

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

ECOLE INTER ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES

(E.I.S.M.V.)



ANNEE 2014

N° 16

**CARACTERISATION DES MYCOBACTERIES ISOLEES CHEZ L'HOMME ET
LES RUMINANTS DOMESTIQUES AU TCHAD : CAUSES DES SUSPICIONS DE
LA TUBERCULOSE DANS LES HOPITAUX ET AUX ABATTOIRS**

Mémoire de diplôme de Master en Santé Publique Vétérinaire

Spécialité : *Epidémiologie des maladies transmissibles et Gestion des Risques Sanitaires*

(EGRS)

Présenté et soutenu publiquement le 29 avril 2014 à 13heures

Par **Lamireou DIDI**

Née le 1^{er} Août 1977 à Kélo (TCHAD)

JURY

Président :

M. Louis Joseph PANGUI

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

Membres :

M. Bhen Sikina TOGUEBAYE

Professeur à la F.S.T de l'UCAD

M. Germain Jérôme SAWADOGO

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

Mme Rianatou BADA ALAMBEDI

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

Directeur de mémoire :

M. Philippe Soumahoro KONE

Maître- Assistant à l'E.I.S.M.V de Dakar

Co-directeur :

Ngandolo BONGO NARE

Chercheur à l'IRED

DEDICACE

A Dieu le Tout Puissant pour sa miséricorde, sa protection, son soutien sans fin,
A mes parents pour leurs prières,
A tous ceux qui ont choisi la carrière de la recherche scientifique,
A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

REMERCIEMENTS

Mes remerciements

A Dieu le créateur de m'avoir protégé jusqu'à la finalisation de ce document

A Afrique One / Wellcome Trust, consortium qui a financé cette étude.

Au Dr Philippe KONE, Maître-assistant au service de MIPI de l'EISMV de Dakar pour votre accueil au sein de cette école, votre disponibilité et vos précieux conseils pendant mon séjour à Dakar et lors de la finalisation de ce mémoire, merci d'avoir dirigé ce travail, que le Tout Puissant prenne soin de vous.

Au Dr Ngandolo BONGO NARE, chercheur à l'IRED pour la confiance placé en moi en me donnant ce sujet de mémoire et m'avoir encouragée à commencer cette étude. Merci pour vos précieux conseils sur la méthodologie de rédaction des documents scientifiques, ainsi que les techniques du diagnostic moléculaire. Vous n'avez pas hésité un instant à venir sur le terrain avec moi pour prendre contact avec les cliniciens en charge de la collecte des données lors de cette étude. Cela ne pourra se réaliser sans votre active participation, que Dieu vous le rende au centuple,

Au Dr Collecte DIGUIMBAYE, ex Directrice adjointe du LRVZ farcha (actuel IRED), vous avez été pour moi une mère par vos sages conseils et votre soutien sans cesse au sein de cette institution chaque fois que j'étais dans le besoin, merci pour votre encadrement technique sur le diagnostic de la tuberculose,

Au Dr Mahamat HAMIT MAHAMAT, ex Directeur du LRVZ farcha pour tout son appui et merci d'avoir permis que je puisse m'inscrire à Dakar pour commencer cette étude.

Au Dr Daugla DOUMAGOUM MOTTO, Directeur du CSSI, qui m'a intégré dans cette équipe de recherche sur la TB à l'IRED,

Au Pr Alfarouk IDRISSE, Directeur de l'IRED, pour tout son appui pour l'aboutissement de cette étude.

Au Dr Alain KAMGA pour son soutien multiforme au sein de l'EISMV

A tout le corps enseignant et le personnel de l'EISMV pour votre soutien

A M. Sylvain TADIO technicien au sein de l'unité de mycobactérie pour son aide lors des travaux de laboratoire concernant la décontamination des échantillons et le suivi des cultures,

Au personnel de l'IRED particulièrement ceux de la division santé animale, Pidou KIMALA, Valentin DIGAMNAYAL, Tchari DOUNGOUS, Service NAISSENGAR, Hassane KEMBE, Maria MAHAMAT SALEH, Prudence DOUNIA pour leurs appuis lors de l'analyse des différents échantillons.

A toutes les équipes de collecte des données sur le terrain au Lac Tchad, Guelendeng, Bongor, Kélo, Moundou, Bebedja, Doba, Koumra et Sarh.

A mes compatriotes Gedeon OSSOGA, Clairance BAWOIDY, Madina et Maka HADJER pour m'avoir accueilli à Dakar et rendre mon séjour agréable,

A tous mes compatriotes de l'EISMV ainsi que ceux de l'UCAD

A mes promotionnaires, Fausta, Rosine, Razak, Désiré, Narcisse, Gael,

A mon amie Hannatou pour sa compagnie à Dakar,

Merci à la Communauté Chrétienne Tchadienne au Sénégal, cellule de Médina pour leurs prières,

Je dis merci à ma famille, mon papa pour tous ses sacrifices, prières et vœux à me voir réussir dans ma carrière.

Ma maman pour son amour maternel toujours manifesté envers moi, mes frères et sœurs, Nadji, Seilou, Femissou Weibero, Fangbo, Ndaklami, Beida, Nicole, Mamissou, Beissou, Massi, pour vos multiples soutiens,

Mes cousins et cousines ainsi que mon beau frère Assane Elsou Disso et son épouse Labey Inne Sophie, mes oncles et tantes ainsi que tous mes neveux et nièces.

Mon filston Ori Inbo Michael tu m'as beaucoup manqué,

Merci à toi mon Luwehdiguim Eleazar pour ton amour, tes conseils et ton soutien lors de cette formation.

A NOS MAITRES ET JUGES

- A notre maître et président du jury, Louis Joseph PANGUI, Professeur à l'EISMV de Dakar.

Vous nous avez honoré en acceptant de présider notre jury de soutenance malgré vos multiples occupations. Veuillez accepter honorable maître, l'expression de notre sincère reconnaissance.

- A notre maître et juge, Rianatou BADA ALAMBEDI Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

Votre présence dans notre jury nous honore malgré vos multiples occupations, votre constante disponibilité pour un travail bien fait ont suscité notre admiration. Veuillez trouver ici l'expression de notre gratitude et nos remerciements les plus sincères.

- A notre Maître et juge, Germain SAWADOGO, Professeur à l'EISMV de Dakar.

Vous nous faites l'honneur d'être parmi les membres de notre jury. Votre rigueur, vos qualités intellectuelles nous ont marqué et resterons gravées dans la mémoire. Veuillez croire en notre sincère reconnaissance.

- A notre Maître et juge, Bhen Sikina TOGUEBAYE, Professeur à la FST à l'UCAD.

Vos qualités humaines et d'homme de sciences, votre disponibilité, ont suscité notre admiration. Recevez notre profonde gratitude et nos hommages.

A notre Maitre et juge, Yaghoub KANE
Professeur à l'EISMV de Dakar

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de faire partie de ce jury de mémoire. Vos qualités intellectuelles, votre rigueur méritent respect. Veuillez trouver ici l'assurance de notre sincère gratitude.

- A notre Maître et Directeur de mémoire, Dr Philippe KONE, Maître-assistant à l'EISMV de Dakar.

En acceptant de diriger ce travail, vous nous faites un grand honneur malgré vos nombreuses occupations, votre constante disponibilité, votre encadrement scientifique, votre humilité suscitent respect et admiration. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance. Ce temps passé ensemble nous a permis de découvrir en vous l'amour pour le travail bien fait. Vos conseils resteront gravés dans notre mémoire.

LISTE DES ABREVIATIONS

% : Pourcentage

°C : Degré Celsius

µl : Microlitre

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Af : African

BAAR : Bacille Acido Alcool Résistant

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

CPC: Cétyle Pyridinium Chloride

CSSI : Centre de Support en Santé Internationale

dNTP : desoxynucléotide triphosphate

DSA : Division Santé Animale

EISMV : Ecole Inter- Etats de Sciences et Médecine Vétérinaires

Eu : Europe

FST : Faculté des Sciences et Techniques

g: Gramme

H₂O : Eau

IDC : Intradermo réaction comparative

IDR : Intradermo Réaction

IRED: Institut de Recherche en Elevage pour le Développement

LVRZ/F : Laboratoire de Recherche Vétérinaires et Zootechniques/ Farcha

M: Mycobacterium

MERA : Ministère de l'Élevage et des Ressources Animales

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

ml: Millilitre

min: Minute

MNT : Mycobactérie Non Tuberculeuse

NaOH : Hydroxyde de Sodium

NALC : N-acétyl L-cystéine

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OR : Odds Ratio

p : Degré de signification

PANTA – OADC : Polymixin, Amphotericin Nadilix Trimetoprim Acide Oleique Dextrose Catalase

Pb : Paire de Base

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaine)

pH: Potentiel d'Hydrogène

PNT : Programme National de lutte contre la Tuberculose

SIDA : Syndrome de l'Immuno Deficience Acquise

Taq : *Thermus aquaticus*, bactérie de laquelle est extraite l'ADN polymérase

TB: Tuberculose

TBE : Tris Acide Borique Ethylène Diamine Tétra Acétate

UCAD : Université Cheikh Anta Diop

V : Volt

VIH : Virus de l'Immuno déficience Humaine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Amorces et gènes ciblés pour le Genus typing	14
Tableau II : Régions de délétion et amorces impliquées pour Deletion typing ...	15
Tableau III : Récapitulatif des activités de terrain réalisées entre Juin et Septembre 2012	17
Tableau IV : Répartition des cas de toux de plus de 15 jours au niveau des centres de santé en fonction de l'âge, du sexe, et des catégories socio professionnelles....	18
Tableau V : Répartition des cas de suspicion de la tuberculose bovine en fonction de l'âge, du sexe, de la race de l'animal et du type de saisie.....	18

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Appareil pour visualisation et électrophorèse des résultats PCR	16
Figure 2 : Amplification de l'ADN des mycobactéries	19

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
Cadre de l'étude	3
Première partie : Etude bibliographique	4
I .Importance de la tuberculose	4
I.1- Dans le monde	4
I.2. En Afrique.....	5
I.3. Au Tchad	5
II. Généralités sur la tuberculose.....	6
II.1. Définition.....	6
II.2. Caractéristiques physico-chimique des mycobactéries	6
II.3. Taxonomie	6
II.4. Rôle des mycobactéries atypiques dans l'infection tuberculeuse	7
II.5. Mode de transmission.....	7
II.6. Pathogénie de la tuberculose et réaction de l'organisme	7
II.7. Étapes de l'infection.....	8
a. Primo infection.....	8
b. Tuberculose maladie	8
II.8. Développement d'une immunité	8
a. Immunité cellulaire	8
b. Développement de l'hypersensibilité de type IV.....	9
c. Apparition des anticorps.....	9
II.9. Symptômes	9
II.10. Lésions.....	9
II.11. Diagnostic	10
II.12. Résistance aux antibiotiques	10
Deuxième partie : Etude expérimentale	11
I. Matériel et Méthodes	11
1. Matériel	11
a. Lieux de l'étude	11
b. Sujets de l'étude	11
c. Matériel de prélèvement et d'analyse de laboratoire	11

d. Taille des échantillons.....	12
e. Matériel biologique.....	12
2. Méthodes	12
a. Diagnostic <i>ante mortem</i>	12
b. Diagnostic <i>post mortem</i>	12
c. Traitement des échantillons et analyses de laboratoire	13
d. Diagnostic moléculaire.....	14
e. Saisie de données et analyse statistique.....	16
II. Résultats et Discussion.....	17
II. 1. Résultats	17
II.1.1. Mise en place d'un réseau de collecte des données	17
II.1.2. Données collectées sur le terrain.....	17
II.1.3. Données de laboratoire.....	19
II.2. Discussion	21
II.2.1. Discussion de la méthodologie.....	21
II.2.2. Discussion des Résultats	21
Conclusion et recommandations	23
Références bibliographiques	25
Annexes	28

RESUME:

Cette étude a pour objectif de mettre en évidence le caractère zoonotique de la tuberculose dans la partie sud et ouest du Tchad. Ainsi, elle a été menée sur 478 patients ayant une toux de plus de quinze jours, parmi lesquels il ya 329 hommes et 147 femmes repartis dans six classes d'âge et analysés en fonction de huit catégories socio professionnelles dans 9 centres de santé. Chez l'animal, 332 carcasses (et abats) ont été suspectés de tuberculose bovine dans 8 abattoirs et provenaient essentiellement de 234 bovins de race Arabe, 91 de race Mbororo, 1 de race Bogolodjé et 1 d'une race indéterminée. Les petits ruminants étaient au nombre de 5. Cent quinze (115) carcasses étaient issues des animaux mâles et 217 des femelles. Les cas de saisies étaient majoritaires dans la tranche d'âge allant de 3 à 12 ans avec 25 cas de saisie totale et 307 cas de saisie partielle. Les diagnostics bactériologique et moléculaire ont été réalisés à partir des échantillons de crachat et de tissus collectés sur les carcasses. Le diagnostic bactériologique a permis d'isoler chez l'homme 83 souches de mycobactéries à partir des crachats et le diagnostic moléculaire de ces souches a montré une fréquence élevée de *Mycobacterium tuberculosis* (45/83souches). *Mycobacterium avium* a été isolé en association avec *Mycobacterium bovis* chez un patient. Les agriculteurs et les ouvriers étaient les plus touchés dans la tranche d'âge de 16 à 60 ans. Le sexe ($p=0,03$, OR=3,3 ; IC OR 95% : 1,071- 10,333) est fortement associé à la positivité chez les hommes au Complexe *M. tuberculosis* par Amplification en Chaîne par Polymérisation (ACP). Les autres variables âge, catégories socio professionnelles n'ont montré aucune association avec la positivité à l'ACP. Il a été constaté que sur les carcasses suspectées, principalement des souches *M. bovis* (42 souches) ont été isolées. Un cas d'infection lié au *M. tuberculosis* a été mis en évidence sur une carcasse bovine. Le sexe a influencé sur l'infection chez les animaux ($p=0,04$, OR=1,7 ; IC OR 95% : 1,039 – 3,089). Le rôle des infections dues aux mycobactéries non tuberculeuses a été aussi démontré avec l'isolement de 24 souches (5%) chez l'homme et 10 (3%) souches chez l'animal.

Au vu des ces résultats, nous suggérons qu'une étude relative au test de sensibilité des souches isolées aux anti tuberculeux usuels en collaboration avec les structures impliquées dans la lutte puisse être envisagée pour une meilleure prise en charge.

Mots clés : Tchad, Mycobactéries, Tuberculose, zoonose.

ABSTRACT:

The main objective of our study is to highlight the zoonotic nature of the disease in the south and west of Chad. We conducted our study on 478 patients having a cough more than 15 days among 329 men and 147 women distributed into six age groups and analyzed by eight socio professional category in 9 health centers and on 332 animals suspected as TB cases at 8 abattoirs with 234 bovine of Arabe breed, 91 Mbororo breed, 1 bogolodjé breed, 1 indetermined breed and 5 small ruminants. One hundred fifteen (115) were males and two hundred seventeen (217) were females. We conducted bacteriological and molecular diagnosis on sputum from patients and tissues from carcasses. Thus, 83 mycobacterial strains were isolated from human with high rate of *Mycobacterium tuberculosis* (45/83 strains). *Mycobacterium avium* was also isolated from a patient in association with *Mycobacterium bovis*. Farmers and workmen were more infected age group ranged from 16 to 60. The sex ($p=0,03$, OR=3, 3; IC OR 95%: 1,071- 10,333) is strongly associated to the positivity in humans to Complex *M. tuberculosis* by Polymerase Chain Reaction. Others variables age, socio professional categories didn't show any association to the positivity by PCR. From animal samples, mainly *M. bovis* strains were isolated (42 strains). *M. tuberculosis* was isolated from one bovine carcass. Sex has influenced infection in animals ($p=0,04$, OR=1,7 IC OR 95% : 1,039- 3,089). The role of non-tuberculous mycobacteria with the isolation of 24 strains (5%) in human and 10 strains (3%) animal infections was also highlighted.

With these results, we propose a study of drug resistance of strains isolated must be considered with different collaborators for a best strategy of fight.

Key Words: Chad, Mycobacteria, Tuberculosis, zoonosis.

INTRODUCTION

En Afrique Subsaharienne, l'élevage joue un rôle non négligeable dans l'économie des pays sahéliens et fait vivre une partie importante de la population rurale. Dans le sahel, l'élevage des petits ruminants, des bovins et plus récemment des camelins se pratique de façon extensive et ne dépend que du pâturage naturel. La disponibilité ou l'abondance de ce dernier est liée à la pluviométrie annuelle obligeant ainsi les éleveurs et leurs bétails à un mouvement de transhumance des régions plus arides vers les régions humides. De plus, eu égard au réchauffement de la planète terrestre qui s'est traduit par la dégradation de la plupart des écosystèmes, dans la zone sahélienne d'Afrique, de nombreuses populations rurales (agriculteurs et éleveurs) soumises à la forte pression de l'avancée du désert, migrent progressivement vers les zones les plus humides pour y trouver des conditions favorables à leurs activités, se trouvant ainsi dans un nouvel environnement qui échappe totalement aux structures de santé publique et vétérinaire en termes de surveillance épidémiologique des zoonoses. C'est le cas de la tuberculose de plus en plus suspectée dans les abattoirs et chez les patients au niveau des centres de santé (Schelling et *al.*, 2000 ; Diguimbaye, 2004 ; Ngandolo et *al.*, 2009). Elle constitue un problème majeur de santé publique. La tuberculose causée par *Mycobacterium bovis* (souche bovine) est sous investiguée chez l'homme et la nature des souches circulantes du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* sont très peu connues au Tchad. En effet, la tuberculose fait partie des maladies surveillées par la Direction des Services Vétérinaires du Tchad et l'un des objectifs du Ministère de la Santé Publique du Tchad est de réduire son incidence au sein de la population humaine d'ici à l'an 2020. Les études microbiologiques sur la tuberculose au Tchad ont commencé depuis les années 2000 mais ces études n'ont pas pu mettre en évidence *Mycobacterium bovis* chez l'Homme ni *Mycobacterium tuberculosis* (souche humaine) chez l'animal. La présente étude se fixe comme objectif principal de mettre en évidence le caractère zoonotique de la tuberculose par la caractérisation moléculaire des souches responsables de l'infection chez ces deux hôtes avec l'hypothèse d'une inter transmission.

De façon spécifique, il s'agit de :

- D'identifier les souches de mycobactéries du Complexe *M. tuberculosis* chez les petits ruminants, les bovins, le dromadaire et l'Homme,
- D'identifier la souche *M. bovis* chez les petits ruminants, les bovins, le dromadaire et l'Homme,
- Déterminer la fréquence des mycobactéries non tuberculeuses responsables des lésions suspectées tuberculeuses au niveau des abattoirs,
- Déterminer la fréquence des mycobactéries non tuberculeuses responsables des cas de toux de plus de 15 jours suspectées tuberculeuses au niveau des centres de Santé.

- Démontrer le rôle des nouveaux outils et moyens de communication dans la réussite d'un système de surveillance.

Pour ce faire, une première partie est consacrée à la synthèse bibliographique sur la tuberculose. La deuxième partie est consacrée à la méthodologie utilisée pour obtenir les résultats suivis de la discussion et des recommandations à l'endroit des différents acteurs impliqués dans la lutte de la tuberculose.

CADRE DE L'ETUDE

Le Tchad est un vaste pays sahélien enclavé situé au cœur de l'Afrique, avec une superficie de 1.284.000 Km². Il s'étend entre le 7^e et le 24^e degré de la latitude Nord, le 13^e et le 24^e degré de la longitude Est. Sa population est estimée à 11 274 106 d'habitants (recensement général de l'année 2009). Il est limité au nord par la Libye, au sud par la République Centrafricaine (RCA), à l'est par le Soudan et à l'ouest par le Niger, le Nigeria et le Cameroun. Avec 23 régions, la population rurale représente 70% et s'occupe principalement de l'agriculture et de l'élevage. Les données statistiques relatives au cheptel tchadien montrent qu'il y a au Tchad environ 8 millions de bovins, 7 millions de petits ruminants et 2 millions de camelins (MERA, 2005). Le système de production dominant est l'élevage transhumant où environ 75% du bétail tchadien est concerné par ce système. Cependant, l'élevage sédentaire se pratique dans les zones agricoles. Dans le milieu rural et urbain, la consommation de la viande constitue une source d'alimentation importante pour la population. Le réseau hydrographique tchadien est constitué de deux fleuves : le Chari et le Logone où six autres lacs s'y ajoutent. Il y a trois zones climatiques au Tchad : le désert au nord avec les précipitations annuelles inférieures à 200 mm où la population est majoritairement nomade avec des troupeaux des dromadaires et petits ruminants ; la zone sahélienne située au centre est constituée de la steppe et de la savane reçoit 200 à 600 mm de précipitation, est une zone d'élevage. Le sud, constitué de forêts tropicales où les précipitations atteignent 1200 mm, les animaux y séjournent pendant la saison sèche en quête du pâturage issu de la végétation naturelle pendant la transhumance. La viande bouchère est consommée dans les grandes villes tchadiennes provenant des ces animaux et cela poussent les pasteurs nomades à camper autour de ces villes pour l'approvisionnement de ces dernières en viande. La consommation de la viande et du lait provenant des animaux infectés par la tuberculose peut être à l'origine de la contamination humaine étant donné qu'elle est transmissible entre l'homme et l'animal.

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- Importance de la tuberculose

I.1. Dans le monde

La tuberculose est une maladie zoonotique infectieuse, contagieuse d'évolution lente due aux mycobactéries appartenant au Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) qui comprend *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. tuberculosis* (Brosch et al., 2002, Aranaz et al., 2003). Elle touche principalement l'Homme, les ruminants domestiques et sauvages à l'exemple des carnivores sauvages (Cleaveland, 2005). Elle s'est largement répandue dans le monde et constitue un fléau en progression dans les pays en développement en raison de la poussée démographique, de l'épidémie du VIH/SIDA, du manque de structure de diagnostic efficaces et de la migration humaine (Chaulet, 2009). L'agent responsable de la maladie chez l'Homme (*M. tuberculosis*) a été identifié en 1882 par Robert Koch. Le vaccin issu de la souche vivante atténuée de *M. bovis* mis au point par Albert Calmette et Camille Guérin en 1921 est devenu obligatoire et largement utilisé de nos jours pour prévenir la tuberculose chez les humains. Charles Mantoux a mis au point durant la même année, le test qui porte son nom et qui est utilisé de nos jours pour dépister la tuberculose chez l'Homme.

Concernant la santé animale, la tuberculose à *M. bovis* est peu fréquente de nos jours, dans les pays industrialisés mais, répandue dans les pays en voie de développement en raison du manque des mesures de contrôle (tuberculination, abattage systématique des animaux infectés et pasteurisation du lait). A cela s'ajoutent les mauvaises pratiques d'élevage (points d'eau communs, mouvement d'animaux d'un élevage à un autre sans mesure de prévention), le manque de programme d'éradication de la maladie (manque de pérennité des systèmes de surveillance de la maladie) dans les services vétérinaires de ces pays. Son aspect zoonotique est toujours considéré comme une priorité dans le monde, même si la tuberculose bovine est presque éradiquée dans de nombreux pays d'Europe (Ngandolo et al., 2009). Probablement introduite en Afrique durant la période coloniale (Müller et al., 2008), elle constitue un risque pour la santé publique car sur 55 pays d'Afrique, 25 rapportent des cas de tuberculose bovine sporadique. Elle est endémique dans six (6) pays. De tous ces pays africains, 7 seulement appliquent des mesures de contrôle régulier, mais le reste fait des contrôles partiels ou pas du tout (Dubois, 2002). Cependant, des cas de contamination du bétail par une source humaine ont été signalés en milieu pastoral en Ethiopie (Balako et al., 2012).

En santé publique, la tuberculose constitue une importante cause de mortalité dans la population adulte car un tiers de la population de la planète est infecté par la tuberculose (environ 2 milliards d'individus) sauf que les sujets malades ne font pas nécessairement la maladie (OMS, 2012). La mortalité annuelle liée à cette pathologie est de l'ordre de 1,4 million en 2012 (OMS, 2012). Plus de 95% des décès se produisent dans les pays pauvres. Son incidence dans le monde a été évaluée à 8,8 millions en 2010 où le plus grand nombre de nouveaux cas a été enregistré en Asie, avec 60% des nouveaux cas à l'échelle mondiale.

L'Afrique subsaharienne compte 270 nouveaux cas pour 100 000 habitants en 2010 (**OMS, 2012**). Vingt deux pays hébergent plus de 80% de nouveaux cas de tuberculose dont 11 pays d'Asie (dont l'Inde et la Chine), 9 pays d'Afrique (dont l'Afrique du Sud, le Nigeria, l'Ethiopie, la République Démocratique du Congo), 1 pays d'Europe (la Russie) et 1 pays d'Amérique latine (le Brésil) (**OMS, 2012**). Parmi ces pays, la lutte contre la tuberculose a reçu une attention particulière depuis l'an 2000.

I.2. En Afrique

Comme on peut le constater, la tuberculose demeure un problème majeur de santé publique humaine et vétérinaire à travers le monde et en Afrique, surtout au sud du Sahara. La majorité des cas de maladies et des décès surviennent dans les pays en développement notamment sur le continent africain. Elle constitue l'une des premières causes des saisies dans les abattoirs africains, en grande partie alimentés par des bovins issus des élevages transhumants (**Delafosse, 1995**). Elle est aussi considérée comme un fléau majeur pour l'élevage des bovins et chez l'Homme en Afrique (**Ayele et al., 2004**). Trois complexes clonaux du *M. bovis* sont identifiés et appelés respectivement African 1 (Af1), trouvé en Afrique du Centre et de l'Ouest (Mali, Cameroun, Tchad et Nigeria, **Müller et al., 2009**), African 2 (Af2) identifié en Ouganda, Burundi, Tanzanie et Ethiopie, (**Berg et al., 2010**), et Europe 1 (Eu1) largement répandu en Nouvelle Zélande, Corée et Afrique du Sud (**Smith, 2012**). Cette répartition géographique pourrait s'expliquer par les mouvements des animaux d'un pays à un autre et la migration des populations dans ces différents pays. En effet, le *M. bovis* du Complexe Af 1 a été isolé chez deux patientes d'origine tchadienne, (Une fille et sa mère) à l'Hôpital de l'Université de Montpellier (**Godreuil et al., 2010**). Au Nigeria des cas d'inter contaminations ont été signalés chez l'Homme et l'animal (**Jenkins et al., 2011**). Ces informations démontrent l'importance du caractère zoonotique de la tuberculose en Afrique Subsaharienne, il est donc nécessaire de mettre sur pied une organisation pluridisciplinaire dans le cadre du concept "**One Health**".

I.3. Au Tchad

Le Tchad présente une forte endémicité tuberculeuse (**OMS, 2012**). La surveillance de la tuberculose humaine est exclusivement assurée par le Programme National de Lutte contre la tuberculose (PNT) qui, de nos jours limite ses activités à la notification des cas, leur prise en charge, la gratuité des examens nécessaires au diagnostic de la tuberculose. Malgré cet effort, l'incidence de la maladie a été estimée à 299 nouveaux cas pour 100 000 habitants en 2009 (**PNT, 2010**). Par ailleurs, la surveillance de la tuberculose animale quant à elle, n'est inscrite que dans le cadre du contrôle et d'hygiène de la viande de boucherie.

L'étude sur la tuberculose bovine a commencé avec les travaux de **Perpezat et al., 1963** qui ont confirmé les pathologies animales dues à *M. farcinogenes* plutôt qu' à *M. bovis*. Plus tard des études ont été réalisées à l'Est, Centre et Sud du pays (**Maho et al., 1997 ; Maho et al., 1999**), **Schelling et al., 2000**, **Ngandolo et al., 2009** et ceux-ci ont prouvé l'existence de la tuberculose bovine au Tchad en travaillant sur des lésions suspectées tuberculeuses par la

technique de coloration de Ziehl Neelsen et par l'intradermo tuberculination. En utilisant l'intradermo tuberculination comparative, **Delafosse et al., 2002** ont pu montrer l'importance des mycobactéries non tuberculeuses dans l'infection tuberculeuse. Ces différentes études réalisées au Tchad chez les bovins ont montré la susceptibilité de la race bovine Mbororo à la tuberculose par rapport à la race Arabe (deux races bovines dominantes au Tchad).

En santé publique, les travaux de **Diguimbaye (2004)** et **Diguimbaye et al., (2006a)**, ont permis de mettre en évidence les souches du Complexe *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M.bovis*) dans le pays.

II. Généralités sur la tuberculose

Les zoonoses bactériennes constituent le groupe le plus important des maladies transmises entre l'homme, les animaux domestiques et la faune sauvage. La tuberculose fait partie des infections bactériennes à caractère zoonotique. Elle a été décrite chez ces trois groupes d'hôtes et son impact négatif sur l'économie et la santé des populations des pays en voie de développement. Ceci interpelle de nos jours toutes les compétences en matière de recherche scientifique à la croisée de la vie humaine, des animaux domestiques et sauvages.

II.1. Définition

La tuberculose est une maladie infectieuse, contagieuse, virulente, d'évolution chronique dont les agents étiologiques sont des mycobactéries du Complexe *M. tuberculosis*.

II.2. Caractéristiques physico-chimiques des mycobactéries

Les mycobactéries du Complexe *M. tuberculosis* et les mycobactéries non tuberculeuses (MNT), appelées aussi Mycobactéries atypiques sont des bacilles qui, une fois colorés par la Fuchsine phéniquée résistent à la décoloration par l'alcool - acide et sont de ce fait dits « Bacilles Acido-Alcool Résistants ». Leur paroi est très riche en lipides et constituent une barrière hydrophobe, empêchant l'action décolorante des acides et des alcools. Ils sont également responsables de la résistance des mycobactéries à certains agents chimiques. Ces bactéries sont aérobies à multiplication lente (toutes les 20 heures).

II.3. Taxonomie

L'unique genre de la famille des Mycobacteriaceae est le genre *Mycobacterium* qui comprend 85 espèces connues dont de nombreuses espèces saprophytes ou commensales.

Les mycobactéries appartiennent à la classe des Corynebacterinae, à l'ordre des Actinomycétales (**Rastogi et al., 2001**). Le complexe *M. tuberculosis* regroupe, *M.tuberculosis* (Homme), *M.bovis* (bovins), *M.africanum* (africains de l'Afrique de l'ouest), *M. canetti* (en particulier en Djibouti), *M. microti* (rongeurs), *M.caprae* (chèvres), *M.pinnipedii* (mammifères marins), *M.bovis* BCG (souche atténuée de *M.bovis*) décrit par Calmette et Guérin. Ce genre comprend les mycobactéries tuberculeuses et non tuberculeuses

II.4. Rôle des mycobactéries atypiques dans l'infection tuberculeuse

Les mycobactéries non tuberculeuses (MNT), sont à l'origine des mêmes signes cliniques que ceux causés par les mycobactéries tuberculeuses chez l'Homme et l'animal. Elles peuvent être à l'origine de la faible spécificité de nombreuses épreuves de diagnostic, source des cas "**faux positifs**" ou "**faux négatifs**". Elles sont présentes dans l'environnement et isolées habituellement de sources d'eau stagnantes naturelles ou à l'intérieur des domiciles. Elles représentent entre 70 et 90% des cas des mycobactérioses où les plus fréquentes dans les maladies pulmonaires chez l'homme sont : Le Complexe *Mycobacterium avium* (environ 80 %), *M fortuitum*, *M abscessus*, *M chelonae* environ 10 %, *Mycobacterium xenopi* (environ 5 %), *Mycobacterium kansasii* (environ 5 %).

Des travaux récents réalisés chez l'Homme et l'animal au Tchad à partir des spécimens suspectés de tuberculeux dans les centres de Santé et à l'abattoir de N'Djamena ont pu mettre en évidence les mycobactéries atypiques (**Diguimbaye et al., 2006b**).

II.5. Mode de transmission de la tuberculose

Les principales voies de contamination de la tuberculose sont l'inhalation et l'ingestion. L'agent responsable de la maladie chez les animaux est dans la majorité des cas *M. bovis*. Sa pénétration dans l'organisme animal peut se faire par contact direct entre l'animal malade et ceux étant en bonne santé. Les animaux infectés exhale les bactéries en respirant, en toussant ou en éternuant (**Dubois, 2002**). Ils risquent ainsi de s'infecter mutuellement lorsqu'ils partagent la même aire d'abreuvement et d'alimentation, mais surtout de transmettre cette zoonose à des personnes à risque tels que les enfants bouviers et le personnel vétérinaire.

Chez l'Homme, l'infection tuberculeuse est due généralement à *M. tuberculosis*. Ce dernier est transmis d'une personne à une autre par l'inhalation ou l'ingestion de gouttelettes issues des sécrétions bronchiques provenant du sujet malade ou par ingestion de lait ou de viande contaminé. Le risque de contamination dépend de la concentration de ces mycobactéries dans l'air ambiant, de leur virulence, de la durée d'exposition et de la réceptivité individuelle de la personne en contact. Les mycobactéries peuvent donner des aérosols en laboratoire et lors d'autopsies (**Dubois, 2002**).

La transmission peut se faire de l'homme à l'animal et vice versa. La faune sauvage constitue aussi un réservoir potentiel pour ces deux hôtes. Toutefois, lorsqu'une espèce du complexe *M. tuberculosis* est transmise à un hôte, elle devient pathogène pour ce dernier.

II.6. Pathogénie de la tuberculose et réaction de l'organisme

Les différentes mycobactéries responsables de la tuberculose chez les mammifères sont plus ou moins pathogènes. Cette différence de pathogénicité varie avec l'espèce. Les matières virulentes sont essentiellement la salive, les fines gouttelettes rejetées lors de la toux et des expectorations (**Dubois, 2002**). Les bacilles peu pathogènes provoquent l'apparition des lésions folliculaires, alors que les bacilles très virulents induisent des lésions exsudatives.

Après pénétration, les bacilles parviennent au niveau des alvéoles pulmonaires, ils sont phagocytés dans des macrophages alvéolaires où ils se multiplient. Une fois dans le macrophage, le bacille est digéré par les enzymes. La défense cellulaire est complétée par une défense immune impliquant les lymphocytes T qui vont interagir par l'intermédiaire de leurs récepteurs avec les antigènes du bacille. Cette réaction limite la multiplication des bacilles en empêchant le développement de la maladie, lorsque ce n'est pas le cas, l'individu infecté évolue par la tuberculose maladie (**Dubois, 2002**).

II.7. Etapes de l'infection

Lors d'une infection, il existe deux phases à savoir la primo-infection et l'apparition de la tuberculose-maladie (**Dubois, 2002**).

a- Primo-infection

La primo-infection tuberculeuse correspond au premier contact de l'organisme avec la bactérie. Dans les conditions biologiques normales, les défenses immunitaires agissent et le bacille est détruit. Dans 9 cas sur 10, la primo-infection tuberculeuse évolue spontanément vers la guérison définitive.

b- Tuberculose maladie

Elle intervient après une primo-infection tuberculeuse lorsque la défense immunitaire est inefficace. La bactérie peut alors atteindre de nombreux organes (poumon, rein, os, le foie, la mamelle etc.). La forme extra-pulmonaire de la tuberculose est fréquente chez les animaux. Cependant, chez les humains, elle a été constatée chez des patients séropositifs.

Dans les deux cas, la pénétration de l'agent infectieux dans l'organisme est préalablement à l'origine d'une réaction immunitaire.

II.8. Développement d'une immunité

a- Immunité cellulaire

Elle est un mécanisme de défense qui permet au sujet infecté de ne pas développer la maladie en bloquant ainsi le processus de multiplication du germe par la mobilisation des lymphocytes T (**Pritchard, 1988**). Dans le cas contraire, une tuberculose maladie pourrait bien s'installer. Cela démontre l'importance de la réponse immunitaire à médiation cellulaire dans l'infection tuberculeuse. Cependant, après pénétration du *Mycobacterium* dans l'organisme, il y a des manifestations inflammatoires locales déterminant une hypersensibilité retardée.

b-Développement de l'hypersensibilité de type IV

C'est l'ensemble des manifestations locales induites par une pénétration du *Mycobacterium* dans un organisme (primo-infection) et donc le début n'apparaît qu'à la 12^{ème} heure et atteignant un maximum entre 48 – 72 heures. L'hypersensibilité retardée peut être révélée chez le bovin par injection d'extrait bacillaires (tuberculine). Chez l'Homme elle est mise en évidence par l'Intradermo réaction ou test de Mantoux qui consiste à injecter sous l'épiderme, une dose d'antigènes permettant de visualiser la présence ou l'absence d'une réaction allergique (taille de la papule) après 48 à 72 heures (**Dubois, 2002**). Ce test n'est cependant pas très sensible, en particulier chez les patients immunodéprimés.

c- Apparition des anticorps

L'infection tuberculeuse induit exclusivement le développement d'une immunité cellulaire, représentée essentiellement par les lymphocytes T qui est ensuite complétée par la défense humorale, pour détruire ou inhiber les bacilles tuberculeux. Les antigènes des bacilles après la phagocytose provoquent l'activation de lymphocytes non spécifiques qui deviennent des lymphocytes spécifiques CD4 et CD8, support de l'immunité en tuberculose. Chez l'animal, les anticorps anti *M.bovis* interviennent plus tardivement après l'hypersensibilité retardée (**Ngandolo et al., 2009**).

II.9. Symptômes

Les signes spécifiques de la tuberculose pulmonaire chez l'Homme sont la toux prolongée pendant plus de 15 jours, les hémoptysies (parfois) et les douleurs thoraciques. Ils sont habituellement associés à un ensemble de signes généraux non spécifiques (amaigrissement en quelques mois, anorexie, fatigue, fièvre vespérale : 38 à 38,5 ° C, et des sueurs nocturnes). Cependant chez le bovin, la maladie a une incubation plus longue (6 semaines à 2 ans, voire plus) avec une évolution chronique et dans la plupart des cas, les symptômes de la maladie restent longtemps inaperçus et l'animal tuberculeux conserve toutes les apparences d'une santé parfaite. C'est pourquoi plus de 9 fois sur 10, la tuberculose bovine est découverte à l'abattoir grâce à des lésions qui peuvent prendre un aspect variable et se trouver dans différents organes. L'animal a une toux fréquente avec une température élevée (jusqu'à 41°C), la perte de l'appétit, l'amaigrissement (**Dubois, 2002**).

II.10. Lésions

Deux types de lésions peuvent être différenciés, les lésions granulomateuses simples sans nécrose et celles avec nécrose. Les lésions localisées et bien délimitées sont des tubercules et celles étendues et mal délimitées sont des infiltrations et des épanchements tuberculeux (**Dubois, 2002**).

II.11. Diagnostic

Chez l'Homme, la radiographie thoracique, la recherche des BAAR dans les expectorations (crachat et autres liquides) par la méthode de coloration de Zhiel Neelsen (**Ehrlich, 1882**) puis de la microscopie sous immersion à l'objectif x100 suivi du diagnostic moléculaire, le test tuberculinique par Intra Dermo Réaction (IDR) à la tuberculine (test de Mantoux) sont les trois voies explorées par le médecin pour confirmer les cas suspects. Les méthodes d'analyses bactériologique et moléculaire nécessitent du temps (plusieurs semaines) ainsi qu'une infrastructure de qualité. Chez les bovins, la tuberculose est habituellement diagnostiquée chez l'animal vivant par Intra dermo tuberculation simple ou comparative. Comme le bétail infecté reste longtemps infectieux avant qu'il n'expose certains signes cliniques où des lésions typiques de la maladie, la carcasse de l'animal abattu nécessite une inspection *post mortem* supplémentaire des ganglions lymphatiques, des articulations, des os et des méninges. L'isolement par culture bactérienne et l'identification par PCR restent le diagnostic définitif et de référence pour confirmer l'infection (**De Lisle et al., 2002**).

II.12. Résistance aux antibiotiques

La complexité des mycobactéries responsables des infections tuberculeuses est à l'origine de l'utilisation d'une combinaison de plusieurs molécules dans le traitement de la tuberculose. Cependant, plusieurs facteurs sont à l'origine des cas d'échec de traitement de la maladie chez l'homme eu égard à la circulation des souches dites résistantes dans le monde qui résultent dans la plupart des cas au non respect des régimes de traitement. Ainsi, la multi résistance des souches *M. tuberculosis* aux antituberculeux de première et seconde ligne, (isoniazide, éthionamide, ethambutol, D-cyclosérine, rifamycines, fluoroquinolones, streptomycine, linezolid et pyrazinamide) constitue un sérieux problème au contrôle de la maladie au niveau mondial (**Riccardi et al., 2009**). Il en est de même, de la résurgence des cas de résistance des souches de *M. bovis* aux antituberculeux de première ligne de plus en plus identifiés dans le monde eu égard aux fréquences élevées des cas de voyages dans le monde (**Long et al., 1999**). Cependant, chez l'animal, le traitement de la tuberculose est une opération hasardeuse et dangereuse qui doit être proscrite car l'animal tuberculeux doit être éliminé dans le plus bref délai, ce qui explique la rareté de la recherche sur la résistance des souches tuberculeuses chez l'animal. Toutefois, il a été signalé que l'une des caractéristiques de *M. bovis* est la résistance à la pyrazinamide (**Long et al., 1999**).

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

I- Matériel et Méthodes.

1- Matériel

a- Lieux de l'étude :

Les données ont été collectées sur les îles du Lac Tchad et au sud du pays principalement à Sarh, Koumra, Doba, Bebedja, Moundou, Kelo, Bongor et Guelendeng (annexe 1, page 28). La collecte de données a été réalisée entre juin et septembre 2012 au niveau des abattoirs et des centres de santé. Les activités de diagnostic bactériologique et moléculaire ont été réalisées à l'Institut de Recherches en Élevage pour le Développement (IREED) à N'Djamena.

b- Sujets de l'étude

- *Les patients*

Il s'agit de tous les cas suspectés d'une toux de plus de 15 jours par un responsable de centre de santé. Sur le patient, les informations relatives à la suspicion de la tuberculose ainsi que les paramètres socio démographiques tels que le sexe, l'âge, la profession etc. ont été enregistrés sur une fiche d'enquête (annexe 2). Les cas de tuberculose extra -pulmonaire constatés par un responsable de centre de santé font aussi partie des sujets enrôlés dans l'étude.

- *Les animaux*

Il s'agit des ruminants (bovin, caprin et ovin) arrivés aux abattoirs et dont les carcasses et abats ont été inspectés et suspectés de tuberculose. Pour chaque espèce abattue, les paramètres socio démographiques ont été enregistrés sur des fiches d'enquête.

c- Matériel de prélèvement et d'analyse de laboratoire

Il est constitué des flacons et tubes de prélèvement, des glacières, des carboglaces. Le matériel du laboratoire se distingue en petit matériel constitué des pipettes, des sachets stériles pour le broyage, des tubes de culture, bécher etc. de milieux de culture (Middle brook 7H9, Loewenstein Jensen), de la solution tampon, des réactifs (Master mix, amorces etc.) puis celui du gros matériel (hotte de sécurité biologique, centrifugeuse, thermocycleur, appareil pour l'électrophorèse et d'un ordinateur muni d'une camera pour les images.

d- Taille des échantillons

Le calcul des tailles des échantillons humain et animal s'est fait respectivement sur la base des prévalences apparentes de 11,2% (**Diguimbaye, 2004**) et de 14% (**Ngandolo et al., 2009**) en utilisant le logiciel OpenEpi *version 2.3*. Le nombre des animaux à échantillonner a été de 729 têtes et celui des humains de 603 pour une marge de confiance de 99.99%. Eu égard à l'importance de la part des mycobactéries non tuberculeuses dans les infections suspectées aussi bien à l'abattoir qu'au niveau des centres de santé d'une part, ainsi que de la faible sensibilité de la bacilloscopie puis celle de la technique d'inspection *post mortem* d'autre part (**Ngandolo et al., 2009, Diguimbaye et al., 2006b**), il convient de minimiser le risque d'erreur en augmentant la taille de l'échantillon à effectuer. Ainsi donc ce dernier a été estimé à 0,01.

e- Matériel biologique

Le matériel biologique collecté sur chaque patient est constitué d'un échantillon de 5 ml de crachat sur un volume de 5 ml de CPC conservé à la température de la salle jusqu'à acheminement à l'IREC.

Sur les carcasses et abats saisis au niveau des abattoirs, environ 50 à 100 g de chaque lésion évocatrice de la tuberculose a été collectée et conservée sous glace (4°C) jusqu'à acheminement à l'IREC.

2- Méthodes

a- Diagnostic ante - mortem

Il a consisté d'abord à une appréciation visuelle de l'état d'embonpoint de chaque animal entrant dans la chaîne du système d'abattage au niveau de l'abattoir ou de l'aire d'abattage, par un agent vétérinaire qualifié. Trois niveaux d'appréciation de l'état d'embonpoint des animaux ont été établis en bon, moyen et mauvais (annexe 3). L'examen clinique a concerné tous les animaux suspectés (mauvais état général) par l'agent vétérinaire en palpant les ganglions inguinaux et près capillaires. L'hypertrophie d'un de ces ganglions renforce la suspicion et le numéro d'abattage de l'animal concerné est bien suivi. Pour ce faire, trois niveaux d'hypertrophie ganglionnaire ont été aussi établis en normal, hypertrophie moyenne et très hypertrophié. D'autres infections susceptibles de provoquer une réaction ganglionnaire similaire ont été aussi signalées.

b- Diagnostic post - mortem

L'inspection *post - mortem* a été réalisée sur les carcasses et les différents organes (poumons, foie, rate, mamelles...) conformément au guide de bonnes pratiques d'inspection des viandes rouges au Tchad (**MERA, 2009**). La suspicion des cas est préalablement basée sur la détermination de la couleur de la lésion (jaune pour les infections bactériennes) et la définition de la forme de la tuberculose bovine suspectée (tuberculose milliaire, caséuse et intestinale).

L'exploration des différents types de ganglions impliqués dans la défense de l'organisme lors d'une infection tuberculeuse se fait selon la topographie suivante :

- Au niveau de la tête (ganglion lymphatique sous maxillaire, ganglion lymphatique retro pharyngien et Ganglion lymphatique parotidien)
- Sur la carcasse (ganglion lymphatique pré scapulaire, ganglion lymphatique brachial (les ganglions de l'épaule), ganglion lymphatique pré crural (les ganglions de la cuisse), ganglion lymphatique poplité, ganglion lymphatique ischiatique)
- Au niveau du poumon (ganglion lymphatique tracheo bronchique droit, ganglion lymphatique tracheo bronchique gauche, ganglion lymphatique tracheo bronchique apical, Ganglions lymphatiques mediastinaux,)
- Au niveau du foie (ganglion lymphatique hépatique, ganglion lymphatique pancréatique)
- Au niveau de la rate (ganglions lymphatiques mésentériques)
- Au niveau des mamelles (ganglion lymphatique retro mammaire (Inguinal))

Le prélèvement des échantillons issus des lésions suspectées a été fait au niveau des parties ci-haut décrites et les spécimens ont été conservés dans des flacons stériles non cassables portant le numéro d'identification de l'animal (annexe 4).

c-Traitement des échantillons et analyses de laboratoire

Les lésions collectées sur les carcasses ont été nettoyées à l'eau distillée stérile puis broyées à l'aide du broyeur *STOMACHER 80* de manière suivante : un morceau du tissu préalablement lavé est déposé dans une boîte de pétri en verre stérile puis découpé en petit morceau, le tout est ramené dans le sachet stérile et on y ajoute de l'eau distillée stérile, le broyage a été fait pendant une minute. Pour chaque spécimen, 10ml du broyat a été récolté et transvasé dans un tube Falcon de 50ml puis conservé au congélateur (-20°C) en attendant le processus de décontamination.

Les échantillons de crachat préalablement décontaminés au Cétyle Pyridinium Chloride (CPC), ont été lavés avec du tampon phosphate pH 6.8 en ajoutant au mélange CPC-Crachat (10 m), 30ml de tampon phosphate. Après une centrifugation de 15 min à 3500 tours/min, le surnageant est jeté et le culot est suspendu dans 2 ml d'eau distillée stérile puis homogénéisé à l'aide d'un agitateur vortex. Un volume de 0,5 ml de cette suspension a étéensemencé sur le milieu solide Loewenstein Jensen (8 ml de milieu contenant du pyruvate ou de glycérol). Un frottis est ensuite réalisé directement à partir de l'homogénat restant.

Ces milieux solides ainsiensemencés ont été incubés à 37°C pendant huit (8) semaines, et suivis une fois par semaine jusqu'à l'observation des pousses de colonies de mycobactéries.

En ce qui concerne les échantillons collectés à l'abattoir, leur processus de décontamination a été faite en utilisant de NaOH-N-acétyl L-cystéine comme décontaminant. Après homogénéisation au vortex pendant 15 minutes sous l'enceinte

de sécurité biologique. Le processus de lavage de l'homogénat s'est fait ensuite en ajoutant 30ml de tampon phosphate (pH 6.8) et après centrifugation à 15minutes à 3500tours/min, le surnageant a été jeté dans une solution d'hypochlorite de sodium. Le culot est repris dans 2ml d'eau distillée stérile et 0,5ml de la suspension a étéensemencé dans deux tubes contenant 5ml chacun de milieu liquide Middlebrook Broth 7H9 supplémenté d'antibiotique PANTA-OADC, l'un contient du pyruvate et l'autre du glycérol permettant respectivement la croissance spécifique du *M. bovis* et du *M. tuberculosis*, puis incubés à 37 °C pendant huit (8) semaines jusqu'à observation de croissance.

La présence des Bacilles Acido-Alcool Résistants (BAAR) a été confirmée après coloration des frottis réalisés à partir des colonies ou des pousses récoltées sur les cultures par la méthode de Ziehl Neelsen et l'observation au microscope optique à l'objectif X100, sous immersion. Après deux mois, toutes les cultures n'ayant pas présenté de croissance ont été éliminées du processus de recherche des membres du Complexe *M. tuberculosis*. Les colonies des bacilles collectées à partir du milieu solide (Loewenstein Jensen) issues des échantillons de crachats, ou des pousses sur le milieu liquide (7H9 Middle broth) issues des échantillons animaux ont été dénaturées à la chaleur sur un bloc chauffant (85°C pendant 30 min). Des extraits d'ADN obtenus suite à cette dénaturation ont été ensuite analysés par les différentes techniques de diagnostic moléculaire par Amplification en Chaîne par Polymérase (ACP) communément appelé PCR (de l'anglais Polymerase Chain Reaction).

d - Diagnostic moléculaire

Les techniques d'amplification en chaîne par polymérase (PCR) utilisées lors de cette étude sont le *Mycobacterium* « Genius typing » et le « Deletion typing » (Berg, 2008), utilisant le PCR multiplexe. La première technique permet d'identifier le genre *Mycobacterium* (1030pb) ainsi que les membres du Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (372pb) mais aussi les différentes espèces du Complexe *M. avium* (180pb) et *M. intracellulare* (850pb). La séquence du gène concernée est le 16S rRNA et le protocole de PCR utilisé pour la mise en évidence des segments spécifiques nécessite l'utilisation des six amorces ci-après :

Tableau I : Amorces et gènes ciblés pour le Genius typing

Gènes ciblés	Amorces	Produit PCR (pb)	Référence
16SrRNA	MycGEN-F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1030	Berg, 2008
	MycGEN-R 5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3'	1030	
	Myc AV-R 5'-ACCAGAAGACATGCGTCTTG-3'	1030 + 180	
	Myc-INT-F 5'-CCTTTAGGCGCATGTCTTTA-3'	1030 + 850	
	TB1-F 5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3'	1030 + 372	
	TB1-R 5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3'	1030 + 372	

La préparation du Master Mix (Taq polymerase, MgCl₂, dNTPs,) à utiliser pour l'amplification d'un échantillon et pour 20 échantillons ainsi que le régime d'amplification d'ADN constitué de 36 cycles est fait selon le protocole de (Berg, 2008).

La deuxième technique « Deletion Typing » permet de faire la différence entre les différentes espèces du complexe *M. tuberculosis*. En effet, les espèces membres du Complexe *M. tuberculosis* sont caractérisées par une phylogénie marquée par une adaptation de l'espèce au sein d'un hôte basé sur la perte ou la conservation des éléments spécifiques localisés sur la région appelée "Région de différence" (RD). Ainsi la mise en évidence de la perte de l'élément RD4 (446pb) indique le typage de *M. bovis* mais la présence du RD9 (396pb) prouve la caractérisation du *M. tuberculosis* qui est l'ancêtre des autres membres du Complexe. Cependant, sur un isolat où le RD9 manque et le RD10 (308pb) est présent, ce dernier est classé comme *M. africanum* (Berg, 2008).

Tableau II : Régions de délétion et amorces impliquées pour « Deletion typing »

Régions de délétion	Amorces	Produit PCR (pb)	Référence
RD 4	FlankFW 5'- CTC GTC GAA GGC CAC TAA AG - 3'	446	Berg, 2008
	FlankRev 5' - AAG GCG AAC AGA TTC AGC AT - 3'		
	InternalFW 5' - ACA CGC TGG CGA AGT ATA GC - 3'		
RD 9	FlankFW 5' - AAC ACG GTC ACG TTG TCG TG - 3'	396	
	FlankRev 5' - CAA ACC AGC AGC TGT CGT TG - 3'		
	InternalRev 5' - TTG CTT CCC CGG TTC GTC TG - 3'		
RD 10	FlankFW 5' - CTG CAA CCA TCC GGT ACA C - 3'	308	
	FlankRev 5' - GAA GCG CTA CAT CGC CAA G - 3'		
	InternalRev 5' - GAA GTC GTA ACT CAC CGG GA - 3'		

La préparation du Master Mix à utiliser pour l'amplification d'un échantillon et pour 20 échantillons ainsi que le régime d'amplification d'ADN constitué de 36 cycles est fait selon le protocole de (Berg, 2008)

- Migration sur gel agarose:

A 150 ml de tampon TBEx1 on ajoute 2,25g d'agarose dans un bécher de 500 ml qu'on fait dissoudre en le chauffant au micro onde jusqu'à homogénéisation complète. A ce gel d'agarose homogène, on ajoute 10µl de bromure d'ethidium. L'ensemble est ensuite solidifié dans un bac contenant un peigne avec 20 dents. Après solidification du gel, une quantité suffisante (1 litre) du tampon est transvasée dans le bac contenant ainsi le gel solidifié, le peigne est ensuite enlevé du gel laissant ainsi 20 puits prêts à recevoir les amplicons.

A 1µl de tampon de charge, on ajoute 5µl du produit à tester (amplicon). Le premier puits et le dernier reçoivent le marqueur de poids moléculaire (mélangé de la même façon au tampon de charge). Dans le second et le troisième puits sont chargés respectivement les témoins positif et négatif. Dans les puits restants, sont chargés les amplicons à tester. La migration sur gel se fait sous une tension de 110V pendant 40min.

- **Lecture :**

La lecture des résultats s'est faite grâce à un ensemble d'appareils composés d'un ordinateur sur lequel est installé le logiciel de traitement des images du Geldoc, où est connectée une caméra qui envoie les images à l'unité centrale dudit ordinateur (Figure 1) visualisées sur l'écran de l'ordinateur. L'identification du genre *Mycobacterium* et du Complexe *M. tuberculosis* est faite grâce à la visualisation des signaux obtenus à 1030pb et 372pb (méthode Genus Typing) indiqué au niveau du marqueur de taille moléculaire (100bp DNA Ladder REF : G2101 www.promga.com) et comparé au résultat fourni par l'échantillon témoin (*M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618), <http://www.lgcpromochem-atcc.com/>). La différence entre les différentes espèces du Complexe *M. tuberculosis* (méthode Deletion typing) est aussi faite de la même manière et les amplicons des espèces *M. tuberculosis* et *M. bovis* sont visualisés respectivement à 396bp (RD9) et 446 pb (RD4).

La mise en évidence du *M. avium* se fait lors de la visualisation des résultats issus du PCR Genus typing à 180pb en comparaison avec le résultat issu du témoin (ATCC 19075).



Figure 1 : Appareil pour visualisation et électrophorèse des résultats PCR à l'IRED (Photo IRED 2013).

e- Saisie de données et analyse statistique

Les données collectées sur le terrain et les résultats issus des diagnostics (bactériologique et moléculaire) ont été saisies en double dans une base de données sécurisée en utilisant le logiciel Microsoft ACCESSTM. Le transfert des données du logiciel ACCESS au logiciel STATA 13 a été réalisé par le biais du logiciel STATA / transfert. Le "taux de prévalence" a été utilisé comme mesure statistique pour exprimer

la fréquence (nombre des cas présents) des patients ou animaux malades par rapport au nombre total échantillonné. La fréquence relative a été utilisée pour exprimer le nombre de cas dans les classes d'âge, les sexes, et catégories socioprofessionnelles. L'analyse multivariée (GLM : Generalized Linear Models) a été utilisée pour la mise en évidence des facteurs significativement dépendants de la positivité au test PCR.

II- Résultats et Discussion

II.1- Résultats

II.1.1. Mise en place d'un réseau de collecte des données

Il a été mis en place à l'issue de cette étude un réseau de collecte de données composé des laborantins dans les centres de santé en charge des activités de diagnostic du Ministère de la santé publique, des inspecteurs au niveau des abattoirs et des agences de voyages chargées du transport des données du terrain jusqu'au niveau central (annexe 5).

II.1.2- Données collectées sur le terrain

Durant la période de collecte de données, 9 localités ont été visitées et la population d'étude était constituée des patients ayant une toux de plus de 15 jours au niveau des centres de santé et de carcasses (et abats) suspectés de tuberculose bovine et saisies dans les abattoirs (ou aires d'abattage) (Tableau III).

Tableau III: Récapitulatifs des activités de terrain réalisées entre Juin et Septembre 2012 (Ndjamena, 2013).

Localités	Patients avec toux de plus de 15 jours	Animaux suspectés	Total
Sarh	11	11	22
Koumra	36	95	131
Doba	8	74	82
Bébidja	34	0	34
Moundou	78	45	123
Kelo	164	47	211
Bongor	55	52	107
Guelendeng	19	8	27
Lac Tchad	73	0	73
Total	478	332	810

Au niveau des centres de santé, l'échantillonnage a concerné 478 patients avec une toux de plus de 15 jours dont 329 hommes et 147 femmes repartis dans six classes d'âge et analysés en fonction de huit catégories socio professionnelles (tableau IV). Dans les abattoirs et aires d'abattage, 332 carcasses (et abats) suspectés de tuberculose

bovine provenaient essentiellement des bovins de races locales : 234 bovins de race Arabe, 91 de race Mbororo, 1 de race Bogolodjé, 1 de race indéterminée. Les petits ruminants n'étaient qu'au nombre de 5. Cent quinze (115) carcasses étaient issues des animaux mâles et 217 des femelles. Les cas de saisies étaient majoritaires dans la tranche d'âge allant de 3 à 12 ans avec 307 cas de saisie partielle et 25 cas de saisie totale (Tableau V).

Tableau IV: Cas de toux de plus de 15 jours au niveau des centres de santé, répartition en fonction de l'âge, du sexe et des catégories socio professionnelles (n=476), Ndjamena, 2013

Classe d'âge	Sexe		Catégories socio professionnelles							
	M	F	Ménagère	Éleveur	Boucher	Agriculteur	Ouvrier	Fonctionnaire	Étudiants	Sans emploi
0 – 15	4	13	3	0	0	2	0	0	11	1
16 – 30	107	55	36	2	3	30	38	9	33	11
31 – 45	137	54	41	3	3	49	67	12	3	13
46 – 60	67	21	15	7	1	25	29	6	0	5
61 – 75	12	4	3	1	0	6	4	0	0	2
≥ 76	2	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Total	329	147	98	13	7	113	138	27	47	33

Tableau V: Répartition des cas de suspicion de la tuberculose bovine en fonction de l'âge, du sexe, de la race de l'animal et du type de saisie (Ndjamena, 2013).

Tranche d'âge (Années)	Sexe		Race bovine				Petits ruminants		Type de saisie	
	M	F	Arabe	Mbororo	Bogolodjé	Autres	Ovins	Partielle	Totale	
0,5 – 3,5	6	9	11	3	0	0	1	15	0	
3,6 – 6,5	54	58	74	34	1	0	3	100	12	
6,6 – 9,5	40	67	81	25	0	0	1	103	4	
9,6 – 12,5	9	55	45	18	0	1	0	56	8	
≥ 12,6	6	28	23	11	0	0	0	33	1	
Total	115	217	234	91	1	1	5	307	25	

II.1.3- Données de laboratoire

Sur les 478 échantillons de crachats collectés, seuls 476 ont pu être traités. Après culture sur milieux spécifiques, 83 souches de bactéries ont été isolées soit un pourcentage d'isolement de 17,43 % (83/476). Les mycobactéries représentaient plus de 84 % (70/83) des bactéries isolées parmi lesquelles il a été caractérisé 45 souches de *M. tuberculosis*, majoritairement dans les tranches d'âge allant de 16 à 60 ans. Les ouvriers et les agriculteurs ont constitué les catégories socio professionnelles les plus touchées. Un cas de tuberculose bovine en co-infection avec la tuberculose aviaire a été détecté chez un aviculteur (Figure 2). La part des mycobactéries non tuberculeuses impliquées dans les infections pulmonaires chez l'homme a été de 28,91% (24/83). Cependant, d'autres bactéries étaient impliquées dans cette infection à 14 % (12/83). En somme, les cas de toux de plus de 15 jours dus réellement au membre de complexe *M. tuberculosis* ont été de 9% (45/476) et celle due aux mycobactéries non tuberculeuses furent de 5% (24/476). Ceux liés aux autres bactéries ont compté pour 2% (12/476). Pour l'âge, le sexe et les catégories socio professionnelles, l'analyse univariée a donné $p > 0,05$. Les éleveurs sont peu représentés dans notre échantillon (13 /478), car ils ne fréquentent pas souvent les centres de santé et recourent aux soins informels.

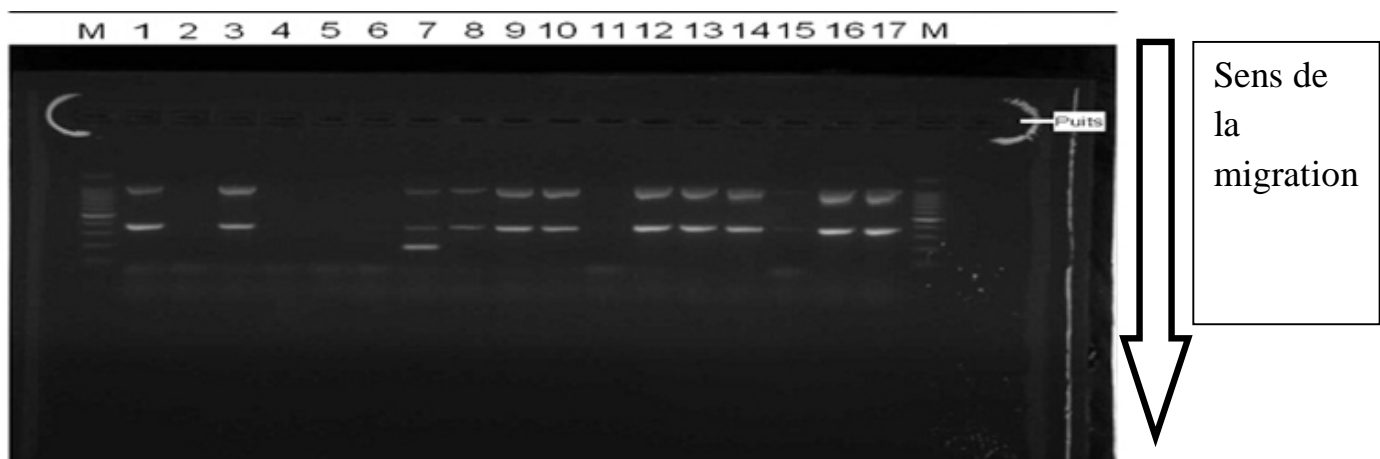


Figure 2: Amplification de l'ADN des mycobactéries (1030 pb), *Complexe M. tuberculosis* (372 pb) et *M. avium* (180 pb) (Un cas de co-infection rencontré chez un aviculteur), Photo IRED/DSA/BACTÉRIO 2013.

Verticalement : ligne M : Marqueur de poids moléculaire; ligne 1 : témoin positif (1^{er} signal (genre *Mycobacterium* = 1030pb) ; 2^{ème} signal (*Complexe M. tuberculosis* = 372pb)); ligne 2 : témoin négatif ; lignes 3, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 17 : échantillons positifs au genre *Mycobactérium* et au complexe *M. tuberculosis*, ligne 7 : échantillon positif au genre M., au *Complexe M. tuberculosis* et au *M. avium* (3^{ème} signal = 180pb)

En ce qui concerne les prélèvements faits à l'issu des examens *post mortem* au niveau des abattoirs et aires d'abattage, après culture sur milieux spécifiques, 73 carcasses (et abats) saisis soit 21% ont été infectées par différents types de mycobactéries. Les mycobactéries appartenant au complexe *M. tuberculosis* furent au nombre de 63 dont un cas d'infection lié à l'espèce *M. tuberculosis* et 42 liés à l'espèce *M. bovis*. Vingt (20) membres du complexe *M. tuberculosis* n'ont pas pu être identifiés. Les infections liées aux mycobactéries non tuberculeuses comptaient pour 3% (10/327) parmi les suspicions faites au niveau des abattoirs et aires d'abattage. Les autres suspicions sont liées aux pathogènes non spécifiés dans notre étude. Les infections à mycobactéries ont été plus constatées dans les classes d'âge allant de 3,6 à 12,5 ans. Cependant, en fonction du sexe, les infections liées aux souches *M. bovis* ont semblé être à part égale chez les mâles (20 souches) et les femelles (22 souches). L'analyse uni variée n'a pas donné une différence en fonction de l'âge et du (sexe $p > 0,05$). En somme, l'infection due réellement à *M. bovis* est de 12,65% (42/332). Aucune mycobactérie n'a été isolée chez les petits ruminants. Il n'a pas eu d'abattage de dromadaire durant l'étude.

Chez l'homme, l'analyse multi variée a pris en compte les variables explicatives l'âge, le sexe et les catégories socioprofessionnelles lorsqu'on est infecté par un membre du Complexe *M. tuberculosis*. Le facteur de risque le plus lié à l'infection est le sexe ($p=0,03$, OR=3,3 IC OR 95% : 1,071- 10,333). Ainsi les femmes ont trois fois plus de risque d'être infectées que les hommes. Les autres variables, âge, catégories socio professionnelles n'ont montré aucune association avec la positivité à la PCR ($p > 0,05$).

Chez les animaux, l'analyse multi variée a permis de montrer une différence significative uniquement pour le sexe ($p=0,04$, OR=1,7 IC OR 95% : 1,039- 3,089). Ainsi les femelles ont approximativement deux fois plus de risque d'être infectées que les mâles. Il n'a pas été détecté de différence significative en fonction de l'âge ($p > 0,05$).

II.2- Discussion

II.2.1-Discussion de la méthodologie

Notre échantillonnage a concerné tout patient avec une toux de plus de quinze jours venu au centre de santé et tout animal entrant dans la chaîne d'abattage dont les carcasses ou abats ont été saisis. Les échantillons ont été collectés en fonction de l'emplacement de l'infection (pulmonaire ou extra pulmonaire). Dans les abattoirs, les saisies n'ont pas beaucoup concerné les petits ruminants car ils seraient moins sensibles à la tuberculose que les bovins (**Dubois, 2002**) ou au temps d'incubation de la tuberculose qui n'est pas atteint chez ces derniers lorsqu'ils sont abattus. Il n'y a pas eu d'abattage de dromadaire car ceux-ci étaient en transhumance dans la zone septentrionale du pays durant cette période d'étude. Il a été constaté que dans les centres de santé visités, la bacilloscopie était la seule technique de diagnostic utilisée eu égard au manque d'équipements appropriés de laboratoire pour la caractérisation des mycobactéries du Complexe *M. tuberculosis* comme dans la plupart des structures sanitaires des pays d'Afrique au Sud du Sahara (**Boukary et al., 2011**). Il en est de même des abattoirs et aires d'abattage, où le diagnostic de la tuberculose bovine ne se limite qu'à l'inspection des viandes rouges qui ne permet qu'une suspicion. Le diagnostic (bactériologique et moléculaire) des échantillons prélevés a eu lieu au niveau des unités de mycobactérie et de PCR de l'IRED dotées d'un laboratoire de niveau de sécurité II mais respectant les exigences en vigueur dans un laboratoire de niveau III. La méthodologie utilisée permet d'obtenir des résultats extrapolables à tout le sud et ouest du Tchad.

II.2.2-Discussion des résultats

La mise en évidence de la tuberculose humaine due à *M. bovis* en co infection avec *M. avium* d'une part puis du *M. tuberculosis* chez le bovin d'autre part, se réalise pour la première fois au Tchad et constitue un danger pour le pays. Ce résultat peut être dû au contact étroit entre l'homme et l'animal mais aussi une preuve de la mauvaise gestion des risques sanitaires au niveau des élevages, surtout que la présence de ces souches (bovine et aviaire) chez l'homme risquerait de compromettre le schéma thérapeutique appliqué au niveau national concernant le traitement de la tuberculose. Des cas de tuberculose humaine dus à *M. bovis* ont été déclarés dans huit pays d'Afrique (Bénin, Érythrée, Éthiopie, Rwanda, Afrique du Sud, Tanzanie, Tunisie, Ouganda), (**Boukary et al., 2011**), mais aussi au Nigeria (**Cadmus, 2007 ; Jenkins et al., 2011**), au Ghana (**Addo et al., 2007**), à Madagascar (**Rasolofon-Razanamparany et al., 1999**). Nos résultats concordent avec leurs résultats, ce qui confirme l'importance du diagnostic moléculaire dans l'épidémiologie de la tuberculose en Afrique. La présente étude a porté sur la population des zones de fortes concentrations humaines et l'infection tuberculeuse est liée au sexe ($p=0,03$, $OR=3,3$ IC OR 95% : 1,071- 10,333), les femmes ont trois

fois plus de risque que les hommes d'être infectées. Ceci pourrait être dû au fait qu'elles soient beaucoup plus en contact avec les malades que les hommes (dans nos sociétés les femmes sont souvent au chevet des malades). La tranche d'âge de 16 à 60 ans qui est la tranche d'âge active était la plus touchée. **Balako et al., (2012)** a mis en évidence *M.tuberculosis* à un taux de 61,53% chez 260 personnes en Ethiopie, nos résultats (9%) diffèrent de ses résultats. La différence serait due au fait que les patients échantillonnés en Ethiopie pourraient constituer un groupe à risque (éleveurs). La part des MNT est de 5% se rapproche de **Balako et al., (2012)** avec 3,83%.

Les saisies à l'abattoir et l'isolement des souches *M. bovis* ont concerné les animaux âgés (3 à 12 ans), comme l'ont observé **Ngandolo et al., (2009)** au Tchad et **Awah et al., (2012)** au Cameroun où les animaux âgés présentaient plus des lésions que les jeunes. Ce résultat pourrait être dû au fait que la tuberculose est une maladie chronique. De même, 42 souches de *M. bovis* soit 12,65% ont été isolées sur 332 échantillons, ce résultat diffère de celui de **Cissé et al., (2008)** en Côte d'Ivoire où 3 souches de *M. bovis* soit 2,88% ont été isolées sur 104 échantillons, la différence serait due aux effectifs échantillonnés. L'infection tuberculeuse peut être attribuée à la variable sexe ($p=0,04$ OR=1,7 IC OR 95% : 1,039- 3,089), ceci concorde avec l'étude réalisée au Tchad (**Diguimbaye et al., 2006a**) mais diffère de celle de **Awah et al., (2012)** où le sexe n'a pas eu d'influence ($p=0,52$). En effet les femelles avaient deux fois plus de risque d'être infectées que les mâles, ceci peut être dû aux systèmes d'élevage où les femelles sont souvent maintenues longtemps dans les troupeaux, ou à l'état physiologique des femelles gravides vulnérables à la maladie lorsque leur immunité baisse. La part des MNT chez l'animal relatives aux suspicions faites dans les abattoirs est de 3% dans notre étude, ceci diffère de ceux trouvés par **Cissé et al., (2008)** qui a isolé 51 souches sur 104 échantillons soit 49,03%. La mise en évidence de *M. tuberculosis* chez l'animal dans notre étude a été aussi signalée au Nigeria et en Ethiopie (**Jenkins et al., 2011 ; Balako et al., 2012**). Sur 233 souches de bactéries isolées après culture, 63 seulement appartiennent au *Complexe M. tuberculosis* après analyse par PCR, le reste constitue le groupe des bactéries environnementales qui peuvent donner des faux positifs lors d'une épreuve d'IDC dans le cheptel, ceci démontre la sensibilité du diagnostic moléculaire par rapport au diagnostic basculloscopique et l'intradermo tuberculination sauf qu'il nécessite trop de temps.

Toutefois, en termes de prévention, dans la population humaine, le modèle "Test Mantoux suivi de la vaccination au BCG" reste de référence. Par contre dans les élevages africains, un modèle impliquant l'épreuve de l'IDC suivi d'abattage serait une alternative pour l'assainissement du cheptel bovin.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Notre étude est le fruit des investigations faites sur la tuberculose humaine et animale au Tchad depuis le début des années 2000 et elle donne un aperçu sur la situation réelle de la maladie sur le terrain. Elle a permis d'estimer la prévalence de la maladie chez les deux hôtes précités au niveau de notre zone d'étude et aussi faire la part des mycobactéries non tuberculeuses impliquées dans les infections pulmonaires chez l'homme et de lésions suspectées tuberculeuses observées sur les carcasses chez l'animal dans cette zone d'étude. La mise en évidence de la souche tuberculeuse d'origine bovine et aviaire chez l'homme, et la souche d'origine humaine chez le bovin vient démontrer pour la première fois au Tchad le caractère zoonotique de la tuberculose chez les populations à risque. Également, cette étude a permis de mettre en place un réseau de collecte des données depuis la périphérie jusqu'au niveau central. Ce réseau pourrait bien être maintenu par la Direction des Services Vétérinaires (DSV) et la Direction Générale des Activités Sanitaires (DGAS) afin d'assurer le relais entre le REPIMAT (Réseau d'Epidémiosurveillance des Maladies Animales au Tchad), le PNT et l'IREN dans le cadre de la surveillance des autres maladies zoonotiques au niveau national. Par ailleurs, ce résultat pourrait aussi orienter les acteurs impliqués dans la lutte pour une meilleure prise en charge des malades, mais aussi d'assainir le bétail car le spectre des bactéries responsables de toux de plus de 15 jours chez l'homme ou des lésions suspectées tuberculeuses sur les carcasses et abats est large.

Au vu de ces constats nous recommandons :

Au gouvernement

- ✓ La mise en place au niveau des hôpitaux régionaux des unités dotées de nouveaux outils de diagnostic rapide à l'exemple du GenExpert afin d'améliorer la qualité de la prise en charge des malades tuberculeux ;
- ✓ L'instauration du test de tuberculination dans tous les élevages ;
- ✓ Le Dépistage et l'abattage systématique avec indemnisation de tous les animaux destinés à l'exportation sur pied par la technique d'intra dermo tuberculination comparative (IDC) ;
- ✓ L'orientation des animaux suspectés par les épreuves d'IDC vers un diagnostic post mortem au niveau des abattoirs et aire d'abattage nationaux ;
- ✓ Assurer le contrôle du mouvement des animaux en transhumance d'une zone à une autre.

Aux professionnels de la santé publique :

- ✓ La sensibilisation de la population sur le caractère zoonotique de la tuberculose, sur la pasteurisation du lait ou la cuisson de la viande avant la consommation.

- ✓ La gestion des souches résistantes en collaboration avec le niveau central ;

A la Direction des Services Vétérinaires :

- ✓ L'établissement des fiches techniques de gestion des risques sanitaires au niveau des élevages des ruminants et de la volaille ;
- ✓ L'établissement d'un cahier de charge relatif à l'inspection post mortem de la volaille au niveau des marchés et des restaurants ;

Au Wellcome trust et Afrique One

- ✓ D'encourager la mise en place et le financement de l'actuelle équipe du consortium en charge de la recherche sur les mycobactéries pour la régionalisation de la lutte contre les maladies causées par ce groupe de bactéries.

BIBLIOGRAPHIE :

- 1 . Addo K., Owusu-Darko K., Yeboah – Manu D. et al., 2007. Mycobacteria species causing pulmonary tuberculosis at Korle Bu Teaching hospital, Accra, Ghana. *Ghana Medical Journal*, **41** (2): 52 – 57
- 2 . Aranaz A., DE Juan L., Bezos J. et al., 2003. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. Paratuberculosis. *Veterinary Research*, **37** (4): 593 – 606.
- 3 . Awah-Ndukum J., Kudi A.C., Bradley G. et al., 2012. Prevalence of bovine tuberculosis in cattle in the highlands of Cameroon based on the detection of lesions in slaughtered cattle and tuberculin skin tests of live cattle. *Veterinari Medicina*, **57** (2): 59–76
- 4 . Ayele W.Y., Neill S.D., Zinsstag J. et al., 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **8** (8): 924 – 937.
- 5 . Balako G., Schelling E., Stefan B. et al., 2012. Zoonotic transmission of tuberculosis between pastoralists and their livestock in South- East Ethiopia. *EcoHealth* **9**: 139-149
- 6 . Berg S., 2008. Standard Operating Procedure for Mycobacterium genus typing and deletion typing, Londres: VLA UK, 6p.
- 7 . Berg S., Carmen Garcia-Pelayo M., Borna M. et al., 2010. A clonal complex of Mycobacterium bovis epidemiologically important in East Africa. *J. Bacteriol*, **193**: 670-678.
- 8 . Boukary A. R., Thys E., Mamadou S. et al., 2011. La tuberculose à Mycobacterium bovis en Afrique subsaharienne, *Méd Vét*, **115**: 23 – 37.
- 9 . Brosch R., Gordon S. V., Marmiesse M. et al., 2002. A new evolutionary scenario for the mycobacterium tuberculosis complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**: 3684 – 3689.
- 10 . Cadmus S., 2007. Bovine tuberculosis in Nigeria (5 - 6). In proceedings of the 1st meeting “African Bovine TB Net work: effective management of bovine tuberculosis in africa: Towards adapted control policy” Bamako, Mali, 26 – 29,
- 11 . Cleaveland S., Mlengeya T., Kazwala R. R. et al., 2005. Tuberculosis in Tanzanian wildlife. *J. Wildl. Dis.* **41**: 446 – 453
- 12 . Cissé B., N’guessan K., Ekaza E. et al., 2008. Isolement de Mycobacterium bovis des lésions tuberculeuses chez les bovins à l’abattoir d’Abidjan Port-Bouet (Côte d’Ivoire). *RASPA*, **6** (3-4) : 199-204.
- 13 . De Lisle G W., Bengis R. G., Schmitt S. M. et al., 2002. Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management. *Rev. Sci. Tech. Off Int Epiz*, **21** (2): 317 – 334.
- 14 . Delafosse A., Traore A. et Kone B. 1995. Isolement de souches de mycobactéries pathogènes chez des bovins abattus à l’abattoir de Bobo-Dioulasso, Burkina Faso. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, **48** (4): 301 – 306.

- 15 . Delafosse A., Goutard F. et Thebaud E., 2002. Epidémiologie de la tuberculose et brucellose des bovins en zone péri urbaine d'Abéché, Tchad. *Rev. Elev. Med. Pays Trop.*, **55** (1) : 5-13.
- 16 . Diguimbaye-Djaibe C., 2004. La tuberculose humaine et animale au Tchad: contribution à la mise en évidence et caractérisation des agents causaux et leur implication en santé publique. Thèse : Epidémiologie : Bâle (Université de Bâle).
- 17 . Diguimbaye-Djaibe C., Markus H., Ngandolo R. et al., 2006a. *Mycobacterium bovis* isolated from tuberculous lesions in Chadian zebu carcasses. *Emerg. Infect. Dis.* **12**(5): 769 – 771.
- 18 . Diguimbaye-Djaibe C., Vincent V., Schelling E. et al., 2006b. Species identification of non-tuberculosis mycobacteria from humans and cattle of Chad. *Sociétés des vétérinaires suisses*, **5**: 225-276
- 19 . Dubois, 2002. Les tuberculoses chez l'animal et l'Homme : Actualités épidémiologique et diagnostique. Thèse : Médecine vétérinaire : Toulouse (Université Paul-Sabatier de Toulouse III).
- 20 . Ehrlich P., 1882. Zur Färbung der Tuberkelbakterien. Aus dem Verein Für innere Medizin zu Berlin. *Deutsche Med Wochenschr*, **8**: 269 – 270.
- 21 . Godreuil S., Jeziorki E., Banuls, A. L. et al., 2010. Intrafamilial cluster of pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium Bovis* of the African 1 clonal complex *J.clin. Microbiol.* **48** : 4680-4683.
- 22 . Jenkins A. O., Cadmus S. I. B., Venter E. H. et al., 2011. Molecular epidemiology of human and animal tuberculosis in Ibadan, South western Nigeria. *Vet. Microbiol* : **151**(1-2) : 139-147
- 23 . Long R., Eva N., Sylvia C., et al., 1999. Transcontinental spread of multi drug resistant *Mycobacterium bovis*, *Am J Respir Crit Care Med.* **159**: 2014 – 2017
- 24 . Maho A. et Ndougou M.R. 1997. *Mycobacterium* des Bovins abattus à l'Abattoir Frigorifique de Farcha, 100-101. Journées Scientifiques internes, Ndjamen, Tchad.
- 25 . Maho A., Mbakasse R. N. et Boulbaya N., 1999. Causes de saisies aux abattoirs du Tchad oriental. Actes IIIème Journées Agro- Sylvo-Pastorales du LRVZ/Farcha, N'Djaména, Tchad, 29 nov – 3 déc. 1999.
- 26 . Müller B., Benjamin S., Bassirou B. et al., 2008, Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle slaughtered at Bamako abattoir in Mali. *Journal list BMC Veterinary Research.* **4** : 26
- 27 . Müller B., Hilty M., Berg S., et al., 2009. African 1. An Epidemiologically important Clonal Complex of *Mycobacterium bovis* dominant in Mali, Nigeria, Cameroon and Chad *J. bacteriol.*, **191**: 1951-1960.
- 28 . Ngandolo B.N, Diguimbaye-Djaibe C., Müller B. et al., 2009. Diagnostic ante et post mortem de la tuberculose bovine au sud du Tchad : cas des bovins destinés à l'abattage, *Rev Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* **62** (2) : 5-12.
- 29 . O M S, 2012. Rapport 2012 sur la lutte contre la tuberculose. Genève : OMS – 5p

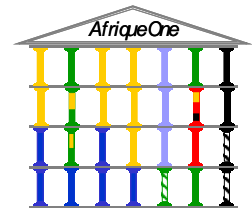
- 30 . Perpezat A. Mariat F., Destombes P., et *al.*, 1963. Importance du farcin chez le zébu du Tchad. *Bull Soc. Path. Exot.*, **56** : 375-383
- 31 . Pritchard D. G., 1998. A century of bovine tuberculosis 1888 – 1988: Conquest and controversy. *Journal of Comparative Pathology*, **99**: 357 – 388.
- 32 . Rastogi N., Legrand E. et Sola C. 2001. Les mycobactéries : Introduction à la nomenclature et la pathogénèse. *Rev. Sci. Tech.* **20** (1): 21 – 54.
- 33 . Riccardi G., Pasca M. R. et Buroni S. 2009. Mycobacterium tuberculosis drug resistance and future perspectives. *Future Microbiol.* **4** (5): 597-614
- 34 . Rasolofo – R. V., Menard D., Rasolonavalona T. 1999. Prevalence of Mycobacterium bovis in human pulmonary and extra pulmonary tuberculosis in Madagascar. *Int. J Tuberc Lung DIS.* **3**: 632 -634.
- 35 . Schelling E., Diguimbaye C., Daoud S. et *al.*, 2000. La tuberculose causée par Mycobacterium bovis : résultats préliminaires obtenus chez les pasteurs nomades Foulbés et Arabes dans le Chari-Baguirmi au Tchad. *Sempervira*, **8** : 44-45
- 36 . Smith N.H., 2012. Infection, *Genetics and evolution* **12**: 857-865
- 37 .Tchad. Ministère de l'Élevage et des Ressources Animales, 2009. Guide de bonnes pratiques d'inspection des viandes rouges. Ndjamenas : MERA- 78p
- 38 . Tchad. Ministère de l'Élevage et des Ressources Animales (MERA), 2005. Rapport annuel des statistiques, années 2004 – 2005, N'Djaména : Direction des Statistiques, de la Programmation et du Suivi : 40 p.
- 39 . Tchad. Ministère de la Santé Publique, 2010. Guide technique pour la prise en charge de la tuberculose à l'échelle nationale : 3^{ème} Édition- Ndjamenas Programme National de Lutte Contre la Tuberculose -125 p

WEBOGRAPHIE :

40. Chaulet P., 2009. La situation de la tuberculose dans le monde et en Afrique. [en ligne] Accès Internet : www.sante.dz/tuberculose/epidemiologie-monde.pdf
41. DNA Ladders - Promega . Accès internet : [http:// www.promega.com](http://www.promega.com)
42. Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens. [en ligne] Accès internet <http://www.lgcpromochem-atcc.com>



ANNEXE 2



Diagnostic de la tuberculose chez l'homme

1- N° LRVZ

Fiche de collecte:

2- N° Centre de prise en charge sanitaire : _____

3- Nom du Centre de Prise en Charge sanitaire :

4- Nom et prénom du patient : _____

5- Age : _____ ans 6- Sexe : M F

7- Catégorie de résidence :

7.1 Natif 7.2 Fonctionnaire de l'État 7.3 Éleveur transhumant

7.4 Personne déplacée 7.5 Humanitaire : National

Expatrié

Institution : _____

8- Adresse du patient : _____

9- Fonction : _____

10- Groupe ethnique (pour les nationaux et personnes déplacées) : _____

11- Source de l'échantillon : Pulmonaire Extrapulmonaire

Nature de l'échantillon

12- Motif de l'examen : Diagnostique Suivi chimiothérapeutique (Contrôle)

13- Date de réception de l'échantillon au LRVZ-Farcha : _____

l'état de l'échantillon à l'arrivée : _____

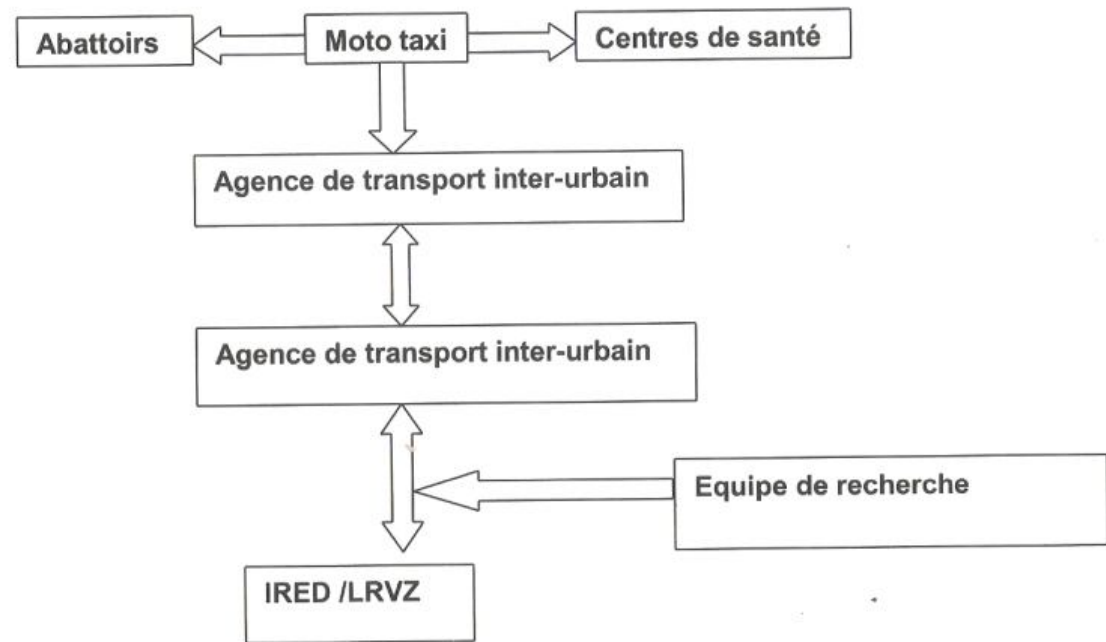
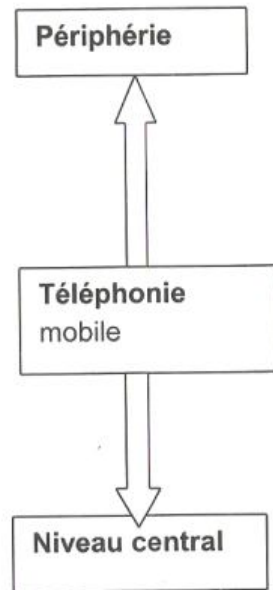
14- Responsable de collecte (nom et signature) : _____

15- Responsable de laboratoire de mycobactérie au LRVZ-Farcha (nom et

Signature) : _____

Annexe 5

Réseau de collecte des données



Caractérisation des mycobactéries isolées chez l'homme et les ruminants domestiques au Tchad: causes des suspicions de la TB dans les hôpitaux et aux abattoirs

Résumé:

Cette étude a pour objectif de montrer le caractère zoonotique de la tuberculose dans la partie sud et ouest du Tchad. Ainsi, elle a été menée sur 478 patients ayant une toux de plus de quinze jours parmi lesquels il ya 329 hommes et 147 femmes repartis dans six classes d'âge et analysés en fonction de huit catégories socio professionnelles dans 9 centres de santé, et sur 332 carcasses (et abats) suspectés de tuberculose bovine dans 8 abattoirs qui provenaient essentiellement de 234 bovins de race Arabe, 91 de race Mbororo, 1 de race Bogolodjé et 1 d'une race indéterminée. Les petits ruminants étaient au nombre de 5. Cent quinze (115) carcasses étaient issues des animaux mâles et 217 des femelles. Les cas de saisies étaient majoritaires dans la tranche d'âge allant de 3 à 12 ans avec 25 cas de saisie totale et 307 cas de saisie partielle. Les diagnostics bactériologique et moléculaire ont été réalisés à partir des échantillons de crachat et de tissus collectés sur les carcasses. Le diagnostic bactériologique a permis d'isoler chez l'homme 83 souches de mycobactéries à partir des crachats et le diagnostic moléculaire de ces souches a montré une fréquence élevée de *M. tuberculosis* (45 /83souches). *M. avium* a été isolée en association avec *M. bovis* chez un patient. Les agriculteurs et les ouvriers étaient les plus touchés. Le sexe ($p=0,03$, $OR=3,3$; IC OR 95% : 1,071-10,333) est fortement associé à la positivité chez les humains au complexe *M. tuberculosis* par PCR. Les autres variables âge, catégories socio professionnelles n'ont montré aucune association avec la positivité au PCR. Il a été constaté que sur les carcasses suspectées, principalement des souches *M. bovis* (42 souches) ont été isolées. Un cas d'infection lié au *M. tuberculosis* a été mis en évidence sur une carcasse bovine. Le sexe a influencé sur l'infection chez les animaux ($p=0,04$, $OR=1,7$ IC OR 95% : 1,039- 3,089). Ainsi les femelles ont deux fois plus de risque d'être infectées que les mâles. Le rôle des MNT a été aussi démontré avec l'isolement de 24 souches (5%) chez l'homme et 10 (3%) souches chez l'animal. Pour une meilleure prise en charge, une étude relative à la sensibilité des souches isolées aux anti tuberculeux usuels en collaboration avec les structures impliquées dans la lutte doit être envisagée.

Mots clés : Tchad, Mycobactéries, Tuberculose, Homme, Animal.

Characterization of mycobacteria isolated from humans and domestic ruminants in Chad: TB suspicion causes in hospitals and abattoirs

Abstract:

The main objective of our study is to highlight the zoonotic nature of the disease in south and west of Chad. So, we conducted our study on 478 patients having a cough more than 15 days among which there are 329 men and 147 women distributed into six age group and analyzed by eight socio professional category in 9 health centers and on 332 animals suspected as TB cases at 8 abattoirs with 234 bovine of Arabe breed, 91 Mbororo breed, 1 bogolodjé breed, 1 indetermined breed and 5 small ruminants. One hundred fifteen (115) are males and two hundred seventeen (217) are females. We conducted bacteriological and molecular diagnosis on sputum from patients and tissues from carcasses. Thus, 83 mycobacterial strains were isolated from human with high rate of *M. tuberculosis* (45/83 strains). *M. avium* was also isolated from a patient in association with *M. bovis*. Farmers and workmen were more infected. Sex ($p=0,03$, $OR=3,3$; IC OR 95%: 1,071- 10,333) strongly associated to the positivity in humans to Complex *M. tuberculosis* by PCR. Others variables age, socio professional categories didn't show any association to the positivity by PCR. From animal samples, mainly *M. bovis* strains were isolated (42 strains). *M.tuberculosis* was isolated from one bovine carcass. Sex has influence infection in animals ($p=0,04$, $OR=1,7$ IC OR 95% : 1,039- 3,089). So females are twice of risk to be infected than males. The role of NTM with isolation of 24 strains (5%) in human and 10 strains (3%) animal infections was also highlighted.

For a best strategy of fight in order to improve care, a study of drug resistance of strains isolated must be considered with different collaborators.

Key Words: Chad, Mycobacteria, Tuberculosis, Human, Animal.