sur les isolats de mycobactéries comme le MALDI-TOF MS et le séquençage conduisent à des retards de diagnostic bien que ces techniques en elles-mêmes soient rapides (**Caulfield et al., 2019**). Les NAAT et les LPAs ont alors été développés pour la détection directe des MTBc, l'identification et la détection de la résistance aux antituberculeux à partir de spécimens respiratoires (**Caulfield et al., 2016**).

- Tests d'amplification des acides nucléiques (ou NAAT)

Les tests d'amplification génique appelés NAAT dans la littérature anglo-saxonne permettent de multiplier artificiellement le nombre de copies d'une séquence d'acides nucléiques spécifique afin d'en permettre la détection. Plusieurs NAAT ont été approuvés par la FDA et l'OMS pour le diagnostic de routine de la tuberculose (**Suhail et al., 2014 ; Tortoli E et Polomino, 2007 ; Bonnet, 2011**). Il s'agit des tests cobas TaqMan Amplicor MTB (Roche Molecular Systems, Switzerland), le test Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct (AMTD) (Gen-Probe, USA), le test BD ProbeTec ET (Becton Dickinson, Sparks, MD), le GenoType MTBDR^{plus}® (Hain Diagnostika) et le GeneXpert MTB/RIF® (Cepheid, Sunnyvale, CA, États-Unis). Ce dernier, développé dans le paragraphe ci-dessous a été approuvé par l'OMS en 2010 (**WHO, 2015**) et est utilisé au Burkina Faso dans les CDT et les laboratoires de diagnostic de la TB. Il associe à la fois détection des MTBc et détection de la résistance à la rifampicine.

Le Xpert® MTB/RIF est un test automatisé semi-quantitatif de PCR nichée en temps réel. Il se base sur l'amplification de la région RRDR « Rifampicine Resistance Determining Region » et sur la détection des mutations dans cette région via l'hybridation de différentes sondes. La non-détection de mutations sur cette région s'interprète comme la sensibilité à la RIF de la souche et réciproquement, la détection de mutations s'interprète comme une résistance à la RIF. La région RRDR est une courte séquence de 81 pb du gène *rpoB* présentant la majorité des mutations décrites actuellement responsables de la résistance à la RIF chez *M. tuberculosis*. (**Blakemore et al., 2010**). La procédure consiste à une décontamination ou non des expectorations avec une solution permettant de réduire la viabilité des MTBc. Les échantillons sont ensuite chargés manuellement dans une cartouche qui est ensuite insérée dans l'instrument geneXpert (**figure 13**). A partir de ce

moment, les différentes étapes d'extraction, purification, amplification d'ADN, hybridation des sondes et détection multiplex sont réalisées automatiquement.



Figure 13 : Système Xpert et cartouche du test MTB/RIF pour la détection des MTBc et les mutations associées aux résistances à la RIF (Caulfield *et al.*, 2016)

La sensibilité et la spécificité pour les échantillons à frottis positif peuvent atteindre 100 et 99 %, respectivement. Pour les échantillons à frottis négatif elles peuvent atteindre 67 et 99 %, respectivement, comparativement à la culture. Le geneXpert réduit significativement le temps de détection de la résistance à la RIF de 4 à 8 semaines (culture et DST) à 2 heures. De plus, Xpert MTB/RIF augmente de 23% le taux de détection du MTBc parmi les cas confirmés de culture par rapport à la microscopie. Cependant, certaines études ont rapporté des résultats faussement positifs avec GeneXpert en raison de mutations silencieuses (Bunsow *et al.*, 2014) et des résultats faussement négatifs en raison de l'impossibilité de détecter les mutations conférant la résistance à la RIF en dehors de la région des points chauds (Sanchez Padilla *et al.*, 2015). De plus, il doit toujours être utilisé avec d'autres tests, comme le DST, pour confirmer le phénotype de résistance de chaque isolat de MTBc. Une autre limite remarquable est son coût élevé en raison de l'utilisation du système complexe GeneXpert et des cartouches à usage unique (l'appareil GeneXpert coûte entre 12 000 et 71 000 \$US, selon le nombre de modules d'essai, et le prix de chaque cartouche d'essai à usage unique est de 9,98 \$) (WHO, 2017b; Walzl *et al.*, 2018). Enfin la machine GeneXpert

nécessite une source d'électricité constante et est sensible à la chaleur et à la poussière. Un certain nombre de pannes de machines ont été signalées en raison de ces problèmes (**Walzl et al., 2018**).

En termes de performance, cette technique reste moins sensible que la culture et un résultat négatif obtenu sur un prélèvement pauci-bacillaire ne permet pas d'exclure une tuberculose. Toutefois, ce test présente l'avantage d'être simple, rapide, sensible et spécifique pour les prélèvements pulmonaires à microscopie positive, permettant ainsi d'accélérer une prise en charge adéquate des patients en termes d'isolement, mais aussi de traitement antituberculeux si le patient présente des facteurs de risques d'avoir été en contact avec une souche multi résistante (**Park et al., 2013**). Dans le but d'améliorer les performances du test Xpert MTB/RIF, le test Xpert Ultra a été développé. La performance globale des deux tests était similaire mais la sensibilité du tests Ultra pour la détection de la tuberculose était supérieure à celle de test Xpert MTB/RIF chez les patients a microscopie négative et chez les patients porteurs du VIH (**Dorman et al., 2018 ; Chakravorty et al., 2017**). Cependant, cette augmentation de la sensibilité s'est faite au détriment d'une diminution de la spécificité selon Dorman et al., 2018 (**Dorman et al., 2018**). Néanmoins, en 2017, l'OMS a recommandé le remplacement du test Xpert MTB RIF par le test Ultra en raison de sa sensibilité accrue (limite de détection 15,6 UFC/ ml contre 112,4 UFC/ ml) qui pourrait optimiser le diagnostic des tuberculoses pauci-bacillaires relative aux enfant, aux porteurs du VIH et aux extra pulmonaire. (**WHO, 2017d ; Chakravorty et al., 2017**).

- Tests d'identification génétique ou Line Probe Assays (LPAs)

Les LPAs cités plus haut servent à la fois pour la détection des MTBc, l'identification et la détection de la résistance aux antituberculeux. Ils ciblent après amplification de l'ADN des MTBc, des mutations spécifiques conférant une résistance aux antituberculeux (**Ninet et al., 2011 ; Guillet-Caruba et al., 2014**).

Le test GenoType®MTBDRplus 2.0, utilisé au Burkina Faso permet en quelques heures et en un seul test de détecter le MTBc et la résistance à la RIF et INH par le criblage des mutations dans *rpoB*, *katG*, et le promoteur du gène *inhA*, soit à partir d'échantillons avec examen direct positif, ou de prélèvement pulmonaire à examen direct négatif. Il montre une bonne performance pour la détection des isolats MDR dans les échantillons à frottis positifs (sensibilité entre 83,3 et 96,4%, et spécificité entre 98,6 et 100%) (**Bai et al., 2016; Nathavitharana et al., 2016; Dantas et al., 2017; Meaza et al., 2017**). Pour les prélèvements pulmonaires à examen direct négatif, l'étude de **Crudu et al.** en 2012, en zone de moyenne endémie, montre une sensibilité de 79,8 % pour la détection du complexe tuberculosis ainsi qu'une sensibilité de la détection de la résistance de 90 % pour la rifampicine et de 93,5 % pour l'isoniazide (**Crudu et al., 2012**).

En conclusion, les LPAs sont rapides, simples et faciles à réaliser. L'analyse des résultats est simple et peut se faire de manière automatique ou manuelle. Cependant, les LPAs nécessitent une infrastructure de laboratoire complexe et de l'équipement coûteux qui est normalement disponible uniquement dans les laboratoires de référence (OMS, 2017c). Le nombre de résultats non interprétables est élevé, et la couverture cible de LPAs est limitée aux principales mutations. Ainsi, leur sensibilité et leur spécificité varient en fonction des prévalences des mutations considérées.

V.2. Diagnostic indirect

L'objectif de ce diagnostic est de dépister les sujets ayant été infectés avec *M. tuberculosis* en mettant en évidence la mémoire immunitaire suite à un contact avec une mycobactérie du complexe tuberculosis. Les tests utilisés sont principalement des tests de libération d'interféron gamma (IGRA) réalisés à partir de prélèvement sanguin et l'intradermo réaction (IDR).

V.2.1. Tests IGRA

Ils reposent sur la détection *in vitro* de la production d'IFN-gamma par les cellules mononuclées sanguines du patient après contact avec des protéines spécifiques de *M. tuberculosis* : ESAT-6 (6 kDa early secretory antigenic target), CFP-10 (Culture Filtrate Protein) et TB7.7. Il s'agit du test Quantiferon-TB[®] Gold In-Tube (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australie), basé sur la mesure de la production *in vitro* d'IFN-gama par test Elisa et le test T-SPOT.TB^{MD} (Oxford Immunotec, Oxford, R.U.) basé sur la quantification du nombre de cellules mononuclées sanguines capables de produire de l'IFN. La spécificité de ces tests est de 82 à 99 % et la valeur prédictive négative est de l'ordre de 99,7 % quelle que soit la population étudiée (Sadatsafavi et al., 2010 ; sester et al., 2011). Ces tests ont été autorisés par la HAS (Haute Autorité de la Santé) en France à partir de 2006 chez l'adulte (Haute Autorité de la Santé, 2011). Il existe cependant des réactions croisées avec *M. Kansasii*, *M. marinuum*, et *M. szulgai*. La HAS a émis de nouvelles recommandations en juillet 2011, puis en 2015 (Haute Autorité de la Santé, 2011 ; Haute Autorité de la Santé, 2015) : Les tests immunologiques ne doivent être utilisés que pour le seul diagnostic de la tuberculose latente et uniquement dans l'objectif d'un traitement. Ces tests ne sont pas recommandés dans le diagnostic de la tuberculose maladie mais seulement pour réaliser l'enquête autour d'un cas, pour le dépistage et la surveillance chez les professionnelles de santé et chez les migrants récents et enfin avant la mise en route d'un traitement par anti-TNF-alpha.

V.2.2. Test de l'intradermo-réaction à la tuberculine

C'est un test de stimulation lymphocytaire *in vivo* réalisé par injection intradermique de la tuberculine purifiée. Il est suivi d'une mesure de l'induration en mm entre 48 et 72 heures (**figure 14**) (**Pfyffer, 2015**). Ce test est essentiellement utilisé pour le diagnostic de la tuberculose latente dans certains groupes de personnes à risque tels que les personnes contacts de patients souffrant de tuberculose, les prisonniers, le personnel des centres de soins de patients de tuberculose ou des laboratoires (**Caulfield, 2019**). Plusieurs tests commerciaux pour une injection intradermique comme le Tubersol[®] et Aplisol[®] ont été mis sur le marché (**American Thoracic Society, 1999 ; American Thoracic Society, 2000**). Il est moins spécifique (75%) que le Quantiféron et le T-SPOT-TB (**Sester et al., 2011**). Des réactions faussement positives dues à la vaccination par le BCG, ou à des réactions croisées avec les MNT peuvent survenir. Des réactions faussement négatives peuvent survenir chez les patients immunodéprimés.



Figure 14 : Réaction à la tuberculine (Singh et Espitia, 2007)

VI. Traitement de la tuberculose

La tuberculose est une maladie que l'on peut soigner et guérir. Son traitement impose l'association de différents antibiotiques ayant des mécanismes d'actions différents (Bactéricide, bactériostatique) compte tenu de l'apparition de résistances pour toutes les molécules utilisées individuellement. Il existe plusieurs régimes thérapeutiques. Le régime standard d'une durée de 6 mois est recommandé pour le traitement de la TB à souche sensible. Il associe 4 médicaments avec 2 phases dans le traitement. Une première phase appelée phase d'initiation (agressive ou intensive) consiste à associer 4 médicaments, l'isoniazide (H), la rifampicine (R), la pyrazinamide (Z) et l'éthambutol (E) pendant 2 mois suivi une phase de continuation d'une durée de 4 mois avec les deux médicaments majeurs (H et R) du traitement de la TB (**WHO, 2009**). Ce régime est également celui utilisé au Burkina Faso. En cas de retraitement suite à un échec du premier traitement ou une rechute, le régime standard recommandé par l'OMS associe la streptomycine (S) aux autres

médicaments de première ligne dans un traitement d'une durée de 8 mois : 2 mois de HRZES, 1 mois de HRZE et 5 mois de HRE (WHO, 2009 ; PNT, 2016).

Lorsqu'une TB-MDR/RR est confirmée, on a recours à des antituberculeux de seconde ligne qui sont moins efficaces et plus toxiques que les antituberculeux de première ligne. De plus, la durée du traitement est rallongée. Les antituberculeux de seconde ligne les plus utilisés sont : les aminoglycosides, les fluoroquinolones, l'acide p-aminosalicylique, les thioamides (Caminero *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006). Au Burkina Faso, le régime thérapeutique standard de seconde ligne est le suivant: neuf mois dont 4 mois de phase intensive avec Pyrazinamide (Z), Prothionamide (Pto), Kanamycine (Km), Moxifloxacine (Mfx), Ethambutol (E), Clofazimine (Cfz), Isoniazide à Haute dose (H_{haute dose}) et 5 mois de phase de consolidation avec Pyrazinamide (Z), Moxifloxacine (Mfx), Ethambutol (E), Clofazimine (Cfz). D'autres régimes particuliers ou personnalisés existent comme le cas des femmes enceintes, certains cas contacts des patients TB, les personnes porteuses du VIH et les résistances particulières (WHO, 2016 ; Falzon *et al.*, 2017).

VII. Prophylaxie

V.II.1 Vaccination par le B.C.G

La mise au point du BCG entre 1908 et 1921 à l'Institut Pasteur de Lille demeure le seul vaccin antituberculeux disponible et reste le plus utilisé dans le monde (Locht, 2008). Il confère une protection chez les enfants contre les formes graves de TB (milliaire, extrapulmonaire ou méningée près de 90% d'efficacité) mais est moins efficace pour les formes pulmonaires qui sont les plus fréquentes (Colditz *et al.*, 1994). Le vaccin n'empêche pas la survenue d'une primo-infection tuberculeuse ou la réactivation d'une TB pulmonaire latente (WHO, 2004).

V.II.2. Chimio-prophylaxie par l'isoniazide

La chimio-prophylaxie par l'isoniazide (H) consiste à donner à un individu à risque de faire la tuberculose maladie, de l'isoniazide tous les jours pendant six mois. Ceci lui évite de développer une tuberculose maladie lorsqu'il s'infecte ou lorsqu'il héberge des BK quiescents. Elle est recommandée pour certains groupes de sujets infectés comme les nourrissons, les adolescents et les immuno-déprimés (PNT, 2016).

V.II.3. Amélioration des conditions socio-économiques

Elle constitue un facteur non négligeable dans la régression de la tuberculose qui est une affection de la misère et du manque d'hygiène. Sa régression en Occident avant même la découverte des premiers médicaments antituberculeux en 1944 en est la preuve **(PNT, 2016)**.

V.II.4. Education pour la santé

Le simple fait d'adopter une hygiène de la toux par la communauté (ne pas tousser dans le visage de son vis-à-vis, tousser toujours dans un mouchoir, ne pas cracher à terre...) peut réduire la densité des particules contagieuses dans l'air et par conséquent, diminuer la transmission du bacille. L'éducation pour la santé, lorsqu'elle utilise des messages adaptés, des techniques de communication adéquates, peut amener à long terme les populations à adopter des comportements moins néfastes à la santé **(PNT, 2016)**.

CHAPITRE 3: MATERIEL ET METHODES

I. Cadre et sites d'étude

L'étude s'est déroulée dans la ville de Bobo-Dioulasso, chef-lieu de la région des Hauts-Bassins au Burkina-Faso. Le Burkina-Faso est un pays situé en Afrique de l'Ouest dans la boucle du Niger. Il s'étend sur une superficie de 272 960 km² (Source IGB2012 BNDT). Sa population a été estimée à 19 632 147 habitants en 2017. C'est un pays en développement avec environ 40% de la population qui vit en dessous du seuil absolu national de pauvreté estimé à 154061 Fcfa. L'agriculture et l'élevage constituent les principales activités économiques (sources PNDES, 2016-2020 ; Plan stratégique TB). Le pays dispose d'un PNT qui coordonne 106 Centres opérationnels de microscopie et centres de Diagnostic et de Traitement de la tuberculose (CDT) répartis dans les 13 régions sanitaires. Les CDTs sont intégrés dans des circonscriptions médicales appelées Centre Médical avec Antenne chirurgicale (CMA). Dans le sens du bas vers le sommet de la pyramide du système de santé, le CMA est un centre de soins intermédiaires avant les hôpitaux : Centre Hospitalier Régional (CHR) et le Centre Hospitalier Universitaire (CHU) en dernier. Le PNT s'appuie sur le Centre Régional de Lutte Anti-Tuberculose (i.e CRLAT) pour ses différentes activités dans la région des Hauts-Bassins. A côté de ces structures, il y a les deux Centres de Pneumo-physiologie des deux CHUs à savoir le CHU Yalgado Ouédraogo (CHUYO) et le CHU Sourô Sanou (CHUSS). Ces derniers prennent en charge les cas de tuberculose multirésistante (MDR-TB) et autres formes très graves de tuberculose.

Le cadre opérationnel de l'étude était constitué de 6 sites (**figure 15**). Un site coordonnateur, l'Unité de Recherche des Mycobactéries du Centre MURAZ qui a assuré une grande partie des travaux de laboratoire. Les 05 autres sites qui ont effectués le recrutement des patients, la collecte des données sociodémographiques et cliniques ainsi que la collecte et le transfert des expectorations au centre MURAZ étaient représentés par les CDTs des districts sanitaires de Dafra, Dandé, Houndé, et les centres spécifiques tel que le CRLAT et le CHUSS.

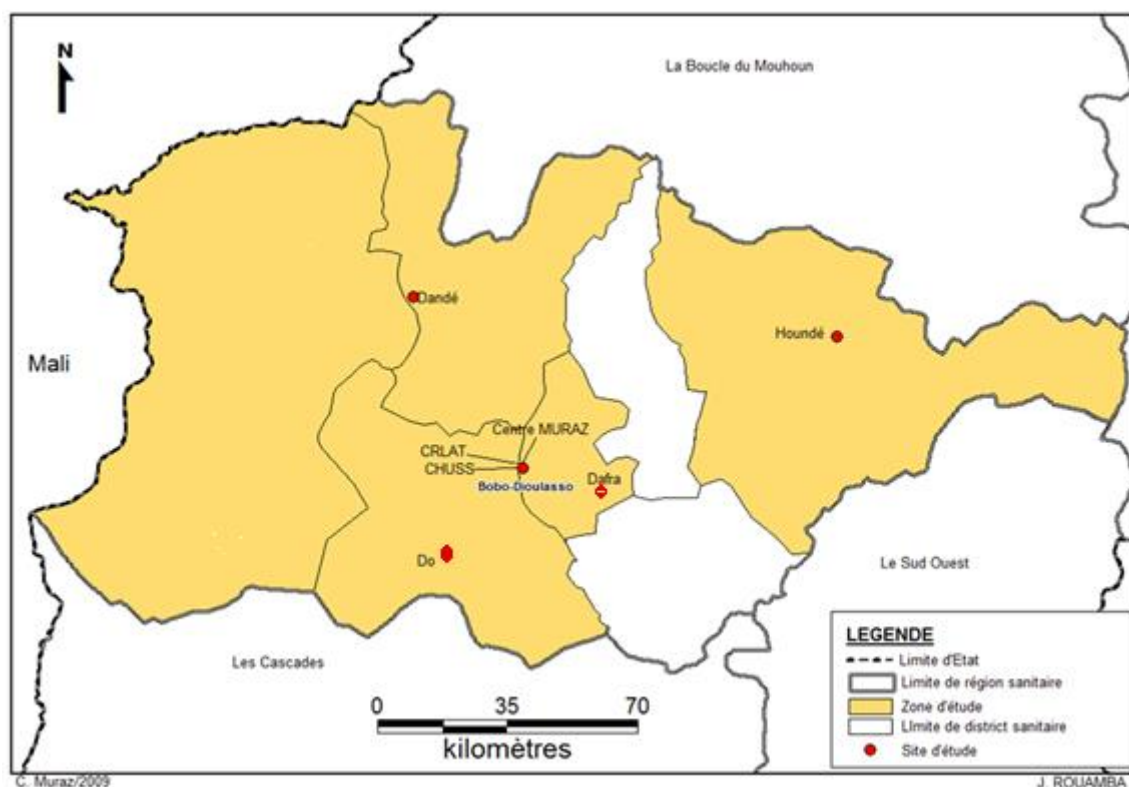


Figure 15 : Carte des sites d'évaluation de l'étude.

II. Population et période d'étude

La population d'étude était constituée des cas de tuberculose confirmée bactériologiquement, ou diagnostiquée cliniquement au cours de l'étude DYTRAVIHT (parties 1 et 2), et des cas suspects dépistés négatifs ou positifs (partie 3) ayant fréquentés les différents sites au cours de la période d'étude. L'étude s'est déroulée entre Mars 2011 et Février 2013 pour les parties 1 et 2 de l'étude ; et entre Février 2016 et Mars 2017 pour les parties 3 et 4 de l'étude.

III. Critères d'inclusion et de non inclusion

III.1. Critères d'inclusion

Les patients de l'étude ont été recrutés parmi les cas suspect de tuberculose selon les critères suivants :

- être âgé de 15 ans ou plus,
- être un cas de tuberculose confirmé bactériologiquement (TCB) (parties 1, 2 et 3),
- ou un cas de tuberculose diagnostiqué cliniquement (TDC) (parties 1 et 2),
- être un cas suspect dépisté négatif (partie 3),
- avoir consenti à participer à l'étude (1, 2, 3 et 4).

III.2. Critères de non inclusion

- cas de tuberculose pulmonaire ne souhaitant pas participer à l'étude,
- cas d'incapacité d'émission des expectorations,
- cas de tuberculose extra pulmonaire,
- nouveau cas de tuberculose pulmonaire ayant débuté un traitement.

IV. Echantillonnage et inclusion des patients

IV.1. Echantillonnage

Les patients soumis au dépistage de la tuberculose durant les périodes des différentes études dans les différents sites ont été inclus de manière successive lorsque ceux-ci consentaient à participer aux études.

IV.2. Inclusion des patients

D'une manière générale, dès qu'un patient a été dépisté et remplissait les critères d'inclusions, l'infirmier du site concerné l'informait de l'étude (cf. annexes1), recueillait son consentement et si applicable, lui administrait un questionnaire standardisé permettant de recueillir ses données sociodémographiques et cliniques (cf. annexe 2). Le consentement à participer à l'étude incluait un accord pour l'utilisation des expectorations fournies lors du dépistage.

V. Recueil, conservation et acheminement des expectorations au laboratoire de Mycobactériologie.

Les recueils d'expectorations ont été réalisés selon le guide technique du PNT basé sur les recommandations de l'OMS (**PNT, 2011**). En résumé, deux échantillons d'expectorations ont été demandés à tous les cas suspects de tuberculose. Le premier échantillon a été recueilli sous la supervision des technologistes biomédicaux (TBM) le jour-même de la consultation et le deuxième a été recueilli le lendemain au petit matin par le patient qui le rapporte au laboratoire. Pour les contrôles, un seul échantillon matinal a été recueilli par le patient directement au laboratoire. Les expectorations ont été collectées dans des pots spéciaux (crachoirs) avec bouchons à vis, prévus pour la collecte (**figure 16**). Les formations sanitaires dépourvues de plateau technique pour la microscopie et dont les patients ne peuvent pas être référés dans les sites d'étude, ont collecté les échantillons d'expectorations et les y ont acheminés, accompagnés d'une fiche d'envoi des échantillons et des bulletins d'examen (**PNT, 2011**).



Figure 16: Crachoir stérile avec bouchons à vis.

La méthode de collecte a consisté à mettre le malade en confiance, et a lui expliqué le motif de l'examen, la manière d'utiliser le crachoir et surtout la manière de recueillir les expectorations. Techniquement, celles-ci sont ramenées des bronches par un effort de toux vigoureux précédé d'une inspiration profonde. La qualité et la quantité (2-5ml) des expectorations ainsi qu'une fermeture hermétique des bouchons à vis des crachoirs ont été contrôlées à la réception des échantillons. Ceux-ci ont été étiquetés en mentionnant la date de recueil, le numéro d'enregistrement et lettre de série A pour un seul échantillon, A ou B si deux échantillons sont concernés).

La fiche de collecte 2 comprenant des informations sur les données de laboratoire (date, site et numéro d'inclusion, résultats de la microscopie...) ont été renseignés (cf. annexe 3).

Sur place dans les sites, une fois l'examen microscopique réalisé sur les échantillons d'expectorations recueillis (crachats A et B), ceux-ci ont été acheminés à l'aide de glacière munie de sachets réfrigérants à l'unité de recherche des mycobactéries du Centre MURAZ. Lorsque le transfert était différé, les expectorations étaient conservées au réfrigérateur entre +4 et +8°C si cela était possible. Il était souhaitable que ce délai n'excède pas 3-4 jours selon les recommandations de l'OMS, et le plutôt possible selon le PNT (Rieder, 2007 ; PNT, 2011). Les échantillons transférés étaient accompagnés des fiches de collectes renseignés, et le cas échéant d'une liste récapitulative des échantillons envoyés.

VI. Analyses des échantillons d'expectorations au laboratoire

VI.1 Préparation des milieux de culture de L-J

La préparation des milieux de culture de L-J est une étape importante de la culture des mycobactéries. Elle se fait en deux jours. La procédure complète est annexée à ce document (cf. annexe 4). Les points critiques de la préparation d'un volume de 1600 ml de milieux correspondant à 600 ml de milieu de base et 1000 ml d'œufs entiers battus (environ 25 œufs) sont résumés dans ce présent paragraphe.

Le premier jour, dans un ballon stérile de 3 litres, 37,2 g de milieu de base de LJ est mise en solution dans de 600 ml d'eau distillée stérile contenant 12 ml de glycérol. Le mélange obtenu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 15 minutes puis est refroidi et gardé au réfrigérateur entre +4 et +8°C. Le matériel nécessaire pour le 2^{ème} jour de préparation (bêchers éprouvettes ballons à fond plat, des tubes à essai en verre...) a été stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 20 min après nettoyage. Le nettoyage des tubes à essai de 22mm suit un protocole spécifique. La désinfection des œufs consiste à les tremper dans l'eau pendant 30 minutes à les laver puis à les tremper dans de l'alcool à 90°C pendant une nuit entière.

Le deuxième jour, les œufs sont retirés de l'alcool puis cassés l'un après l'autre jusqu'à atteindre un volume de 1000 ml. Ils sont ensuite mixés et versés aseptiquement dans le ballon contenant le milieu de base de L-J. Ce mélange est ensuite distribué dans l'obscurité sous PSM (Poste de sécurité microbiologique) dans les tubes à essai avec bouchon à vis qui sont ensuite coagulés dans le friocell en position inclinée pendant 45 minutes à 85°C. Les milieux ainsi obtenues, représentés par la **figure 17**, ont été conservés au réfrigérateur à + 4 °C. Pour le milieu L-J enrichi au pyruvate, le milieu de base préparé sans glycérol (300 ml) est additionné à 500 ml d'œufs complet mixé et une quantité adéquate de solution de pyruvate à 20% est ajoutée stérilement au milieu de L-J avant la coagulation.

La qualité des milieux de L-J préparés est évaluée par observation macroscopique (couleur, consistance). La stérilité des milieux préparés est testée par incubation d'un échantillon du lot préparé pendant environ une semaine à 37°C. Lorsqu'un nouveau lot de milieu de base est entamé un test de viabilité des mycobactéries sur les milieux est réalisé par inoculation de la souche H37Rv ou la souche du BCG si cela était possible.



Figure 17: Milieux de Lowenstein Jensen coagulés, disposés sur des clayettes (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ).

VI.2. Biosécurité

Comme le prévoit la recommandation de l'OMS pour les laboratoires des à ressources limitées qui pratiquent la culture de mycobactéries (IUATLD ; 2007), nous avons réalisé les cultures des expectorations ainsi que la caractérisation des contaminants sous un poste de sécurité microbiologique de classe II type A2 (PSM II) (**figure 18**). Dans cette même logique, le port des Equipements de Protection Individuel (EPI : blouse, gants et masques de protection N95 ou FFP2 contre les aérosols) était obligatoire (**figure 18**). Les déchets infectieux (pipettes, cônes, tubes Falcon etc...) étaient d'abord décontaminés dans un bocal contenant de l'eau de Javel dilué à 10% pendant 24h puis autoclavé sà 121°C pendant 20 minutes. Les tubes de cultures, les suspensions bacillaires et les boites de Pétries usagers ont été collectés dans des sachets autoclavables puis transférés à la stérilisation pour y être détruits par autoclavage. La stérilisation du PSM est assurée par des lampes U.V. en fin de journée. Enfin, le laboratoire était décontaminé par fumigation au formaldéhyde environ tous les trois mois.

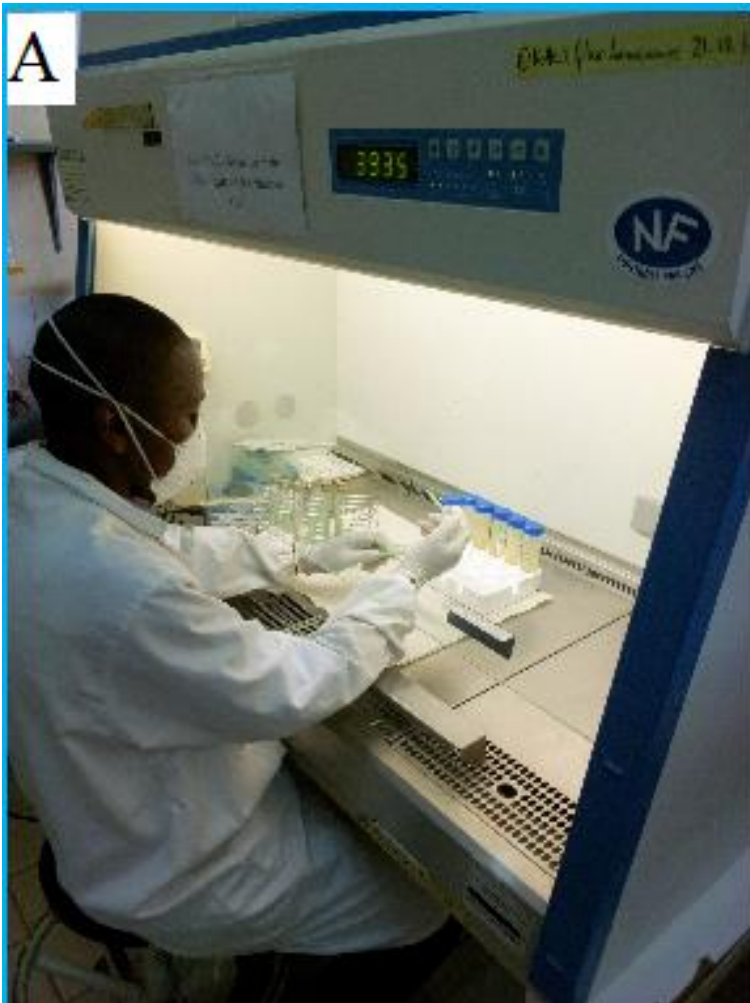


Figure 18: Technologiste biomédicale inoculant les milieux de L-J sous un poste de sécurité microbiologique de classe II et portant les équipements de protection Individuelle (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ).

VI.3. Mise en culture des expectorations

VI.3.1. Décontamination des expectorations

La méthode de Petroff modifié à été utilise pour la decontamination. Il s'agissait d'effectuer en mélangeant dans un tube Falcon stérile de 50 ml (**figure 19A**) un volume égal d'expectoration et de solution de NaOH à 4 %. Ce mélange est placé dans un agitateur de Khan (**figure 19B**), et incubé à température ambiante sous agitation pendant 20 minutes à température ambiante. La soude est ensuite neutralisée par l'ajout de 40 ml d'eau distillée stérile au mélange expectorations-soude puis centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée (**figure 19C**) à 3000tr/mn pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé délicatement à la fin de la centrifugation dans un bocal contenant de l'eau de Javel non dilué. Ce processus de neutralisation de la soude est répété 2 fois et enfin, le culot obtenu

à la dernière centrifugation est remis en suspension avec 1ml d'eau distillée stérile à l'aide de pipette pasteur stérile (**figure 19D**) pour l'inoculation des milieux de culture.

S'agissant la procédure de décontamination par la méthode à l'acide oxalique, la soude était remplacée par une solution d'acide oxalique à 5%.

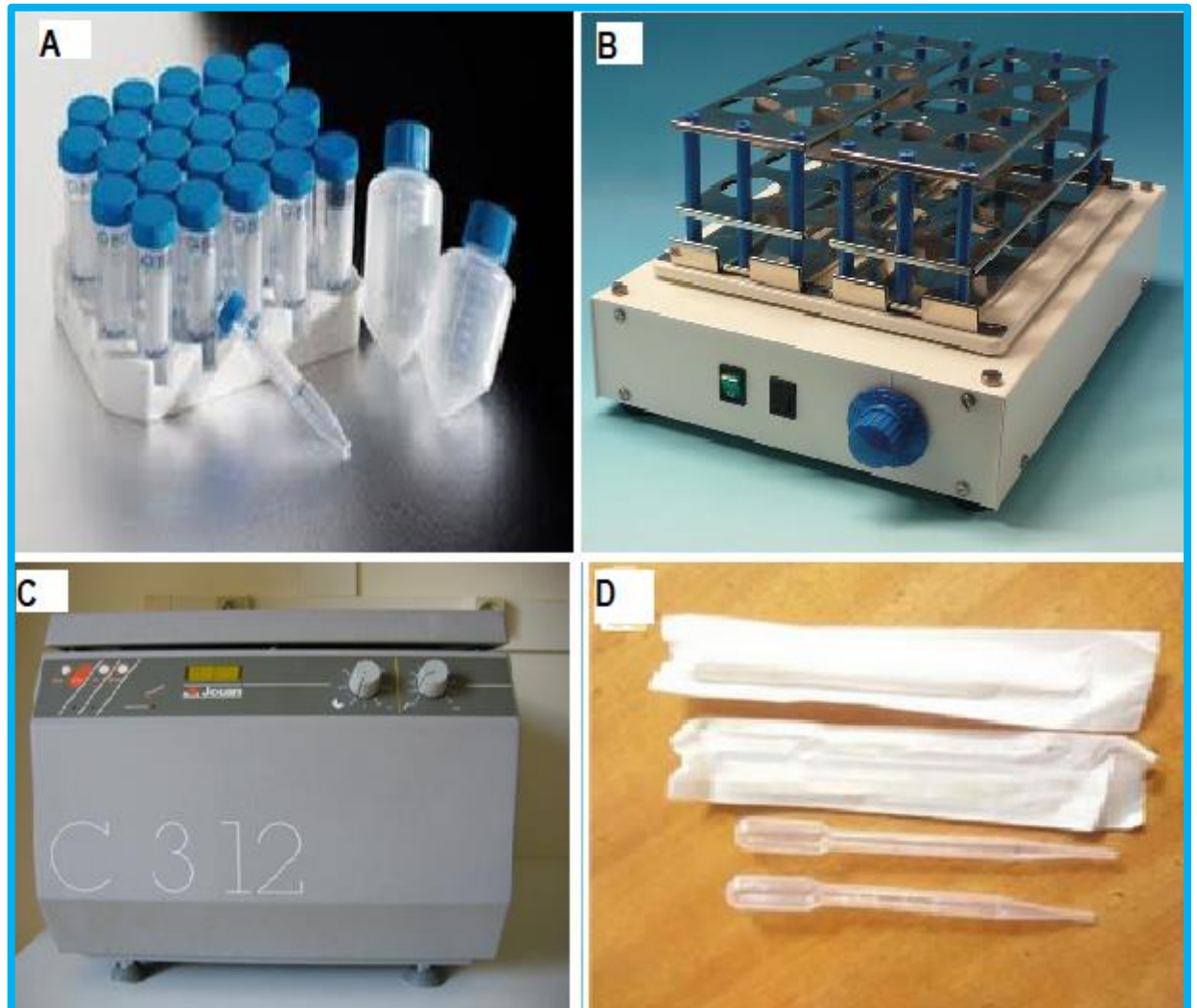


Figure 19: Consommables et petits équipements de laboratoire utilisés dans le processus de mise en culture (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ).

(A) Tubes Falcon stériles ; (B) Agitateur de Khan ; (C) Centrifugeuse réfrigérée ; (D) Pipettes pasteur stérile

VI.3.2. Inoculation des culots de décontamination et examen des cultures

Deux tubes de milieu ordinaire de L-J plus 2 tubes de milieu de L-J enrichi avec 2% (Partie 1 et 2) ou 5% (partie 3) de pyruvate ont été inoculés à raison de deux à quatre gouttes par tube pour chaque culot de décontamination. Les bouchons des tubes des milieux inoculés sont vissés à moitié,

placés en position inclinée sur les clayettes (**figure 20A**) et incubés à l'étuve (**figure 20B**) à une température de 37°C. Les cultures sont ensuite examinées au troisième et au septième jour (J3 et J7), à la recherche surtout des contaminations. Les critères d'une culture contaminée étaient les suivants : i) tout changement de couleur ou de consistance du milieu, ii) toute liquéfaction du milieu de culture iii) et/ou la présence confirmée par coloration au ZN de colonies autre que des mycobactéries. Elles sont enfin examinées une fois par semaine pendant 90 jours à la recherche de cultures positives. Après le 90^{ème} jour les cultures ont été considérées comme étant négatives lorsqu'aucune colonie de mycobactérie n'a été observée.

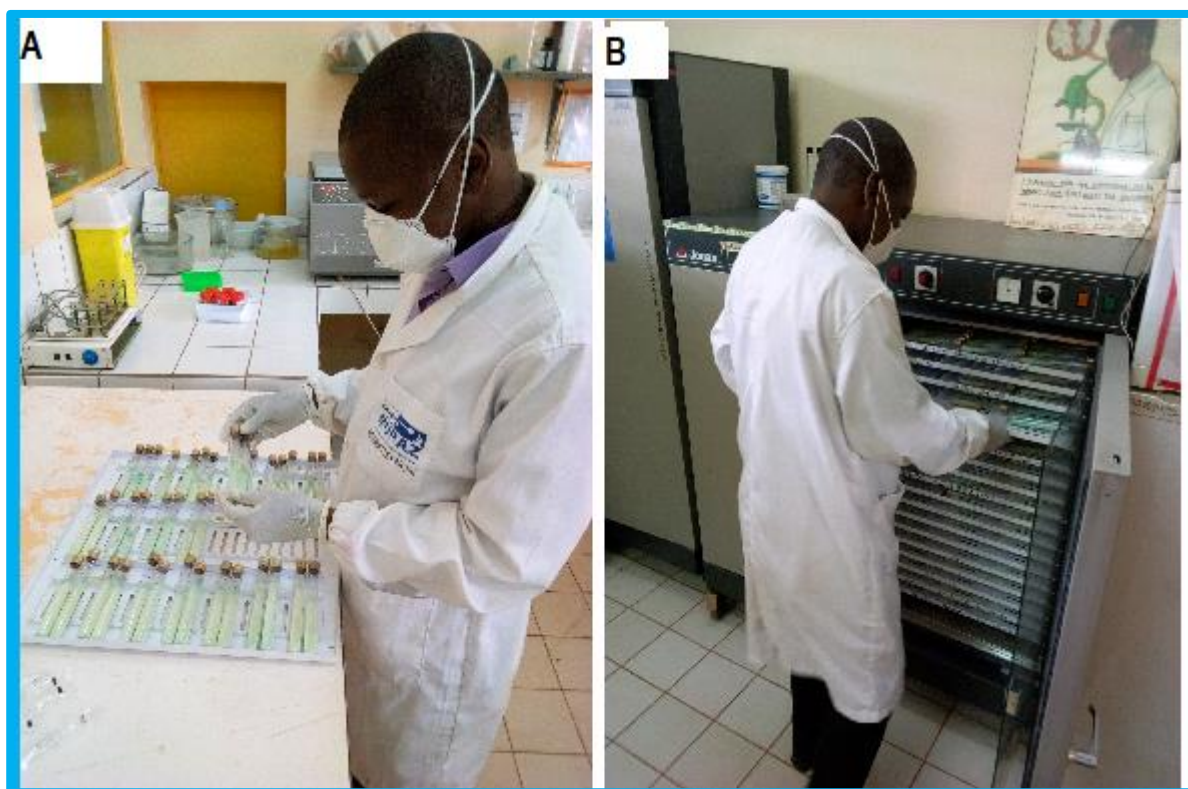


Figure 20: Quelques étapes de l'inoculation des milieux de culture (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ).

(A) Technologiste biomédical (TBM) placant en position inclinée les milieux inoculés et les tubes à moitiés dévisés sur les clayettes.

(B) TBM rangeant les clayettes chargées de milieux inoculés dans l'étuve.

VI.3.3. Contrôle de qualité des cultures

Afin de maîtriser les contaminations des cultures liées aux conditions analytiques au laboratoire, les cultures ont été réalisées sous un PSM II qui préserve les expectorations des contaminations. Des contrôles de qualité interne ont été mis en œuvre, notamment, l'eau distillée et

les solutions de décontamination utilisées lors de l'étape de la culture ont été stérilisées par autoclavage à 121°C pendant 15mn. La stérilité de l'eau était contrôlée par inoculation dans les tubes de milieu de L-J lors des cultures à la recherche de contaminations éventuelles. Pour les solutions de décontamination, l'absence de turbidité était recherchée à l'usage. Aussi, des consommables stériles ont été utilisés (Tubes Falcon de 50 ml, pipettes pasteurs, cônes etc...). Le laboratoire était également soumis au contrôle de qualité extrême du PNT pour la microscopie et de la National Health Laboratory Service (NHLS) pour la microscopie et la culture des mycobactéries.

VI.4. Considérations éthiques

Les parties 1 et 2 de notre recherche sont des études ancillaires de l'étude DYTRAVIHT. Cette étude a reçu un avis favorable du comité d'éthique institutionnel du Centre MURAZ avant sa mise en œuvre (Avis N° 049 du 7 Juillet 2010). Le protocole « Effet d'un bain de bouche antiseptique à base de la Chlorhexidine sur les contaminations de cultures des mycobactéries », (parties 3 et 4 de nos travaux) a été également approuvé par le comité d'éthique institutionnel du Centre MURAZ (Avis N° 2017-03/MS/SG/CM/CEI). Nos travaux ont été exécutés dans le strict respect des bonnes pratiques de recherche clinique et biologique, en accord avec la déclaration d'Helsinki. Les patients ont été informés de l'étude par une note d'information. Le consentement de chaque patient inclu a été recueilli (Cf. annexe 4). Tous les patients inclus ont été identifiés par un numéro d'anonymat. IL n'y'avait pas de risque particulier à participer à ces études. Néanmoins, il était prévu une prise en charge pour la gestion d'éventuels effets indésirables liés à l'utilisation du bain de bouche.

CHAPITRE 4: RESULTATS ET DISCUSSIONS

Partie1 relative à l'article 4

Titre : « Comparaison de deux méthodes de décontamination des expectorations pour la culture des mycobactéries au Burkina-Faso : Acide oxalique5% *versus* NaOH 4% ».

Article I

« Comparaison de deux méthodes de décontamination des expectorations pour la culture des mycobactéries au Burkina-Faso : Acide oxalique 5% vs NaOH 4% ». (Accepté pour publication dans la revue Africaine de Biologie Médicale).

I. Introduction

Le diagnostic par culture de la tuberculose pulmonaire comprend nécessairement une étape de décontamination. Cette décontamination a pour objectif d'éliminer les microorganismes contaminants tout en préservant les mycobactéries. Elle tire profit de la capacité des mycobactéries à résister aux acides, aux bases ou à d'autres agents antibactériens. De nombreuses procédures de décontamination ont été développées et évaluées dans le monde entier, sans qu'il y ait une preuve incontestable de la supériorité de l'une d'entre elle (**Narvaiz de Kantor et al., 1998 ; Zingué et al., 2013**). De ce fait, il est essentiel que chaque laboratoire choisisse et adopte après évaluation les méthodes de décontamination qui sont appropriées et qui par ailleurs lui confère un taux de contamination inclus dans les fourchettes acceptables (**Narvaiz de Kantor et al., 1998**).

Au Burkina Faso, comme dans la plupart des PRLs, la méthode de décontamination à l'hydroxyde de sodium à 4 % appelé « méthode modifiée de Petroff » est largement utilisé dans les laboratoires car accessible et simple d'utilisation. (**Rieder et al., 2007**). Cependant, au cours des études PNT et DYTRAVITH, nous avons été confrontés à des taux de contaminations élevés de l'ordre de l'ordre de 25-45% (Données non encore publiées). Dans notre contexte de travail, il était donc nécessaire d'identifier une autre méthode de décontamination plus efficace. En effet, avec une concentration de l'hydroxyde de sodium à 4% (concentration limite recommandée) (**Rieder et al., 2007**), nous aboutissons toujours à des taux de contaminations élevés. Celle à l'acide oxalique à 5 %, qui est recommandée pour le recouvrement des mycobactéries à partir de spécimens fortement contaminés tel que ceux contenant des espèces comme le *Pseudomonas* (**Narvaiz de Kantor et al., 1998 ; Cadmus et al. 2011**), constituait donc le candidat idéal à tester.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer la méthode de décontamination modifiée de Petroff (4% NaOH) versus celle de l'acide oxalique à 5% pour la réduction des taux de contaminations et l'amélioration du taux de recouvrement des cultures de mycobactéries au Burkina Faso.

II. Matériel et Méthodes

II.1. Type d'étude

Nous avons réalisé une étude d'évaluation qui compare les taux de contaminations et de recouvrement des cultures obtenues après décontamination par la méthode modifiée de Petroff et celle de l'acide oxalique à 5%.

Deux types d'expectorations appartenant à 76 patients atteints de tuberculose bactériologiquement confirmée ont été utilisés. Le premier type a concerné des expectorations fraîchement collectées au niveau du CRLAT entre novembre 2012 et février 2013 puis transférées au Centre MURAZ, où elles ont été stockées entre 4 °C et 8°C avant d'être traitées dans un délai n'excédant pas trois jours. Le deuxième type d'échantillon était des restes d'expectorations dont les cultures après décontamination par la méthode modifiée de Petroff avaient été contaminées. Elles avaient été conservées au congélateur à -20°C durant l'étude DYTRAVITH entre mars 2011 et février 2013 après une primoculture contaminée. Les échantillons ont été décongelés si nécessaire, mis en suspension à l'aide d'un vortex et repartis dans deux tubes pour les deux types de décontaminations. La présence de BAAR dans les expectorations a été confirmée par l'observation au microscope de frottis colorés au ZN.

II.2. Cultures des expectorations et identification des mycobactéries

La décontamination des expectorations, la mise en culture ainsi que l'examen des cultures ont été réalisés tels que décrits précédemment dans le chapitre 3 (cf. paragraphe VI .3.) Les isolats ont été identifiés à partir des tests biochimiques : test de niacine, test de nitrate réductase et test de catalase à 22°C et 68°C.

II.3. Analyse des données

Les données ont été saisies et vérifiées sous Windows Excel 2007 puis analysées à l'aide de STATCALC d'Epi-Info 7. Le test de comparaison de deux échantillons appariés a été utilisé pour déterminer la différence entre les proportions de contamination et le taux de recouvrement des mycobactéries. Le seuil de significativité statistique était de 5%.

III. Résultats

Au total, 76 patients atteints de tuberculose bactériologiquement confirmée ont fourni 76 échantillons d'expectorations dont 33 étaient fraîches et 43 avaient été congelés. Les résultats de la culture sont résumés dans le tableau (**tableau 7**). Il y avait une différence significative entre les

proportions des cultures contaminées et celle non contaminées (p= 0.001). Respectivement 31 (41 %) et 12 (16 %) échantillons avaient des cultures positives après une décontamination par la méthode à l'acide oxalique et par celle au NaOH à 4%. Nous avons constaté que 10 échantillons (13 %) ont été contaminés après décontamination par la méthode à l'acide oxalique, tandis que 62 (82 %) ont été contaminés après traitement par la méthode de Petroff modifiée (**tableau 7**). Les isolats de mycobactéries obtenues à partir des cultures positives après décontamination par les deux méthodes appartenaient tous au MTBc avec un test de production de niacine et de réduction de nitrate positifs et un test de catalase thermostable négatif.

Tableau 7 : Résultats des cultures selon les différentes méthodes de décontaminations

| Méthodes de décontamination | | Pétroff modifiée | | | Oxalic Acide oxalique 5% | | | Ch2 | p | |
|-------------------------------|---------------------------------|------------------|-----------|-------------|--------------------------|-----------|-------------|----------|----|-------|
| | | Fraîches | congelées | Total N (%) | Fraîches | congelées | Total N (%) | | | |
| Types d'expectorations | | | | | | | | | | |
| | Cultures non contaminées | Pos | 12 | 0 | 12 (16%) | 21 | 10 | 31 (41%) | 72 | 0,001 |
| | | Nég | 2 | 0 | 2 (3%) | 6 | 29 | 35 (46%) | | |
| | Total | 14 | 0 | 14 (18%) | 27 | 39 | 66 (87%) | | | |
| Cultures contaminées | | | | | | | | | | |
| | | | 19 | 43 | 62 (82%) | 6 | 4 | 10 (13%) | | |
| | Total | 33 | 43 | 76 (100%) | 33 | 43 | 76 (100%) | | | |

N = Nombre ; % = pourcentage

IV. Discussion

La culture des expectorations est importante pour les programmes de lutte contre la tuberculose, car elle permet l'isolement des souches de mycobactéries nécessaires pour l'identification des MTBc et la réalisation des tests de sensibilité aux antituberculeux. Mais la culture est entravée par des taux de contaminations élevés dus aux microorganismes charriés par les expectorations lors du recueil.

Cette étude visait à évaluer les méthodes modifiée de Petroff et de l'acide oxalique à 5 % pour la décontamination des expectorations et le recouvrement des cultures. Globalement, la décontamination par la méthode de l'acide oxalique a montré un taux de contamination inférieur à celle de Petroff modifiée. Toutefois ce taux était supérieur aux taux acceptables indiquant la nécessité de poursuivre les investigations en vue d'apporter les améliorations idoines. En effet, selon les recommandations, nos résultats signifient que la décontamination n'était pas assez forte et qu'il était nécessaire de l'améliorer en augmentant soit la concentration du décontaminant soit le temps de contact de celui-ci (**Rieder et al., 2007**). Mais paradoxalement, le taux de culture négative avec l'acide oxalique était supérieur aux taux acceptables (fraîches : 18 %, congelées : 67 %; fourchette cible : 1 à 3 %), ce qui signifiait que cette méthode de décontamination était déjà trop forte. Elle ne peut donc pas être renforcée et apparait de ce fait inappropriée dans nos conditions de laboratoire. Ce paradoxe, à suscité dans notre laboratoire l'intérêt de l'évaluation d'autres facteurs pouvant influencer les contaminations des cultures, tels que les facteurs pré analytiques.

Néanmoins, la décontamination par l'acide oxalique a montré un meilleur recouvrement des Mycobactéries (expectorations Fraîches : +18 points ; expectorations congelées : +10 points) par rapport à la méthode de Petroff modifiée. Pour cette raison, elle pourrait être une méthode alternative en attendant qu'une méthode plus appropriée soit testée validée et applicable. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des expectorations fraîches, confirmant les recommandations de l'OMS selon lesquelles il était important pour le diagnostic de la tuberculose d'utiliser un spécimen frais plutôt que conservés (**Rieder et al., 2007**).

V. Conclusion

Nos résultats suggèrent que l'acide oxalique pourrait être une méthode de décontamination alternative à celle de Petroff modifiée puisqu'il permet d'améliorer le recouvrement des mycobactéries à partir des expectorations fraîches et congelées. Cependant des facteurs en amont de la culture, pouvant influencer les contaminations doivent être évalués.

Partie 2 relative l'article 1

Titre : « Analyse de l'influence des facteurs pré-analytiques température et durée de conservation des expectorations sur les contaminations de cultures de mycobactéries ».

Article 2

Kaboré A, Hien H, Sanou A, Zingué D, Daneau G, Ganamé Z, et al. Impact of pre-analytical factors on mycobacterium cultures contaminations rates in Burkina Faso, West Africa. *Pan Afr Med J* 2014; 19:39.

I. Introduction

Au Burkina Faso comme dans la plus part des PRLs, la qualité du diagnostic de la tuberculose pulmonaire par la méthode de la culture est hypothéquée par de fortes proportions de contamination. En effet, au cours de l'étude PNT et DYTRAVITH pour lesquelles l'hydroxyde de sodium à 4% a été utilisé comme décontaminant, nous avons observé des taux de contaminations de culture des mycobactéries d'environ 50% et 25% respectivement. Ces alarmants taux de contaminations ont motivé l'évaluation sans grand succès de la méthode de décontamination par l'acide oxalique (cf. partie 1) par rapport à la méthode modifiée de Petroff et suscité l'évaluation des facteurs préanalytiques

En effet, des facteurs pré analytiques tels que la condition de collecte, la température de conservation et de transport des expectorations ainsi que la durée de conservation des expectorations avant la mise en culture peuvent contribuer à augmenter les proportions de contamination des cultures par les germes commensaux (**Paramasivan et al., 1983, Maciel et al., 2009, Muzanye et al., 2009 ; Kalema et al., 2012**). Ainsi, pour limiter le risque de contamination des cultures, l'OMS et le PNT recommandent pour les expectorations qui ne peuvent pas être traité immédiatement, une conservation au frais (4 °C et 8 °C) et un court délai entre le recueil et le traitement des expectorations (3 jours en générale ,7 jours pour les PRLs, le plutôt possible selon le PNT) (**WHO, guidelines on Standard Operating Procedures for MICROBIOLOGY, PNT, 2011**). Cependant, au Burkina Faso, nous avons connaissance de la non-application des recommandations concernant les conditions de conservation des expectorations, mais nous en ignorions son niveau réel et son impact sur les contaminations des cultures.

L'objectif de cette étude était de déterminer, le niveau d'application des recommandations sur la température et la durée de conservation des expectorations avant leurs mises en culture et de déterminer l'association de ces facteurs aux contaminations de cultures des expectorations destinées au diagnostic de la tuberculose pulmonaire.

II. Matériel et méthodes

En marge de l'étude DYTRAVIHT, entre mars 2011 et février 2013 nous avons réalisé une étude descriptive, portant sur 427 patients TCB et TDC. Les échantillons d'expectorations ont été collectés de manière successive au CRLAT au CDT de Dafra, Dandé, Houndé et le PPH du CHUSS précédemment décrits dans le chapitre 3 (cf. Paragraphe I).

Les données concernant les modes de conservation et de transport des expectorations ont été collectées à l'aide d'un questionnaire dans les sites d'études. Les expectorations collectées ont été conservées soit dans des réfrigérateurs soit à température ambiante. L'estimation de la température

(ambiante) moyenne minimale a été de 22°C et celle de la moyenne des maximale de 34°C compte tenu de l'absence d'air conditionnée et du système de ventilation qui ne fonctionne que quelques heures dans la journée (données de la Direction Générale de la Météorologie ; DGM).

Les données sur les conditions de transfert (avec ou sans sachets réfrigérants) ainsi que les délais entre la collecte des expectorations et leurs mises en culture ont été déterminé à partir des registres du laboratoire au Centre MURAZ.

Les expectorations ont été décontaminées et mises en culture selon les méthodes décrites dans le chapitre 3 (cf. paragraphe VI.3.). Le pourcentage des expectorations conservées au réfrigérateur et celles conservées à température ambiante ont été déterminés, ainsi que le pourcentage des expectorations traitées dans les délais acceptables compris entre zéro et trois jours après la collecte et celles traitées entre quatre et sept jours et plus de sept jours après la collecte.

La version 12.1 du logiciel stata (Stata Corp., College Station, TX, USA) a été utilisée pour l'analyse des données. Le test KHI2 de Pearson a été utilisé pour comparer les différentes proportions de contamination et une régression logistique pour déterminer l'association des facteurs température et durée de conservation des expectorations aux contaminations de culture. Une p value <0,05 était considérée comme statistiquement significative avec un intervalle de confiance à 95%.

III. Résultats

III.1 Caractéristiques de la population d'étude

Au total, sur les 427 patients (dont 65 TDC) inclus dans l'ensemble des 5 sites, 23 ont été exclus de l'analyse parce que leurs cultures n'ont pas été réalisées au centre MURAZ. L'analyse a donc été effectuée sur 404 patients parmi lesquels 27,23% (110) étaient des femmes dont l'âge moyen était de 38ans (extrêmes : 15ans -75ans) et 72,77% (294) étaient des hommes dont l'âge moyen était de 41 ans (extrêmes : 15 ans -90ans). Sur 404 cultures réalisées, 24% (97) ont été contaminées, 69% (279) ont été positives et 7% (28) ont été négatives. Parmi les cultures positives, 6,4% (26) étaient des microscopies négatives au ZN, et parmi les expectorations dont les cultures étaient négatives, 1,2% étaient positives à la microscopie après coloration au ZN. Pour le cas particulier des TDC, 35% (23) des cultures ont été négatives, 40% (26) positives et 25% (16) contaminées.

III.2. Application des recommandations concernant les modes et les durées de conservation des expectorations

Globalement, 246 (61%) expectorations ont été conservées au frais et 158 (39 %) à température ambiante. Au CRLAT et au PPH, toutes les expectorations (100%) ont été conservées au frais tandis qu'au CDT de Dandé et de Houndé, elles ont toutes été conservées à température ambiante (**tableau 8**). Quant au CDT de Dafra, 98 (76%) expectorations ont été conservées au réfrigérateur et 31 (24%) collectées dans des zones ne disposant pas de microscopie ont été conservées à température ambiante (**Tableau 8**). La durée de conservation entre la collecte et le traitement des expectorations dans chaque site est présentée dans **le tableau 8** à l'aide de la classification suivante : ≤ 3 jours (recommandation OMS), 4-7 jours (acceptable pour le PNT), et > 7 jours. Seulement 61(15%) expectorations ont été traitées dans un délai n'excédant pas 3 jours après la collecte et la majorité de ces expectorations (84%) a été conservé au frais. Pour les expectorations qui ont été traitées entre 4-7 jours et plus de 7 jours après la collecte, respectivement 61 (58%), et 134 (56%) ont été conservées aux réfrigérateurs. Pour l'ensemble des sites de collecte, le transport des expectorations à l'URM du Centre MURAZ s'est effectué avec des glacières munies de sachets réfrigérants, en adéquation avec les recommandations de paquetage et de transport de l'OMS.

Tableau 8 : Répartition des expectorations selon la température et durée de conservation en fonction des sites de collectes

| Sites de collectes | Température de conservation | | Durée de conservation | | |
|--------------------------|-----------------------------|------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| | Température | N | ≤ 3 jours N | 4-7 jours N | > 7 jour N |
| CRLAT | 4-8°C | 89 | 14 | 28 | 47 |
| Dafra | 4-8°C | 98 | 6 | 24 | 68 |
| | T° ambiante | 31 | 1 | 6 | 24 |
| Dande | T° ambiante | 63 | 1 | 15 | 47 |
| Hounde | T° ambiante | 64 | 8 | 23 | 33 |
| PPH | 4-8°C | 59 | 31 | 9 | 19 |
| Sous total, N (%) | 4-8°C | 246 (61) | 51 (13) | 61 (15) | 134 (33) |
| | T° ambiante | 158 (39) | 10 (2.5) | 44 (11) | 104 (26) |
| Total N (%) | | 404 (100) | 61 (15) | 105 (26) | 238 (59) |

T° = température ; N = nombre

III.3. Association de la température et de la durée de conservation des expectorations aux contaminations des cultures

L'association des facteurs température et durée de conservation des expectorations aux contaminations des cultures est présentée dans le **tableau 9**. Les contaminations de cultures étaient significativement plus faibles lorsque les expectorations ont été conservées au réfrigérateur que lorsque celle-ci ont été conservées à la température ambiante (17.5% vs 34,2% ; OR=2.45, 95% IC 1.54-3.90, P<0.0001). Concernant la durée de conservation, lorsque les expectorations ont été traitées dans un délai n'excédant pas 3 jours après la collecte, les contaminations étaient plus faibles que lorsque celle-ci ont été traitées entre 4-7jours et plus de 7jours (respectivement 11.5% vs 25.7%, OR= 2.17, p= 0.097 et 26.5%, OR= 2.23, P=0.066).

Les odds ratio ajustées par rapport à la température et à la durée de conservation, montrent que les expectorations conservées à température ambiante avaient deux fois plus de risque d'être contaminées (2.24, p=0.001). Les expectorations conservées à température ambiante montrent que les contaminations de culture étaient toujours élevées quel que soit le délai de conservation des

expectorations ($\geq 30\%$). Au contraire, les expectorations conservées au réfrigérateur avaient des taux de contaminations, plus faibles (8%) pour les courtes durées de conservation (0-3 jours) que pour les longues durées (20%) (**Figure N°21**).

Tableau 9 : Association de la température et de la durée de conservation des expectorations aux contaminations des cultures

| Conditions de conservation | Contamination % (N/ total) | OR [95%IC] | OR ajusté [95%IC] | P-value |
|----------------------------|----------------------------|------------------|-------------------|--------------|
| Température | | | | |
| 4-8°C | 17.5 (43/246) | 1 | 1 | - |
| T° ambiante | 34.2 (54/158) | 2.45 [1.54-3.90] | 2.24 [1.40-3.60] | 0,001 |
| Durée | | | | |
| ≤ 3 jours | | | | |
| 4-7 jours | 11.5 (7/61) | 1 | 1 | - |
| > 7 jours | 25.7 (27/105) | 2.67 [1.08-6.57] | 2.17 [0.87-5.43] | 0,097 |
| | 26.5 (63/238) | 2.78 [1.20-6.42] | 2.23 [0.95-5.23] | 0.066 |

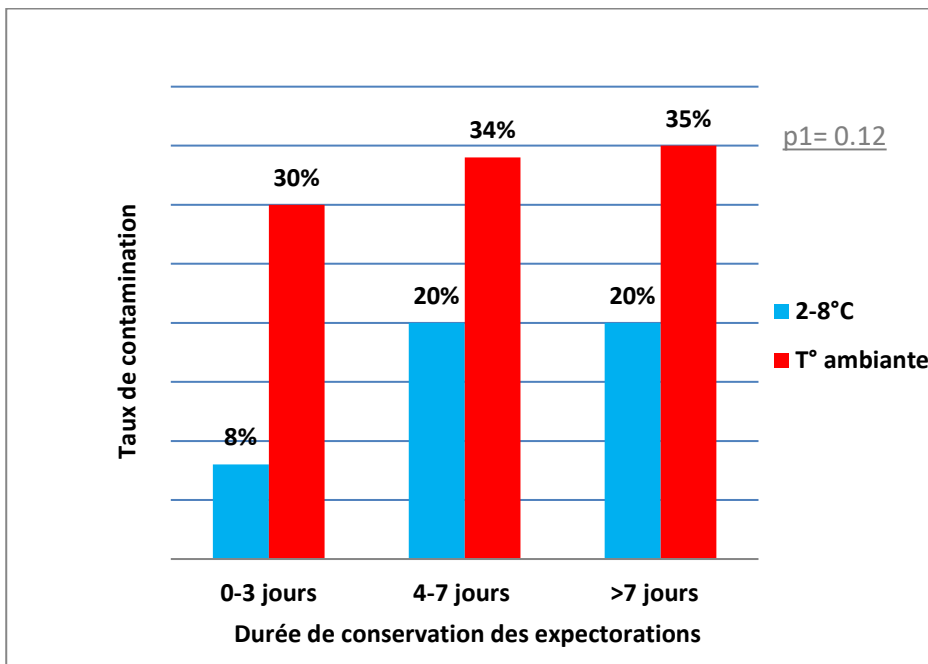


Figure 21: Contamination des cultures selon de la temperature et de la durée de conservation des expectorations

Taux de contamination pour les expectorations conservées à 2-8°C, (p=0.12) [Bleu] ou à temperature ambiante (22-35°C), p=1 [Rouge], categorisé par la durée de conservation des expectorations (compris entre 0- 3 jours, entre 4 et 7 jours, ou plus de 7 jours).

IV. Discussion

Les cas de TCB peuvent être pratiquement doublés lorsque la méthode de diagnostic utilisé est la culture. Son rôle est aussi capital pour la surveillance, le diagnostic et le traitement des TB-MDR. Cependant, la contamination des cultures diminue la valeur diagnostic de cette méthode de diagnostic qui demeure un challenge pour les pays à ressources limités (**Demers et al., 2012, De Waard et Robledo et al., 2007**).

Des facteurs pré-analytiques ont été décrits comme pouvant influencer les contaminations des cultures des mycobactéries. Au cours de cette étude, nous avons analysé deux facteurs pré-analytique et évaluer leurs impacts sur les contaminations des cultures. Nos résultats confirment l'importance de la température de conservation. En effet, parce que les contaminations étaient deux fois (2,24) plus importante lorsque les expectorations ont été conservées à la température ambiante versus au réfrigérateur. La durée de conservation est seulement un facteur secondaire qui n'influence pas significativement les contaminations. Les expectorations traitées à des délais n'excédant pas trois jours semblent moins touché par les contaminations (11,5%) comparé à celles traitées entre 4-7 jours ou plus de 7jours (respectivement 25,7%, p=0.097 et 26,5%, p=0,06), ou les

contaminations semblent avoir atteint une limite maximale. L'hypothèse la plus vraisemblable pouvant expliquer ces résultats est que la multiplication des germes commensaux entraînerait une diminution et un épuisement des nutriments existants dans les expectorations et ainsi réduirait voire stopperait la prolifération des germes après trois jours de conservation à la température ambiante. Les proportions de contamination vont alors atteindre une limite maximale lorsque les microorganismes ne seront plus à mesure de croître. Le fait que la durée de conservation n'ait pas d'impact sur les contaminations de culture lorsque les expectorations sont conservées à température ambiante ($\geq 30\%$ quel que soit le délai) consolide cette hypothèse. Enfin, ce résultat corrobore l'étude de Tessema *et al.* en 2011 en Ethiopie, qui avait évalué le pourcentage de recouvrement des cultures de mycobactéries sur des expectorations congelées à -20°C et qui avait conclu que la durée de conservation des expectorations avait un effet non significatif sur les résultats des proportions de cultures positives (Tessema *et al.*, 2011).

Malheureusement, le nombre d'expectoration dont les conditions de conservation n'ont pas été réalisées tel que recommandé par le PNT était majoritaire (72%). Bien que l'ensemble des sites d'inclusions soit informé de ces recommandations, nous avons trouvé qu'un nombre non négligeable d'expectorations 158 (39%) avait été conservé à la température ambiante et que 59% avait été traité plus de 7 jours après la collecte. Ces résultats montrent que les recommandations ne sont pas correctement appliquées et que des stratégies de corrections doivent être mises en place. Le manque ou parfois l'insuffisance des moyens logistiques (réfrigérateurs) et de ressources humaine (technologistes biomédicaux) ont été rapportés comme étant les raisons qui justifient cette situation. Pour le CDT de DAFRA qui reçoit des expectorations provenant des CSPS (Centre de Santé et de Promotion Sociale) ne disposant pas de laboratoires et ne réalisant pas la microscopie pour la recherche des BAARs, 18% des expectorations ont été conservées à température ambiante avant leur transfert au CDT. Concernant les CDTs de DANDE et de HOUNDE, quel que soit les provenances des expectorations collectées (sur site ou *via* les CSPS) elles ont toutes été conservées à température ambiante parce que la priorité en matière de conservation au frais était donnée aux vaccins et aux réactifs au détriment des expectorations. En effet, selon les bonnes pratiques de laboratoire les échantillons et les réactifs ne doivent pas être conservés dans le même réfrigérateur à cause du risque de contamination des réactifs. Au contraire, pour les sites urbains comme le CRLAT et le PPH, qui avaient moins de difficultés de logistique, 100% des expectorations a été conservé au réfrigérateur après l'examen microscopique pour la recherche des BAARs.

Le transfert des expectorations à l'URM s'est fait par les technologistes biomédicaux aux moyens de transport public ou personnel. Malheureusement, leurs nombres n'étant pas toujours suffisants dans les laboratoires des sites d'inclusion, effectuer plusieurs transferts par semaine

n'était pas possible et cela rallongeait les durées de conservations. Des moyens en termes de ressources humaines et des moyens logistiques doivent être mis à la disposition des laboratoires des districts et des CSPS afin de permettre un meilleur suivi des recommandations.

La conservation à la température ambiante des expectorations destinées à la culture favorise la prolifération des germes commensaux (**De Waard et Robledo, 2007 ; Rieder, et al., 2007**) et augmente donc le risque de contamination des cultures. En Inde, une étude ayant évalué l'impact de la température de conservation sur les contaminations après une décontamination des expectorations par la méthode de Petroff, a montré que le taux de contamination était élevé (18%) lorsque les expectorations avaient été conservées 7 jours à température ambiante. Une faible proportion de contamination (5%) a été trouvée lorsque celles-ci ont été traitées immédiatement après la collecte (**Paramasivan et al., 1983**). Les conclusions de cette étude sont similaires aux notre, à savoir que les proportions de contaminations augmentent lorsque les expectorations sont conservées à température ambiante. Cependant, la proportion de contamination des expectorations conservées entre 4-7 jours à la température ambiante dans notre étude était deux fois plus élevée que celle obtenue par Paramasivan (34% contre 18%) (**Paramasivan et al., 1983**). Une des hypothèses qui justifierait ce résultat est la différence de température ambiante qui existe entre l'Inde et le Burkina Faso (30°C maxima en Inde versus 35°C maxima au Burkina Faso). Le climat plus chaud du Burkina Faso se traduit par des températures ambiantes plus élevées qui favorisent une multiplication beaucoup plus importante des germes commensaux et pourrait ainsi augmenter les contaminations de culture. En outre, un autre facteur pourrait jouer un rôle au Burkina Faso : les patients ne rinçant pas nécessairement la bouche, et ce facteur est connu pour augmenter les contaminations (**Muzanyi et al., 2011, Kalema et al., 2012, Muzanye et al., 2009**). Etant donné que l'hygiène buccodentaire est insuffisante au Burkina Faso, une des limites de cette étude était que dans aucun site de collecte il n'a été recommandé aux participants de se rincer la bouche avant de fournir les expectorations. Cela pourrait avoir joué un rôle dans les contaminations des cultures. Ce facteur pourrait aussi expliquer les 8% de contamination supérieur aux taux acceptable (3-5%) malgré une conservation au frais et un délai de traitement des expectorations n'excédant pas trois jours. Une lente prolifération des microorganismes dans le réfrigérateur, parce que non complètement inhibé pourrait expliquer nos taux élevés de contamination (20%) des expectorations conservées plus de trois jours. Une autre raison qui pourrait également expliquer ce résultat est le délai d'attente après la collecte pour la réalisation de l'examen microscopique des BAARs. Les expectorations sont gardées sur la paillasse à la température ambiante pendant environ 2 à 4 heures voire plus. Elles sont ainsi soumises aux températures ambiantes favorisant la multiplication des germes commensaux. Le temps de génération de certains microorganismes étant de 20 minutes en moyenne, ils mettront alors peu de temps pour doubler ou tripler la population initiale existante.

L'augmentation de leur nombre dans les expectorations, peut à terme nécessiter le rallongement du temps de contact du décontaminant si on veut avoir une décontamination efficace. Mais cela n'est pas possible dans notre cas eu égard de la proportion de cultures négatives à microscopie positive (1.4%) qui montre que la procédure de décontamination ne peut pas être renforcée.

V. Conclusion

Cette étude a montré que les contaminations des cultures d'expectoration sont élevées au Burkina Faso. Les recommandations concernant la température et les délais de conservation des expectorations ne sont pas complètement respectées par manque de moyens logistiques et de ressources humaines. Les contaminations de cultures sont influencées par la conservation à température ambiante des expectorations qui est le facteur le plus lié à la contamination des cultures des expectorations. Pour une meilleure qualité du diagnostic de la tuberculose pulmonaire par la technique de la culture dans les PRLs, des mesures doivent être prises afin d'accompagner la mise en œuvre des recommandations du PNT et de l'OMS concernant la conservation des expectorations destinées à la culture. Quand bien même que les expectorations soient conservées à la bonne température et traitées dans les délais recommandés, les taux de contamination demeurent supérieurs aux taux acceptables suggérant l'implication d'autres facteurs dans la contamination des cultures. D'autres études doivent être menées afin d'améliorer la culture des mycobactéries dans les PRLs, et l'effort global pour contrôler la tuberculose doit considérer cette importante problématique.

Partie 3 relative à l'article 2

Titre : « Effet d'un bain de bouche antiseptique à base de la Chlorhexidine sur les contaminations de cultures des mycobactéries au Burkina Faso ».

Article 2

Kaboré A, Sanou A, Tranchot-Diallo J, Hervé Hien, Daneau G, Gomgnimbou KM, et al. Why Oral antiseptic mouth rinsing before sputum collection cannot reduce contamination rate of mycobacterial culture in Burkina-Faso. Afri Health Sci. 2019; 19(1): 1321-1328. <https://dx.doi.org/10.4314/ahs.v19i1.3>

I. Introduction

L'application des recommandations concernant la température et la durée de conservation des expectorations a montré que les taux de contaminations demeuraient largement au-dessus des taux acceptables suggérant ainsi l'existence de l'influence d'autres facteurs. Nous avons alors évalué un autre facteur pré-analytique pertinent, la réduction de la CMB sur les contaminations de cultures. Notre hypothèse est que la réduction en amont de la CMB par l'utilisation d'un bain de bouche antiseptique avant le recueil des expectorations influencerait favorablement l'issue de la culture. Par ailleurs, de par leur nature, notamment la structure de leurs parois, les microorganismes ont une sensibilité vis-à-vis des désinfectants et des antiseptiques qui varie (**McDonnell et Russell, 1999**). La connaissance de la nature des microorganismes contaminants résiduels serait donc un atout pour mieux comprendre la problématique des contaminations.

De nombreuses études ont apporté la preuve de l'efficacité de la Chlorhexidine un antiseptique de la classe des biguanides, sur les bactéries Gram+, Gram- ainsi que sur les champignons. Aussi, la résistance des mycobactéries vis à vis de cette molécule ainsi que sa non toxicité relative sur les cellules humaines ont été prouvés (**McDonnell et Russell, 1999**) ; **Grosseman et al., 1986** ; **Rusell, 1996**). Dans des études récentes, son utilisation comme décontaminant des expectorations ou antiseptique buccal avant le recueil des expectorations a montré des réductions importantes du taux de contamination des cultures (**Kalema et al., 2012** ; **Peres et al., 2011**) Néanmoins, cette réduction était accompagnée d'une réduction du taux de positivité des cultures pour l'une des études (**kalema et al., 2012**). **Cette étude** a montré que le recueil des expectorations après le rinçage de la bouche avec un antiseptique (chlorehexedine et nystatine) permettait une réduction significative des taux de contaminations des cultures (14 à 4%) mais que cela s'accompagnait d'une réduction du taux de positivité des cultures (8%). Selon ces auteurs, cette réduction du taux de positivité pourrait s'expliquer par une action de l'antiseptique résiduel. De plus, ces études n'ont pas caractérisées les types de contaminants résiduels pourtant connu pour avoir des sensibilités variables vis-à-vis des antiseptiques et des décontaminants. L'objectif général de notre recherche était d'évaluer, l'effet de l'utilisation de bain de bouche à base de la chlorhexidine avant le recueil des expectorations sur les contaminations de cultures des mycobactéries. De manière spécifique, les taux de contaminations et les scores des colonies de cultures positives ont été comparés avant et après utilisation des bains de bouche, et les types de microorganismes contaminants résiduels ont été caractérisés morphologiquement et également comparés.

II. Matériel et Méthodes

II.1. Cadre et type d'étude

Il s'agit d'une étude d'évaluation de l'effet du bain de bouche antiseptique à base de la chlorhexidine sur les contaminations de cultures. L'étude s'est déroulée entre février 2016 et mai 2017 au laboratoire de bactériologie du Centre MURAZ à Bobo-Dioulasso en collaboration avec le CRLAT décrit tantôt dans le chapitre 3 (Cf. paragraphe I), qui a procédé au recrutement des patients et à la collecte des expectorations.

II.2. Inclusion des patients et collecte des expectorations

Les patients ont été inclus et les expectorations collectées tel que décrit dans le chapitre 3 (cf. paragraphes IV. 2. et V) à quelques exceptions près compte tenu de la spécificité de l'étude. La deuxième expectoration fournie pendant le dépistage a constitué le groupe contrôle « sans bain de bouche » (SBB). De manière spécifique, une troisième expectoration a été recueillie par patient le deuxième jour, après rinçage de la bouche avec un antiseptique. Le rinçage de la bouche s'est fait avec 10ml de chlorhexidine digluconate à 0,1% (septyl®, Laboratoires PPM, Phnom Penh, Cambodge) sous la supervision des technologistes biomédicaux et a constitué le groupe expérimental « après bain de bouche » (ABB). Le temps de contact du bain de bouche était de 60 secondes suivi d'un second rinçage d'environ 30sec avec de l'eau courante afin d'éliminer l'antiseptique résiduel. Le contrôle de la qualité du Septyl® est assuré lors de l'importation par la Direction générale de la pharmacie, du médicament et des laboratoires (DGPML) qui délivre l'autorisation de mise sur le marché des produits pharmaceutiques. Afin de s'assurer de la bonne qualité microbiologique de l'eau courante, trois contrôles de la qualité en vue de rechercher les bactéries contaminant habituellement l'eau (incluant les bactéries sporulantes) ont été réalisés. Ces contrôles ont consisté à filtrer l'eau à l'aide d'un dispositif (Sartorius) menu de membranes filtrantes. Ces membranes ont été ensuite déposées sur les quatre milieux de culture habituellement utilisés pour l'analyse de l'eau (Azid, Endo, TSC et gélose ordinaire). Ces milieux ont été incubés pendant 24-48h à 37°C ou à 37°C en anaérobiose. Enfin les colonies ont été comptées et identifiées. Ces contrôles étaient satisfaisants avec seulement deux staphylococcus sp trouvés (2 bactéries pour 100ml d'eau ; Norme : < à 10 bactéries / 100ml d'eau). Ces expectorations ont été codées de sorte à garantir l'anonymat et l'aveugle à l'endroit des techniciens réalisant les cultures. Elles ont ensuite été conservées puis transférées au Centre MURAZ ainsi que précédemment décrits dans les méthodes (cf. paragraphe V.).

II.3. Détermination des taux de contaminations et des scores CFU des cultures positives

II.3.1. Mise en culture et détermination des contaminations

Les cultures ont été réalisées tel que décrit dans le chapitre 3 (cf. paragraphe VI.3.). Mais pour permettre la comparaison des résultats des deux groupes d'expectoration, nous avons standardisé certaines étapes de la culture. Celles-ci ont été réalisées avec un volume exact de 2ml d'expectorations, puis les culots de centrifugation ont été re-suspendus avec un volume exact de 500µl d'eau distillée stérile et enfin un volume de 100ul de cette suspension a été inoculé dans les milieux de culture de LJ et de LJ enrichie avec 0,5% de pyruvate. Les taux de contaminations et les scores des cultures positives ont été déterminés après examen des cultures. Des reprises de culture n'ont pas été réalisées lorsque celles-ci ont été contaminées.

Pour éviter que des contaminations de nature exogènes ne viennent influencer les résultats de nos cultures, des dispositions ont été prises et ont été précédemment décrites dans le chapitre 3 (cf. paragraphe VI. 3.3.)

II.3.2. Détermination des scores CFUs de cultures positives

La viabilité des mycobactéries a été évaluée en comparant à partir des cultures positives les scores des CFUs de mycobactéries dénombrées ou estimées (**Tableau 10**). La différence entre les scores de colonies (dénombrables et non dénombrables) dans les deux groupes permet une association avec la viabilité des souches.

Tableau 10 : Scores des colonies de mycobactéries

| Nombres de colonies par tube | scores | |
|---|-----------------|-----------------|
| 1 à 20 colonies | Noter le nombre | Dénombrable |
| 20 à 50 colonies | + | Dénombrable |
| > 50 colonies bien séparées | ++ | Dénombrable |
| Nombreuses colonies semi-confluentes | +++ | Non dénombrable |
| Très nombreuses colonies confluentes | ++++ | Non dénombrable |

II.4. Caractérisation morphologique des types de contaminants résiduels

Il Existe deux catégories de microorganismes contaminants résiduels des cultures d'expectorations : Ceux qui ont survécus à la décontamination par l'hydroxyde de sodium et sont présents dans les culots de décontamination, et ceux qui ont résisté à la fois à l'hydroxyde de sodium et au vert de malachite (antiseptique contenu dans les milieux de LJ) et sont présents dans les milieux de LJ contaminés. Afin de caractériser morphologiquement les contaminants, des frottis sur lames réalisés à partir des culots de décontaminations et des milieux de LJ contaminées (des deux groupes) ont été colorés à l'aide de la technique de GRAM (Kit Gram Nicole Quimica Clinica Aplicada, SA, Espagne) et de vert malachite (vert malachite oxalate, Réactifs RAL, bordeaux Technopolis, 33650, Martillac). Les différentes formes et les types de Gram des microorganismes contaminants résiduels ont été décrits à l'aide du microscope BX53 haute définition (**Figure 22**).

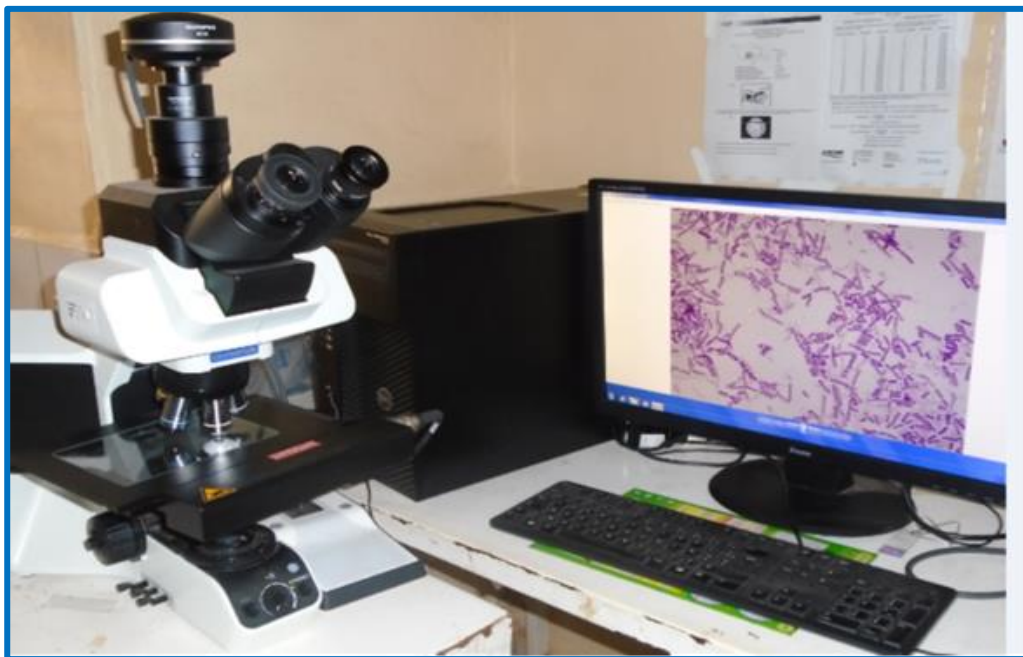


Figure 22 : Microscope optique Olympus BX53 connecté à son ordinateur (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ).

II.5. Analyses statistiques

Les logiciels Excel 2013 et OpenEpi 2.20 ont été utilisés respectivement pour la saisie et l'analyse des données. Les proportions de contamination des cultures, les scores des colonies des cultures positives ont été calculées et comparée à l'aide du test de Chi2 afin de déterminer si des différences significatives existent entre les deux groupes. Les fréquences des types de

microorganismes contaminants résiduels ont été également calculées puis comparées. Le seuil de signification retenu était de 0,05, avec un IC de 95%.

III. Résultats

III.1. Caractéristiques de l'échantillon

Parmi les 158 patients inclus, huit (08) ont été exclus pour cause de données de laboratoires incomplètes. Cent douze (112) patients étaient des TCB et un nombre réduit de patients dépistés négatifs (38) ont aussi été inclus. L'analyse des données a concerné 150 patients qui ont tous fourni les deux types d'expectorations. **La Figure 18** résume le diagramme de la collecte et du traitement des échantillons. Parmi les patients inclus, 38% étaient des femmes et 62% (93) des hommes avec un sexe ratio de 1,6. L'âge moyen des patients était de 38 ans (extrêmes : 18- 88 ans). La tranche d'âge la plus touchée était celle comprise entre 23 et 42 ans, soit 58% des patients. Tous les échantillons collectés ont été conservés après le dépistage au réfrigérateur entre 4-8°C avant leur transfert et traitement au centre MURAZ. Environ 85% ont été traités dans les délais recommandés par l'OMS ou le PNT.

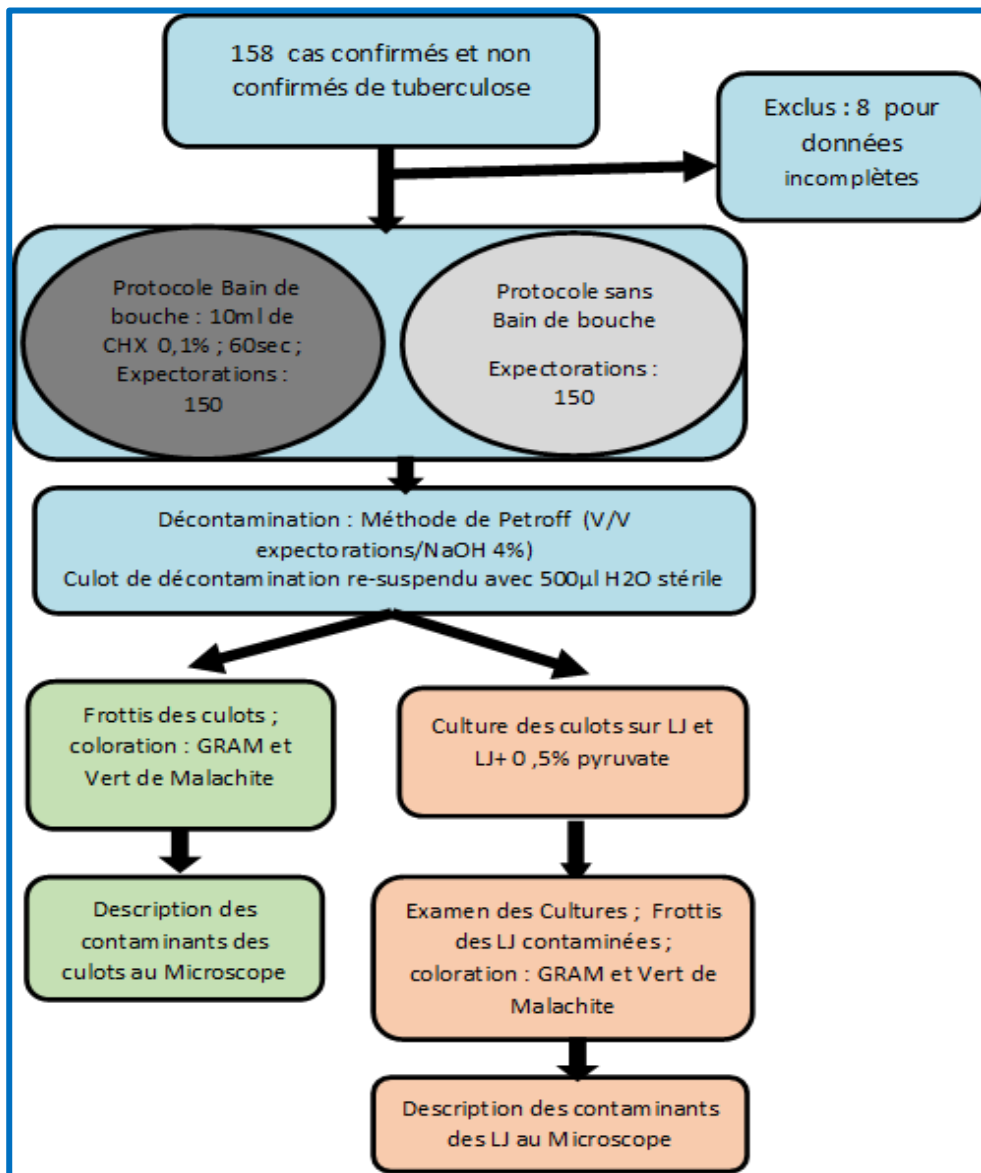


Figure 23: Diagramme résumant la collecte et le traitement des expectorations.

III.2. Effet du bain de bouche à base de la chlorhexidine sur les contaminations de cultures

Le taux global de contamination était élevé (environ 40 %) et n'était pas différent avant et après le rinçage de la bouche (39% contre 41% ; $p = 0,7$) (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Effet du bain de bouche à base de la chlorhexidine sur les contaminations de cultures

| Résultats des Cultures | Rincage de la bouche | | Ch2 | McNemar <i>p</i> -value |
|---------------------------------|----------------------|-------------|------|-------------------------|
| | Avant N =150 | Après N=150 | | |
| Cultures | | | | |
| Contaminées | 61(41%) | 58 (39%) | | |
| Cultures non contaminées | | | | |
| positives | 64 (43%) | 61 (41%) | 0, 2 | 0, 7 |
| negatives | 25 (17%) | 31 (21%) | | |
| Total | 89 (59%) | 92 (61%) | | |

N = nombre

III.3. Effet du bain de bouche à base de la chlorhexidine sur les scores des colonies de mycobactéries

Les scores des cultures positives entre les groupes contrôle et expérimental n'étaient pas différents (**Tableau 12**). Pour le sous-groupe de score de microscopie inférieur ou égale à 1+, les proportions de colonies dénombrables étaient respectivement de 19% contre 26% pour les groupes contrôle et expérimental et de 81% contre 74% pour les colonies non dénombrables ($p= 0,8$). Pour le sous-groupe score de microscopie supérieure à 1+, les proportions de colonies dénombrables étaient respectivement de 11 % contre 19 % pour les groupes contrôle et expérimental et 89 % contre 81 % pour les colonies non dénombrables ($p= 0,19$).

Tableau 12 : Effect de la chlorhexidine sur le score des colonies de mycobactéries

| score de la mycoscopie | Score des colonies de mycobactéries | Rinçage de la bouche | | Ch2 | p-value |
|---------------------------|--|----------------------|----------------------|------|---------|
| | | Avant N =64 N (%) | Après N =61 N (%) | | |
| Score ≤ 1+ | denombrable* | 4 (19) | 5 (26) | 0.06 | 0.8 |
| | Non dénombable** | 17 (81) | 14 (74) | | |
| Score >1+ | Dénombrable* | 4 (11) | 8 (19) | 1.6 | 0.19 |
| | Non dénombable ** | 39 (89) | 34 (81) | | |
| Total | Dénonbrable | 8 (12.5) | 13 (21) | 1.7 | 0.19 |
| | Non dénombable | 56 (87.5) | 48 (79) | | |

Légende

N= Nombre

* 1 à 50 colonies formants des unités séparées (CFU)

** : Nombreuses ou très nombreuses CFU semi-confluentes ou confluentes

III.4. Caractérisation morphologique et comparaison des fréquences des types de microorganismes contaminants résiduels

Concernant les milieux de LJ contaminées, le nombre total de contaminants caractérisés était respectivement de 97 et 96 pour les groupes control et expérimental. Les BGP et les spores étaient les contaminants résiduels majeurs. Les fréquences respectives de ces microorganismes dans les deux groupes n'étaient pas non plus statistiquement différentes (BGP environ 55%, p=0.96; and spores 40%, p = 0.87) (**figure 24**).

Concernant les culots de décontamination, le nombre total de contaminants caractérisés était de 100 et 75 respectivement pour les groupes contrôle et expérimental. Les bacilles à GRAM Positif (BGP), et les champignons étaient les contaminants résiduels majeurs des culots de décontaminations. Leurs fréquences respectives dans les groupes contrôle et expérimental n'étaient pas statistiquement différentes (46/100 (46 %) versus 43/ 75 (57 %), p = 0, 3; 23/100 (23 %) versus 14/75 (17 %), p = 0, 5).

Les endospores étaient de nature déformante ou non déformante (**figure 25**). Des frottis colorés au Gram à partir de colonies isolées ont montré que les BGP et les spores constituaient les mêmes micro-organismes à des stades différents de leur développement et que leur fréquence

cumulative représentait environ 94 % des contaminants résiduels. Les spores isolées, qui peuvent être confondues avec des levures, ont été correctement identifiées comme telles à partir de frottis de subcultures (gélose columbia au sang frais à 5%) des contaminants colorés au GRAM puis observés au microscopique BX53. (Figure 25 C et 25 D). Les endospores étaient de nature déformante ou non déformante et leurs formes étaient ellipsoïdales ou rondes (Figure 25).

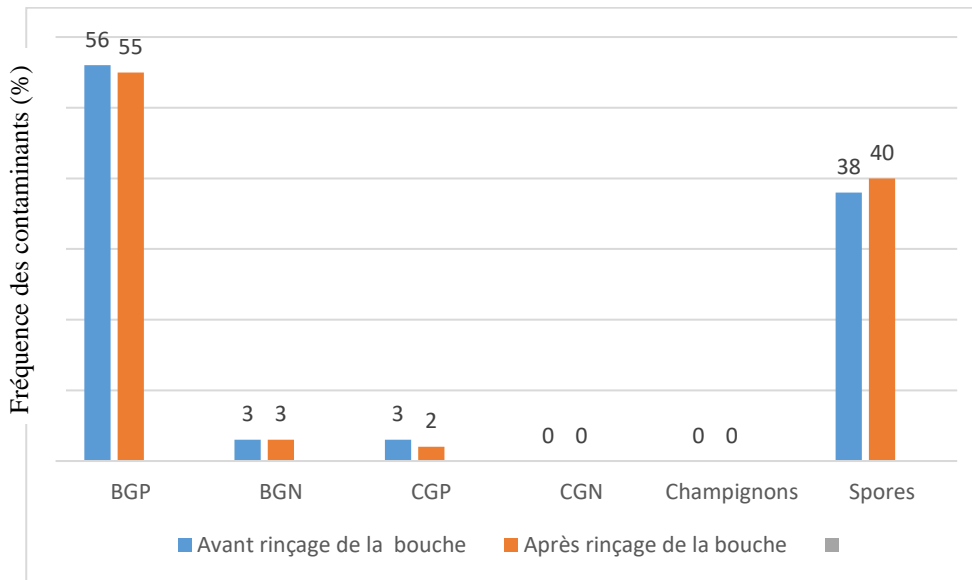


Figure 24 : Répartition des contaminants résiduels majeurs sur milieux L-J

Légende Contaminants résiduels sur L-J: Avant bain de bouche N= 97; après bain de bouche N=96; BGP avant vs après : $p=0.96$; spores avant vs après : $p = 0.87$. **Abbreviations:** BGP: Bacilles à Gram Positif ; BGN: Bacilles à Gram Négatif ; CGP: Cocci à Gram positif, CGN: Cocci à Gram négatif

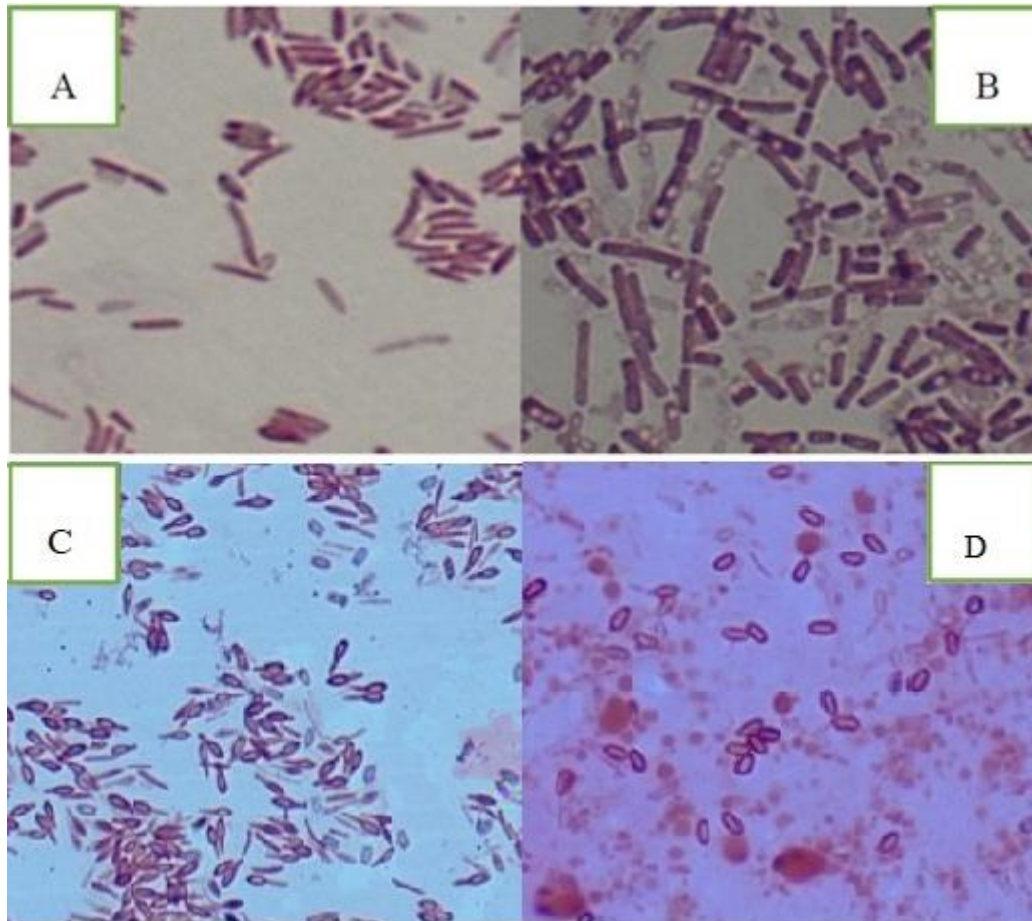


Figure 25 : Bactéries sporulantes au microscope BX 53 (x 1000) (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ).

A et B: Bacilles à Gram Positif (BGP) avec des endospores non déformantes; B et D: BGP avec des endospores déformantes.

IV. Discussion

La contamination des cultures constitue un obstacle majeur à l'efficacité de la technique de la culture dans les pays à ressources limitées. Dans cette étude, nous avons évalué l'effet d'un bain de bouche antiseptique à base de la chlorhexidine sur le taux de contamination de la culture. Nos résultats montrent que quel que soit le mode de recueil des expectorations, les taux de contaminations ne sont pas significativement différents (ABB= 39% contre SBB= 41%, $p=0,12$). Cela suggère que la réduction en amont de la charge microbienne buccale par l'utilisation du bain de bouche antiseptique à base de la Chlorhexidine n'induit pas en aval une réduction significative des contaminations de cultures. Cette absence d'efficacité significative est comparable aux résultats de **Peres et al., en 2011** qui ont également montré une différence non significative entre les groupes contrôle et expérimental (10, 2% vs 5, 1% ; $p= ?$). [6/59 (10, 2 %) contre 3/59 (5, 1 %); $p = 0,38$]. Toutefois, leurs résultats avec un taux de contamination initial bas ont montré à la différence des nôtres une forte tendance de réduction des contaminations (réduction de 50 % vs 4 %). Cela pourrait s'expliquer en partie par l'utilisation dans cette étude du milieu Ogawa, plus sélectif pour les mycobactéries. En revanche, nos résultats diffèrent de ceux de **Kalema et al** qui ont montré une réduction significative des taux de contamination des cultures (16/110 (14,5 %) vs 4/110 (3,6 %), $p = 0,005$). Il est possible que la réalisation dans cette étude d'un second bain à la nystatine consécutivement à celui de la chlorhexidine ait pu participer à une meilleure désinfection de la bouche et influencer favorablement la réduction des contaminations. Toutefois, les types de contamination n'ont pas été décrits par les auteurs. De ce fait, il n'est possible pour confirmer cette hypothèse. Néanmoins, dans notre étude très peu de contamination par les champignons a été observé, et donc nous ne nous attendons pas à un impact fort de la nystatine sur nos taux de contamination.

Le manque d'efficacité de la chlorhexidine, censé réduire un large éventail de bactéries buccales, puis induire la réduction des contaminations (après la méthode de décontamination à l'hydroxyde de sodium) n'est pas surprenant à la lumière de nos contaminants résiduels caractérisés. En effet, les bactéries sporulantes mise en évidence comme étant les contaminants résiduels majeurs des milieux de LJ contaminés sont connues pour être résistantes aux traitements thermiques, au manque de nutriments, et à la plupart de substances chimiques y compris la chlorhexidine et l'hydroxyde de sodium utilisé dans notre étude.

Les contaminations sur les milieux de LJ sont observées plutôt 72 heures après leur inoculation, ce qui a donné suffisamment de temps aux BGP à produire et libérer les spores. Il est important de noter que ces formes bactériennes pourraient facilement être confondues avec les levures. Le lien entre les BGP et les spores a été établi par l'observation au microscope de frottis

colorés au GRAM, réalisés à partir de subcultures (gélose Columbia au sang frais à 5%) des contaminants. Ces observations ont clairement montré que les GPB et les spores bactériennes isolées d'un même milieu de LJ contaminé représentaient les mêmes micro-organismes à divers stades de croissance. Même si **Kalema et al.**, en Ouganda, et **Peres et al.**, au Brésil n'ont pas caractérisé les contaminants résiduels, dans notre cas, la mise en évidence des bactéries sporulantes comme étant les contaminants résiduels majeurs est probablement la raison pour laquelle nous avons observé un taux de contamination élevé. Du fait que les spores soient plus résistantes que les mycobactéries (**Russell, 1996**), dès lors qu'elles sont présentes dans les expectorations, aucun antiseptique n'y désinfectant utilisé ne sera à mesure de les éliminer tout en préservant les mycobactéries. De manière rétrospective, la mise en évidence de ces bactéries, probablement à la base de la séculaire problématique des contaminations de culture dans les PRL en général et au Burkina-Faso en particulier, permet de justifier l'échec des nombreuses méthodes de décontaminations et la recherche d'autres stratégies visant à réduire les contaminations de cultures (conservation au frais ou congélation des expectorations, rinçage de la bouche avec ou sans antiseptique avant le recueil des expectorations, utilisation de conservateurs ou d'antibiotiques dans les milieux de transport ou de culture) (**Paramasivan et al., 1983; Tessema et al., 2011 ; Peres et al., 2011 ; Kalema et al., 2012 ; Mclain et al., 2011 ; Okumu et al., 2017, Kassaza et al., 2014 ; Azam et al., 2018 ; Zallet et al., 2018**).

Des dispositions ont été prises pour contrôler le risque de contamination exogène. En outre, aucun problème de contamination n'est observé lors des repiquages des souches de mycobactéries sur les milieux de L-J ou lors de la réalisation des DST dans notre laboratoire. Ces indicateurs-arguments suggèrent une contamination endogène de la culture de mycobactéries. Quant à l'origine de ces contaminants peu ordinaire, elle serait vraisemblablement alimentaire puisque de nombreuses études en Afrique et en particulier au Burkina Faso ont rapportées que les bactéries sporulantes étaient les principaux microorganismes responsables de la fermentation des aliments fermentés largement consommés (**Savadoغو et al., 2011 ; Savadoغو et al., 2016**). Une caractérisation beaucoup plus complète (biochimique et/ou moléculaire) sera nécessaire pour analyser les possibles liens entre nos contaminants et ceux isolés dans les aliments fermentés et fournir des données afin d'élaborer de nouvelles stratégies visant à réduire la contamination.

Au-delà de cette étude, dans les pays à ressources limitées, l'implication des bactéries sporulantes dans les contaminations des cultures devrait être déterminée à grande échelle et des stratégies novatrices de décontamination des expectorations devraient être développées dans le cas échéant.

Contrairement à notre étude, celles de **McCleane et al.** en Irlande du Nord, au Royaume-Uni (**McCleane et al., 2011**), et **Kassaza et al.**, en Ouganda (**Kassaza et al., 2014**), n'ont pas réalisé de

rinçage de la bouche avec un antiseptique et ont utilisé respectivement la méthode Petroff modifiée et la méthode de l'hydroxyde d'acétyl-L-cystéine-sodium pour la décontamination des expectorations. Ces études ont montré que les contaminants majeurs étaient respectivement des BGN (84%) et des BGP non sporulant (60%) y compris des champignons. Seulement 2% de BGP sporulant (*Bacillus licheniformis*) a été trouvé dans l'étude de McClean. (McCLean et al., 2011).

Ainsi, l'état actuel des connaissances montre qu'il y a très peu de données sur les types de microorganismes contaminants résiduels des cultures et que celles-ci montrent de franches discordances. Les localisations géographiques et les facteurs propres à l'hôte (âge, race/origine ethnique, environnement, état de santé, immunité, etc.) qui semblent contribuer à la variabilité du microbiome oral (Moon et al., 2016 ; Li et al., 2014 ; Belstrom et al., 2014a ; Belstrom et al., 2014b), peuvent expliquer ces différences. Cela suggère une analyse spécifique des contaminants pour chaque laboratoire confronté aux contaminations des cultures de mycobactéries.

Dans les culots de décontaminations, les contaminants majeurs étaient des BGP et des champignons majoritairement filamenteux. Alors que la fréquence des BGP n'était pas différente dans les deux groupes, celle des champignons était significativement plus faible dans le groupe d'intervention que dans le groupe contrôle. Ce qui suggère une certaine efficacité de la chlorhexidine. La même observation a été faite sur les CGP, contaminants de moindres ampleurs. Mais ces différentes réductions de contaminants observées dans les culots de décontaminations du groupe expérimental ne s'observaient pas sur les cultures LJ contaminées. Nous y avons en effet observé une faible présence des CGP et une absence totale des champignons dans les deux groupes. Cette faible présence et l'absence de ces types de contaminants initialement présents dans les culots de décontaminations, pourraient s'expliquer par l'action des propriétés antiseptiques du vert de malachite que contiennent les milieux de cultures de LJ. En plus de ce qui précède, pour le cas spécifique des champignons filamenteux, deux facteurs de compétitions concourent à l'expliquer : La présence simultanée de ces champignons et des BGP sporulant dans les tubes de cultures contaminées, ainsi que la pousse tardive des champignons (5 -21 jours). En effet, plus de 80% des cultures contaminées par les champignons l'était aussi par les BGP sporulant, de sorte que, les BGP qui poussent en 24-48 heures vont envahir les milieux de cultures avant les champignons dont les pousses les plus rapides surviennent au bout de 5 jours.

Notre hypothèse était que le bain de bouche réduirait les contaminations de cultures. Mais, il fallait s'assurer que le bain de bouche n'ait pas d'effet bactéricide et/ ou inhibiteur important sur les mycobactéries en éliminant l'antiseptique résiduel par un second rinçage de la bouche avec de l'eau courante. Nos résultats ont montré que le score des colonies des cultures positives dans le

groupe contrôle et le groupe d'intervention n'était pas différent y compris pour les prélèvements pauci bacillaires. Cela suggère que la viabilité des mycobactéries n'est pas compromise après le bain de bouche à base de la chlorhexidine suivi d'un rinçage à l'eau courante. Ce résultat fort intéressant sur la préservation de la viabilité des mycobactéries manque cependant d'intérêt au vu de notre principal objectif.

V. Conclusion

La réduction de la CMB par l'utilisation du bain de bouche à base de la chlorhexidine dans notre condition n'a pas permis de réduire les contaminations de cultures des mycobactéries. La cause de cette inefficacité de la chlorhexidine est très probablement liée à la nature sporulante des bactéries Gram positif mise en évidence comme contaminants résiduels majeurs de nos cultures. Notre résultat suggère que les méthodes actuelles de décontaminations sont inappropriées pour ces types de contaminations. Une caractérisation plus complète des contaminants résiduels de nos cultures ainsi que l'initiation d'autres études pour mettre au point de nouvelles stratégies innovantes de décontamination prenant en compte l'élimination des spores bactériennes constitue probablement le challenge ultime à relever dans les PRLs.

Partie 4 relative à l'article 3

Titre : « Identification des bactéries sporulant isolées des cultures contaminées de Lowenstein Jensen et efficacité de la Vancomycine à réduire les contaminations de cultures des mycobactéries au Burkina Faso ».

Article 4

Antoinette Kaboré, Tranchot-Diallo Juliette, Hervé Hien, Zouré Ouseini, Zingué Dezémon, Adama Sanou et al. Identification of spore-forming bacteria isolated from contaminated Lowenstein Jensen media and effectiveness of Vancomycin to reduce Mycobacterial culture contamination in Burkina-Faso. **Scientific Reports 2019 ; 9(1) DOI: 10.1038/s41598-019-43662-**

I. Introduction

La culture sur les milieux solides de LJ demeure la technique de référence du diagnostic de la tuberculose et de la tuberculose résistante. Cependant, son efficacité est grandement compromise par les contaminations par d'autres bactéries champignons (**Murray et al., 1999 ; Peres et al., 2011 ; Asmar et Drancourt, 2015**). Le processus de la culture requiert une étape de décontamination des expectorations permettant l'élimination des autres microorganismes tout en préservant les mycobactéries (**Narvaiz de Kantor et al., 1998**). Mais les types de contaminants peuvent influencer l'efficacité des décontaminants (**Prescott et al., 2003**). En effet, la présence dans la paroi des microorganismes d'une enveloppe externe (bactérie à Gram négatif), d'une couche de cire (mycobactéries) ou d'une tunique sporale (bactéries sporulantes) induisent une variabilité de résistance aux biocides (**McDonnell et Rusell, 1999**). Très peu d'études se sont intéressées à la caractérisation de microorganismes contaminant les cultures des mycobactéries. De plus les résultats de ces études étaient divergeants. En effet, des études réalisées d'une part en Irlande en 2011 caractérisant les contaminants des cultures sur BacT/Alert et sur LJ et d'autre part en Ouganda en 2014 portant toujours sur la caractérisation ont montré que des bactéries Gram négatives (*Pseudomonas aeruginosa* (47.2 %) et *Serratia marcescens* (13 %)), et des bactéries Gram positive (*Staphylococcus spp* (50 %) and *Streptococcus spp* (16 %)), étaient respectivement les espèces de contaminants majoritairement isolées des cultures des mycobactéries (**Mclain et al., 2011 ; Kassaza et al., 2014**). Quelques études sur des cultures de mycobactéries à partir de différents spécimens (expectorations, liquides gastriques) sur différents milieux (liquides et ou solides) ont rapporté la présence de bactéries sporulantes parmi les contaminants des cultures même si pour beaucoup d'entre elles, celles-ci ne représentaient pas la majorité (**McClellan et al., 2011 ; Keilty et al., 1915 ; Rothlauf et al., 1981 ; Mathew et Paramasivan, 2001 ; Outo et al., 2008**). Récemment en 2017, la caractérisation sommaire des contaminants réalisée au cours de l'étude sur l'effet des bains de bouches antiseptiques avant le recueil des expectorations sur les contaminations des cultures, a révélé que 90% des contaminants résiduels majeurs des cultures de mycobactéries étaient des bactéries sporulantes (**Kaboré et al., 2019**). Aucune de ces études n'a identifié les espèces des bactéries sporulantes mis en cause à l'exception de celle de **McClellan et al. en 2011** qui a identifié un *B. licheniformis*. Cependant, connaître les espèces auxquelles appartiennent ces contaminants pourrait fournir des informations sur leur origine probable et cela pourrait être utilisé pour la prévention et l'élaboration de stratégies innovantes pour réduire les contaminations.

Ces contaminants, particulièrement résistants aux biocides dus à leur capacité à sporuler apportent une justification solide aux taux élevés de contamination que connaît le Burkina Faso et

probablement de nombreux autres pays à ressources limitées. Fort heureusement, la vancomycine généralement inactive sur les mycobactéries est active sur les bactéries sporulantes (**Rubinstein et al., 2014; Celandroni et al., 2016**). De ce fait, elle constitue un candidat potentiel qui pourrait être inclus dans les combinaisons d'antibiotiques utilisés comme suppléments sélectifs dans les milieux de culture des mycobactéries. Des données certes limitées de cultures de mycobactéries sur MGIT supplémentées d'une combinaison de vancomycine, d'Amphotericin B d'acide nalidixique (VAN), ainsi que des cultures sur des milieux sélectifs Kirchner supplémentés de vancomycine à 10% (SKV : Selective Kirchner medium supplemented with vancomycin) ont montré une importante réduction des contaminations (**Mathew et Paramasivan, 1995 ; Chulhun et al., 2002**). Cependant, ces études n'ont concernées que des milieux liquides rarement utilisés dans les pays à ressources limités du fait de leur coût élevé. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que la culture des mycobactéries réalisée sur le très populaire milieu solide de LJ supplémenté d'une combinaison d'antibiotiques comprenant la vancomycine à 10µg , la colistine, la nystatine et le triméthoprime (VCNT) pourrait contribuer à réduire les contaminations de culture. L'utilisation de cette combinaison d'antibiotique comporte par ailleurs un double avantage : elle cible aussi bien les Bactéries sporulantes que les autres bactéries à Gram négatif, à Gram Positif et enfin les champignons (susceptibles d'être présent dans les expectorations). De plus elle est disponible dans de nombreux laboratoires au Burkina Faso et en Afrique.

L'objectif de cette étude était :

- d'identifier les espèces des bactéries sporulantes contaminants les cultures des mycobactéries,
- d'évaluer l'efficacité du VCNT à réduire les contaminations des cultures,
- de s'assurer de la susceptibilité des bactéries sporulantes,
- et de s'assurer de la résistance des mycobactéries au VCNT.

II. Matériel et Méthodes

II.1 Echantillon

Trois types d'échantillons ont été utilisés dans cette étude. Il s'agit des isolats des bactéries sporulantes et de mycobactéries ainsi que des expectorations. Ils ont été collectés au cours de l'étude d'évaluation de l'effet des bains de bouche sur les contaminations des cultures (partie 3 de nos travaux) entre février 2016 et mai 2017. Les isolats de bactéries sporulantes au nombre de cinquante-trois ont été collectés à partir de milieux de culture contaminés de LJ. Les expectorations utilisées pour ces cultures ont été collectées sans un bain préalable de bouche avec un antiseptique. Environ 79% (42/ 53) des isolats ont été collectés chez des TCB et 21% (11/53) chez des cas de tuberculose

négative. Ces isolats ont été conservés à -20°C dans du milieu STGG (skim milk, glycerol, glucose, and tryptone soya broth) jusqu'à leur utilisation. Les isolats des mycobactéries ont été collectés à partir des cultures positives et les échantillons d'expectorations étaient constitués principalement d'aliqots d'expectorât résiduels. Trente-deux expectorations ont été collectées chez 19 patients tuberculeux dépistés entre décembre 2016 et janvier 2017 avec deux échantillons fournis pour 13 des patients et un seul fourni pour 6 des patients. Les conditions de conservation et de transfert sont telles que précédemment décrites dans le chapitre 3 des Matériel et méthodes (cf. paragraphe V.).

II.2. Subcultures et caractérisation morphologique des isolats

Les isolats ont été repiqués sur gélose Columbia enrichie avec 5% de sang frais de mouton (Liofilchem®, roseta d. Abruzzi TE- Italy) puis incubés pendant 24 heures dans des conditions aérobies à 37 °C. Afin d'obtenir des colonies isolées, nous avons réalisé une suspension à 0,5 McFarland de ces subcultures qui ont ensuite été diluées à 10⁻³ avec de l'eau distillée stérile puis inoculées par inondation sur de la gélose Columbia au sang de mouton à 5 %. Ces inoculats ont été incubés pendant 24-48 heures en aérobiose à 37°C. Les colonies obtenues ont été décrites à l'aide microscope Leica EZ4HD (**figure 26**) et regroupées en trois principales sortes :

- Les colonies S (lisses) : Colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées, de consistance crémeuse et donnant des suspensions homogènes;
- Les colonies R (rugueuses) : Colonies à surface rugueuse et bords dentelés, plates, de consistances sèches et donnant des suspensions hétérogènes;
- Et les colonies M (Muqueuses) : Colonies à surface lisse et bords réguliers, bombées, filantes sous l'anse, et donnant des suspensions hétérogènes.

Des frottis des colonies isolées ont été réalisés puis examinés au microscope optique Olympus BX53. Après une coloration de Gram ou de vert-malachite (**Trujillo, 1932**). La mobilité bactérienne a été étudiée par observation entre lame et lamelles des cellules bactériennes. Le test de Catalase (ID color Catalase, Biomérieux SA, Lyon, Marcy-l'étoile/France) ainsi que celui de l'oxydase (Oxydase test Disc, Liofilchem s.r.l Roseto D.A- Italy) ont été réalisés.

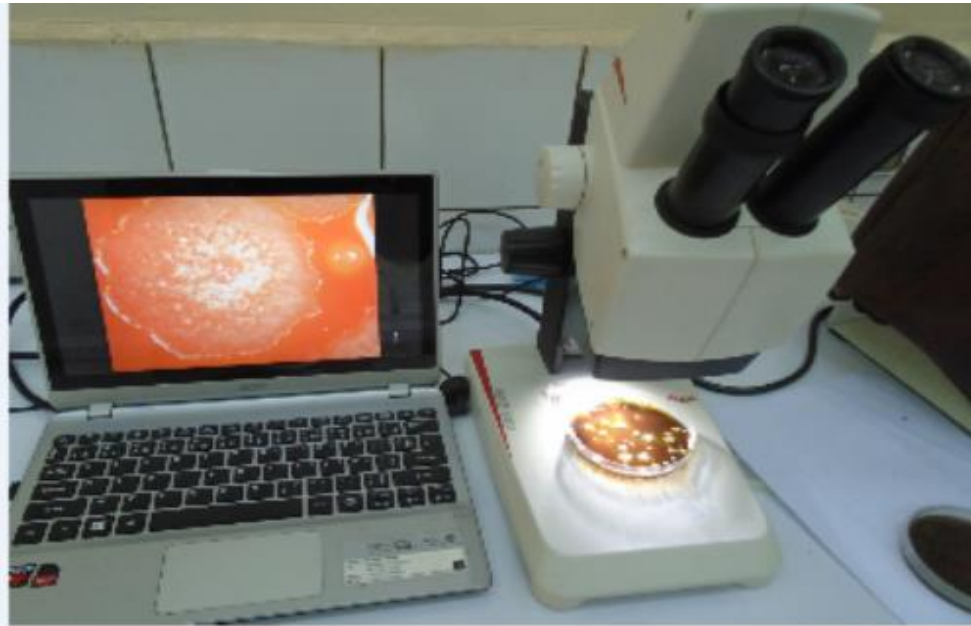


Figure 26 : Microscope Leica EZ4HD connecté à un ordinateur (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ).

II.3. Identification des bactéries sporulantes

II.3.1. Identification par la galerie API 50CH/B

La galerie API 50 CH/B strips (bioMérieux, Marcy-L'Etoile, France) destinée à l'identification des *Bacillus* et apparentés a été utilisée pour l'identification des isolats selon les indications du fabricant. Il s'agit de milieux prêts à l'emploi qui permettent l'étude de la fermentation de 49 sucres par les bactéries et l'identification d'environ 29 espèces de *Bacillus* et apparentés. **La figure 27** schématise le protocole d'identification. En résumé, nous avons réalisé une suspension à 0,5 McFarland de ces subcultures qui ont ensuite été diluées à 10^{-3} avec de l'eau distillée stérile puis inoculées par inondation sur de la gélose Columbia au sang de mouton à 5 %. A partir des subcultures de 24 heures sur gélose au sang frais de nos isolats, une suspension à 2 McFarland dans le milieu CHB/E medium (bioMérieux, Marcy-L'Etoile, France) a été réalisée puis inoculée dans chaque cupule de la galerie API 50 CH/B. Le catabolisme des glucides produit des acides organiques qui font virer l'indicateur de pH après 24 à 48 heures d'incubation à 37°C ainsi que le montre la **figure 28**. Les profils biochimiques des souches ainsi obtenus ont servi à l'identification par comparaison avec les profils standards (Analytical Profile Index : API) du logiciel ApiwebTM version 1.2.1. (Software BioMérieux, Marcy l'Etoile, France, version 1.2.1). Un score supérieur ou égal à 60% indique une bonne identification au niveau espèce. Les profils des différents groupes ont été compilés dans un tableau en **annexe 5**. La souche de *Bacillus spizizenii*/ATCC/6633 a été utilisée pour le contrôle de qualité interne.

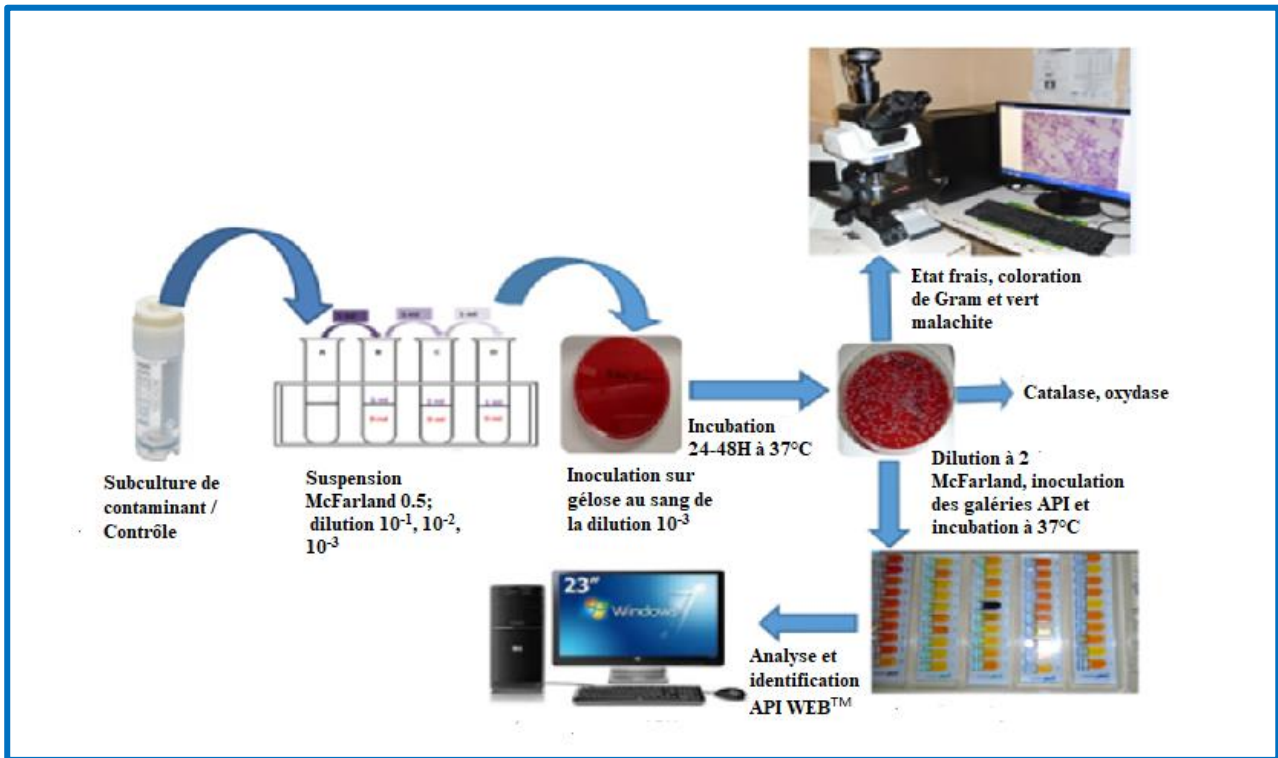


Figure 27: Protocole d'identification des contaminants par la galerie API 50CH/B



Figure 28: Profil de fermentation sur API50CH/B d'une souche de *Bacillus cereus* (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ).

II.3.2. Contrôle de qualité externe des identifications

Le contrôle de qualité externe a été réalisé par la méthode Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) à l'Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes à Marseille, France.

La base de données du MALDI-TOF MS inclue environ 3997 espèces et sous-espèces dont 252 Bactéries sporulantes. **La figure 29** synthétise le protocole d'identification. A l'aide d'une anse à usage unique stérile (Sigma Aldrich), les colonies des isolats obtenues par culture sur gélose Columbia au sang frais ont été prélevées et appliquées en quadruplet sur les spots de la plaque d'échantillonnage du MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Wissembourg, France). Cette application a consisté à un étalement circulaire de la biomasse sur chaque spot dans le but d'obtenir une couche translucide. Après séchage des étalements à température ambiante, 1 ml de la solution de matrix (saturated α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile, 2.5% trifluoroacetic acid and high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade water) (Bruker Daltonik) a été utilisé pour les recouvrir et permettre une co-cristallisation à température ambiante pendant 5 minutes. La solution du matrix et des colonies d'une souche d'*E. coli* ont été chargés en duplicate sur la plaque MALDI-TOF respectivement comme contrôle négatif et positif. Ensuite, la plaque a été transférée dans le Microflex LT MALDI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics) pour l'acquisition des spectres et le MALDI Biotyper automation a été utilisé pour l'identification des bactéries. Les critères des scores d'identification ont été effectués tel que recommandé par Bruker Daltonics: Un score de 2,000 indique une identification au niveau espèces ; un score compris entre 1,700-1,999 une identification au niveau genre et enfin un score inférieur à 1,700 indique une absence d'identification.

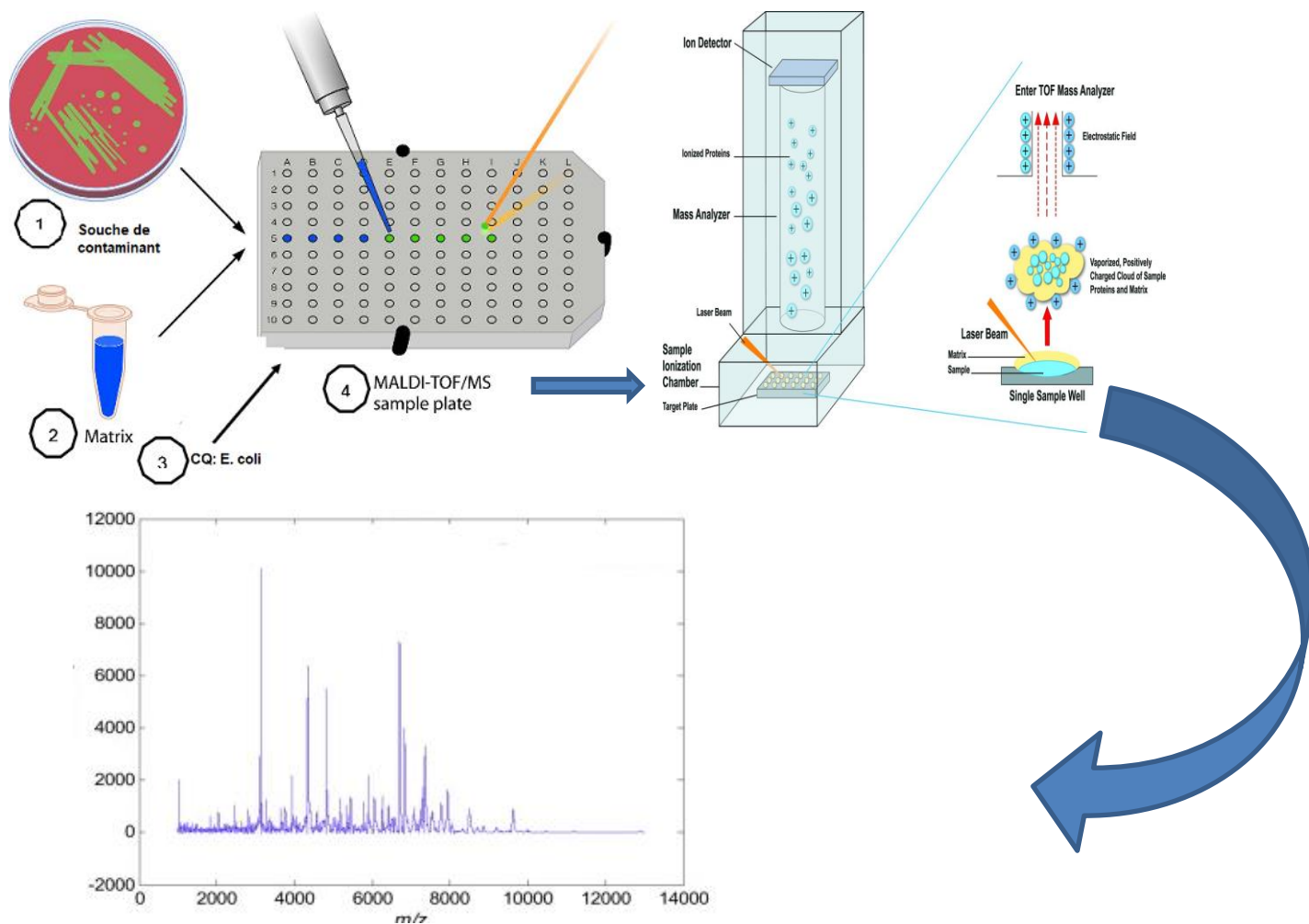


Figure 29 : Protocole d'identification des bacteries contaminants par le MALDI-Tof/MS.

II.4. L'Efficacité des milieux LJ supplémentés de VCNT sur les contaminations de culture des expectorations

Après décontamination par la méthode de Petroff modifié à 4 % de NaOH, tel que décrit dans le chapitre 3 des matériels et méthodes (cf. paragraphe VI. 3.1.), 100µl de culot de décontamination de chaque expectoration a été inoculé sur 2 milieux de LJ sans VCNT et 2 milieux de LJ supplémenté de VCNT à 10µg/ml de vancomycine. Les milieux ainsi inoculés ont été incubés et examinés tel que décrite dans le chapitre méthode (cf. paragraphe VI. 3.2).

II. 5. Tolérance des mycobactéries et susceptibilité des bactéries sporulantes au VCNT

Ces expériences ont été réalisées entre le 24 novembre 2018 et le 19 décembre 2018.

II.5.1. Tolérance des mycobactéries au VCNT

Huit (8) isolats de mycobactéries ont été utilisés, dont une souche vivante atténuée de *Bacillus Calmette Guérin* (BCG) comme témoin positif (BCG 00002462 ref: KSV-026/17; Green Signal, India). De l'eau distillée stérile a été utilisé comme témoin négatif. A partir des milieux LJ, des colonies ont été transférées dans un tube en verre de 15 mm contenant environ 20 billes en verre et 3 ml d'eau distillée. Ce mélange a été vortexé et une suspension calibrée à 0,5 McFarland à l'aide de l'eau distillée stérile et d'un densitomètre cellulaire (580-nm) a été réalisée afin d'obtenir 10^6 CFU/ml. À partir de la suspension de 0,5 McFarland, l'inoculum a été dilué à 10^{-1} et 10^{-3} pour chaque isolat, puis à un volume de 100 μ l (contenant environ 10^4 UFC pour la dilution à 10^{-1} et environ 10^2 UFC pour la dilution à 10^{-3}) ont été inoculés en duplicate sur les milieux LJ sans et avec VCNT à différentes concentrations de vancomycine. Les milieux LJ ont été préparé ainsi que décrit dans la partie méthode (cf. paragraphe VI. 1.). Le VCNT a été ajouté juste avant la coagulation des milieux, de sorte à obtenir une concentration finale de 10, 15 et 30 μ g/ml de vancomycine (VCNT ref : SR0091E, Oxoid Ltd, wade Road, Basingstoke, Hants, RG24 8PW, UK). Les milieux inoculés ont été incubés à 37 °C et ont été examinés visuellement toutes les 72 heures pendant 28 jours à la recherche d'éventuelles colonies. Pour chaque isolant, et pour chaque concentration de VCNT, lorsque les cultures étaient positives, les colonies ont été comptées sur les deux tubes et le nombre moyen des colonies a été enregistré.

II.5.2. Susceptibilité des bactéries sporulantes au VCNT

Quinze isolats comprenant trois *B. cereus*, trois *B. licheniformis*, trois *Paenibacillus*, trois *Bacillus* non réactifs, un *B. subtilis* un *Brevibacillus* ont été utilisés. La souche de référence *E. coli* (ATCC25922) et de l'eau distillé stérile ont été utilisées respectivement comme témoin positif et négatif. Ces isolats ont été dilués et inoculés sur les milieux LJ avec et sans VCNT tel que décrits dans le paragraphe ci-dessus, hormis le fait que des billes en verre n'ont pas été utilisées. Les milieux inoculés ont été examiné à l'œil nu aux jours trois, sept et quatorze afin d'identifier les tubes contaminés. En raison du type de contamination (en nappe) des milieux de LJ, le dénombrement des CFU n'est pas possible. Ainsi, nous avons déterminé les proportions de contamination à chaque concentration de VCNT en réalisant le ratio des bactéries sporulantes qui ont poussées sur les milieux de LJ avec VCNT sur le nombre total de bactéries sporulantes inoculées sur ces milieux.

Analyses statistiques

Excel 2013 a été utilisé pour la saisie des données et OpenEpi 3 pour l'analyse. Le taux de contamination des expectorations cliniques inoculées sur les milieux de LJ sans ou avec VCNT à 10µg de vancomycine a été comparé à l'aide du test exact de Fischer. Le test de Wilson t a été utilisé pour comparer la moyenne des nombres de CFU sur LJ avec VCNT à différentes concentrations de vancomycine au contrôle (LJ sans VCNT). Les proportions de contamination de bactéries sporulantes qui ont contaminé les milieux de LJ avec VCNT ont été comparés à l'aide du test binomial au taux de contamination standard dans notre laboratoire (environ 40%). Les valeurs de $p = 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

III. Résultats

III.1. La caractérisation morphologique

Globalement, l'observation microscopique des isolats (colonies et cellules bactériennes) a montré 8 différents morpho-groupes représentés par différentes tailles et formes de colonies et différentes tailles de bactéries sporulantes produisant des endospores de différentes formes à différentes positions dans les cellules bactériennes (**tableau 13**). Tous les isolats étaient catalase positives et les plus importants étaient représentés par les morpho-groupes 1 et 2 avec respectivement 16 (30,18%) et 11 (20,75%) isolats (**tableau 13**). Les bactéries du groupe 1, identifiées étaient constituées de grands bacilles à Gram positif, mobiles, isolés, ou regroupés en paire et en chaîne avec des endospores ellipsoïdales et cylindriques en position centrale à sub-terminale, ne déformant pas la cellule bactérienne (**figure 30A**). Les colonies correspondantes étaient larges lisses, grisâtres, régulières et hémolytiques (**figure 30B et 30C**). Le groupe 2 était constitué de petits bacilles à Gram positif, mobiles, isolés, ou regroupés en paire avec des endospores ellipsoïdales et cylindriques en position centrale et sub-terminale ne déformant pas la cellule bactérienne (**figure 30D**). Les colonies correspondantes étaient moyennes, rugueuses, de couleur crème, irrégulières et non-hémolytiques (**figure 30E et 30F**). Le groupe 3 était constitué de moyens bacilles à Gram positif, mobiles isolés ou regroupés en paires avec des endospores déformant la cellule bactérienne (**figure 30G**). Les colonies étaient moyennes, lisses, grisâtres, régulières et non hémolytiques (**figure 30H et 30I**). Les profils de fermentation correspondants aux trois groupes de bactéries sont présentés dans la **figure 31**.

Tableau 13: Caractères morphologiques des bacteries sporulantes isolées des cultures contaminées de Löwenstein-Jensen

| groupes de bacteries | Description des colonies | Morphologie des bacteries | Gram | Description des spores | Cat* | Oxy** | N (%) |
|----------------------|--|--|---------------|---|------|-------|--------------|
| Group 1 | Larges, lisses, grises, régulières et hémolytiques | Bacilles isolés, en paires et en chaines | Gram positif | Ellipsoïdes et cylindrique, centrale à subterminale, non déformante | + | + | 16 (30.18) |
| Group 2 | Moyennes, rigesuses, couleur crème, irrégulières et non-hémolytiques | Bacilles isolés, en paires et en chaines | Gram positif | Ellipsoïdes et cylindriques, centrales à subterminales, non-déformantes | + | +/- | 11 (20.75) |
| Group 3 | Moyennes, lisses, crème, régulières et non-hémolytiques | Bacilles isolés et en paires | Gram positif | ovales, subterminales à terminales, déformantes | + | + | 3 (5.66) |
| Group4 | Larges, mucoïdes, irrégulières, non-hémolytiques | Bacilles isolés et en paires | Gram positif | Ellipsoïdes, subterminales, non-déformantes | + | + | 2 (3.77) |
| Group5 | Larges, lisses, grises, régulières, non-hémolytiques | Bacilles isolés, en paires et en chaines | Gram positif | Ellipsoïdes à cylindrique, central à subterminale, non déformantes | + | + | 1 (1.8) |
| Group6 | Petites, lisses, crème-blanche, régulières, non-hémolytiques | Bacilles isolés, en paires et en chaines | Gram positif | Ellipsoïdes, central à subterminales, non déformants | + | + | 1 (1.8) |
| Group 7 | Larges, muqueuses, transparentes, irrégulières, non-hémolytiques | Bacilles isolés et en paires | Gram-positif | Ellipsoïdes, subterminales, non -déformantes | + | + | 1 (1.8) |
| Group 8 | Petites à moyennes, lisses, crème, régulière, non-hémolytiques | Bacilles isolés et en paires | Gram variable | Ellipsoïdes ou rondes, subterminales à terminales, déformantes | + | + | 18(33.9 318) |
| Total | | | | | | | 53 (100) |

* Cat = Catalase ; ** Oxy = Oxydase ; N = Nombre

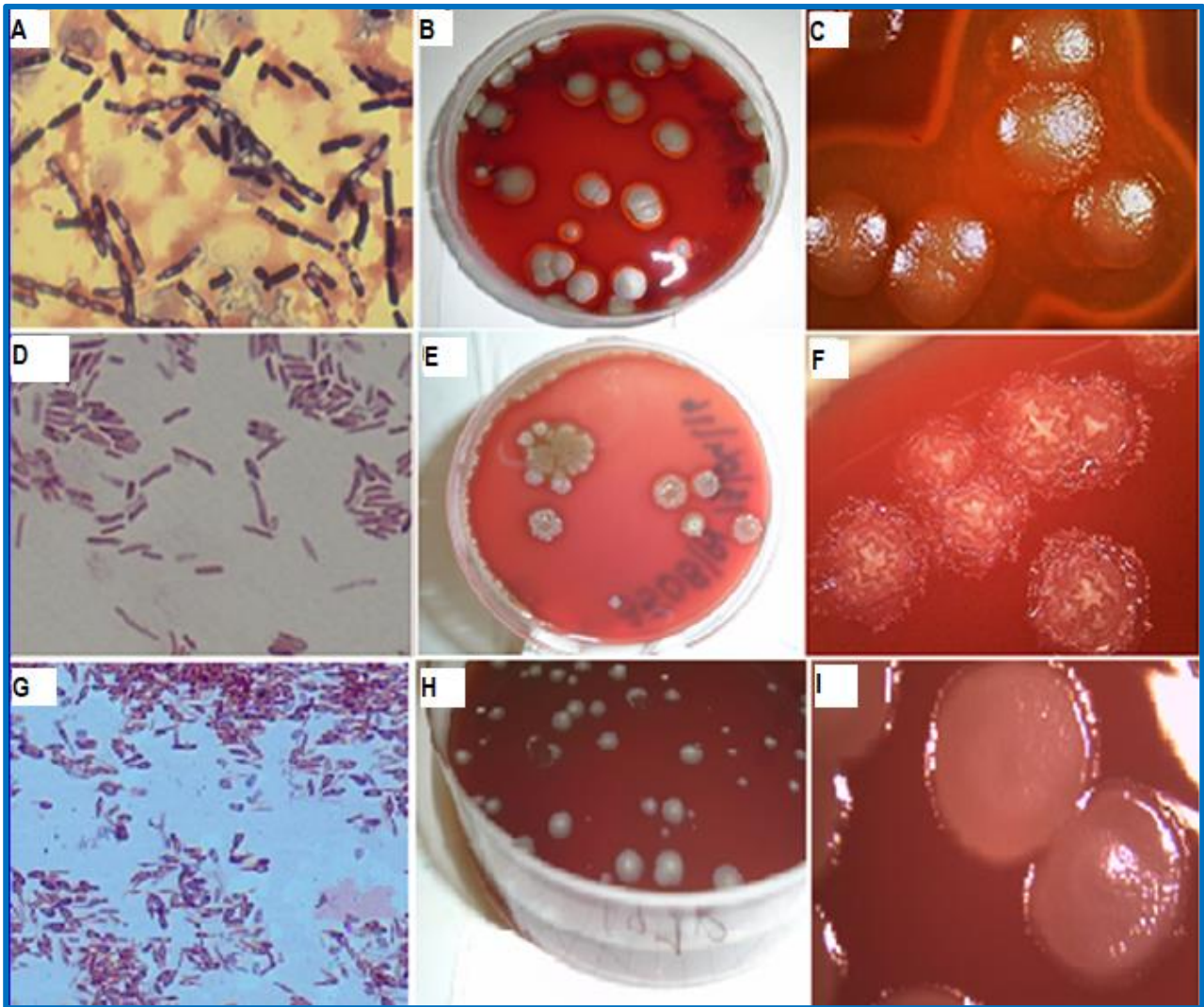


Figure 30 : Cellules et colonies de *B. cereus*, *B. licheniformis* et *Paenibacillus* après 24 heures d'incubation sur gélose Columbia au sang frais à 5% (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ).

Cellules de *B. cereus*, Bacilles à Gram positif, isolées, en pairs et en chaîne avec des endospores non déformantes représentant le groupe 1 (A); **Colonies de *B. cereus*** : (B) appareil android *Itel* (C) microscope Leica EZ4, larges, lisses, régulières et hémolytiques;

Cellules de *B. licheniformis*, bacilles à Gram positif, isolées et en pairs (D); **Colonies de *B. licheniformis*** : (E) appareil android *Itel*, (F) au microscope Leica EZ4, moyenne, rugueuse, crème-gris, irrégulières et non-hémolytiques.

Cellules de *paenibacillus*, bacilles à Gram positif, isolées et en pairs (G); **Colonies de *paenibacillus*** : (H) appareil android *Itel* (H); (I) microscope Leica EZ4, moyenne, rugueuse, irrégulières et non-hémolytiques.

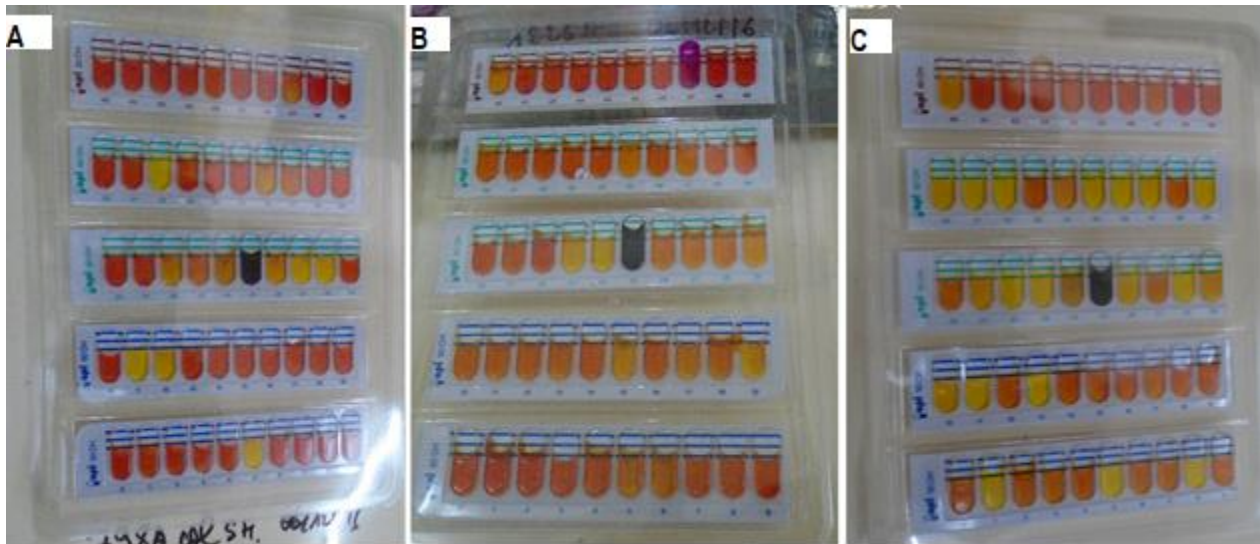


Figure 31 : profils de fermentation des hydrates de carbones par les bactéries sporulantes (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ).

(A) Profil de *B. cereus*, (B) profil de *B. licheniformis*, (C) Profil de *Paenibacillus*

III.2. Identification des bactéries sporulantes

Les tests biochimiques API 50 CHB ont permis d'identifier 35 des 53 isolats testés. Ces isolats appartenaient à 3 genres (*Bacillus*, *Paenibacillus* et *Brevibacillus*) et représentaient 8 espèces. Trente-quatre (64%) isolats ont été correctement identifiés avec des scores de similitudes supérieurs à 60% et un (2%) avec un score de 58%. Dix-huit (33,96%) isolats n'ont fermentés aucun des 49 hydrates de carbones et ont été identifiés comme des *Bacillus* non fermentant (**tableau 11**). Le contrôle de qualité externe avec le MALDI-TOF, a montré 87% (13/15) de concordance avec le test API 50CH/B. Seulement une discordance au niveau espèce a été observée (*B. firmis* 58% de similitude identifié comme *B. cereus* par le MALDI-TOF) et une espèce supplémentaire a été identifiée par le MALDI-TOF comme *lysiniibacillus Fusiformis* parmi les espèces identifiées comme non fermentant par le test API 50CH/B. Finalement, cette étude a montré la présence de 10 espèces (*B. cereus*, *B. licheniformis*, *Paenibacillus Thiaminolyticus*, *Paenibacillus alvei*, *B. Subtilis/ amyloliquefaciens*, *Brevibacillus laterosporus*, *B. firmus*, *B. anthracis*, *B. vallismortis* et *Lysinibacillus fusiformis*) (**tableau 14**). Les plus importants étaient *B. cereus* (30%) fermentant entre 9-14 hydrates de carbones et *B. licheniformis* (21%) fermentant entre 23-26 hydrates de carbone (**tableau 14**). Environ 69 % des isolats provenant des cas de tuberculoses confirmées bactériologiquement ont été identifiés contre 55% pour les cas de tuberculoses négatives.

Tableau 14 : Identification des espèces de bactéries sporulantes isolées des cultures contaminées de L-J

| Espèces des bactéries contaminantes | API 50 CH/B | | | MALDI-TOF-MS | | |
|--------------------------------------|-------------|------------------------------------|-------------------------|--|-------------|--------------|
| | Isolats Nb. | Hydrates de carbones fermentés Nb. | Similarité % (No.) | Espèces des bactéries contaminantes | Isolats Nb. | scores |
| <i>B. Cereus1</i> | 1 | 12 | 94,10 (1) | <i>B. Cereus</i> | 4 | [2,00; 2,39] |
| <i>B.Cereus1</i> | 11 | 13 | 71,40 (2), 72,80 (9) | | | |
| <i>B. Cereus2</i> | 1 | 9 | 92,40 (1) | <i>B. cereus</i> | 3 | |
| <i>B. Cereus2</i> | 1 | 10 | 79,80 (1) | | | |
| <i>B. Cereus2</i> | 2 | 11 | 79, 3 (1), 88 (1) | | | |
| <i>B. Licheniformis</i> | 5 | 25 | 99,90 (3), 66,10 (2) | <i>Licheniformis</i> | 4 | [2,3; 2,47] |
| <i>B. Licheniformis</i> | 2 | 26 | 99,80 (2) | | | |
| <i>B. Licheniformis</i> | 2 | 27 | 99, 90 (1), | | | |
| <i>B. Licheniformis</i> | 2 | 28 | 99,90 (3) 100 (1) | | | |
| <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> | 1 | 21 | 99,60 (1) | <i>Paenibacillus thiam.</i> | 1 | |
| <i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> | 1 | 23 | 99,90 (1) | <i>Paenibacillus thiam./B. vallismortis*</i> | 1 | [2,10; 2,17] |
| <i>Paenibacillus alvei</i> | 1 | 26 | 99, 90 (1) | <i>Paenibacillus thiam./B. cereus*</i> | 1 | |
| <i>B. Subtilis/amylo</i> | 2 | 24 | 98, 8 (1), 99,5 (1) | Non identifiée | 1 | NA |
| <i>B. anthracis</i> | 1 | 10 | 83, 10 (1) | Non identifiée | 1 | NA |
| <i>B. firmus**</i> | 1 | 6 | 57,70 (1) | <i>B. Cereus**</i> | 1 | 2 |
| <i>Brevibacillus laterosporus</i> | 1 | 10 | 76,6 | Non identifiée | 1 | NA |
| Non réactives | 18 | 0 | NA | <i>Lysinibacillus fusiformis</i> | 1 | 2,15 |

* Identification mixte d'isolat par la méthode du MALDI-TOF

** Isolats dont l'identification de l'espèce par les méthodes API et MALDI-TOF MS était différente.

III.3. L'Efficacité des milieux LJ supplémentés de VCNT sur les contaminations de culture des expectorations

La proportion de contamination des milieux de LJ supplémentés de VCNT à 10µg de vancomycine était statistiquement inférieure à celles des LJ non supplémentés de VCNT (18,7% contre 43,8%) ($p = 0,01$). Les cultures négatives étaient deux fois plus élevées pour les milieux LJ avec VCNT que pour ceux sans VCNT (12,5 % contre 6,2 %) (**Tableau 15**).

Tableau 15: Comparaison des résultats des cultures d'expectorations sur LJ avec ou sans VCNT

| Types de milieux | | L-J sans VCNT | | | | Total % | Ch2 | p-value |
|------------------|--------------------------|----------------------------|-----|------------------------|------|---------|-----|---------|
| | | Cultures non contaminées N | | Cultures Contaminées N | | | | |
| | | Pos | Nég | | | | | |
| L-J avec VCNT | Cultures non contaminées | Nég | 13 | 1 | 8 | 68,8 | 4.9 | 0,011 |
| | | Pos | 2 | 1 | 1 | 12,5 | | |
| | Cultures Contaminées | | 1 | 0 | 5 | 18,8 | | |
| | Total % | | 50 | 6.2 | 43,8 | 100 | | |

N= Nombre ; Nég = négatif, Pos =positif

III.4. Tolérance des mycobactéries et susceptibilité des bactéries sporulantes au VCNT

III.4.1. Tolérance des mycobactéries au VCNT

Le nombre d'UFC était indénombrable (colonies confluentes et de semi-confluentes) à la dilution de 10^{-1} pour 3/7 isolats de mycobactéries, ainsi que pour le BCG. Pour les quatre autres isolats, les UFC étaient dénombrables (**Figure 32**). La moyenne des UFC des milieux de LJ sans VCNT et des milieux de LJ avec VCNT à 10, 15 et 30 µg de vancomycine n'étaient pas différentes. Elles étaient respectivement de 95,5 ; 64 ; 44,5 et 33,5 avec $p=0,34$, 0,34 et 0,32 respectivement. Les UFCs étaient dénombrables pour tous les isolats de mycobactéries à la dilution de 10^{-3} . Les moyennes des UFCs dénombrées sur les milieux LJ supplémentés de VCNT à 10µg/ml de vancomycine par rapport au groupe témoin n'étaient pas significativement différentes (45,43 vs

31,14, $p = 0,56$; IC 95 : -37,15-65,73). Elles étaient cependant différentes pour les milieux de LJ supplémentés de VCNT à 15 et 30 $\mu\text{g/ml}$ de vancomycine (45,43 vs 16,85 et vs 3,71 respectivement; $p = 0,03$ et $p = 0,00$).

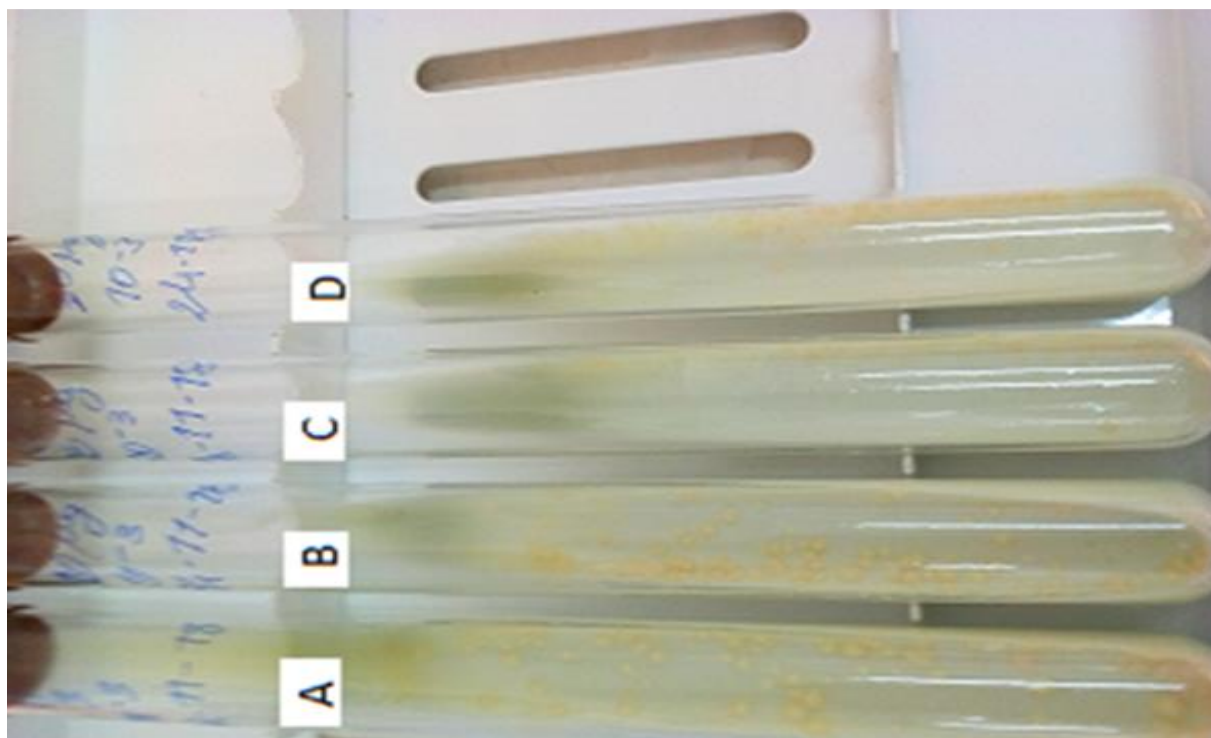


Figure 32 : Colonies dénombrables sur milieux de L-J supplémentés de VCNT (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ)

(A) LJ non supplémenté de VCNT, (B) LJ supplémenté de VCNT à 10 $\mu\text{g/ml}$ de Vancomycine

(C) LJ supplémenté de VCNT à 15 $\mu\text{g/ml}$ de vancomycine, (D) : LJ supplémenté de VCNT à 30 $\mu\text{g/ml}$ de Vancomycine

III.4.2. Susceptibilité des bactéries sporulantes au VCNT

La figure 33 représente la susceptibilité des bactéries sporulantes au VCNT à 10, 15, et 30 $\mu\text{g/ml}$ de vancomycine. Après trois jours d'incubation, 12/15 (80%) de *Bacillus* ont contaminés les milieux de L-J non supplémentés de VCNT et aucun (0/15) *Bacillus* n'a contaminé les milieux de L-J supplémentés de VCNT quelles que soit la concentration de celui-ci et la dilution de l'inoculât.

Après 7 jours d'incubation, tous les *Bacillus* ont contaminés tous les milieux de L-J non supplémentés de VCNT. Deux *Bacillus* (un *B. cereus* et un *Bacillus* non réactive) ont contaminés les milieux de L-J supplémentés de VCNT à 10 $\mu\text{g/ml}$ de vancomycine pour les inoculât dilués à 10^{-1} et 10^{-3} . Cela représenterait un faible taux de contamination statistiquement différent de notre

taux standard de contamination (13 % vs 40 %; $p = 0,035$; CI95 : 3,73-37,88). Un Bacillus non réactive a également contaminé les milieux de L-J supplémentés de VCNT à 15 μ g/ml de vancomycine pour les deux dilutions (taux de contamination : 7%). Si on le comparait à notre taux standard de contamination, la différence serait statistiquement significative ($p=0,00$; IC 95 : 1,18-29,8). Après 14 jours d'incubation, 3/15 Bacillus (deux B. cereus et un B non réactif) ont contaminés les milieux de L-J supplémentés de VCNT à 10 μ g/ml de vancomycine pour les inoculât dilués à 10^{-1} et 10^{-3} (taux de contamination de 20 %). Comparé à notre taux standard de contamination la différence ne serait pas statistiquement significative ($p=0,11$, IC : 7,04-45,18). Aucun Bacillus n'a contaminé les milieux de L-J supplémentés de VCNT à 30 μ g/ml de vancomycine et le témoin E. coli (sensible au VCNT) n'a poussé sur aucun milieux de L-J supplémentés de VCNT quelles que soit la concentration de ce dernier et la dilution des inoculât.

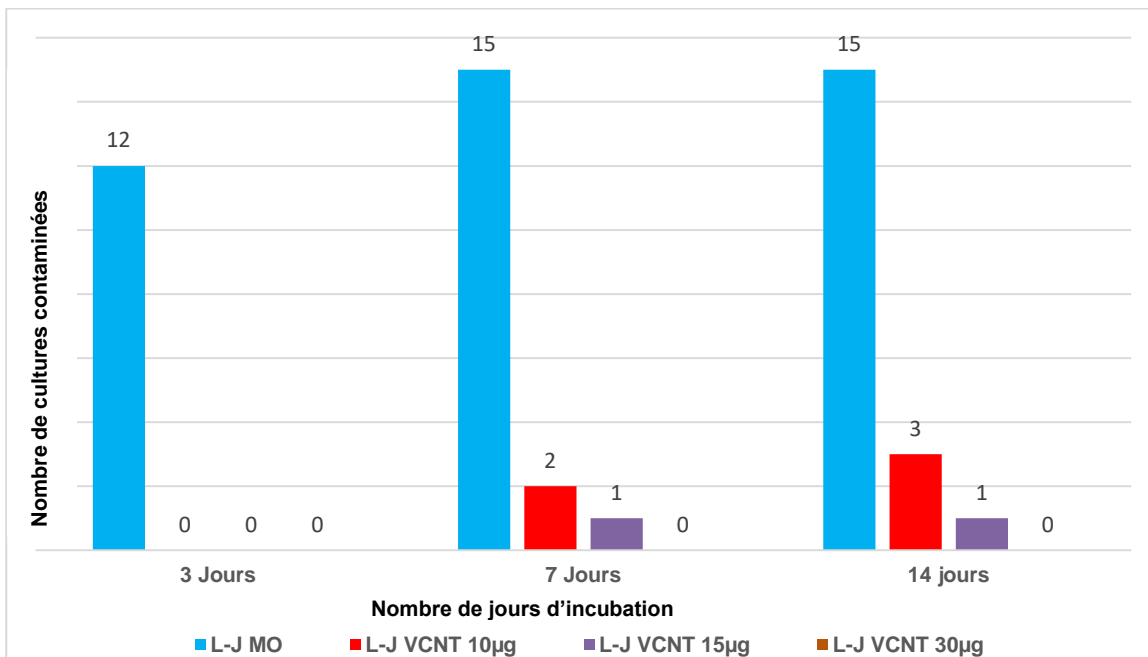


Figure 33: Contamination des cultures en fonction de la durée d'incubation

L-J MO : Lowenstein-Jensen ordinaire ; VCNT : Vancomycine, colistine, nystatine, triméthoprim ; L-J VCNT 10µg : L-J VCNT à 10µg/ ml de vancomycine ; L-J VCNT 15µg : L-J VCNT à 15µg/ ml de vancomycine ; L-J VCNT 30µg : L-J VCNT à 30µg/ ml de vancomycine.

En fonction des groupes de *Bacillus*, l'apparence des milieux contaminés était caractéristique. Le groupe des *B. cereus* était caractérisé par une croissance en nappe de couleur brun-jaune avec une liquéfaction importante des milieux (milieu fissuré) (**figure 34A**), ceux de *B. licheniformis* par une croissance en nappe, avec un pigment rouge framboise et une liquéfaction moins importante du milieu (**figure 34B**), enfin, la croissance des *Paenibacillus* a été caractérisée par un virage en bleu turquoise du milieu sans liquéfaction (**figure 34C**).

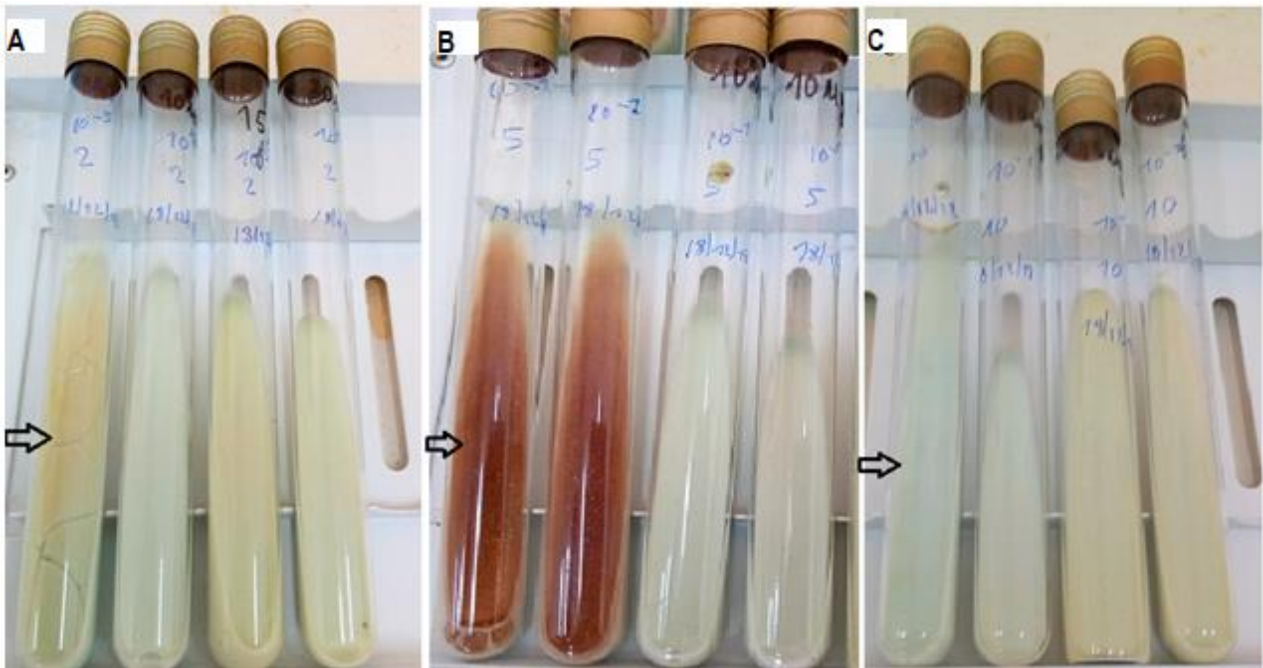


Figure 34 : Aspects des contaminations sur les milieux de LJ (Photo KA, URM, INSP/Centre MURAZ).

- (A) : Aspect de la croissance *B. cereus* sur les milieux de LJ non supplémentés de VCNT,
- (B) : Aspect de la croissance *B. licheniformis* sur les milieux de LJ non supplémentés de VCNT,
- (C) : Aspect de la croissance *des paenibacillus* sur les milieux de LJ non supplémentés de VCNT.

IV. Discussion

L'objectif de cette étude était d'identifier les espèces de bactéries sporulantes isolées des cultures contaminées de LJ, d'évaluer l'efficacité du VCNT à réduire les taux de contamination des cultures mycobactérienne, et de s'assurer de la tolérance des mycobactéries et de la sensibilité des bactéries sporulantes au VCNT.

La description morphologique a montré que les isolats majeurs étaient ceux du groupe 1 et 2. Ils correspondaient respectivement aux bactéries du groupe 1 (sous-groupe A) et du groupe 1 (sous-groupe B) décrites par Drobniewski *et al.* en 1993 (**Drobniewski *et al.*, 1993**). Selon Drobniewski, les bacillus appartenant à ce groupe sont les plus fréquemment isolées en clinique, et donc leur isolement dans les expectorations n'est pas un évènement exceptionnel. Cette étude a montré la présence de 10 espèces dont les plus importantes étaient *B. cereus* (30%) et *B. licheniformis* (21%) correspondant aux morpho-groupes 1A et 1B précédemment cités. Il est important de noter que les réactions positives à 24h se négative à 48h d'incubation pour les souches apparentées au *B. licheniformis*. Ce phénomène est probablement dû à la neutralisation de l'acide par des protéases alcalines produites naturellement par ces bactéries (**Ferrero *et al.*, 1996**). Les résultats du test API 50CH/B n'étaient pas en parfait accord avec celui du control de qualité externe. En effet, l'isolat identifié comme étant un *B. firmus par* API50 CH/B a été identifié comme *B. cereus* par le MALDI-TOF-MS. Selon la taxonomie actuelle, cette espèce appartient au groupe d'espèce de *B. subtilis* et une discrimination avec les espèces du groupe *B. cereus* devrait se faire sans difficulté. Morphologiquement, cet isolat ressemble à *B. cereus* mais il n'a fermenté que 6 hydrates de carbone au lieu de 13 comme la majorité des *B. cereus*. Une identification moléculaire de cet isolat serait nécessaire pour préciser son espèce. Le test API 50CH/B n'a pas pu identifier 18 (33%) isolats hétérogènes. Aucun de ces isolats n'a fermenté aucun des 49 hydrates de carbones du test API 50 CH/B et donc conséquemment, aucune similarité de profil biochimique n'a pu être établie au niveau espèces avec les *Bacillus* et apparentés. Selon leur morphologie (table1), ces bactéries appartiendraient aux groupes II et III de la classification de Drobniewski et seraient moins impliqués dans les infections cliniques (**Drobniewski *et al.*, 1993**). Malheureusement, la quasi-totalité de ses isolats n'a pas été identifié au MALDI-TOF-MS, ce qui aurait peut-être permis d'identifier ce groupe de Bacillus non réactive. Malgré cette limite, nous avons été en mesure de mettre en évidence les contaminants majeurs.

B. cereus (30 %) et *B. licheniformis* (21 %) étaient les isolats les plus importants identifiés dans cette étude. Ces résultats différent de ceux de l'étude irlandaise et ougandaise, qui ont respectivement montré que les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* 47,2 % et *Serratia marcescens* 13 %) et à Gram positif (*Staphylococcus spp* 50 % et *Streptococcus spp* 16 %)

étaient les principaux contaminants isolés (**McClain et al., 2011 ; Kassaza et al., 2014**) Seulement 2 % de *B. licheniformis* a été détecté dans l'étude irlandaise. Cette différence pourrait s'expliquer par les conditions climatiques géographiques et ethniques (nutrition, génétique, immunités qui conduisent à la variabilité du microbiome oral) (**Li et al., 2014**), principalement pour l'étude irlandaise. Pour ce dernier en effet, le climat est tempéré océanique et les conditions ethniques sont plus éloignées de la nôtre par rapport à l'étude ougandaise. L'alimentation est le principal argument militant en faveur de nos résultats car les *Bacillus spp* sont généralement utilisés comme ferments dans la production d'aliments fermentés, largement utilisés en Afrique et en particulier dans les plats cuisinés au Burkina Faso (**Sanni et al., 1993 ; Sanni et al., 2002 ; Ouoba et al., 2007 ; Ouoba et al., 2008 ; Savadogo et al., 2011**). Par conséquent, leur isolement dans la culture des expectorations dans notre contexte ne devrait pas être exceptionnel. Nous avons observé une grande similitude (74 %) entre les espèces que nous avons identifiées et celles identifiées dans les aliments fermentés au Burkina-Faso. IL s'agit essentiellement de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. firmus* et *B. borstelensis* (**Ouoba et al., 2008 ; Savadogo et al., 2011**). Cela indique que les aliments jouent un rôle important dans la contamination des expectorations en transférant ces microorganismes (de manière transitoire ou permanente) dans l'oropharynx ou dans les écosystèmes pulmonaires. Même si nous ignorons les interactions qui peuvent faciliter cette colonisation, il est très probable que leur isolement dans des milieux de LJ contaminés soit lié à des facteurs contributifs. En effet, l'utilisation d'hydroxyde de sodium pendant le processus de décontamination des expectorations pourrait être le facteur de sélection de microorganismes résistants à la plupart des agents chimiques. Pour les aliments fermentés, la longue durée de cuisson des graines de *Parkia biglobosa* et d'*Hibiscus sabdariffa* pendant la préparation de bikalga et de soumbala (aliments fermentés) est le facteur qui permet la sélection de ces microorganismes thermo-tolérants tels les bactéries sporulantes.

Nos résultats soulèvent une question importante : le rôle réel de la présence dans les expectorations de *B. cereus*, *B. licheniformis* et *subtilis*, bactéries le plus souvent impliqués dans les infections humaines (**Turnbull et al., 1996**). De nombreux arguments suggèrent que le principe de précaution doit être appliqué et que les cliniciens et les microbiologistes cliniques doivent prêter attention à ce problème et ne pas considérer ces bactéries comme étant de simples contaminants.

Premièrement en 1993, **Drobniewski et al.** ont affirmé que la plupart des souches importantes de bacillus isolées cliniquement appartenaient au groupe *B. cereus* et *B. subtilis*, suggérant ainsi que cette présence dans les expectorations n'est peut-être pas fortuite. En effet, *Bacillus cereus* est bien connu pour causer des intoxications alimentaires, et *B. licheniformis* a parfois été isolé dans des cas d'infections liées à la consommation d'aliments (**Logan et al., 2011**,

Bottone et al., 2010). En plus des intoxications alimentaires, *B. cereus* et *B. licheniformis* au cours des dernières années ont été de plus en plus impliqués dans un large éventail d'infections, incluant les abcès, bactériémie/septicémie, blessures et brûlures, infections de l'oreille, endocardite, méningite, ophtalmite, ostéomyélite, péritonite et infections respiratoires et urinaires chez les personnes immunodéprimées et immunocompétentes (**Turnbull, 1996 ; Bottone, 2010 ; Sweany et Pinner, 1925 ; Jeon et al., 2012 ; Yuichiro et al. 2017**). De plus, *Paenibacillus* et *Brevisbacillus* identifiés dans notre étude ont été sporadiquement isolés dans des échantillons cliniques (sang, urine, drainage, aspiration bronchique) (**Celendroni et al., 2016 ; Frankard et al., 2004, Kim et al., 2010**). Aussi, *B. anthracis*, l'un des pathogènes les plus dangereux impliqué dans les infections humaines, a également été identifié sur un isolat appartenant à un cas de tuberculose négative. Deuxièmement, bien que cela ne soit pas l'objectif de cette étude, des caractères de virulence comme l'hémolyse et la sécrétion de protéase ont été mis en évidence sur la plupart de nos isolats.

Enfin, les données actuelles suggèrent que le microbiome pulmonaire est un potentiel facteur de risque modifiable de l'infection tuberculeuse et de la maladie (**Wood et al., 2017**). Tous ces éléments suggèrent une possible association entre les bactéries sporulantes (en particulier *B. cereus*, *B. licheniformis*, *Paenibacillus B. anthracis*) et la tuberculose pulmonaire ou l'infection pulmonaire en général. De futures études seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Notre deuxième objectif était d'évaluer l'efficacité à réduire les contaminations de cultures par l'utilisation de milieux sélectif de L-J à base de VCNT à 10µg de vancomycine et de s'assurer d'une bonne tolérance des mycobactéries au VCNT et d'une susceptibilité accrue des bactéries sporulantes au VCNT. La culture des expectorations sur les milieux de L-J supplémentés de VCNT à 10µg de vancomycine a montré un taux de contamination significativement plus faible et un meilleur taux de recouvrement des mycobactéries comparées à celles des milieux de L-J non supplémentés de VCNT. Bien que largement utilisé dans les laboratoires de bactériologie classique, le VCNT à notre connaissance n'a jamais été utilisé comme supplément sélectif dans les milieux de L-J. Cependant, le supplément sélectif (VAN : Vancomycine, acide nalidixique et nystatine) contenant de la vancomycine à 10µg/ml a été utilisé avec des milieux liquides pour les cultures de mycobactéries à partir d'aspiration gastrique, et a également montré une réduction significative de la contamination des cultures.

Deux récentes études ont aussi évaluées le milieu L-J ordinaire versus des combinaisons d'antibiotiques. Il s'agit de l'étude de **Kassaza et al.**, en Ouganda qui a évaluée le milieu LJ + PANTA, L-J + Selectatab (dont on ne connaît pas la composition) et L-J + Pénicilline (**Kassaza et al. 2014**), et celle d'**Okuma et al.**, au Kenya qui a évaluée le milieu LJ versus LJ+PACT (**Okuma**

et al., 2017). Notre résultat en termes de taux de contamination sur les LJ supplémentés d'antibiotiques était différent de ces deux études (18% vs respectivement 4% et 6%). La raison de cette différence est le gain de résistance qu'acquièrent les bactéries sporulantes après 14 jours d'incubation à 37°C. Mais en termes de réduction des contaminations, nous pouvons considérer que nos résultats étaient similaires puisque qu'ils ont tous montrés que les taux de contaminations étaient significativement plus faibles sur les milieux L-J supplémentés d'antibiotiques que sur les L-J ordinaires. Cependant en termes de recouvrement des MTBc, nos résultats sont beaucoup plus proches de ceux de **Kassaza** qui ont montrés un gain dans le recouvrement des MTBc alors que ceux de **Okuma** ont montré des taux de recouvrement similaires quelque soit le milieu utilisé. Dans notre étude et en partie dans celle de **Kassaza**, les contaminants résiduels des cultures sur LJ ordinaire appartenaient aux spectres d'action des combinaisons d'antibiotiques utilisés et les mycobactéries ont une résistance naturelle à l'endroit de ces antibiotiques. Ce qui expliquerait la diminution du taux de contamination suivie de l'augmentation du taux de recouvrement des MTBc. Dans l'étude d'**Okuma**, les contaminants n'étaient pas connus, mais étaient probablement susceptibles aux PACT au vu des résultats de contamination. Quand au non recouvrement des mycobactéries nous n'avons pas d'explication vu que ceux-ci sont censés avoir une résistance naturelle vis a vis du PACT.

Malgré le nombre réduit d'échantillons analysés, cette expérimentation suggère que le milieu sélectif de LJ supplémentés de VCNT pourrait être utilisé pour isoler les mycobactéries à partir des expectorations, principalement dans les laboratoires qui sont confrontés à des taux élevés de contamination liés aux bactéries sporulantes. Toutefois, nous avons noté que les taux de contaminations demeurent supérieurs aux taux acceptables (5 à 10 %), et que par conséquent, il était important d'étudier la tolérance des mycobactéries et la sensibilité des bactéries sporulantes au VCNT dans une perspective d'augmentation de la concentration du VCNT. Comparativement au contrôle, les mycobactéries ont montré une bonne tolérance à toutes les concentrations du VCNT pour l'inoculum dilué à 10^{-1} ($p \geq 0.32$), mais pour ceux dilués à 10^{-3} , cette tolérance n'est maintenue que pour le VCNT à 10µg de vancomycine ($p=0.56$), mais pas pour le VCNT à 15 ou 30µg de vancomycine (respectivement : $p=0,03$ et $p=0,00$). Cette expérimentation suggère que l'utilisation de milieux de LJ supplémentés de VCNT à 10 µg de vancomycine n'affecterait pas l'isolement des mycobactéries, contrairement aux milieux de LJ supplémentés de VCNT à 15 ou 30µg de vancomycine, où il pourrait y avoir un risque réel de recouvrement des mycobactéries, en particulier pour les expectorations pauci-bacillaires. Toutefois, l'utilisation de milieux de LJ supplémentés de VCNT à 15 µg de vancomycine pourrait être envisagée pour les frottis fortement positifs.

Pour la susceptibilité des bactéries sporulantes au VCNT à 10µg de vancomycine, nos résultats ont montré une augmentation de la susceptibilité des bactéries en fonction de l'augmentation de la concentration du VCNT, et une diminution de la susceptibilité en fonction de la durée d'incubation des milieux principalement pour la concentration du VCNT à 10µg/ml de vancomycine. Ainsi, les taux de contamination des milieux de LJ supplémentés de VCNT à 10µg/ml de vancomycine étaient respectivement de 0%, 13% et 20% après 3, 7 et 14 jours d'incubation, de 0%, 6% et 6% pour les milieux de LJ supplémentés de VCNT à 15µg/ml de vancomycine et de 0% pour les milieux de LJ supplémentés de VCNT à 30µg/ml de vancomycine quelle que soit la durée d'incubation. Même si les milieux de LJ supplémentés de VCNT à 15µg ou 30µg de vancomycine permettent une meilleure réduction de la contamination, les résultats de la tolérance des mycobactéries et de la sensibilité des bactéries sporulantes pris ensemble, suggèrent que la concentration de VCNT à 10µg/ml de vancomycine est celle qui permet à la fois la préservation optimale des mycobactéries et l'élimination optimale des bactéries sporulant. A cette concentration, nous avons obtenu un taux de contamination de 20% par les bactéries sporulantes après 14 jours d'incubation. Ce taux comparé à notre taux standard de contamination (40%) représente une réduction de 20%. Malgré ce bon résultat, ce taux de contamination est supérieur aux niveaux acceptables recommandés par l'OMS (5-10%). De ce fait, cette méthode pourrait simplement être utilisée comme alternative jusqu'à la mise au point de méthodes plus efficaces. Un des candidats potentiels pourrait être une méthode qui initierait la germination, bloquerait la sporulation et ciblerait donc la forme végétative qui est le talon d'Achille des bactéries sporulantes. Lorsque la durée d'incubation ne dépassait pas trois jours, tous les isolats étaient sensibles aux milieux de LJ supplémentés de VCNT à 10µg de vancomycine. Ces résultats étaient similaires aux études sur le bacillus clinique et sur les bacillus isolés des alimentaires traditionnels africains fermentés (**Ikeda, et al., 2015 ; Adimpong et al., 2012**). Mais l'augmentation du temps d'incubation semble réduire l'efficacité du milieu de LJ supplémentés de VCNT à 10µg/ml de vancomycine. Cette perte d'efficacité est une préoccupation, mais on s'attend à ce que la contamination se stabilise après 14 jours d'incubation, parce que cette durée est suffisante pour permettre à la majorité des mycobactéries de se développer. Nous avons noté que les aspects des contaminations étaient spécifiques, en particulier pour *B. cereus*, *B. licheniformis* et *Paenibacillus*. Cette spécificité des aspects des contaminations pourrait servir d'outil pour prédire les types de contaminants dans les cultures.

En résumé, cette étude a montré que le milieu sélectif de LJ supplémentés de VCNT à 10 µg/ml de vancomycine est une bonne solution de rechange pour réduire la contamination de la culture des expectorations, en particulier celles liées aux bactéries sporulantes. L'augmentation de

la concentration de VCNT pour réduire la contamination n'est pas une option pour les expectorations pauci-bacillaires, mais pourrait être utilisée pour les frottis fortement positifs. Une évaluation multicentrique est nécessaire pour confirmer tous ces résultats, principalement dans les pays à ressources limitées confrontés aux problèmes de contamination.

V. Conclusion

Les bactéries sporulantes isolées à partir de milieux de LJ contaminés appartenaient aux genres *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* et *Lysinibacillus*. Les plus importantes étaient *B. cereus* et *B. licheniformis*. La similitude entre les isolats identifiés dans cette étude et ceux couramment isolés des aliments traditionnels fermentés, suggère un lien entre les contaminations des cultures et l'alimentation. La similarité entre nos isolats et ceux impliqués dans les infections humaines suggère une clarification de leur rôle réel dans les expectorations. L'utilisation de milieux de LJ supplémentés de VCNT à 10µg/ml de vancomycine pour réduire les contaminations de culture pourrait être une méthode complémentaire et ou alternative aux milieux de LJ ordinaire en attendant la mise au point d'une méthode plus efficace.

Partie 5 relative à l'article 5

Titre : « Etats des lieux sur la tuberculose de l'origine à nos jours : Défi, voix à explorer en vu de l'amélioration du diagnostic en vu d'une meilleure prise en charge voir de l'éradication de cette maladie ; Limites et avancées majeures imputables à nos travaux ».

CHAPITRE 5: DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

Le présent travail de thèse vise à améliorer par l'étude des facteurs pré-analytiques, et analytiques, la qualité du diagnostic de la tuberculose pulmonaire par la technique de culture sur les milieux de L-J au Burkina Faso. Le but ultime de ce travail étant de contribuer au contrôle de la tuberculose en vu de son éradication. Or, le diagnostic efficace de la tuberculose demeure entravé par des taux élevés de contaminations. Aussi, dans le but d'atteindre notre objectif, nous avons évalué successivement :

- la méthode de décontamination à l'acide oxalique à 5% ;
- les facteurs préanalytiques tels que la température et la durée de conservation des expectorations ;
- et enfin, la réduction de la charge microbienne buccale par l'utilisation du bain de bouche à base de la Chlorhexidine.

Suite aux résultats obtenus principalement durant cette dernière évaluation, nous avons caractérisé les espèces des microorganismes contaminants résiduels majeurs présents dans les cultures, et mis au point un milieu sélectif de L-J à base de vancomycine comme méthode de culture complémentaire permettant la réduction des contamination des cultures.

La mise en évidence et la caractérisation des bactéries sporulantes, contaminants majeurs des cultures au cours de cette thèse ont de facto permis de relever les caractéristiques de base de ces types de bactéries bien connu pour être largement étudié dans le cadre de la microbiologie alimentaire. Cela a été un avantage qui a permis une meilleure compréhension de l'ensemble de nos résultats et la formulation de nouvelles recommandations sur les conditions de conservation des expectorations. En effet, selon la littérature, ces bactéries sont :

- de nature mésophile à psychrotrophe (capacité de croissance à basse température et à haute température) (**Guinebretiere et al., 2008**) ;
- de grande résistance aux agents physiques et chimiques et notamment supérieure à celle des mycobactéries en raison de leurs capacité à sporuler et du fait de la présence majeure de la bactérie sous sa forme sporulée (**setlow et al., 2006**) ;
- capables d'initier leur processus de sporulation en réponse à un nombre de signaux internes et externes tels que l'augmentation de la densité cellulaire, ainsi que l'appauvrissement du milieu en nutriments et dure généralement entre 8 et 10 heures selon un modèle basé sur *B. subtilis* (**De Hoon et al., 2010**) ;
- capable d'induire ce processus de sporulation même à basses températures (**Gauvry, 2017 ; Bressuire-Isoard et al., 2018**).

Le principe de la décontamination repose, nous le savons, sur une meilleure résistance des mycobactéries par rapport aux bactéries contaminantes. La réduction des contaminations que nous avons obtenues suite à l'évaluation de la méthode de décontamination à l'acide oxalique à 5% réalisée dans le but d'optimiser le processus de décontamination des cultures était insuffisante. En effet, elle induisait un effet pervers, à savoir l'augmentation du nombre de cultures faussement négatives imputable probablement à l'action de l'acide oxalique. L'utilisation d'échantillons congelés au moment de l'évaluation de la décontamination à l'acide oxalique pourrait être considérée comme un biais. Cependant nous pensons qu'il n'avait pas de risque ni pour la viabilité des mycobactéries ni pour celle de nos contaminants majeurs car l'exposition à la congélation n'a pas d'effet sur leur croissance (Tessema et al., 2011 ; Assadishad et al., 2014). Par ailleurs, la présence de bactéries sporulantes plus résistantes que les mycobactéries dans les expectorations, signifie que leurs éliminations par décontamination impliqueraient de facto l'élimination d'abord des mycobactéries surtout si ceux-ci ont sporulé. Cependant nous ne sommes pas à mesure de prédire le moment où ces bactéries initient et complètent la sporulation. Plusieurs scénarios sont possibles et mériteraient d'être explorés dans de futures recherches. En effet, la sporulation peut survenir au moment de :

- la conservation à température ambiante ou à 4-8°C au réfrigérateur (principalement pour les bactéries psychotropes) (puisque des spores sont observées dans les culots de décontamination) ;
- la décontamination sous l'action de la soude qui peut initier la sporulation;
- l'incubation à 37°C des milieux de L-J inoculés (sous l'effet de croissance optimale des souches).

Aussi, pour nous chercheur, contourner cette difficulté en apparence quasi-incontournable demeure un défi majeur dans la lutte contre la tuberculose.

Nos travaux sur les facteurs préanalytiques soumis à des recommandations tels que la température et la durée de conservation des expectorations ont confirmé d'une part l'importance des contaminations de culture au cours du diagnostic de la tuberculose pulmonaire au Burkina Faso et montré d'autre part que ces recommandations ne sont pas complètement applicables dans nos conditions par manque de moyens logistiques et/ou de ressources humaines.

La nature psychrotrophe et mésophile de la quasi-totalité de nos contaminants pourrait expliquer le fait que la conservation des expectorations à température ambiante soit le facteur le mieux associé aux contaminations des cultures comparativement à la durée de conservation. Il est admis que les bactéries ne sporulent pas en dehors des phases de croissance (), et les gammes de températures de croissance des *B. cereus* (psychrotrophes / mésophile) sont comprises entre 5°C et 45°C (Kramer et Gilbert, 1989 ; Guinebretiere et al., 2008) et celles de *B. licheniformis* (habituellement

mésophiles ou thermophiles facultatifs) sont comprises entre 20 à 60°C (Douin, 2013). Ces températures qui incluent les températures ambiantes enregistrées dans nos contrées (22-35°C) induiraient une croissance et par conséquent la sporulation de ces bactéries lorsque nos expectorations sont conservées à température ambiante. Ce qui par conséquent augmenterait les contaminations des cultures.

Il est connu que les souches de *B. cereus* sensu stricto qui représente un de nos contaminants majeurs (30%) peuvent être psychrotropes. La possibilité de croissance de ces contaminants à basses températures expliquerait leur croissance (voire leur sporulation) dans les expectorations conservées au réfrigérateur (entre 2°C et 8°C) et traitées dans l'intervalle des délais recommandés. En effet, selon les références ci-dessus citées, la gamme de température de croissance de *B. cereus* qui varie entre 5°C et 50°C, inclut celles recommandées pour la conservation des expectorations. Ce qui signifie qu'il y aura une croissance résiduelle de ces bactéries durant la conservation des expectorations et possiblement l'induction de la sporulation. Cela contribuerait à réduire l'efficacité de la décontamination et augmenterait les taux de contaminations. Dans ce contexte, nous pouvons affirmer que les recommandations spécifiques de l'OMS, de l'Union et du PNT pour les pays à ressources limitées concernant la conservation des expectorations sont elles même en partie tributaires de l'augmentation des contaminations de culture que connaissent ces pays. Car il apparaît que l'allègement des recommandations en faveur de ces pays pauvres qui préconise la conservation au frais des expectorations (à défaut de pouvoir les traiter dans les deux heures suivant le prélèvement) soit en partie la cause même dans une certaine mesure de l'augmentation des taux de contaminations de culture des mycobactéries dans ces pays. En ce qui concerne la durée de conservation, il faudra nécessairement des études pour déterminer la durée nécessaire à la sporulation de ces bactéries à ces basses températures de croissance afin de pouvoir recommander des durées de conservation adéquates. Ce dont nous sommes sûr, c'est que plus elle sera longue plus elle laissera du temps aux bactéries de sporuler et plus cela sera susceptible d'entraîner une augmentation des contaminations tel qu'observé dans nos travaux (Kabore et al., 2014). Aussi, pensons-nous que ces recommandations mériteraient certainement d'être revues à la lumière des informations résultantes de nos travaux (Kabore et al., 2014 ; Kabore et al., 2019). Par exemple, le traitement express des expectorations et la congélation immédiate de celles-ci pourraient être recommandés dans un algorithme revu et corrigé en tenant compte des conditions intrinsèques de transport et de laboratoire dans la sous-région en général et au Burkina Faso en particulier. À défaut, le recueil de expectorations directement dans des milieux de transport/décontaminant devrait être recommandé. En effet, il est admis que ces bactéries ne sporulent pas à l'intérieur du corps humain et que la cellule végétative est le maillon faible de ces types de bactéries. Ces recommandations de toute évidence pourraient améliorer le diagnostic de la tuberculose car elles limiteront les

contaminations, et dans nos conditions de travail, il serait judicieux d'envisager une étude comparative de recueil des expectorations directement dans des milieux de transport/décontaminant versus méthode classique pour consolider ou infirmer notre proposition. Mais, une question sensible est par ailleurs soulevée : Comment concilier le manque de moyen (la pauvreté) et le renforcement de ces recommandations alors que celles actuelles, peinent à être appliquées par manque de moyens logistiques et de personnels ?

De surcroît, des études ont montré que *B. licheniformis*, le deuxième contaminant en terme d'importance (21%) était résistant à la congélation (Assadishad et al., 2014) et donc au froid de nos réfrigérateurs. De plus ils peuvent se développer dans des environnements à pH 10 puisque produisant eux-mêmes des protéases alcalines (Douin, 2014 ; Razzaq et al., 2019). Nous avons d'ailleurs fortuitement mis en évidence de manière indirecte la production de protéase alcaline dans notre étude sur la caractérisation des contaminants (Neutralisation de l'acidité de nos cultures positives en 24 heures sur API 50 CH qui redeviennent négatives à 48 heures). De ce fait, nous pouvons aisément imaginer que ces bactéries puissent résister à la décontamination par le NaOH à 4% (décontaminant alcalin) même sans avoir sporulé. Dans ces conditions, l'utilisation de l'acide oxalique par exemple comme décontaminant serait une bonne alternative. De manière avantageuse, la contamination sur L-J par *B. licheniformis* a un aspect spécifique reconnaissable (rouge framboise) (Kaboré et al., 2019b), il suffira donc de retraiter à l'acide oxalique les expectorations contaminées par *B. licheniformis* lors des primoculture.

La revue de la littérature a montré, en terme d'importance, qu'en dehors de l'évaluation des conditions de conservation et des délais de traitement des expectorations, le facteur préanalytique le plus évalué dans l'optique de réduire les contaminations des cultures était la réduction de la charge microbienne buccale par l'usage des bains de bouches avant le recueil des expectorations. En nous intéressant au facteur « charge microbienne buccale », notre hypothèse était que sa réduction en amont par l'utilisation du bain de bouche à base de la chlorhexidine réduirait en aval les contaminations de cultures au cours de la phase analytique. Pour minimiser les biais lié à la sélection des échantillons, nous avons eu recours à des échantillons appariés, chaque patient ayant fourni une expectoration pour le groupe contrôle et une pour le groupe expérimentale. Malheureusement, cette étude n'a pas permis de réduire les contaminations de cultures des mycobactéries contrairement aux études publiées qui nous avaient inspirées (Kalema et al., 2012 ; Peres et al., 2011). Néanmoins, la caractérisation sommaire des contaminants réalisée au cours de cette étude a permis pour la première fois, la mise en évidence de bactéries sporulantes comme contaminants résiduels majeurs des cultures des mycobactéries. La présence de ces bactéries sporulantes connues pour être résistantes à de nombreux agents physiques et chimiques utilisés comme désinfectants ou

décontaminants expliquerait l'inefficacité des bains de bouches à contribuer à la réduction des contaminations dans nos conditions d'étude. L'autre hypothèse permettant de justifier cet échec serait que les bactéries sporulantes proviennent du microbiote pulmonaire à l'abri des bains de bouche qui dès lors demeurent sans effet.

Très peu d'études se sont intéressées à la caractérisation des contaminants mais aucune parmi elle n'a mis en évidence des bactéries sporulantes comme étant les contaminants majeurs. Pourtant, aux regards de l'importance de la connaissance des types de contaminants, il est crucial que les laboratoires qui pratiquent la culture des mycobactéries et qui rencontrent des problèmes de contaminations puissent les caractériser. Un adage populaire ne dit-il pas : « Pour bien combattre son ennemi, il faut bien le connaître ».

La dernière partie de nos travaux était orientée sur la caractérisation biochimique des bactéries sporulantes isolées de nos cultures et sur l'évaluation de l'efficacité du milieu sélectif à base de VCNT à 10µg/ml de vancomycine. Il faut rappeler que la vancomycine est généralement inactive sur les mycobactéries et active sur les bactéries sporulantes (**Rubinstein et al., 2014; Celandroni et al., 2016**), et de ce fait, elle constituait la candidate idéale à inclure dans les combinaisons d'antibiotiques utilisées comme suppléments sélectifs dans les milieux de culture des mycobactéries. La caractérisation des isolats de contaminants résiduels, a révélé que ceux-ci appartiennent aux genres *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* et *Lysinibacillus*. Les plus importantes étaient *B. cereus* (30%) et *B. licheniformis* (20%). Deux types de similarités entre nos isolats et ceux identifiés dans d'autres domaines d'étude, notamment des études dans le domaine de la microbiologie alimentaire, ont été mis en exergue. La première avec les bactéries couramment isolées dans les aliments traditionnels fermentés très prisés dans nos contrées, suggérant au moins en partie, l'origine alimentaire de ces contaminants. La possibilité d'une approche préventive de réduction des contaminations par l'élimination de ces aliments dans les régimes alimentaires sera difficilement envisageable compte tenu du fait qu'ils en constituent la base. Une deuxième similarité a été établie avec les bactéries régulièrement incriminées dans des intoxications alimentaires et les infections pulmonaires exhortant ainsi à la prudence quant au rôle éventuel d'agents infectieux que joueraient également ces contaminants. Il sera donc nécessaire d'étudier les caractères de virulence de ces différents isolats.

A notre connaissance, aucune étude dans la sous-région ne s'est intéressée à la caractérisation des contaminants des cultures. Pourtant, il n'est pas exclu que les types de contaminants dans ces pays soient proches (ou en parti proches) des nôtres pour deux raisons : Primo, le microbiote pulmonaire est constitué de microorganismes appartenant aux microsites nasopharynx et buccal, et secundo, les aliments traditionnels fermentés sont largement consommés

dans les pays de la sous région et chez nous au Burkina faso en particulier. Cela signifie que la probabilité que nos contaminants soient similaires est grande. Il est donc crucial que tous les pays de la sous-région confrontés aux problèmes de contaminations puissent étudier les types de contaminants résiduels présent dans leurs cultures contaminées afin d'améliorer éventuellement les stratégies de réduction de dites contaminations.

Notre approche pour réduire les contaminants, ciblait principalement les bactéries sporulantes et à consister à évaluer l'efficacité du milieu sélectif L-J supplémenté de VCNT sur les contaminations de cultures. Il fallait également s'assurer d'une bonne tolérance des mycobactéries au VCNT et d'une susceptibilité accrue des bactéries sporulantes au VCNT. Nous avons montré que les milieux sélectifs de L-J à base de VCNT à 10µg/ml de vancomycine peuvent être utilisés en complément des milieux de L-J ordinaire pour réduire la contamination des cultures. De manière avantageuse, en termes de faisabilité, le milieu sélectif à base de VCNT est facilement réalisable car cette combinaison d'antibiotiques est utilisée en routine dans de nombreux laboratoires en Afrique de même que les milieux de L-J faits maison. Des résultats similaires en termes de réduction des contaminations avec des combinaisons d'antibiotiques différents ont été observés par **Kassaza et al., en 2014** et **Okumu et al., en 2016**. Cependant, si cette réduction a permis dans l'étude de Kassaza d'obtenir des taux de contaminations acceptables, cela n'a pas été le cas dans la nôtre du fait probablement de nos types de contaminants. La longue incubation des cultures de mycobactéries favorise l'émergence des bactéries sporulantes sur les milieux sélectifs. Cela a été prouvé dans notre étude et dès lors compromet une efficacité totale de ces types de stratégies alternatives. La connaissance des types de contaminants s'avère une fois de plus nécessaire à la compréhension voir à l'analyse des résultats des études visant à les réduire.

En définitive, le tour de la question a été fait et des améliorations en termes de réduction des contaminations ont été observées dans la quasi-totalité des évaluations sans pour autant que les taux de contaminations soient réduits à des niveaux acceptables. Toutes nos stratégies visant à optimiser les méthodes de décontaminations, les conditions préanalytiques et les milieux de cultures se sont révélées insuffisantes au vu de nos résultats. Cela sous-entend qu'un changement radical des stratégies doit être envisagé. Ce changement, valable pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire par la technique de la culture sur milieux solides devrait nécessairement l'être pour la culture sur les milieux liquides, pour peu que les contaminants majeurs soient eux aussi des bactéries sporulantes.

Il faut noter cependant que cette étude de caractérisation des contaminants avait quelques limites. En effet, pour des raisons économiques et d'accessibilités, la galerie API 50CH/B développée pour l'identification d'environ 29 profils de bactéries sporulantes a été utilisé avec pour

conséquence 18 souches non identifiées au niveau espèces. Les MALDI-TOFs que disposent certains pays comme le Ghana et le Sénégal et auxquels nous avons fait appel, n'est pas toujours fonctionnel par manque de réactifs et/ou de maintenance. De ce fait, nous n'avons pas pu encore compléter la caractérisation des espèces. Les échantillons ont été expédiés et nous sommes en attente d'un retour de nos collaborateurs.

La science se construit de manière lente et cumulative et l'ensemble des résultats présentés, loin d'avoir définitivement résolu la séculaire problématique des contaminations de cultures des mycobactéries, offre en perspective de nouveaux axes de recherche. En effet, les similitudes observées entre les bactéries sporulantes caractérisées dans cette étude et celles couramment isolées des aliments traditionnels fermentés et des infections humaines suggèrent que des études d'épidémiologies moléculaires et de caractérisation des facteurs de virulence de ces contaminants doivent être nécessairement réalisés afin de confirmer ou infirmer l'origine et/ou la nature virulente de ces bactéries contaminants.

Un changement de paradigme doit s'opérer en matière de recherche de solution à la problématique des contaminations et il nous semble important de prendre en compte les trois facteurs suivants : Primo, la grande résistance aux agents chimiques de ces bactéries sporulantes; Secundo, la limite de l'efficacité de l'ensemble des stratégies jusque-là utilisé; Et tertio, la susceptibilité des formes végétatives de ces bactéries sporulantes qui est un atout majeurs. Précisément, de nouvelles stratégies ciblant les formes végétatives de ces contaminants résiduels plus sensibles aux décontaminants que les mycobactéries doivent être développées. Parmi elles, citons entre autres, la recherche de milieux capables soit de maintenir simplement ces bactéries sous une forme végétative et donc vulnérables (par blocage de la sporulation, soit d'initier la germination des spores et de les maintenir sous des formes végétatives. Toujours dans cette optique de limiter significativement au Burkina Faso les contaminants résiduels au cours du diagnostic de la tuberculose pulmonaire par la technique de la culture, il est envisageable de s'orienter également vers des techniques de séparation en phase liquide par utilisation des différences de densité entre les mycobactéries et les autres microorganismes incluant les spores et les formes végétatives des bactéries sporulantes.

L'exploration de ces axes de recherches nous semble être un préalable et constitue probablement selon nous le challenge ultime à relever dans les pays à ressources limitées en général et aux Burkina Faso en particulier pour rendre performantes les méthodes de diagnostic de la tuberculose pulmonaire par la technique de culture en vue de contrôle de la tuberculose voire de son éradication.

CHAPITRE 6: CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Plus d'un siècle après l'invention de la technique d'isolement des mycobactéries avec des milieux à base d'œuf par Pettrof, cette technique demeure la méthode de référence du diagnostic de la tuberculose. Mais elle est toujours confrontée aux problèmes de contamination surtout dans les pays à ressources limitées comme le Burkina Faso. Le but des travaux exposés dans cette thèse est de contribuer au contrôle de la tuberculose. Ils s'intègrent dans un objectifs global d'améliorer la qualité du diagnostic de la tuberculose pulmonaire par culture sur milieu de Lowenstein-Jensen au Burkina Faso par l'évaluation des facteurs préanalytiques et analytiques influençant les contaminations des cultures des mycobactéries.

Nos études ont montré que malgré des effets pervers, la méthode de décontamination à l'acide oxalique à 5%, pourrait être une méthode alternative ou complémentaire à la méthode modifiée de Petroff.

L'étude des facteurs températures et durée de conservation des expectorations a montré que les recommandations y relatives pour les pays à ressources limitées ne sont pas toujours applicables à cause du manque de moyens logistiques et de personnels. De plus, au regard des types de contaminants impliqués, l'étude a mis en évidence de possibles liens de causalité entre les recommandations et les taux élevés de contaminations dans les pays à ressources limitées en général et au Burkina faso en particulier. Des études seront nécessaires afin d'ajuster ces recommandations qui doivent être revues.

L'évaluation de la réduction de la charge microbienne buccale par l'utilisation du bain de bouche à base de la Chlorhexidine n'a pas permis de réduire significativement les taux de contaminations. Cependant, elle a permis la mise en évidence des bactéries sporulantes, facteurs d'influence fondamentale des contaminations des cultures des mycobactéries permettant une meilleure compréhension des résultats obtenus lors des études précédentes et subséquentes. La simple présence de ces bactéries sporulantes dans les expectorations, plus résistantes aux désinfectants et aux décontaminants que les mycobactéries, suggère que les méthodes actuelles de décontaminations sont inappropriées.

La caractérisation des isolats de contaminants résiduels, a révélé que ceux-ci appartenaient majoritairement aux genres *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* et *Lysinibacillus* et que les plus importantes étaient *B. cereus* et *B. licheniformis*. L'origine probable des contaminants des cultures serait alimentaire, du fait des similarités observées entre ces isolats et ceux identifiés dans les aliments fermentés largement consommés dans la sous région en général et au Burkina Faso en particulier. Des moyens de prévention seraient difficilement envisageables dans le cadre d'un régime alimentaire restrictif compte tenu de la large utilisation de ces aliments dans nos pays.

Bien que la longue incubation inhérente à la culture des mycobactéries compromette l'efficacité du milieu sélectif de L-J à base de vancomycine, ce dernier pourrait être utilisé comme méthode de culture complémentaire. Il permettra la réduction de la contamination des cultures en attendant que soit mises au point d'autres méthodes plus efficaces axées sur l'élimination des bactéries sporulantes.

Dans cette lutte sans relâche contre la tuberculose qui cause un lourd tribut en matière de mortalité dans notre pays, de nouvelles stratégies ciblant les formes végétatives de ces contaminants résiduels plus sensibles aux décontaminants que les mycobactéries doivent être développées. Il est envisageable également de s'orienter vers des techniques de séparation en phase liquide par utilisation des différences de densité entre les mycobactéries et les autres microorganismes incluant les spores et les formes végétatives des bactéries sporulantes. En tenant compte des conditions économiques de notre pays, l'ensemble de ces stratégies aura pour objectif spécifique de poser un diagnostic fiable de la tuberculose pulmonaire dans les meilleurs délais. Cet objectif spécifique ayant lui-même in fine comme objectif global une meilleure prise en charge des patients infectés en vue de contrôler la tuberculose à court terme voir de mettre un terme à l'épidémie mondiale de la tuberculose tel qu'envisager avec la stratégie « End TB »

CHAPITRE 7: REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Addise D, Bitew A, Yaregal Z, Yenew B, Mollalign H, Getu Diriba G et al. (2016) Effect of 1.5% sodium hydroxide final concentration on recovery rate of Mycobacterial Species and decontamination of other Bacterial and Fungal contaminants on sputum. *Ethiop J Public Health Nutr*, 1(1): 57–67.

Adimponga DB, Kim B, Sørensen I, Thorsena L, Stuer-Lauridsen B, Abdelgadirc WS, et al. (2012) Antimicrobial Susceptibility of Bacillus Strains Isolated from Primary Starters for African Traditional Bread Production and Characterization of the Bacitracin Operon and Bacitracin Biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 78 (22) :7903–7914.

Affolabi D, Sanoussi N, Sossou A, Nys T, Bodi O, Esse M. et al. (2018) Performance of OMNIgene•SPUTUM (DNA Genotek) and cetylpyridinium chloride for sputum storage prior to mycobacterial culture. *J Med Microbiol*, 67: 798-805.

Alcaide F, Benítez MA, Martín R, Escribà JM. (2000) Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and MB BAC/T system for routine detection of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 38 (8): 3131-2.

ATS. (2000) Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(4 Pt 1): p. 1376-95.

ATS. (2000) Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. American Thoracic Society. *MMWR Recomm Rep*, 49(RR-6):1-51.

ATS. (2000) Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med*, 161(4 Pt 1): 1376-95.

Armstrong JA, Hart PD. (1971) Response to cultured macrophage to Mycobacterium Tuberculosis with observation of fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med*, 134 (3):713-740.

Armstrong, JA, Hart PDA. (1975) Phagosome-lysosome Interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. *J Exp Med*, 142:1-16.

Asadishad B, Olsson AL, Dusane DH, Ghoshal S, Tufenkji N. (2014) Transport, motility, biofilm forming potential and survival of Bacillus subtilis exposed to cold temperature and freeze-thaw. *Water Res*, 1(58) :239-47.

Asandem DA, Asante-Poku A, Asare P, Aboagye SY, Stephen OW, Danso E, et al. OMNIgene SPUTUM: A good transport and decontaminating reagent for tuberculosis testing. *Int J Mycobacteriol*, 7:222-227.

Azam K, Cadir N, Madeira C, Gillespie SH, Sabiit W. (2017) SPUTUM suppresses contaminants while maintaining Mycobacterium tuberculosis viability and obviates cold-chain transport. *ERJ Open Research*, 1 (4): pii: 00074-2017. eCollection.

Bai Y, Wang Y, Shao C, Hao Y, Jin Y. (2016) GenoType MTBDRplus Assay for Rapid Detection of Multidrug Resistance in Mycobacterium tuberculosis: A Meta-Analysis. PLoS One. 11(3):e0150321.

Bange FC, Kirschner P and Böttger EC. (1999) Recovery of mycobacteria from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 37(11):3761-3763.

Bauer, AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized disk method. Amer. J. Clin. Path, 45:493-496.

Becton Dickinson (2011) Lowenstein-Jensen Medium with 5% Sodium Chloride L007464 • Rev. 09 •

Belstrøm D, Fiehn NE, Nielsen CH, Kirkby N, Twetman S, Klepac-Ceraj V. et al. (2014) Differences in bacterial saliva profile between periodontitis patients and a control cohort. J. Clin. Periodontol, 41: 104–112.

Belstrøm D, Holmstrup P, Nielsen C H, Kirkby N, Twetman S, Heitmann B L, et al. (2014). Bacterial profiles of saliva in relation to diet, lifestyle factors, and socioeconomic status. J Oral Microbiol, 6 :1–9. Doi: 10.3402/jom.v6.23609.

Bezawada J, Yan S, John RP, Tyagi RD, Surampalli RY. (2011) Recovery of *Bacillus licheniformis* alkaline protease from supernatant of fermented wastewater sludge using ultrafiltration and its characterization. Biotechnol Res Int, 238549. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/238549>.

Bioforma (2003) Mycobactéries et Mycobactérioses. Cahier de Formation Biologie Médicale N°29, Paris 157p. Available: <https://www.sjbm.fr/.../cahiers/2003-Bioforma-29-Mycobactéries%20Mycobactérioses>.

Bizzini A, Greub G. (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin Microbiol Infect, 16(11):1614-9. Doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x.

Blakemore R, Story E, Helb D, Kop J, Banada P, Owens MR et al. (2010) Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. J Clin Microbiol, 48:2495–501. Doi: 10.1128/JCM.00128-10.

Blanc P, Minodier P, Dubus JC, Uters M, Bosdure E, Retornaz K et al. (2007) Les nouveaux tests diagnostiques de la tuberculose. Rev Mal Resp 24 : 441-52.

Boehme C, Molokova E, Minja F, Geis S, Loscher T, Maboko L et al. (2005) Detection of mycobacterial lipoarabinomannan with an antigen-capture ELISA in unprocessed urine of Tanzanian patients with suspected tuberculosis. Trans R Soc Trop Med Hyg ; 99: 893–900.

Bonnet M. (2011) Les nouveaux tests diagnostiques de la tuberculose maladie : de la théorie à la pratique dans les pays du Sud. Revue des maladies respiratoires. 28 10 1310-13121 doi:10.1016/j.rmr.2011.10.002.

Bottone EJ. (2010) *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. Clin. Microbiol. Rev, 2: p. 382–398.

Boum Y 2nd, Oriquiriza P, Rojas-Ponce G, Riera-Montes M, Atwine D, Nansumba M, et al. (2013) Use of colorimetric culture methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from sputum samples in resource-limited settings. *J Clin Microbiol*, 51(7):2273-9. Doi: 10.1128/JCM.00749-13.

Bressuire-Isoard C, Broussolle V, Carlin F. (2018) Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*, fuy021, 42, 614–626. doi: 10.1093/femsre/fuy021

Brossard H, TERRY O. (1989). *Mycobactéries*, In : *Bactériologie Systématique I*, 4ème partie, chapitre 1, Ed Lyon Centre régional de documentation pédagogique. P205-22.

Bunsow E, Ruiz-Serrano M J, López Roa P, Kestler M, Viedma DG, Bouza E. (2014). Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in clinical specimens. *J Infect*, 68:338–343. Doi: 10.1016/j.jinf.2013.11.012

Butler WR et Guthertz LS. (2001) Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev* 14: 704-26

Cadmus S, Falodun O, Fagade O. (2011) Methods of sputum decontamination with emphasis on local tuberculosis laboratories. *Afr J Med Med Sci*, 40(1):5-14.

Cambau E, and Drancourt, M. (2014). Steps towards the discovery of *Mycobacterium tuberculosis* by Robert Koch, (1882). *Clin Microbiol Infect*, 20:196–201. Doi: 10.1111/1469-0691.12555.

Armstrong, JA, Hart PDA. (1975) Phagosome-lysosome Interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. *J Exp Med* 142:1-16.

Cambau E, Herrmann J-L. (2015) *Mycobacterium tuberculosis* et les autres mycobactéries, Chap 68. In : *REMIC : Société Française de Microbiologie Ed ; ed. ; 2015. p 545-558.*

Cambier CJ, Takaki KK, Larson RP, Hernandez RE, Tobin DM, Urdahl KB, et al. (2014) *Mycobacteria* manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. *Nature*, 505(7482):218-22. Doi: 10.1038/nature12799.

Caminero JA, Sotgiu G, Zumla A, Migliori GB.(2010) Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 2010. 10(9): 621-9.

Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, et al. (1969). Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity and the use of sensitivity test in tuberculosis control programmes. *Bulletin of the World Health Organization*, 41: 21-43.

Cao Y, Wang L, Ma P, Fan W, Gu B, Ju S. (2018) Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of mycobacteria: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, 8:4131. Doi: 10.1038/s41598-018-22642-w.

Caulfield A J, Wengenack LN. (2016) Diagnosis of active tuberculosis disease: from microscopy to molecular technique. *J Clin Tuberculosis Other Mycobacterial Dis*. 4, 33-43. doi.org/10.1016/j.jctube.2016.05.005.

Caulfield AJ, Liesman RM, Chen DJ, Wengnack NL. (2019). Mycobacteriology, In: Rifai N, Horvath AR, Wittier CT and Burnham CA. Clinical Microbiology, Chapter 5, Google Book. Available from: <https://www.goodreads.com/book/show/43694691-clinical-microbiology>.

Celandroni F, Salvetti S, Gueye SA, Mazzantini D, Lupetti A, Senesi SE. (2016) Identification and Pathogenic Potential of Clinical Bacillus and Paenibacillus Isolates. PLoS One, 11(3): e0152831.

Ceysens PJ, Soetaert K, Timke M, Van den Bossche A, Sparbier K, De Cremer K, et al. (2007) Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Combined Species Identification and Drug Sensitivity Testing in Mycobacteria. J Clin Microbiol. 55(2):624-634. Doi: 10.1128/JCM.02089-16

Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, Parmar H, Cao Y, Ryan J, et al. (2017) The new Xpert MTB/RIF Ultra: improving detection of Mycobacterium tuberculosis and resistance to rifampicin in an assay suitable for point-of-care testing. mBio, 8:e00812-17. doi:10.1128/mBio.00812-17.

Chatterjee M, Bhattacharya S, Karak K, Dastidar SG. (2013) Effects of different methods of decontamination for successful cultivation of Mycobacterium tuberculosis. Indian J Med Res, 138:541–548.

Chulhun LC et al. (2002) Reduction of Contamination of Mycobacterial Growth Indicator Tubes with a Modified Antimicrobial Combination. Journal of Clinical Microbiology, 40 (10), 3845–3847.

Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV et al. (1994) Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. Jama 271:698-702.

Collins FM. (1971). Relative susceptibility of acid-fast and non-acid fast bacteria to ultraviolet light. Applied Microbiology, 21 (3) p 411-413.

Collins FM. (1971) Relative Susceptibility of Acid-Fast and Non-Acid-Fast Bacteria to Ultraviolet Light. Applied Microbiology, 21 (3):411-413.

Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. (2004) Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. J Clin Microbiol, 42(5):2321–5.

Crudu V, Stratan E, Romancenco E, Allerheiligen V, Hillemann A, Moraru N. (2012). First evaluation of an improved assay for molecular genetic detection of tuberculosis as well as rifampin and isoniazid resistances. J Clin Microbiol. 50(4):1264–1269.

Daffe M, Draper P. (1998) the envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. Adv. Microb. Physiol, 39: 131–203.

Daffé M. (2008) The Global Architecture of the Mycobacterial Cell Envelope, p 3-11. In Daffé M, Reyat J, Avenir G (ed), The Mycobacterial Cell Envelope. ASM Press, Washington, DC. Doi: 10.1128/9781555815783.ch1.

Daley P, Michael J S, Hmar P, Latha A, Chordia P, Mathai D, John KR. Et al. (2009) Blinded evaluation of commercial urinary lipoarabinomannan for active tuberculosis: a pilot study. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009 Aug; 13(8): 989–995.

Daniel, TM, 2006. The history of tuberculosis. *Respir. Med.* 100, 1862–1870.

Dantas NGT, Suffys PN, Carvalho WDS, Gomes HM, Almeida IN, Figueiredo LJA, et al. (2017). Correlation between the BACTEC MGIT 960 culture system with genotype MTBDRplus and TB-SPRINT in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112 769–774. Doi: 10.1590/0074-02760170062.

Das D, Dwibedi B, Kar SK. Transportation of sputum samples in cetylpyridinium chloride for drug resistance studies from remote areas of Odisha, India. *J Infect Dev Ctries*, 8:1059–1062

De Hoon MJL, Eichenberger P, Vitkup D. (2010) Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology* 20, R735-R745.

De Waard JH, Robledo J. (2007) Conventional diagnostic methods. In Palomino CJ, Leão S C, Ritacco V. *Tuberculosis 2007 from basic science to patient care*, (1th Ed.). 2007. p 401- 420.

Denis F, Ploy MC, Martin C, Bingen E and Quentin R. *Mycobactéries*, In : *Bactériologie Médicale Techniques Usuelles*, chapitre 38. Elsevier Masson, 2ème ed: p507-535.

Diriba G, Kebede A, Yaregal Z, Getahun M, Tadesse M, Meaza A, et al. (2017) Performance of *Mycobacterium* Growth Indicator Tube BACTEC 960 with Lowenstein-Jensen method for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* at Ethiopian National Tuberculosis Reference Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Res Notes*; 10(1):181. Doi: 10.1186/s13104-017-2497-9.

Djelouadji Z, Raoult D, Drancourt M. (2011) Palaeogenomics of *Mycobacterium tuberculosis*: Epidemic bursts with a degrading genome. *Lancet Infect Dis*, 11: 641–650

Dorman SE, Schumacher SG, Alland D, Nabeta P, Armstrong DT, King B, et al. (2018) Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicenter diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis*, 18:76–84. Doi:10.1016/S1473-3099(17)30691-6.

Drobniewski F, Cooke M, Jordan J, Casali N, Mugwagwa T, Broda A, et al. (2015) Systematic review, meta-analysis and economic modelling of molecular diagnostic tests for antibiotic resistance in tuberculosis. *Health Technol Assess*, 19(34):1-188.

Drobniewski FA. (1993) *Bacillus cereus* and Related Species. *Clin Microbiol Rev* 1993: 324-338.

Drouin M. (2013) Etude de stratégies visant à stimuler la production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. (Thèse de doctorat, Université du Québec, Canada). <http://espace.inrs.ca/1496/>.

Dutau G. (2005) [A little illustrated history of tuberculosis] [letter]. *Arch pediatr*, 12: 88 - 95.

El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. (2011) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of *mycobacteria* in routine clinical practice. *PLoS One*. 6(9):e24720. Doi: 10.1371/journal.pone.0024720.

Espasa M, Salvadó M, Vicente E, Tudó G, Alcaide F, Coll P, et al. (2012) Evaluation of the VersaTREK system compared to the Bactec MGIT 960 system for firstline drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 50:488–91.

Falconi FQ, Suarez LI, Lopez Mde J, Sancho CG. (2008) Comparison of the VersaTREK system and Lowenstein-Jensen medium for the recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Scand J Infect Dis*, 40(1):49–53.

Falzon D, Holger J, Schünemann H J, Harausz E, González-Angulo L, Lienhardt C. (2017) World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update. *Eur Respir J*. 49(3): 1602308. Doi: 10.1183/13993003.02308-2016.

Ferrero MA, Castro GR, Abate CM, Baigorñ MD and Sin8eriz F. (1996) Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 45:327-332.

Ferroni A, Vu-Thien H, Lanotte P, Le Bourgeois M, SermetGaudelus I, Fauroux B, et al. (2006). Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 44, 2237–2239.

Fine AE, O'Brien DJ, Winterstein, S.R., Kaneene, JB. (2011b) An effort to isolate *Mycobacterium bovis* from environmental substrates during investigations of bovine tuberculosis transmission sites (cattle farms and wildlife areas) in Michigan, USA. *ISRN Vet Sci*, ID 787181:1-11.

Fitzwater SP, Caviedes L, Gilman RH, Coronel J, LaChira D, Salazar C, et al. Prolonged infectiousness of tuberculosis patients in a directly observed therapy short-course program with standardized therapy. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*, 51:371–8.

Frankard J, Li R, Taccone F, Struelens MJ, Jacobs F, Kentos A. *Bacillus cereus* pneumonia in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23(9):725-8.

Garrity, GM, Bell JA, Lilburn, TG. (2004) Taxonomic outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, Release 5.0. New York: Springer.

Gauvry E. (2017). Modélisation de la sporulation de *Bacillus subtilis* BSB1 et liens physiologiques avec les cinétiques de croissance. (Thèse de doctorat, Université de Bretagne occidentale - Brest, France). NNT : 2017BRES0140.

Ghodbane R, Drancourt M. (2013) Non-human sources of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis Edinb*, 93:589–595.

Ghosh J, Larsson P, Singh B, Pettersson BM, Islam NM, et al. (2009) Sporulation in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci*, 106: 10781–10786.

Gil O, Diaz I, Vilaplana C, Tapia G, Diaz J, Fort M, et al. (2010). Granuloma encapsulation is a key factor for containing tuberculosis infection in minipigs. *PLoS ONE* 5:e10030. Doi:10.1371/journal.pone.0010030.

Gitteh E, Kweku Otu J, Jobarteh T, Mendy F, Faal-Jawara IT, Ofori-Anyinam NB, et al. (2016) Evaluation of sodium hydroxide–N-acetyl-L-cysteine and 0.7% chlorhexidine

decontamination methods for recovering *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples: A comparative analysis (The Gambia Experience). *Int J Mycobacteriol.* 5 Suppl 1:S167-S168. Doi: 10.1016/j.ijmyco.2016.09.020.

Goodman E and Moore M. (1922) Cultivation of Tubercle Bacilli. *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 30, No. 1, pp. 58-63.

Goodman E L and Mary Moore M. (1922) Cultivation of Tubercle Bacilli. *The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 30, No. 1, pp. 58-63.

Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. (2007) An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 15; 175(4):367-416.

Grossman E, Reiter G, Styrzenberg OP. (1986) Six-month study of effects of a chlorhexidine mouth rinse on gingivitis in adults. *J Periodontal Res*, 343:33–43.

Guillet- Caruba C, Martinez V, Doucet-Populaire F. (2014) Les nouveaux outils diagnostiques de la tuberculose maladie. *La Revue de Médecine Interne*, 35 (2): 794-800.

Guinebretière M.-H., Thompson F. L., Sorokin A., et al. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology.* 2008; 10(4):851–865. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x.

Guirado E, Schlesinger LS. (2013) Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* Granuloma - the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. *Front Immunol*, 4: 98.

Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, et al. (2005) Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2005, 1 (1): e5-10.1371/journal.ppat.0010005.

Hang Y, Post-Martens K, Denkin S. (2006) New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug Discov Today* 11:21–27.

Harold E. (1970) Human Infections Caused by Organisms of the *Bacillus* Species. *Am J Clin Pathol*, 53(4):506-15.

HAS, Groupe de travail Haut Conseil de la Santé publique. (2011) Tuberculose et tests de détection de l'interféron gamma.

Haute Autorité de Santé. (2015). Tests invitro de dépistage de l'infection tuberculeuse latente par détection e la production de l'interféron gamma. https://www.hassante.fr/.../argumentaire_igra_vd_2015-06-29_11-57-54_758.pdf.

HersHKovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, Besra GS, Lee OY, Gernaey AM et al. (2008) Detection and molecular characterization of 9,000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. *PLoS One*, 3(10):e3426. Doi: 10.1371/journal.pone.0003426.

Hiza H, Doulla B, Sasamalo M, Hella J, Kamwela L, Mhimbira F, et al. (2017) Preservation of sputum samples with cetylpyridinium chloride (CPC) for tuberculosis cultures and Xpert MTB/RIF in a low-income country. *BMC Infect Dis.* 17(1):542. Doi: 10.1186/s12879-017-2642-z.

Horne DJ, Royce SE, Gooze L, Narita M, Hopewell PC, Nahid P, et al. Sputum monitoring during tuberculosis treatment for predicting outcome: systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 10:387–94. doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000333.

Huber TW, Reddick RA, Kubina GP. (1970) Germicidal Effect of Ultraviolet Irradiation on Paper Contaminated with Mycobacteria. *Applied Microbiology*, 19 (2): 383-384.

ISO 15189 (2012). Exigences particulières concernant la qualité et la compétence. Laboratoires d'analyses de biologie médicale. AFNOR, association française de normalisation.

Jarlier V, Nikaido H. (1990) Permeability Barrier to Hydrophilic Solutes in Mycobacterium chelonae. *J Bacteriol*, 172:1418–1423. doi: 10.1128/jb.172.3.1418-1423.1990.

Jensen, K.A. (1932) Rinzuchtung und Typenbestimmung von Tuberkelbazillentammen. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig.* 125:222-239.

Jeon YL, Yang JJ, Kim JM, Lim G, Cho SY, Park TS, et al; (2012) Combined Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis infection in a patient with oesophageal perforation. *Journal of Medical Microbiology*, 61: 1766–1769.

Kaboré A, Hien H, Sanou A, Zingué D, Daneau G, Ganamé Z, et al. (2014) Impact of pre-analytical factors on mycobacterium cultures contaminations rates in Burkina Faso, West Africa. *Pan Afr Med J*, 19:39

Kabore A, Tranchot-Diallo J, Sanou A, Hien H, Daneau G, Gomgnimbou MK, et al. (2019) Why Oral antiseptic mouth rinsing before sputum collection cannot reduce contamination rate of mycobacterial culture in Burkina-Faso. *Afri Health Sci*, 19(1): 1321-1328. doi.org/10.4314/ahs.v19i1.3.

Kalema N, Boon SD, Cattamanchi A, Davis JL, Andama A, Katagira W, et al. Oral antimicrobial rinse to reduce mycobacterial culture contamination among tuberculosis suspects in Uganda: a prospective study. *PLoS One*,7: e38888.

Kao AS, Ashford DA, McNeil MM, Warren NG, Good RC. (1997) Descriptive profile of tuberculin skin testing programs and laboratory-acquired tuberculosis infections in public health laboratories. *Journal of clinical microbiology*, 35:1847-1851. 127.

Kassaza K, Orikiriza P, Llosa A, Bazira J, Dan Nyehangane D, Anne Laure P, et al. (2014) Lowenstein Jensen selective media to Reduce contamination in Tuberculosis Culture. *J. Clin. Microbiol*, 2671–2673. Doi: 10.1128/JCM.00749-14.

Kaur D, Guerin ME, Skovierova H, Brennan PJ, and Jackson M. (2009) Chapter 2: Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of Mycobacterium tuberculosis. *Adv Appl Microbiol*, 69:23–78.

Keating LA, Wheeler PR, Mansoor H, Inwald JK, Dale J, Hewinson RG, et al. The pyruvate requirement of some members of the Mycobacterium tuberculosis complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. *Molecular Microbiology*, 56(1):163–74. Doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04524.x.

Keilty R A. (1915). A Study of the Cultivation of the Tubercle Bacillus Directly from the Sputum by the Method of Petroff. *J Exp Med*, xxii: 612. 11.

Kelly-Cirino CD, Musisi E, Byanyima P, Kaswabuli S, Andama A et al. (2017) Investigation of OMNIgene-SPUTUM performance in delayed tuberculosis testing by smear, culture, and Xpert MTB/RIF assays in Uganda. *J Epidemiol Glob Health*, 7:103–109

Kent PT, Kubica GP. (1985) eds. *Public health mycobacteriology: a guide for the Level III laboratory*. Atlanta: Centers for Disease Control.

Kim KK, Lee KC, Yu H, Ryoo S, Park Y and Lee JS. (2010) *Paenibacillus sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pulmonary disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 2371–2376.

Kim T H, Kubica G P. (1972) Long term preservation and storage of mycobacteria. *Appl Microbiol*, 24, 311–317.

Kim, TH, Kubica GP. (1973) Preservation of mycobacterta. 100% vrability of suspensions stored at -70°C. *Appl Microbiol*, 25: 956–960.

Kommareddi S, Abramowsky CR, Swinehart GL, Hrabak L.(1984) Nontuberculous mycobacterial infections: comparison of the fluorescent auramine-O and Ziehl-Neelsen techniques in tissue diagnosis. *Hum Pathol*, 15(11):1085–9.

Kramer, J.M. and Gilbert, R.J. (1989) *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle, M.P., Ed., *Foodborne Bacterial Pathogens*, Marcel Dekker, Inc., New York, 21- 50.

Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. (1963) Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*, 87:775–779. doi:10.1164/arrd.1963.87.5.775.

Kubica GP, Kim TH. (1979) Preservation of mycobacteria at -70 degrees C: survival of unfrozen suspensions in transit. *Tubercle*, 60(1):37-43.

Kudoh S, Kudoh TA. Simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bulletin World Health Organisation* 1974; 51, 71– 82.

Kumar AJU and Srinivasa H. (2015) Fast and Accurate Identification of M. tuberculosis Complex Using an Immunochromatographic MPT64 Antigen Detection Test. *Journal of Tuberculosis Research*, 3, 149-156. <http://dx.doi.org/10.4236/jtr.2015.34021>.

Kumar VG, Urs TA, Ranganath RR. (2011) MPT 64 Antigen detection for Rapid confirmation of M. tuberculosis isolates. *BMC Res Notes*, 4:79

Lamont EA, Bannantine JP, Armien A, Ariyakumar DS, Sreevatsan S. (2012) Identification and characterization of a spore-like morphotype in chronically starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures. *PLoS One* 7:e30648. doi:10.1371/journal.pone.0030648.

Lawn SD, Edwards DJ, Kranzer K, Vogt M, Bekker LG, Wood R. (2009) Urine lipoarabinomannan assay for tuberculosis screening before antiretroviral therapy diagnostic yield and association with immune reconstitution disease. *AIDS* 2009; 23: 1875–80.

Lawn SD, Kerkhoff AD, Vogt M, Wood R. (2012) Diagnostic accuracy of a low-cost, urine antigen, point-of-care screening assay for HIV-associated pulmonary tuberculosis before antiretroviral therapy: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*, 12: 201–09. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70251-1

Leão SC, Portaels F. History. In Palomino CJ, Leão S C, Ritacco V. Tuberculosis 2007 from basic science to patient care, (1th Ed.). 2007. p 25- 52.

Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, Vincent-Lévy-Frébault V. (1992) Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol*, 30:2476–2478.

Li J, Quinque D, Horz HP, Li M, Rzhetskaya M, Raff JA, et al. (2014) Comparative analysis of the human saliva microbiome from different climate zones: Alaska, Germany, and Africa. *BMC Microbiol*, 14: 316.

Li J, Quinque D, Horz HP, Li M, Rzhetskaya M, Raff JA, et al. (2014) Comparative analysis of the human saliva microbiome from different climate zones: Alaska, Germany, and Africa. *BMC Microbiology*, 14:316.

Lin S-YG, Desmond E, Bonato D, Gross W, Siddiqi S. (2009) Multicenter evaluation of Bactec MGIT 960 system for second-line drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex. *J Clin Microbiol*, 47:3630–4.

Liu PI, McGregor DH, Faucher I, Jinks WL, Lawrence A, Miller LA et al. (1973) Comparison of three culture media for isolation of Mycobacterium tuberculosis: a 6-year study. *Appl Microbiol*, 26(6):880-3.

Locht, C. 2008. A common vaccination strategy to solve unsolved problems of tuberculosis and pertussis? *Microbes and Infection* 10:1051-1056. 148.

Logan NA. (2011) Bacillus and relatives in foodborne illness. *J. of Appl Microbiol*, 112:417–429.

Lotz A, Ferroni A, Beretti J L., Dauphin B., Carbonnelle E., Guet-Revillet H., et al. (2010) Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 48 (12) : 4481-4486.

Lowenstein E. (1931). Die zachtung der tuberkelbazillen aus dem stramenden blute. *Zentralb. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig.* 120:127.

Lowenstein, E. (1931) Die Zachtung der Tuberkelba zillen aus dem stramenden Blute. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig.* 120:127.

Maciel EL, Prado TN, Peres RL, Palaci M, Johnson JL, Dietze R. (2009) Guided sputum sample collection and culture contamination rates in the diagnosis of pulmonary TB. *J Bras Pneumol*, 35(5):460-3.

Maharjan B, Kelly-Cirino, C D, Weirich A, Curry PS, Hoffman H, Avsar K, et al. (2016) Evaluation of OMNIgene®•SPUTUM-stabilised sputum for long-term transport and Xpert® MTB/RIF testing in Nepal. *INT J TUBERC LUNG DIS*, 20(12):1661–1667.

Mahoko Ikeda M, Yuka Yagihara Y, Tatsuno K, Mitsuhiro Okazaki M, Shu Okugawa S, et al. (2015) *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015; 14:43 DOI 10.1186/s12941-015-0104-2.

Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. (2014) Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for

Narvaiz de Kantor I, Frieden TR, Laszlo A, Fabio L, Pierre-Yves N, Hans LR et al.. (1998). Laboratory services in tuberculosis control. WHO, Geneva, Switzerland.

Nathavitharana R R, Hillemann D, Schumacher SG, Schlueter B, Ismail N, Omar SV, et al. (2016). Multicenter noninferiority evaluation of hain genotype MTBDRplus version 2 and Nipro NTM+MDRTB line probe assays for detection of rifampin and isoniazid resistance. *J. Clin. Microbiol*, 54:1624–1630. Doi: 10.1128/JCM.00251-16.

Ninet, B, Roux-Lombard P, Schrenzel J, Janssens JP. (2011) News tests for the diagnosis of tuberculosis. *Revue des Maladies Respiratoires*, 28: 823-83.

Norme Internationale Iso 15189. Laboratoire de Biologie Médicale –Exigence concernant la qualité et la compétence. Troisième édition 2012.

Obeta JA. (1983) note on the microorganisms associated with the fermentation of seeds of African oil bean (*Pentaclethra macrophylla*). *J. Appl. Biotechnol*, 54: 433–435.

Okamba P, Staal A, Tabary T, Le Ber V, Panter-Brick B, Boyer C et al. (2008) Signification de Quantiféron TB Gold en tube en dépistage de la tuberculose parmi le personnel hospitalier en cas d'intradermoréactions positives très anciennes ou récentes. *Path Biol* 56: 467-470.

Okumu A, McCarthy K, Orwa J, Williamson J, Musau S, Alexander H, Cavanaugh S, Modi S, Cain K (2017) Comparison of Mycobacterium tuberculosis complex Yield and Contamination Rates using Lowenstein-Jensen with and without Antibiotics in Western Kenya. *Journal of Medical science and clinical research* 5 (8) p 26503-26511.

OMS. (2015) Tuberculose: lignes directrices relatives à la surveillance de la pharmacorésistance - 5ème édition 2015, WHO/HTM/TB/2015.13. p 86.

Otu J, Antonio M, Cheung YB, Donkor S, De Jong BC, Corrah T, et al. (2008) Comparative evaluation of BACTEC MGIT 960 with BACTEC 9000 MB and LJ for isolation of mycobacteria in The Gambia. *J Infect Dev Ctries*, 2(3):200-5.

Ouassa TD, Zinzendorf NY, Affi MR, Menan H, Loukou GY.(2011) Evaluation des performances de trois milieux de culture des Mycobactéries à Abidjan, Côte d'Ivoire. *J sci pharm Boil*. 2011; 12: 50-57

Ouoba LII, Diawara B, Amoa-Awua WK, Traore AS, and Lange Møller P. 2004) Genotyping of starter culture of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soumbala. *Int J Food Microbiol*, 90: 197–205.

Ouoba LII, Diawara B, Jespersen L, and Jakobsen M. Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Soumbala production. *J. Appl. Microbiol*. 2007; 102(4):963-970.

Ouoba LII, Diawara B, Jespersen L, Jakobsen M.(2007) Antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) for Soumbala production. *J. Appl. Microbiol*, 102:963-970.

Papp D. (2016) Histoire des antibiotiques. *Rev Hist Sci*, 124–38.

Paramasivan CN, Narayana AS, Prabhakar R, Rajagopal MS, Somasundaram PR, Tripathy SP (1983) Effect of storage of sputum specimens at room temperature on smear and culture results. *Tubercle*, 64(2):119-124.

Park KS, Kim JY, Lee JW, Hwang YY, Jeon K, Koh WJ et al. (2013) Comparison of the Xpert MTB/RIF and Cobas TaqMan MTB assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*, 51(10):3225-7. Doi: 10.1128/JCM.01335-13.

Parkouda C, Diawara B, Ouoba LII. (2008) Technology and physico-chemical characteristics of Bikalga, alkaline fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa*. *Afr.J Biotechnol*, 7: 916-922.

Parrish N, Carrol K. (2008) Importance of improved TB diagnostics in addressing the extensively drug-resistant TB crisis. *Future Microbiol*; 3:405–13.

Parrish NM, Carroll KC. (2011) Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings. *J Clin Microbiol*, 49:772–6.

Patrick J. Brennan PJ and Nikaido H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 29-63.

Pereira Arias-Bouda LM, Nguyen LN, Ho LM, Kuijper S, Jansen HM, Kolk AH. (200) Development of antigen detection assay for diagnosis of tuberculosis using sputum samples. *J Clin Microbiol*. 2000;38: 2278–2283.

Peres RL, Palaci M, Loureiro RB, Dietze R, Johnson JL, Golub JE, et al. (2011) Evaluation of oral antiseptic rinsing before sputum collection to reduce contamination of *Mycobacterial* cultures. *J Clin Microbiol*, 49: 3058–3060.

Petersen PE, Varenne B, Ouattara S. (2006) Oral health behaviour of children and adults in urban and rural areas of Burkina Faso, Africa. *International Dental Journal*, 56:61-70.

Petroff SA. (1915) Some cultural studies on the tubercle bacillus. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*:276-279.

Pfyffer GE, Welscher HM, Kissling P, Cieslak C, Casal MJ, Gutierrez J, et al. (1997) Comparison of the *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) with radio-metric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol*, 35(2):364–8.

Pfyffer GE. (2015) *Mycobacterium*: general characteristics, laboratory detection, and staining procedures. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Washington, DC: ASM Press: 536–69. E_Book.

Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, et al. (2001) Comparison of MB/BacT ALERT 3D System with radiometric BACTEC system and Lowenstein-Jensen medium for recovery and Identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicentre study. *J Clin Microbiol*, 39: 651-7.

Pignone M, Greth KM, Cooper J, Emerson D, Tang J. (2006) Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 44(6):1963-70.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA. (2003) Le control des microorganismes par les agents physiques et chimiques. In *Microbiologie 2e edition francaise de Boeck*. 2003. P: 136-151.

PNT : Guide technique de lutte contre la tuberculose Burkina Faso. Ed 2011: Quatrième partie: directives pour le diagnostic bactériologique de la tuberculose; p 53-67.

PNT. (2015). Ministère de la santé. Rapport annuel d'activités de lutte contre la tuberculose. Programme national de lutte contre la tuberculose, Burkina-Faso.

PNT. (2016). Ministère de la santé. Rapport annuel d'activités de lutte contre la tuberculose. Programme national de lutte contre la tuberculose, Burkina-Faso.

PNT. (2018) Ministère de la santé. Rapport annuel d'activités de lutte contre la tuberculose. Programme national de lutte contre la tuberculose, Burkina-Faso.

Rageade F, Picot N, Blanc-Michaud A, Chatellier S, Mirande C, Fortin E. et al. Performance of solid and liquid culture media for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical materials: meta-analysis of recent studies *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33 (6) pp 867–87.

Rageade F, Picot N, Blanc-Michaud A, Chatellier S, Mirande C, Fortin E, van Belkum A. (2014) Performance of solid and liquid culture media for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical materials: meta-analysis of recent studies. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33:867-870.

Ratovonirina NH. (2017) Etudes descriptive, épidémiologique, moléculaire et spatiale des souches *Mycobacterium tuberculosis* circulant à Antananarivo, Madagascar. (Thèse de doctorat, Université Paris-Saclay, France). NNT: 2017SACLS527.

Raviglione MC, Uplekar MW. (2006) WHO's new Stop TB Strategy? *Lancet*, 367(9514):952-5.

Razzaq A, Shamsi S, Ali A, Ali Q, Sajjad M, Malik A et al. (2019) Microbial Proteases Applications. *Front Bioeng Biotechnol.* 7: 110. doi: 10.3389/fbioe.2019.00110.

Redy M, Gounder S, Reid S A. (2014) Tuberculosis diagnostics in Fiji: how reliable is culture? *International Union against Tuberculosis and Lung Disease. Public Health Action*, 4: 184–188.

Reeve BWP, McFall SM, Song R, Warren R, Steingart KR, Theron G. (2018) Commercial products to preserve specimens for tuberculosis diagnosis: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis*, 22:741-753.

Richter E, Niemann S, Rusch-Gerdes S, Hoffner S. (1999). Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. *J. Clin. Microbiol*, 37 964–970.

Rieder HL, Van Deun A, Kam KM, Kim SJ, Chonde TM et al.(2007) Priorities for Tuberculosis Bacteriology Services in Low-Income Countries, 2nd ed. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2007;https://tbrieder.org/publications/books_english/red_book.pdf.

Rothlauf MV, George L, Brown GL, Blair EB. (1981). Isolation of *Mycobacteria* from Undecontaminated Specimens with Selective 7H10 Medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 13, 76-79.

Rubinstein E, Keynan Y. (2014) Vancomycin revisited – 60 years later. *Public Healf*. Doi: 10.3389/fpubh.2014.00217.

Russell AD. (1990) Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clin Microbiol Rev*. 3:99–119.

Russell AD. (1996) Activity of biocides against mycobacteria. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 25: 87S–101S.

Russo C, Tortoli E, Menichella D. (2006) Evaluation of the new GenoType Mycobacterium Assay for identification of mycobacterial species. *J Clin Microbiol*, 44:334–339. doi: 10.1128/JCM.44.2.334-339.

Sadatsafavi M, Shahidi N, Marra F, FitzGerald MJ, Elwood KR, Guo N. et al. (2010). A statistical method was used for the meta-analysis of tests for latent TB in the absence of a gold standard, combining random-effect and latent-class methods to estimate test accuracy. *J Clin Epidemiol*, 63(3):257-69. Doi: 10.1016/j.jclinepi.2009.04.008.

Sakula A, Koch R; (1983) Centenary of the Discovery of the Tubercle Bacillus, 1882. *Can Vet J*, 24(4): 127–131.

Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. (2011) Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 49 (5) :1790-1794.

Sanchez-Padilla E, Merker M, Beckert P, Jochims F, Dlamini T, Kahn P, et al. (2015). Detection of drug-resistant tuberculosis by Xpert MTB/RIF in Swaziland. *N. Engl. J. Med*, 372: 1181–1182. Doi: 10.1056/NEJMc1413930.

Sankar MM, Kumar P, Munawwar A, Singh J, Parashar D, et al.(2009) Recovery of Mycobacterium tuberculosis from sputum treated with cetyl pyridinium chloride. *J Clin Microbiol*, 47:4189–4190. Doi: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01295-09>.

Sanni AI, Onilude AA Fadahunsi IF, Ogubanwo ST, and Afolabi RO. (2002). Selection of starter cultures for the production of ugba, a fermented soup condiment. *Eur.Food Res.Technol*, 215:176–180. Doi: 10.1007/s00217- 002-0520-3.

Sanni AI. (1993) The needs of optimisation of African fermented foods and beverages. *Int J Food Microbiol*. 18:85–95.

Savadogo A Tapsoba F, Zongo C, Taale ES, Tarnagda B, Baba M L.(2016) Biofilm producing strains from local seeds foods (Zamne, Bikalga and Soumbala): Effect of glucose and agar concentrations on the biofilm production. *IJAMBR*, 4: 48-59.

Savadogo A, Ilboudo A J, Gnankine O, Traore AS. (2011) Numeration and Identification of thermotolerant endospore-forming Bacillus from two fermented condiments Bikalga and Soumbala. *Adv. Environ. Biol*, 5, (2) 2960-2967.

Sester M, Sotgiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori GB. Et al. (2011) Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*, 37(1):100-11. Doi: 10.1183/09031936.00114810.

Setlow, P. (2006) Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol*101, 514–525.

Sharma M, Misra RN, Gandham NR, Jadhav SV, Angadi K, Wilson V.(2012) Comparison of modified Petroff's and N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide methods for sputum decontamination in tertiary care hospital in India. *Med J DY Patil Univ*, 5:97-100.

Sharma M, Thibert L, Chedore P, Shandro C, Jamieson F, Tyrrell G, et al.(2011) Canadian multicenter laboratory study for standardized second-line antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 49:4112–6.

Shinnick TM and Good RC. (1994) *Mycobacterial taxonomy*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 13 (11):884-901.

Shoub HL. (1923) A Comparison of the Ziehl-Neelsen and Schulte-Tigges Methods of Staining Tubercle Bacilli. *J Bacteriol*, 8(2): p. 121-6.

Singh K. (2009). Laboratory-acquired infections. *Clin. Infect, Dis*. 49, 142–147. Doi: 10.1086/599104.

Small PM, Pai M. (2010) Tuberculosis diagnosis–time for a game change. *N Engl J Med*, 363:1070–1.

Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. (2014). Xpert®/MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1:CD009593. Doi: 10.1002/14651858.CD009593.

Stop TB Partnership. Global Plan to End TB 2016-2020. Available at: <http://www.stoptb.org/global/plan/plan2/>. Accessed 02/09/2017.

Sweany HC, Pinner M. (1925) A pathogenic subtilis bacillus from a patient with chronic tuberculosis. *Infect. Dts*, 37 340-343, 1925.

Sweeney FP, Courtenay O, Hibberd V, Hewinson RG, Reilly LA, Gaze WH, et al. (2007) Environmental monitoring of *Mycobacterium bovis* in badger feces and badger sett soil by real-time PCR, as confirmed by immunofluorescence, immunocapture, and cultivation. *Appl. Environ. Microbiol*, 73: 7471– 7473

Tessema B, Beer J, Emmrich F, Sack U, Rodloff AC. (2011) Rate of recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from frozen acid-fast-bacillus smear-positive sputum samples subjected to long-term storage in Northwest Ethiopia. *J Clin Microbiol*. 49(7):2557–2561. Doi: 10.1128/JCM.00059-11.

Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G. (2003). Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *Journal of clinical microbiology*, 41(9): 4418–4420. Doi:10.1128/jcm.41.9.4418-4420.2003.

Tortoli E, Polomino JC. (2007) New diagnostic methods. In Palomino CJ, Leão S C, Ritacco V. *Tuberculosis 2007 from basic science to patient care*, (1th Ed.). 2007. p 441- 486.

Tortoli E. (2006) The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 48:159–178.

Traag BA, Driks A, Stragier P, Bitter W, Broussard G, Hatfull G, Chu F, Adams KN, Ramakrishnan L, Losick R. (2010) Do *Mycobacteria* Produce Endospores? *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107:878–881.

Truffot-Pernot C, Veziris AN. (2011) Les tests bactériologiques de la tuberculose maladie: standards et perspectives. *Revue des Maladies Respiratoires* 28 (8) : 1034-1047. Doi : 10.1016/j.rmr.2011.07.002.

Trunet C, Mtimet N, Mathot AG, Postollec F, Leguerinel I, Sohier D et al. (2015) Modeling the recovery of heat-treated *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores at suboptimal temperature and pH using growth limits. *Appl Environ Microbiol.* 2015 Jan; 81(2):562-8. Doi: 10.1128/AEM.02520-14. Epub 2014 Nov 7.

Turnbull PC. (1981) *Bacillus cereus* toxins. *Pharmacol Ther.* 13: 453-5.

Turnbull PCB. (1996) *Bacillus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 15. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7699/>.

Walzl G, McNERNEY R, du Plessis N, Bates M, McHugh TD, Chegou NN, et al. (2018). Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers. *Lancet Infect Dis.* 18: E199–E210. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30111-7.

Wang XN, He TL, Geng MJ, Song YD, Wang JC, Liu M. et al. (2018). Prevalence of and risk factors for tuberculosis among healthcare workers in Chinese tuberculosis facilities. *Infectious diseases of poverty*, 7(1), 26. doi:10.1186/s40249-018-0407-6.

Wayne LG, Krichevsky MI, Portyrata D, Jackson CK. (1984) Diagnostic probability matrix for identification of slowly growing mycobacteria in clinical laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 20 (4): 722-729.

Wayne LG. Lin KY.(1982) Glyoxylate metabolism and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *Infect. Immun*, 37: 1042-1049.

Wheeler MW. (1951) A simple procedure for the preparation of egg medium for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 62(2): 244-6.

WHO. (2004) BCG vaccine. WHO position paper. *Relevé épidémiologique hebdomadaire/Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations= Weekly epidemiological record/Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 79:27.

Whyte T, Hanahoe B, Collins T, Corbett-Feeney G, Cormican M. (2000) Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and MB BAC/T systems for routine detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*, 38:3131–3132.

Wirth T, Hildebrand F, Allix-Beguec C, Wolbeling F, Kubica T, et al. (2008) Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog* 4: e1000160.

Wood MR, Yu EA, and Mehta S. (2017) The Human Microbiome in the Fight against Tuberculosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 96(6):1274–1284.

WHO. *Global tuberculosis report*, WHO, Geneva (2013).

WHO. (2017b). *Global Tuberculosis Report 2016*. Geneva: WHO.

WHO. (2017d). *Next-Generation Xpert®MTB/RIF Ultra Assay Recommended by WHO*. Geneva.

WHO. Global tuberculosis report 2018. Available: www.who.int/entity/tb/publications/global_report/gtbr2018_main_text.pdf.

WHO. (2009). Treatment of tuberculosis: guidelines – 4th ed. [who/htm/tb/2009.420](http://www.who.int/htm/tb/2009.420) .

WHO. (2011). Global tuberculosis control: WHO report 2011. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/44728>.

WHO. (2012) Global tuberculosis report 2012. <https://www.who.int/iris/handle/10665/75938>.

WHO. (2014) Global Tuberculosis Report. Geneva. (http://www.who.int/tb/publications/factsheet_global.pdf?ua=1).

WHO. (2015) Policy Statement: Automated Real-Time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF system. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2015.

WHO. (2016) Global tuberculosis report, WHO Press, Geneva (2016).

WHO. (2017c). Global Tuberculosis Report 2017. Geneva: WHO.

WHO. https://www.who.int/violence_injury_prevention/road_safety_status/country_profiles/en/.

Yuichiro S, Osamu U, Yukimasa O, Tomoyuki A, Noriko K, and Toshiaki M. (2017) Bacillus cereus pneumonia in an immunocompetent patient: a case report. JA cil Rep, 3(1):25.

Zallet J, Olaru ID, Witt A-K, Vock P, Kalsdorf B, Andres, et al. (2018) Evaluation of OMNIgene®•SPUTUM reagent for mycobacterial culture. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 22:945-949(5).

Zhao L, Xia Q, Lin N, Liu B, Zhao X, Liu Z, et al. (2012) Evaluation of BACTEC MGIT 960 system for the second-line drugs susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in China. J Microbiol Methods; 91:212–4.

Zingué D, Hien H, Méda N, Zida S, Kaboré A, Sanou A, et al. (2013) Advantages and drawbacks of expectoration decontamination methods for tuberculosis and anti-tuberculosis drug 344 resistance diagnosis. Ann Biol Clin, 71:283-291.

CHAPITRE 8: ANNEXES

CHAPITRE 8: ANNEXES

ANNEXES 1 : Formulaire d'information (version 2.1 de septembre 2016)

Je m'appelle.....et
je veux m'entretenir avec vous sur une étude sur la tuberculose dans la région des hauts bassins, province
du Houet.

Nous sollicitons votre participation à l'étude intitulée : « *Evaluation de l'effet d'un bain de bouche antiseptique à base de chlorehexidine sur les contaminations de cultures des mycobactéries à Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso* » (version 2.0 septembre 2016)», qui est une étude conçue et conduite par des chercheurs du Centre MURAZ. Nous vous prions de prendre connaissance des informations sur cette étude à travers ce document en le lisant ou en le faisant lire pour vous par un de vos proches. Vous pouvez également avoir des informations auprès du personnel impliqué dans l'étude pour vous expliquer les points que vous ne comprenez pas.

Contexte et justification

La technique de la culture est un outil indispensable dans le processus du diagnostic de la tuberculose pulmonaire et des résistances aux antituberculeux.

La difficulté majeure concernant la réalisation de la culture des expectorations dans les pays pauvres est la fréquence élevée des contaminations. Lorsque la culture de crachat d'un patient est contaminée, le laboratoire ne sera pas à mesure de dire quel type de mycobactérie le patient héberge et encore moins si cette mycobactérie est résistante aux antituberculeux utilisés ou pas. Ces informations sont cependant nécessaires pour une prise en charge médicale appropriée.

Les crachats contiennent des microbes qui proviennent de la bouche. Ces microbes qui se multiplient beaucoup plus rapidement que les bacilles tuberculeux vont proliférer et occasionner les contaminations des cultures malgré l'utilisation de solution décontaminant lors de la mise en culture.

Des études dans des pays pauvres comme le Burkina Faso ont montrées que le recueil des crachats après le rinçage de la bouche avec un antiseptique permet de réduire les proportions de contaminations des cultures. Nous pensons donc que les bains de bouches antiseptiques pourraient être une des solutions au problème de contamination que nous rencontrons.

Objectif de l'étude :

Nous voulons mener une étude sur l'impact d'un bain de bouche antiseptique à base de chlorehexidine sur les contaminations de cultures des crachats.

Méthodologie

Nous allons inclure 146 patients tuberculeux. Vous avez été dépisté positif en ce qui concerne la tuberculose. Si vous décidez de participer à l'étude, nous demanderons des informations d'ordre sociodémographiques et cliniques vous concernant et vous nous fournirez deux crachats ; un sans avoir rincé la bouche avec l'antiseptique et un après vous être rincé la bouche avec l'antiseptique. Les deux groupes de crachats vont être cultivés et nous déterminerons lequel des groupes à moins de contamination. Si vous avez accepté de vous faire prélever pour le test VIH, nous vous demanderons votre autorisation pour utiliser les résultats.

Bénéfices directs et indirects

Les patients(es) pourront bénéficier directement des résultats des tests de sensibilités aux anti-tuberculeux qui seront transmis au médecin traitant pour une meilleure prise en charge du patient. Montrer que le rinçage de la bouche avec un antiseptique avant le prélèvement des crachats réduit les contaminations des cultures, et connaître les microorganismes contaminants permettront de mettre à la disposition du PNT des données scientifiques pour l'amélioration des conditions de prélèvement des crachats destinées à la culture et ainsi permettre un meilleur contrôle la tuberculose.

Risques prévisibles

Les risques liés à l'utilisation du bain de bouche à base de chlorhexidine sont rares. En effet, de rares réactions allergiques chez des patients ont été documentées. Les moyens nécessaires seront donnés aux médecins pour prendre en charge les cas d'allergies liés à l'utilisation des bains de bouche qui surviendront.

Participation à l'étude

Votre participation à cette étude est entièrement libre. Vous avez le droit d'y mettre fin à tout moment. Le refus de participer ou l'arrêt de sa participation à l'étude n'entraînera aucun préjudice.

Confidentialité :

Toute information vous concernant sera rigoureusement confidentielle et protégée par les règles strictes du secret médical auquel est tenue toute l'équipe participant au projet. Les données recueillies seront rendues anonymes avant d'être utilisées dans le cadre de cette recherche. Enfin, si vous le souhaitez, vous serez personnellement informé (e) par votre médecin des résultats de cette recherche dès qu'ils seront disponibles.

Projet approuvé par le comité d'éthique institutionnel du centre MURAZ, joignable au numéro suivant : 702632691 (N° d'approbation...) en date du :

Si vous acceptez de participer à cette étude, il vous suffit de signer le formulaire de consentement de participation. Un exemplaire du document vous sera remis.

Nous vous remercions de votre collaboration.

Nom et prénom de l'investigateur ayant remis la note d'information : (Centre MURAZ) , Bobo-Dioulasso),

Tel : 20 97 01 02.

Date.....

ANNEXE 2 : FICHE DE COLLECTE DES DONNEES 1

PROTOCOLE DE RECHERCHE : « *Evaluation de l'effet d'un bain de bouche antiseptique à base de chlorhexidine sur les contaminations de cultures des expectorations dans le cadre du diagnostic de la tuberculose pulmonaire à Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso* » (version 2.1 septembre 2016)

Site :

Date d'inclusion : /__ / __ / __ / __ / __ / __ /

Numéro d'enregistrement labo: /__ / __ / __ / __ /

N° Inclusion patient : ... / __ / __ / __ / __ /

I. Caractéristiques sociodémographiques

I.1.Age (ans): /__ / __ / __ /

I.2.Sexe : Masculin Féminin

I.4.Niveau d'instruction :

Scolarisé : Primaire Secondaire Universitaire Alphabétisé

Non scolarisé

I.5.Situation professionnelle : Salarié Ménagère Commerçant Cultivateur/Éleveur

Elève/Étudiant Autres Sans emploi

II. Renseignements cliniques

II.1.TPM+ TPM-

II.2 Nouveau cas Rechute : Autres :

II.3.Statut VIH : négatif Positif Indéterminé Inconnu

II.4.Type de VIH : VIH1 VIH2 VIH1+2

II. Modalité de prélèvement des expectorations

Crachat A : Sans Bain de bouche : Après bain de bouche :

Crachat B : Sans Bain de bouche : Après bain de bouche :

ANNEXE 3 : FICHE DE COLLECTE DES DONNEES 2

PROTOCOLE DE RECHERCHE : « *Evaluation de l'effet d'un bain de bouche antiseptique à base de chlorhexidine sur les contaminations de cultures des expectorations dans le cadre du diagnostic de la tuberculose pulmonaire à Bobo-Dioulasso* » (version 2.0 de septembre 2016)

Site :

Date d'inclusion : /__//__ /__//__ /__//__

N° Inclusion patient : .../__//__//__//__//__//__

Renseignements du Laboratoire

Numéro d'enregistrement labo: /__//__//__//__//__//__

Résultat de l'examen microscopique

| Date D'examen | Echantillon | Aspect* | Résultats | | | | |
|------------------|------------------|---------|-----------|-------|---|----|-----|
| | | | Négatif | 1-9** | + | ++ | +++ |
| | Crachat A | | | | | | |
| | Crachat B | | | | | | |

Date de recueil des prélèvements

Crachat A /__//__ /__//__ /__//__

Crachat B /__//__ /__//__ /__//__

Température de conservation : Température 4-8°C température Ambiante

Date de transmission au laboratoire du centre MURAZ : /__//__ /__//__ /__//__

ANNEXE 4 : Procédure de préparation des milieux de Lowenstein Jensen

ANNEXE 5 : PROFIL API DE FERMENTATION DES DIFFERENTS GROUPES DE BACTERIES SPORULANTES

| Identification | B. Agri Gpe1 | B. firmus Grp2 | B. cereus1 Gpe3 | B. cereus2 Gpe3 | B. subtilus Gpe4 | B. lentus Gpe5 | B. alvei Gpe6 | B. thiamolyticu s Gpe7 | B. Licheniformis Gpe8 | B. acillus non réactive Gpe9 |
|---------------------|-----------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Hydrates de carbone | | | | | | | | | | |
| Glycérol1 | + | - | + | - | + | - | + | + | + | - |
| Erythriol2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-arabinose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-arabinose 4 | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - |
| D-ribose 5 | - | - | + | + | + | - | + | + | + | - |
| D-xylose 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| L-xylose 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-adonitol 8 | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - |
| MDX 9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-galactose 1 | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - |
| D-glucose 11 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - |
| D-fructose 12 | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - |
| D-mannose 13 | - | + | - | - | + | + | + | + | + | - |
| L-sorbose 14 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-rhamnose 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| Dulcitol 16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Inositol 17 | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - |
| D-mannitol 18 | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - |
| D-sorbitol 19 | - | - | - | - | + | + | - | - | + | - |
| MDM20 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| MDG21 | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - |
| NAG22 | - | - | + | + | - | + | + | + | - | - |
| Amygdaline 23 | - | - | + | - | - | + | + | + | + | - |
| Arbutine 24 | - | - | + | - | - | + | + | + | + | - |
| Esculine 25 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| Salicine 26 | - | - | + | + | - | + | + | + | + | - |
| D-cellobinose 27 | - | - | + | - | + | + | - | + | + | - |
| D-maltose 28 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| D-lactose 29 | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - |
| D-melibiose 30 | - | - | - | - | - | + | + | + | - | - |
| D-saccharose 31 | - | + | - | + | + | + | + | + | + | - |

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------|---|------|--------|-------|------|------|------|-------|---------|----|
| D-trehalose 32 | - | + | + | + | + | - | + | + | - | - |
| Inuline 33 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-melezitose 34 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| D-raffinose 35 | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - |
| Amidon36 | - | + | - | - | - | + | + | + | + | - |
| Glycogène 37 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - |
| Xylitol 38 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Gentobiose 39 | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - |
| D-turanose40 | - | - | - | - | - | - | + | + | + | - |
| D-xylose 41 | - | - | - | - | - | +f | - | - | - | - |
| D-tagotose 42 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| D-fucose 43 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-fucose 44 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| D-arabitol 45 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-arabitol46 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 47GNT 47 | - | - | + | - | - | - | + | + | - | - |
| 2KG 48 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5KG 49 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Nbre de sucres fermentés | 5 | 6-7 | 13-14 | 8-11 | 17 | 20 | 21 | 23-26 | 23-28 | 0 |
| % d'homologie | | 97,7 | 58-94% | 79-92 | 99,9 | 98.8 | 99,6 | 99,9 | 66-99,9 | NA |

ANNEXE 6: CURRICULUM VITAE

CURRICULUM VITAE

Ingénieur des travaux d'Analyses Biomédicales, DEA de Biologie Appliquée et modelisation des systèmes biologiques, Doctorante (spécialité Microbiologie)

1. Informations générales

- Nom de famille: ILBOUDO/ KABORE
- Prénoms: Sidbè-wendé Antoinette
- Matricule : 107924T

2. Nationalité: Burkinabè

3. Formation:

| Institution (Date début - Date fin) | Diplômes obtenus: |
|--|--|
| 2013-2019 | Doctorat en cours, Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques (BA-MSB), Université NAZI BONI (UNB), Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso. |
| 2008-2010 | DEA BA-MSB, UNB, Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso. |

| | |
|-----------|---|
| 2006-2007 | ING. des travaux d'Analyses Médicales, ESTBA, Lomé, Togo. |
| 1991-1995 | ING. des travaux d'Analyses Biomédicales, Collège Polytechnique Universitaire (CPU), Université Polytechnique du Bénin, Cotonou, Bénin. |
| 1990-1991 | Baccalauréat, Série D, Lycée Bambata, Ouagadougou, Burkina-Faso. |

4. Niveau des langues connues: (par compétence de 1-excellent à 5-rudimentaire)

| Langues | Lu | Parlé | Ecrit |
|----------|----|-------|-------|
| Français | 1 | 1 | 1 |
| Anglais | 3 | 3 | 3 |
| Mooré | 3 | 1 | 4 |

Associations ou corps professionnels:

- Membre de la task force Ebola du Centre MURAZ,
- Membre de « Assaut Hépatites Burkina-faso »
- Membre de l'Association des Biologistes et technologistes Biomédicaux du Burkina-Faso (AB.TE.B).

Autres qualifications (ex: connaissances informatiques, etc.):

- Bonne connaissance de l'informatique,
- Bonne connaissance dans utilisation de plusieurs logiciels (Word, OpenEpi, Excel, PowerPoint...).

7. Position actuelle

- Doctorante en Biologie Appliquée,
- Membre de l'unité de recherche des Mycobactériologies, Département des Sciences Biomédicales, INSP/Centre MURAZ

8. Nombre d'années dans la société

- 2000-2019 : 19 années

9. Qualifications **principales**

- Longue expérience dans la gestion des aspects biologiques des projets et programmes de recherche,
- Bonne expérience dans les diagnostics microbiologiques et immunologiques des infections bactériennes et Virales (techniques conventionnelles et nouvelles techniques),
- Expérience démontrée dans le Monitoring biologique des projets et programmes de recherche y compris gestion des Biothèques,
- Compétence démontrée dans l'évaluation des outils de diagnostic microbiologique et immunologique,
- Bonne expérience dans l'encadrement (Maitre de stage) des étudiants de Licence et Master II en Biologie Médicale,
- Bonne expérience de la réglementation en matière de transfert de produits biologiques dangereux (Règlementation IATA),
- Bonne expérience en matière de Biosécurité et de Biosûreté.

10. Expérience professionnelle

| De (date) - à (date) | Lieu | Société ...et personne de référence (y compris adresse E-mail ou n° tel) Note : en priorité pour les missions récentes | Position | Description |
|----------------------|-------------------------------------|--|--|---|
| Depuis 2013 | Bobo-Dioulasso | Centre MURAZ Nicolas MEDA: nicolas.meda@gmail.com | Investigateur principal | Mise en œuvre de la recherche intitulée : Contribution à l'amélioration de la qualité du diagnostic microbiologique de la tuberculose pulmonaire par la culture dans les pays à ressources limités : Etude des facteurs influençant les contaminations de culture des mycobactéries » -Thèse de Doctorat en biologie Appliquée et Modélisation des systèmes biologiques. Financement : Wanetam EDTCP, Réseau IMT-TB, Maitre de stage de deux Master II en Bactériologie-Virologie dans le cadre de cette recherche. |
| 2013-2015 | Bobo-Dioulasso | Centre MURAZ Nicolas MEDA: nicolas.meda@gmail.com | Ingénieur de recherche (site du Burkina) | Mise en œuvre du projet multicentrique sur l'amélioration du diagnostic de la tuberculose chez les enfants infectés par le VIH en Asie et en Afrique (Projet PAANTHER). Financement ANRS 12229 France. -Diagnostic par GenXpert de la tuberculose infantile, -Diagnostic Immunologique par Quantiférons TB Gold de la tuberculose infantile. |
| 2012-2013 | Bobo-Dioulasso, région du Sud-Ouest | Centre MURAZ Dr Hien Mwinonè Hervé | Ingénieur de recherche | Projet de renforcement des capacités des laboratoires intitulé : « Transfert et évaluation de nouvelles techniques de diagnostic rapides de la tuberculose et des résistances aux antituberculeux au BF » Financement Wanetam EDCTP. |
| 2011- 2013 | Bobo Dioulasso | Centre MURAZ Dr Hien Mwinonè Hervé m | Moniteur d'étude biologique | Mise en œuvre de la recherche sur « l'Impact de la coinfection VIH/Mycobacterium tuberculosis sur la dynamique de transmission de la tuberculose au Burkina Faso ». Financement ANRS 12204 France -Isolement, identification, et tests de résistance aux antituberculeux des souches de Mycobactéries. -Gestion de la base de données laboratoire du projet, -Gestion du stockage des souches. |

| | | | | |
|-----------|--------------------|--|--------------------------------|--|
| 2009-2011 | Burkina-Faso | Centre MURAZ Serge DIAGBOUGA diagbouga_serge@hotmail.com | Ingénieur de recherche | Mise en œuvre du Project PNT« Evaluation de la résistance primaire et acquise du complexe tuberculosis aux médicaments antituberculeux au Burkina Faso » financement Fonds Mondial (2008) de Lutte contre le SIDA, la Tuberculose et la Malaria. -Isolement, identification, et tests de résistance des souches de Mycobactéries, -Gestion de la base de données laboratoire du projet, - Gestion de la Biothèque du projet. |
| 2007-2011 | Bobo- Dioulasso | Centre MURAZ Serge Diagbouga diagbouga_serge@hotmail.com | Moniteur d'étude biologique | Project Yérélon: Suivie Biologique des femmes à haut risque pour le VIH de la Cohorte yérélon. -Diagnostic des hépatites B, C et HSV2, -suivie immunologique (CD4+) des patientes VIH+, - Gestion de la Biothèque du projet. |

| | | | | |
|-----------|----------------|--|---|--|
| 2000-2007 | Bobo-Dioulasso | Centre MURAZ Serge Diagbouga diagbouga_serge@hotmail.com | Ingénieur des travaux d'analyses Biomédicales | <p>Réalisation du diagnostic de la tuberculose en routine, du suivie immunologique des patients de la file active de REVS+ et des patients de la ville de Bobo-Dioulasso.</p> <p>-Participation à la mise en œuvre (aspects laboratoires) de plusieurs projets de recherche sur le VIH, les Hépatites et la tuberculose:</p> <p>Etude de performances d'un nouveau test VIKIA HIV1/2 pour le diagnostic de l'infection à VIH. Financement Laboratoires BioMérieux. - Evaluation des tests.</p> <p>Etude de performances d'un nouveau test VIKIA AgHBs pour le diagnostic de l'hépatite B. Financement Laboratoires BioMérieux. -Evaluation des tests.</p> <p>Etude des performances d'un test PCR des urines pour le diagnostic de la tuberculose à <i>mycobacterium tuberculosis</i> au Burkina. Financement ANRS -Evaluation du test</p> <p>Faisabilité de l'implantation des techniques alternatives Dynabeads pour la numération des lymphocytes T CD4+ dans les pays à ressources limités (étude sous régionale) ; - Formateur des équipes du Togo, Mali et Burkina-Faso.</p> <p>Evaluation de la prise en charge psychosociale, nutritionnelle et médicale des couples mère-enfants infectés par le VIH au Burkina Faso : étude des déterminants potentiels associés à la progression à long terme de l'infection à VIH chez l'enfant au Burkina Faso » financement ANRS 1221, France</p> |
| 1998-2000 | Ouagadougou | Clinique SANDOF Pr Soudré Robert | Ingénieur des travaux d'analyses Biomédicales | Responsable de la section Immunologie et Hématologie du laboratoire de la clinique SANDOF |

| | | | | |
|-------------------------------|-------------|--|---|--|
| Octobre 1995 à Mai 1997 | Ouagadougou | Hôpital Yalgado OUEDRAGO Pr Soudré Robert | Ingénieur des travaux d'analyses Biomédicales | Service de Bactériologie - Parasitologie. Hôpital Yalgado OUEDRAGO Ouagadougou (SND suivi de bénévolat) -Diagnostic des infections Bactériennes et Parasitaires. |
|-------------------------------|-------------|--|---|--|

11-Autres informations pertinentes (Publications scientifiques) Publications scientifiques (articles) dans des revues avec comité de lecture Entre 2011 et 2019

- 1- **Kaboré A**, Tranchot-Diallo J, Hien H, Zouré O, Zingué D, Sanou A, Gomgnimbou MK, Daneau G, Ouédraogo GA, Méda N, Sangaré L Identification of spore-forming bacteria isolated from contaminated Lowenstein Jensen media and effectiveness of Vancomycin to reduce Mycobacterial culture contamination in Burkina-Faso. *Sci Rep.* 2019 May 10; 9(1):7194. doi: 10.1038/s41598-019-43662-0.
- 2- **Kabore A**, Tranchot-Diallo J, Sanou A, Hien H, Daneau G, Gomgnimbou MK, Meda N, Sangaré L. Why Oral antiseptic mouth rinsing before sputum collection cannot reduce contamination rate of mycobacterial culture in Burkina-Faso. *Afri Health Sci.* 2019; 19(1): 1321-1328. <https://dx.doi.org/10.4314/ahs.v19i1.3>
- 3- Hervé Hien, Dézémon Zingué, **Antoinette Kaboré**, Ganamé Zakaria, Adama Sanou, Michel Gomniougou, Philippe Van De Perre, Nicolas Meda. The situation of Mycobacterium tuberculosis complex and HIV co-infection in the Hauts-Bassins Health Region, Burkina Faso. ANRS 12204 / DYTRAVIHT study. *Journal of Medical Practice and Review* 2018; 2:10
- 4- Diabougou S, Zingué D, Bahembera E, **Kabore A**, et al. Simplified Dynabeads Method Using Light Microscopy for Enumerating TCD4+ Lymphocytes in Resource-Limited Settings. *Ann Clin Lab Res.* 2016, 4: 4.
- 5- **Antoinette Kaboré**, Hervé Hien, Adama Sanou, Dézémon Zingué et al. Impact of pre-analytical factors on mycobacterium cultures contaminations rates in Burkina Faso, West Africa *Pan African Medical Journal.* 2014; 19:396 doi:10.11604/pamj.2014.19.396.5551
- 6- Sylvie Z, Zekiba T, **Antoinette K**, Dezemon Z, Herve H, Adama S, et al. Etat des lieux des mycobactérioses atypiques au Burkina Faso : résultats d'une enquête régionale. *Pan African Medical Journal [Internet].* 2014 [cité 4 août 2014];17. Disponible sur: <http://www.panafrican-medjournal.com/content/article/17/188/full/>
- 7- Adama Sanou, Zekiba Tarnagda, Estelle Kanyala, Dezemon Zingue, Moumini Nouctara, Zakaria Ganame, Adjima Combarry, Herve ´ Hien, Mathurin Dembele, **Antoinette Kabore**, Nicolas Meda, Philippe Van de Perre, Dorine Neveu, Anne Laure Banuls., Sylvain Godreuil. Mycobacterium Bovis in Burkina Faso: Epidemiologic and Genetic Links between Human and Cattle Isolates. (PNTD-D-1400472R1) in *PLOS Neglected Tropical Diseases.*
- 8- Zingue D, Hien H, Drabo A, Nouctara M, **Kabore A**, Ouédraogo O et al. (2014) Comparative Evaluation between the New BD FACS Count System and Standard BD FACS Count System by Enumeration of Absolute TCD4 Lymphocytes in Adults: Preliminary Results. *J Clin Diagn Res* 2:103.
- 9- Zingué D, Hien H, Méda N, Zida S, **Kaboré A**, Sanou A, Ouédraogo AS, Gomgnimbou M, Diandé S, Tarnagda Z, Godreuil S. Advantages and drawbacks of expectoration decontamination methods for tuberculosis and anti-tuberculosis drug resistance diagnosis. *Ann Biol Clin (Paris).* 2013 May-Jun; 71(3):283-91. doi: 10.1684/abc.2013.0815. French.
- 10- Gomgnimbou MK, Refrégier G, Diabougou SP, Adama S, **Kaboré A**, Ouiminga A, Sola C. Spoligotyping of Mycobacterium africanum, Burkina Faso. *Emerg Infect Dis.* 2012 Jan; 18(1):117-9. doi: 10.3201/eid1801.110275.
- 11- Huet C, Ouedraogo A, Konaté I, Traore I, Rouet F, **Kaboré A**, Sanon A, Mayaud P, Van de Perre P, Nagot N. Long term virological, immunological and mortality outcomes in a cohort of HIV-infected female sex workers treated with highly active antiretroviral therapy in Africa. *BMC Public Health.* 2011 Sep 14; 11:700

12-Communications scientifiques à des congrès nationaux et internationaux

- 1- **Antoinette Kaboré**, Tranchot-Diallo Juliette, Hervé Hien, Zouré Ouseini, Zingué Dezémon, Adama Sanou, Géraldine Daneau, Mamoudou Ouedraogo, Nicolas Méda, Lassana Sangaré. Phenotypical identification of spore-forming bacteria strains isolated from contaminated Lowenstein Jensen media. Communication orale, 2ème Forum International de la Biologie en Afrique (FIBAFric) Dakar (Sénégal), 08 - 10 Mai 2018.
- 2- **Antoinette Kaboré** Tranchot-Diallo Juliette, Hervé Hien, Zouré Ouseini, Zingué Dezémon , Adama Sanou , Géraldine Daneau , Mamoudou Ouedraogo, Nicolas Méda, Lassana Sangaré. Caractérisation des souches de bactéries sporogènes isolées des milieux de culture de Lowenstein Jensen contaminés à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). Communication orale, 19ème journées des sciences de la santé de Bobo (Burkina Faso), 09- 11Mai 2018.
- 3- **Kabore A**, Hien H, Sanou A, Diallo-Tranchot J, Zoure O, Gomgnimbou KM, Meda N, Ouedraogo GA, Sangare L. Les bains de bouche à base de la Chlorhexidine avant le recueil des **expectorations ne permettent pas la réduction des contaminations de culture des mycobactéries au Burkina-Faso**. 1ère Journées Scientifiques du CERMES, Niamey, Niger, du 14 au 16 novembre 2017. Communication affichée p28.
- 4- Anca Vasiliu, Laurence Borand, Malin Inghammar, Ngoc Lan Nguyen, **Antoinette Kabore**, Sara Eyangoh, Olivier Marcy, Pean Polidy, and Guislaine Carcelain for the PAANTHER study group. Performance of the Interferon Gamma Release Assay Quantiferon® TB Gold In-Tube for the diagnostic of tuberculosis in HIV-infected children; Communication orale (B14) 9ème conférence sur le HIV 23 - 26 juillet 2017 Paris, France.
- 5- **Antoinette Kaboré1**, Hervé Hien1,2 AdamaSanou 1,,Dézémon Zingué 1, Zakaria Ganamé1, MouminiNouctara1, Mamoudou Ouédraogo 1, Oumarou Ouédraogo 1, Michel Gomgnimbou1, Nicolas Méda1,4 Lassana Sangaré . Impact des facteurs pré-analytiques sur les contaminations des cultures des mycobactéries au cours du diagnostic de la tuberculose pulmonaire au Burkina Faso Communication orale (CO11) 15èmeColloque international de Biologie technique (CIBIOTECH) Abidjan (Côte d'Ivoire), 04 Mai- 08 Mai 2015.
- 6- **Antoinette Kabore**, Hervé Hien, Adama Sanou, Zingué D, Ganamé Z, Nouctara M, Ouédraogo Mamoudou, Ouédraogo Oumarou, Felicité Koutou, Gomgnimbou Michel, Méda Nicolas, Neveu Dorine, Godreuil Sylvain, Sangaré Lassana. Impact des facteurs préanalytiques sur les contaminations des cultures des mycobactéries au cours du diagnostic de la tuberculose pulmonaire au Burkina Faso. Communication orale (CO117) 17ème journées des sciences de la santé de Bobo (Burkina Faso), 06 Mai- 09 Mai 2014.
- 7- **Kaboré Antoinette**, Zingué Dézémon1Hien Hervé1, 2 Sanou Adama1,3 Ganamé Zacharia1,Amélie Lompo Nouctara Moumini1 et al. Etude des résistances aux antituberculeux chez des patients TPM+ coinfectés ou non par le VIH dans la région des Hauts Bassins. Communication orale, 2ème forum des acteurs de la recherche sur le SIDA Ouagadougou, 17-19 décembre 2013.
- 8- **Antoinette kaboré**, Hervé Hien1, 2 Dezemon Zingué1 Adama Sanou1, 5,6, sylvie Zida1 michel Gomgnimbou1, 4, Moumini Nouctara1, Mamoudou Ouédraogo1, Oumarou Ouédraogo1 Nicolas

Meda1, 3: Etat des lieux des mycobactéries non tuberculeuses en Afrique. 16èmes journées des Sciences de la Santé de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. 08 au 11 Mai 2012. Communication orale, CO37.

9-. Salimata Fané, Adama Sanou, Hervé Hien, Dezemon Zingué, Moumini Nouctara, Sylvie Zida, Michel

Goumgnimbou, Aly Drabo, **Antoinette Kaboré**, Mahamoudou Ouédraogo, Oumarou Ouédraogo, Nicolas Méda. Optimisation de l'isolement des mycobactéries tuberculeuses au laboratoire du Centre Muraz. 16èmes journées des Sciences de la Santé de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. 08 au 11 Mai 2012. Communication orale, CO39.

10-. Dezemon Zingué Aly Drabo, **Antoinette Kaboré** Hervé Hien1 Sylvie Zida Validation du nouveau kit de réactif FACSCount CD4 et logiciel BD FacsCount pour la numération des lymphocytes TCD4+ en pourcentage : résultats préliminaires

11- M. K. Gomgnimbou, G. Refrégier, S. Diagbouga, A. Sanou, A. Ouiminga, **A. Kabore** and C. Sola1,4* and the Team of Tuberculosis study of Centre MURAZ: Diversité génétique de mycobacterium tuberculosis complex (MTBC) au Burkina Faso: intérêt des frottis de lames Ziehl-Neelsen. 16èmes journées des Sciences de la Santé de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. 08 au 11 Mai 2012. Communication affichée, P22

.12- Hien H., Diagbouga S., Kagoné T., Ouiminga A., **Kaboré A.**, Sawadogo A., Simporé J., Rouet F., Vergne L., Meda N., Peters M., Delaporte E.: Evaluation de la résistance du VIH aux antirétroviraux au Burkina Faso : enquête transversale comparant des patients exposées et non exposées au programme de Prévention de la Transmission Mère Enfant du VIH. Projet OOAS N°20. 15ème Journées Scientifiques des Sciences de la Santé de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. 04 au 07 juin 2010. Communication orale, CO25

13- Hien H. Siribié I., Dao A. Somda P., Yerbanga N. Sanou A., Koussoube/Balima T, Kantagba L., Somda S Traoré G., Meda N. , Kania D., Ouiminga A., Nouctara M., **Kaboré A.** Drabo F., Diagbouga S. : Faisabilité et efficacité des interventions sur la prise en charge médicale des patients infectés par le VIH en milieu décentralisé à la SMI/CNSS, District de Dô. 15ème Journées Scientifiques des Sciences de la Santé de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 04 au 07 juin 2010. Communication orale, CO23.

14-Hien H., Kagoné T., Ouiminga A., **Kaboré A.**, Sawadogo A., Simporé J., Rouet F., Vergne L., Meda N., Peters M., Delaporte E., Diagbouga S. Evaluation de la résistance du VIH aux antirétroviraux chez des patients traités après une Prévention de la Transmission Mère-Enfant –Projet OOAS n°20. 5ème conférence Francophone VIH/SIDA, 28-31 mars 2010, Casablanca, Maroc. Communication affichée, 338/62P

15-Zingue D., Diagbouga S., Ouiminga A., **Kaboré A.**, Hien H., Bahembera E., Optimisation de la technique Dynabeads en microscopie optique permettant la numération des lymphocytes CD4+ chez des sujets infectés par le VIH dans les pays à ressources limitées. 5ème conférence Francophone VIH/SIDA, 28-31 mars 2010, Casablanca, Maroc. Communication orale192/39A.

13-Autres publications

Mémoires

1. KABORE/ILBOUDO S A. Evaluation des performances biologiques d'un nouveau test VIKIA® HIV 1/2 pour le dépistage rapide de l'infection à VIH au Burkina Faso. Mémoire de DEA – Université polytechnique de Bobo, décembre 2010.
2. KABORE/ILBOUDO S A. Evaluation des Influences réciproques de l'infection par plasmodium Berghei ANKA et de la vaccination anticoquelucheuse chez le rat. Mémoire d'ingénieur des travaux – Université de Lomé TOGOI, mars 2007.

14-Referents

PERSONNES RESSOURCES

| NOM ET PRENOM | TITRE/FONCTION | INSTITUTION/ORGANISME | CONTACTS |
|------------------|--|---|---|
| Hien M. Hervé | Docteur en médecine, Docteur en Santé Publique (PhD), spécialiste en politiques et systèmes de santé, Chargé de recherches (CAMES) | Centre MURAZ IRSS/CNRST, Burkina-Faso; Institut Nationale de Santé Publique (INSP) | Tél: 00226 70 24 55 54 Email: hien_herve@hotmail.com |
| Nicolas MEDA | Professeur Santé Publique, MD, PhD, HDR (CAMES) | Centre MURAZ, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso; UFR/SDS, Université Pr Joseph Ki-Zerbo, Burkina-Faso | Tél : (P) 00 226 70 21 50 84 Email : : nicolas.meda@gmail.com |

Attestation

Je soussigné, Ilboudo/Kaboré S. Antoinette certifie sur l'honneur le caractère complet, fiable et sincère des informations contenues dans ce curriculum vitae.

Fait à Bobo-Dioulasso, le 28 Mars 2019

