



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Université M'Hamed Bougara - Boumerdès -



Faculté des Sciences

Département de Biologie

Mémoire de Fin d'Etudes pour l'Obtention du Diplôme de
Master en Sciences Biologiques
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Thème

Production de milieu Lowenstein-Jensen modifié
additionné de sang ou dérivé de sang (plasma ou
sérum) humain ou équin.

Présenté par :

Mlle AIT OUALI Lina et Mlle GANOUN Nesrine

Devant le jury composé de :

Mme AMELLAL H.	Professeur (UMBB)	Présidente
Mme BENZINA F.	MCA (UMBB)	Examinatrice
Mr. SEMRI M.L.	Pharmacien en microbiologie (IPA)	Promoteur
Mme HALLADJ F.	MCB (UMBB)	Co-Promotrice

Année universitaire : 2022–2023

REMERCIEMENTS

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre promoteur Dr SEMRI M.L., Chef du laboratoire des milieux de culture à l'Institut Pasteur d'Algérie, pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur durant la préparation de ce mémoire ainsi que pour ces précieux conseils. Votre dévouement et votre constante disponibilité tout au long de l'élaboration de ce travail nous a profondément marqué. Soyez assuré de notre vive reconnaissance.

Nos remerciements s'adressent également, à notre Co-Promotrice Mme HALLADJ F. d'avoir consacré du temps au suivi de ce travail, pour nous avoir guidés de son mieux, pour l'accomplissement de ce mémoire de fin d'études. Soyez assurée de notre grande estime et de notre parfaite reconnaissance.

Nous tenons aussi à remercier Mme AMELLAL H et Mme BENZINA F. d'avoir accepté de présider et d'examiner respectivement ce modeste travail. Veuillez accepter le témoignage de notre profond respect.

Nos remerciements d'adressent en outre, au Dr NAIT SAADA, chef du département des Réactifs des Laboratoires à l'Institut Pasteur d'Algérie pour son accueil et assurer le bon déroulement de notre stage.

On tient à remercier tout le personnel de Laboratoire des Milieux de Culture, en particulier
Mr MEZGHICH N, ainsi que Mr YESLI H.

Un grand merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce modeste travail.

Dédicaces

Avec tous mes sentiments de respect et toute ma reconnaissance, je dédie ma remise de diplôme et ma joie :

A dieu

A la mémoire de mon père GANOUN Rezki

Qui n' a pas pu voir mon travail, qui m' a toujours poussé et motivé dans mes études, qui a fait de moi la femme que je suis aujourd' hui, je ne pourrais pas rédiger ce mémoire sans me rappeler de toi, car tu as été tout pour moi. Je ne t' oublierai jamais, tu demeureras à jamais dans mon cœur, que DIEU garde ton âme dans son vaste paradis.

A ma chère mère BENDAHMANE Ghalia

La femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n' a jamais dit non à mes exigences et qui n' a épargné aucun effort pour me rendre heureuse.

Pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices.

A mes chers frères Housseem et Said

À l' amour que je vous porte, à votre soutien permanent à travers les difficultés que j' ai pu rencontrer.

A mes chères amies

Amira, Hind, Kenza, Zohra, ma cousine Yasmine ainsi que mon amie et mon binôme Lina, qui ont été présents à mes côtés tout au long de cette aventure. Vos encouragements, votre soutien moral et votre compréhension durant mes moments de stress ont été inestimables. Cette dédicace vous est dédiée, en témoignage de notre amitié sincère et de notre solidarité.

A tous les membres de ma grande famille, votre amour et votre soutien ont été mes piliers tout au long de cette aventure académique.

A mon chat Casper

Ma petite source de bonheur.

GANOUN Nesrine

Dédicaces

Avec l' aide et la grâce de Dieu, j' ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie particulièrement :

A ma très chère MAMAN Nadjet

Symbole de la bonté, la source de tendresse, lumière de mes yeux qui a œuvré pour ma réussite, ma mère qui a été toujours à mes côtés et m' a toujours soutenue tout au long de ces longues années d' études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce qu' elle mérite pour tous les sacrifices qu' elle n' a cessé de me donner, que Dieu te garde pour moi **Maman**.

A mon très cher Papa Kamel

Qui a toujours cru en moi, aucune dédicace ne saurait exprimer le dévouement et le respect, que j' ai toujours eu pour lui. Je le remercie vivement pour son soutien permanent que Dieu te bénisse et te garde pour moi **Papa**.

A mes frères Hakim et Chakib

Qui m' ont énormément soutenu et à qui je souhaite beaucoup de réussites et de succès

A mes grand-mères Ouardia et Saadia

Que ce travail, soit l' expression des vœux qu' elles n' ont cessés de formuler dans leurs prières. Aucun mot ne pourrait exprimer l' attachement, l' amour et la tendresse que j' éprouve pour elles, je vous souhaite une longue vie pleine de joie, de bonheur et beaucoup de santé.

Je ne peux clôturer cette dédicace sans remercier ma chère famille ainsi que ma cousine Celia, mes chères amies et en particulier mon amie et binôme Nesrine, mon amie Maroua, au nom des souvenirs qu' on a partagés ensemble, je n' oublierai jamais l' expérience que j' ai vécue avec elles.

AIT OUALI LINA

الملخص

المتفطرات هي كائنات حية دقيقة مسببة لأمراض عند الانسان والحيوان. استزراع وعزل متفطرات تركيبة السل يتم على مستوى الوسط الزراعي Lowenstein-Jensen الصلب. هذا الاستزراع معقد ومتعب للغاية ويستغرق وقتا طويلا للنمو (عدة أسابيع)، مما يؤثر سلبا على العلاج والرعاية الصحية للمرضى، وخاصة فيما يتعلق انتقال المرض (مرض معدي). لذلك هدفنا هو تحسين كفاءة هذا الوسط عن طريق اثرائه بالدم أو مشتقات الدم (البلازما والمصل) من أصل بشري أو من الخيل في حالة وجود أو عدم وجود Pyruvate لتحسين حساسيته. تم تقييم فعالية وأداء وسائط استنبات التي تم تطويرها عن طريق استنبات سلالات مرجعية (*M. Bovis*، *M. Tuberculosis H37Rv* و *M. Tuberculosis* سلالة تم عزلها من مريض خلال فترة حضانة تتراوح من 30 يوم على الأقل إلى 48 يوم كحد أقصى. النتائج التي تم الحصول عليها مشجعة للغاية وأظهرت انخفاضا في وقت الحضانة (10 أيام) مع نمو سريع للبكتيريا مقارنة مع وسط LJ القياسي (15 يوم).

الكلمات المفتاحية: Lowenstein-Jensen، الدم، السل، المتفطرات، *M. tuberculosis H37Rv*، *M. bovis*

Résumé

Les mycobactéries sont des microorganismes responsables de maladies chez l'homme et chez les animaux. La culture et l'isolement des mycobactéries du complexe tuberculosis se fait sur un milieu standard spécifique, le milieu Lowenstein-Jensen (LJ) solide. Cette culture est particulièrement laborieuse et fastidieuse avec en outre, une longue durée d'incubation (plusieurs semaines), un déterminant important dans le retard du délai dans la prise en charge du sujet malade, son traitement et surtout la transmission de la maladie (maladie contagieuse). De ce fait, notre objectif consiste à améliorer l'efficacité du milieu LJ standard par son enrichissement avec du sang ou dérivé du sang (plasma et sérum) d'origine humaine ou équine en présence ou non du pyruvate pour améliorer sa sensibilité. L'efficacité et la performance des différents milieux de culture LJ modifiés ainsi produits ont été évaluées par la culture de souches de référence (*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, *Mycobacterium bovis*) et une souche de *M. tuberculosis* collectée chez un malade et ce sur une durée d'incubation allant d'un minimum de 30 jours à un maximum de 48 jours. Les résultats ainsi obtenus ont été très encourageants et ont démontré une réduction du temps d'incubation (10 jours) avec une croissance bactérienne rapide comparé au milieu LJ standard (15 jours).

Mots clés : Lowenstein-Jensen, sang, mycobactéries, Tuberculose, *M. bovis*, *M. tuberculosis H37Rv*.

Abstract

Mycobacteria are microorganisms that cause disease in humans and animals. The culture and isolation of *Mycobacterium tuberculosis* complex is performed on a specific standard medium, the solid Lowenstein-Jensen (LJ) medium. This culture is particularly laborious and tedious, with a long incubation time (several weeks), which is an important determinant in delaying the management of the sick individual, their treatment, and especially the propagation of the disease (contagious disease). Therefore, our goal is to improve the efficiency of standard LJ medium by enriching it with blood or blood derivative (plasma and serum) of human or equine origin in the presence or absence of pyruvate to enhance its sensitivity. The efficacy and performance of the different modified LJ culture media were evaluated by culturing references strains (*Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, *Mycobacterium bovis*), and a strain of *M. tuberculosis* collected from a patient, over a period of incubation ranging from a minimum of 30 days to a maximum of 48 days. Results obtained were very encouraging and demonstrated a reduction in the incubation time (10 day) with rapid bacterial growth compared to standard LJ medium (15 days).

Key-words: Lowenstein-Jensen, blood, mycobacteria, tuberculosis, *M. bovis*, *M. tuberculosis*.

Sommaire

Liste des figures	IV
Liste des tableaux	V
Liste des abréviations.....	VI
Introduction	1

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur les mycobactéries et leurs infections	4
1 Les mycobactéries	4
1.1 Mycobacterium du complexe tuberculosis	4
1.1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Bacille de Koch).....	5
1.1.2. <i>Mycobacterium bovis</i>	5
1.1.3. Tuberculose.....	6
1.2. Les mycobactéries atypiques ou mycobactéries non tuberculosis (MNT)	9
1.2.1. Les Mycobactérioses atypiques ou mycobactérioses.....	10
1.3. <i>Mycobacterium leprae</i> (bacille de Hansen)	12
1.3.1. Lèpre.....	12
Chapitre 2 : les milieux de culture	14
2.1. Généralités	14
2.2. Composition d'un milieu de culture	14
2.3. Classification.....	15
2.4. Etude de milieu Lowenstein-Jensen.....	17
2.4.1. Définition.....	17
2.4.2. Composition et préparation du milieu Lowenstein-Jensen (pour 1600 mL).....	18
Chapitre 3 : Le sang	19
3.1. Définition du sang.....	19
3.2. Composition du sang	19

Deuxième partie : Matériel et méthodes

1 Description du laboratoire des milieux de culture (Annexe Pasteur EL-HAMMA)	22
2. Matériel	23
2.1. Produits biologiques	23
2.1.1. Souches tests	23
2.1.1.1. Souches de Mycobacterium	23
2.1.2 Le sang	23
2.1.3. Œufs de poule frais	23
2.2 Produit non biologique	23
2.2.1. Poudre de base pour la préparation de milieu standard LJ	23
3. Méthodes	24
3.1. Préparations initiales	24
3.1.1. Prélèvement et collecte du sang humain	24
3.1.2 Prélèvement du sang de cheval	25
3.1.3. Préparation de la suspension d'œufs	26
3.2. Préparation du milieu Lowenstein-Jensen standard de base	26
3.3. Préparation de milieux Lowenstein-Jensen modifiés	27
3.3.1. Préparation de milieux LJ modifiés à base du sang humain et le milieu LJ modifié à base du sang de cheval	28
3.3.2. Préparation de milieu LJ modifié a base du plasma humain et du sérum de cheval	28
3.3.3. Préparation de milieu LJ standard additionné de sang et de pyruvate	29
3.4. Contrôle de la qualité des milieux de culture Lowenstein-Jensen préparés	30
3.4.1. Contrôle physico-chimique	30
3.4.2. Contrôle de stérilité	30
3.4.3. Contrôle de fertilité	30
3.4.3.1. Méthode d'ensemencement des souches tests	31

Troisième partie : Résultats et Discussion

3. Résultats	35
3.1. Résultats du contrôle physique (LJ standard et modifié)	35
3.2. Résultats du contrôle de qualité	36
3.2.1. Résultats du contrôle de stérilité	36
3.2.2. Résultats du contrôle de fertilité des milieux de culture préparés pour les différentes souches ensemencées	36
3.3. Caractères culturaux des souches de <i>Mycobacterium</i> étudiées sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés)	40

2. Discussion	42
Conclusion	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

Liste des figures

Figure 1: Incidence de la tuberculose en Algérie en 2017	7
Figure 2 : a) Lèpre tuberculoïde avec des taches décolorées insensibles, b) Lèpre lépromateuse avec le faciès léonin	13
Figure 3 : Étapes de prélèvement de sang d'un donneur.....	25
Figure 4: Séparation du plasma humain par centrifugation	25
Figure 5 : Les étapes de préparation du sérum de cheval.....	26
Figure 6 : Étapes de préparation du milieu lowenstein jensen standard	27
Figure 7 : Préparation des milieux de culture LJ modifié à base de sang et dérivés De sang.....	29
Figure 8 : Préparation de milieu LJ modifié à base de pyruvate et sang humain.....	29
Figure 9: Méthode de préparation de la solution mère des souches de mycobactéries à tester	31
Figure 10 : Détermination de la densité de la solution mère.....	31
Figure 11 : Préparation des dilutions et l'ensemencement des souches tests.....	32
Figure 12: Mise en culture en souches de mycobacteriums	33

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales catégories de mycobactéries en fonction de leur pouvoir pathogène.	4
Tableau 2 : Composition de la poudre de base de préparation du milieu LJ	24
Tableau 3 : La composition des milieux de culture LJ standard et modifiés.....	27
Tableau 4 : Résultats du contrôle physique	35
Tableau 5 : Résultats de l'ensemencement de la solution mère de la souche de référence H37Rv sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés).....	36
Tableau 6 : Résultats de l'ensemencement de la dilution 10^{-2} de la souche de référence H37Rv sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés).....	37
Tableau 7 : Résultats de l'ensemencement de la solution mère de la souche de référence <i>M. bovis</i> sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés).....	37
Tableau 8 : Résultats de l'ensemencement de la dilution 10^{-2} de la souche de référence <i>M. bovis</i> sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés).....	38
Tableau 9 : Résultats de l'ensemencement de la solution mère de la souche de <i>M. tuberculosis</i> isolée d'un malade sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés)	39
Tableau 10 : Résultats de l'ensemencement de la dilution 10^{-2} de la de la souche de <i>M. tuberculosis</i> isolée d'un malade sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés).	40
Tableau 11 : Caractères cultureux des souches de mycobacterium ensemencées.....	41

Liste des abréviations

BAAR: Bacille acido-alcool résistant

BK : Bacille de Koch

IPA : Institut Pasteur d'Algérie

J : jours

LJ : Lowenstein-Jensen

LJm : Lowenstein-Jensen modifié

LJPH : Lowenstein-Jensen à base du plasma humain

LJs : Lowenstein-jensen standard

LJSC : Lowenstein-Jensen à base du sang de cheval

LJSH : Lowenstein-Jensen à base du sang humain

LJSRC : Lowenstein-Jensen à base du sérum de cheval

LJSHP : Lowenstein-Jensen à base du sang humain et du pyruvate

M: Mycobacterium

MNT: Mycobacterium non tuberculosis

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

TB: Tuberculose

TEP: Tuberculose Extra-pulmonaire

VIH : Le virus de l'immunodéficience humaine

Introduction

Les mycobactéries (genre *Mycobacterium*) sont des agents pathogènes responsables de maladies chez l'homme et chez les animaux. Par leurs aspects cliniques, épidémiologiques, les infections dues à des mycobactéries peuvent être divisées en trois grands groupes : la tuberculose dont les agents étiologiques sont les bacilles tuberculeux ou mycobactéries du complexe tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, etc.), les mycobactérioses provoquées par les mycobactéries commensales dites « atypiques » (*M. avium*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, etc.) et la lèpre (*Mycobacterium leprae*) (Martin et Denis, 2013).

La culture des mycobactéries nécessite le recours à des milieux spécifiques et complexes riches avec de plus, un apport de lipides. Ainsi, le milieu le plus utilisé pour l'ensemencement des produits pathologiques est le milieu Lowenstein-Jensen (LJ) solide. *M. tuberculosis*, *M. avium* et d'autres mycobactéries atypiques nécessite du glycérol pour leur croissance tandis que pour la croissance de *M. bovis*, le glycérol est remplacé par du pyruvate de sodium (0,4%) suggérant ainsi, l'inoculation de variantes de milieux LJ. Par ailleurs, le milieu de culture doit être supplémenté d'agents décontaminant comme le cycloheximide (400 µg/ml), lincomycine (2µg/ml), acide nalidixique (35µg/ml) pour le rendre plus sélectif (Markey et al. 2013).

En outre, le milieu Lowenstein-Jensen, bien que favorable au développement des mycobactéries du groupe tuberculosis, ne répond que partiellement à nos attentes sur le plan diagnostique compte tenu du taux d'isolement et de la longue durée d'incubation (jusqu'à 8 semaines) ce qui constitue un facteur limitant la précocité pour la prise en charge du sujet malade et des sujets contacts (Gomgnimbou et al. 2020).

Ces dernières années, de nombreuses études se sont concentrées sur la mise en évidence d'approches de diagnostic plus efficaces et rapides. Ainsi, Essawy et al. (2014) ont rapporté une différence statistiquement significative de la croissance des bacilles de *M. tuberculosis* dans leur étude comparative entre le milieu LJ solide ($23,6 \pm 8,1$ jours) contre des systèmes de culture sur milieu liquide MGIT (mycobacteria growth indicator tube) et Bio-FM (milieu Middlebrook 7H9 enrichi) avec respectivement, une moyenne de ($10,7 \pm 2,9$ jours) et ($11,1 \pm 4,3$ jours). De même, Palange et al. (2016) ont mentionné un temps d'isolement plus court (18,4 jours) des souches de *M. tuberculosis* issues de prélèvements pulmonaires et extra-pulmonaires sur de la gélose au sang (5% de sang de mouton) contre 35

jours pour le milieu Lowenstein-Jensen. Ces auteurs ont de plus, observé que le milieu gélose au sang peut être utilisé comme milieu de culture pour l'isolement de routine des mycobactéries dans les environnements aux ressources limitées, mais en raison du taux de contamination accru (7,2 %) comparé au milieu LJ (4,8 %), les laboratoires doivent suivre des procédures améliorées pour la décontamination des échantillons.

Notre objectif consiste à améliorer l'efficacité du milieu LJ standard par son enrichissement avec du sang ou dérivé du sang (plasma et sérum) d'origine humaine ou équine en présence ou non du pyruvate pour améliorer sa sensibilité. L'efficacité et la performance des différents milieux de culture LJ modifiés

Notre travail réparti comme suit :

- 1- Formulation de différents milieux de culture LJ modifiés par enrichissement : LJ + sang humain, LJ + sang de cheval, LJ + sérum de cheval, LJ + plasma humain, et LJ + sang humain + pyruvate.

- 2- Evaluation de la qualité et performance de ces milieux comparés au milieu (LJ) standard par culture de souches de référence (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Mycobacterium bovis*) et une souche de *M. tuberculosis* collectée chez un malade sur une durée d'incubation de 30 à 48 jours.

Première partie
Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur les mycobactéries et leurs infections

1. Les mycobactéries

Les mycobactéries sont des bacilles aérobies stricts fins, appartenant à l'ordre des Actinomycétales et en particulier à la famille des *Mycobacteriaceae* qui ne comprend qu'un seul genre : le genre *Mycobacterium*. Ce sont des agents pathogènes responsables de diverses infections ; elles sont présentes dans divers environnements tels que le sol, l'eau et l'air, et certaines espèces peuvent également infecter les humains, les animaux et les plantes. Elles sont caractérisées par une propriété tinctoriale essentielle, en particulier le caractère de bacille acido-alcool- résistant (BAAR). Cette propriété est due à la richesse de leur paroi en lipides qui les rend imperméables aux colorants usuels, mais qui fixe à l'intérieur les colorants alcalins comme la fuschine basique et s'oppose à leur décoloration après un traitement conjoint par l'acide et l'alcool (**Grosset *et al.*, 1990**).

Le tableau 1 résume les principales catégories de mycobactéries définies en fonction de leur pouvoir pathogène.

Tableau 1 : Les principales catégories de mycobactéries en fonction de leur pouvoir pathogène.

Première catégorie	Deuxième catégorie	Troisième catégorie
Le complexe des tuberculosis	Les mycobactéries atypiques (MNT)	<i>Mycobacterium leprae</i>
- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> - <i>Mycobacterium bovis</i> - <i>Mycobacterium africanum</i> - <i>Mycobacterium Canetti</i> - <i>Mycobacterium microti</i>	- <i>Mycobacterium avium intracellulaire</i> - <i>M. kansasii</i> - <i>M. xenopi</i> - <i>Mycobacterium ulcerans</i> - <i>Mycobacterium marinum</i>	Bacille responsable de la maladie infectieuse chronique : la lèpre.

1.1. *Mycobacterium* du complexe tuberculosis

Première partie : Synthèse bibliographique

Regroupe plusieurs espèces de bactéries du genre *Mycobacterium* en raison de leurs similitudes génétiques dont *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis*. Chacune de ces espèces présente des caractéristiques et des impacts différents sur la santé humaine et animale (Grosset *et al.*, 1990).

1.1.1. *Mycobacterium tuberculosis* (Bacille de Koch)

Bacille de la famille des *Mycobacteriaceae*, cette espèce est connue sous le nom de bacille de Koch en référence à Robert Koch, le chercheur auteur de sa découverte. Il s'agit de l'agent pathogène causal de la tuberculose chez l'homme. C'est une bactérie non mobile, aérobique, en forme de bâtonnet. Les cellules de *Mycobacterium tuberculosis* se multiplient relativement lentement avec un temps de dédoublement moyen qui varie de 13 à 20 heures par rapport à d'autres bactéries. Sur milieu de culture Lowenstein-Jensen solide, elle donne des colonies de grande taille en forme de chou-fleur, de couleur crème-beige, avec une surface sèche et rugueuse. La croissance de ces colonies prend généralement de 21 à 28 jours (Grosset *et al.*, 1990).

Ce bacille se transmet principalement par voie aérienne, lorsque des personnes infectées émettent des gouttelettes contenant les bactéries par la toux, les éternuements ou la parole. La tuberculose humaine est une maladie grave qui affecte principalement les poumons, mais peut également toucher d'autres parties du corps (Huang *et al.*, 2019).

Dans la cellule hôte (l'homme), la survie de cette bactérie est alimentée par des acides gras et du cholestérol. Elle est capable de parasiter les macrophages de son hôte, son succès est dû à sa capacité à manipuler le phagosome dans lequel il réside et à empêcher cet organe de mûrir normalement dans un compartiment hydrolytique acide (Suarez, 2019).

Mycobacterium tuberculosis est naturellement sensible à l'isoniazide, un médicament antituberculeux couramment utilisé. Cependant, des souches résistantes à l'isoniazide peuvent émerger. La résistance à l'isoniazide est souvent associée à une réduction ou à une absence d'activité catalasique dans la bactérie (Grosset *et al.*, 1990).

1.1.2. *Mycobacterium bovis*

Cette espèce est responsable de la tuberculose bovine ; elle peut causer des lésions tuberculeuses pulmonaires chez les bovins ainsi que des lésions des glandes mammaires. Les bovins infectés peuvent excréter les bactéries dans le lait. Cette zoonose peut également infecter d'autres mammifères, y compris les humains, qui peuvent contracter la maladie en

Première partie : Synthèse bibliographique

inhalant des particules infectées présentes dans les étables ou par la consommation de viande contaminée ou les produits laitiers non pasteurisé. *M. bovis* est considéré comme micro-aérophile, nécessite des niveaux d'oxygène plus bas par rapport à *M. tuberculosis*. En culture sur milieu de Lowenstein-Jensen solide, les colonies sont petites, apigmentées (sans pigmentation), lisses et brillantes. Elles ont une taille ne dépassant pas celle d'une tête d'épingle, à moins que le milieu de culture ne soit enrichi en pyruvate de sodium (0,2 à 0,3 %). Dans ce cas, après repiquage, la croissance peut être plus rapide et les colonies peuvent devenir rugueuses et bien développées. Contrairement à *M. tuberculosis*, l'espèce *M. bovis* est sensible à l'hydrazide de l'acide thiophène carboxylique (TCH), un médicament antituberculeux. Cette souche ne possède pas d'activité nitrate réductase et n'accumule pas suffisamment de niacine pour donner un résultat positif au test niacine, ce qui le distingue de *M. tuberculosis*. De plus, sa croissance peut être inhibée par de fortes concentrations de glycérol (Cedenio *et al.*, 2005).

D'autres bactéries font partie du complexe tuberculosis, on cite :

- *Mycobacterium africanum* : est une espèce qui cause également la tuberculose chez l'homme, principalement en Afrique. Bien qu'elle soit moins fréquente en Europe, des cas d'infection par cette espèce peuvent survenir chez certaines populations (Grosset *et al.*, 1990).
- *Mycobacterium microti* : est une espèce qui infecte principalement les rongeurs et les bovins. Elle est considérée comme peu pathogène pour l'homme (Frota *et al.*, 2004).
- *Mycobacterium Canetti* : est une espèce rarement associée à la tuberculose. Les cas d'infection par cette espèce ont été principalement signalés en Afrique (Ali Akbar, 2017).

1.1.3. Tuberculose

1.1.3.1. Définition

La tuberculose est une maladie aussi vieille que l'humanité. Elle constitue un problème de santé mondiale qui peut s'aggraver jusqu'à la mort. Elle compte parmi les 10 principales causes de décès dans le monde, et est causée par *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis* (Gomgnimbou *et al.*, 2020).

Première partie : Synthèse bibliographique

La transmission de la tuberculose se produit par l'inhalation des microgouttelettes secrétées par un patient atteint de la tuberculose active lorsqu'il tousse. La bactérie peut survivre de manière intracellulaire sans provoquer de symptômes cliniques en premier lieu (quiescence), mais les enfants et les individus immunodéprimés peuvent développer des symptômes cliniques peu de temps après l'infection (**Churchyard et al., 2017**).

1.1.3.2. Epidémiologie

En 2018, le nombre de cas de tuberculose a été estimé à 10 millions avec environ 1,3 millions de décès dans le monde. La tuberculose est l'une des 10 premières causes de la mort dans le monde. Selon l'OMS, 10 millions de personnes développent chaque année une forme active de la maladie (**Gomgnimbou et al., 2020**).

En Algérie, la tuberculose est une pathologie fréquente, son incidence en 2018 était de 13,8 cas pour 100 000 habitants pour la tuberculose pulmonaire (TP) et 38,4 cas pour 100 000 habitants pour la tuberculose extra-pulmonaire (TEP) (**Mouhoub, 2020**). La figure 1 montre l'incidence de la tuberculose en Algérie sur la période de 2017 (**Bentata, 2018**).

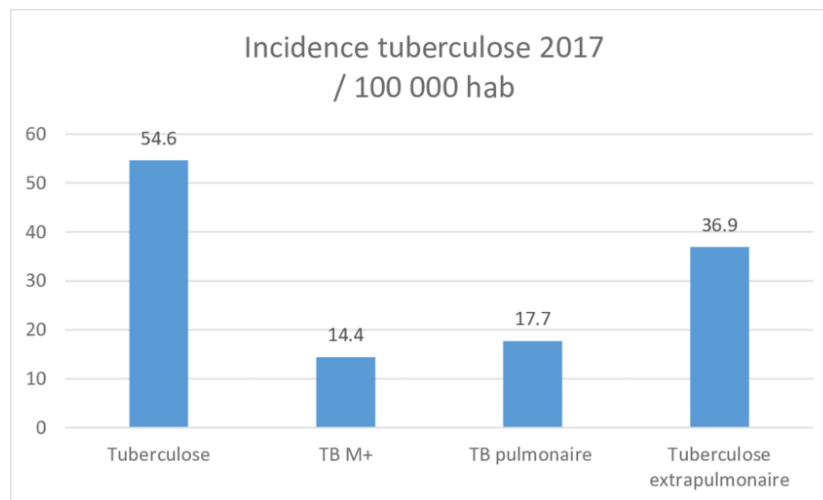


Figure 1 : Incidence de la tuberculose en Algérie en 2017 (**Bentata, 2018**).

1.1.3.3. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques diffèrent en fonction du type de l'infection de la tuberculose observée (**Suarez et al., 2019**) :

- **TB pulmonaire**

La tuberculose est principalement une pneumonie (altération du tissu pulmonaire). Les symptômes de cette infection comprennent une fièvre, des sueurs nocturnes, une fatigue

Première partie : Synthèse bibliographique

anormale, une toux productive et une hémoptysie. Cette maladie évolue lentement chez les individus immunocompétents, mais une tuberculose fulminante d'apparition brutale apparaît chez les enfants et chez les immunodéprimés.

- **TB extra-pulmonaire et disséminé**

La tuberculose peut toucher tous les autres organes, les symptômes cliniques sont déterminés par le ou les organes impliqués. Il existe aussi la tuberculose miliaire qui est une infection généralisée dans tout le corps.

- **Infection latente de tuberculose**

La personne infectée ne présente pas de symptômes de la maladie, les agents pathogènes étant en état de quiescence. Cette infection n'est pas contagieuse.

1.1.3.4. Diagnostic

- Pour les personnes infectées par la tuberculose latente, on utilise les tests de libération d'interféron gamma (TLIG). Dans ce cas, les lymphocytes T sont stimulés par les antigènes spécifiques de la tuberculose causant la sécrétion de l'interféron gamma qui sera détecté. La TLIG ne s'applique pas au diagnostic de la tuberculose cliniquement manifeste, car elle ne peut pas différencier entre la tuberculose latente et active (**Suarez *et al.*, 2019**).

- Dans le cas de la tuberculose active, les tests sont basés sur l'observation microscopique directe de l'agent pathogène, la culture et les tests d'amplification des acides nucléiques. L'échantillon doit être obtenu et testé avant de débiter le traitement. La tuberculose pulmonaire est exclue si on ne peut pas trouver des bâtonnets acido-résistants dans le test microscopique des échantillons d'expectoration prélevés sur 3 jours différents. Il existe aussi la microscopie d'échantillons de crachats, de sécrétions bronchiques ou de liquide de lavage broncho-alvéolaire. Ces tests sont économiques, rapides et un marqueur de l'intentionniste de malade. En cas de suspicion de la tuberculose extra-pulmonaire, des prélèvements, des échantillons de biopsie ou des liquides organiques doivent être examinés (urines, selles, sperme, etc.) (**Suarez *et al.*, 2019**).

- Chez les animaux, le diagnostic de la tuberculose à l'abattoir est basé essentiellement sur l'existence de lésions macroscopiques évocatrices de la maladie. C'est pour cela, vu l'ampleur des saisies d'abattoir et l'importance de la maladie chez le bétail, ainsi que son caractère zoonotique, des études ont été menées pour réaliser l'isolement et la caractérisation de *M. bovis* à partir de carcasses de bovins présentant des lésions suspectes de tuberculose (**Cedenio *et al.*, 2004**).

Première partie : Synthèse bibliographique

- *Mycobacterium tuberculosis* présente une activité nitrate réductase et accumule de l'acide nicotinique (niacine). Ces caractéristiques peuvent être utilisées dans des tests diagnostiques, tels que l'épreuve de Konno ou le niacine-test, pour identifier la présence de *Mycobacterium tuberculosis*. A l'inverse, *M. bovis* ne possède pas d'activité nitrate réductase et n'accumule pas suffisamment de niacine pour donner un résultat positif au niacine-test, ce qui le distingue de *M. tuberculosis*. De plus, sa croissance peut être inhibée par de fortes concentrations de glycérol (Suarez *et al.*, 2019).

1.1.3.5. Traitement

Le traitement de cette maladie est adapté selon le type de la tuberculose identifiée (Suarez *et al.*, 2019).

- **TB pulmonaire** : deux (02) mois de quadruple thérapie avec l'isoniazide, rifampicine, ethambutol et pyrazinamide plus 4 mois supplémentaires en utilisant une double administration d'isoniazide et rifampicine.
- **TB extra-pulmonaire** : nécessite un traitement plus long que celui de la tuberculose pulmonaire (TB ganglionnaires 6 mois, TB articulaire ou osseuse 9 mois, système nerveux central 12 mois).
- **TB disséminés** : la durée de traitement doit être adaptée en fonction de l'évolution de la maladie chez le patient.

1.2. Les mycobactéries atypiques ou mycobactéries non tuberculosis (MNT)

Elles font référence à un groupe de bactéries du genre *Mycobacterium* qui ont des caractéristiques particulières par rapport aux mycobactéries du complexe de la tuberculose. Contrairement à ces dernières qui sont pathogènes pour l'homme, les mycobactéries atypiques sont généralement considérées comme des espèces saprophytes ; elles sont rencontrées dans l'environnement et ne possèdent aucun pouvoir pathogène significatif chez les individus en bonne santé. Il n'y a pas de réservoir humain. Les MA le plus souvent incriminées sont : *M. kansasii*, responsable d'une infection proche de la tuberculose, *M. avium* sp avium, *M. ulcerans*, *M. marium*, *bénignes*, *M. chlonoi*, *M. fortuitum*, *M. xenopi* (Schmutz, 2008).

Première partie : Synthèse bibliographique

Cependant, certaines mycobactéries atypiques peuvent devenir opportunistes ubiquitaires isolées de l'eau, de la terre, des végétaux et de nombreux animaux tant domestiques que sauvages et causer des infections chez les personnes dont les défenses immunitaires sont affaiblies, telles que les personnes immunodéprimées ou atteintes du VIH. Ces infections sont appelées mycobactérioses (**Frota *et al.*, 2004**).

Par ailleurs, les mycobactéries atypiques (ou MNT) se distinguent des bacilles de la tuberculose par leurs caractères morphologiques, cultureux et biochimiques ainsi que par leur sensibilité aux antibiotiques. Elles possèdent habituellement une activité catalasique thermostable et sont résistantes ou pas. Plus de cinquante espèces (50) ont été décrites. Par commodité, on peut les grouper selon la classification proposée par Runyon en 1959 qui ne tient compte ni de leur pouvoir pathogène naturel ni de leurs relations phylogénétiques, mais qui repose sur deux caractères bactériologiques simples : la vitesse de croissance (plus ou moins 7 jours) et la pigmentation des colonies (**Schmutz, 2008**).

1.2.1. Les mycobactérioses atypiques ou mycobactérioses

1.2.1.1. Définition

Egalement appelées infections à mycobactéries non tuberculeuses, elles peuvent être rencontrées dans l'environnement. Les mycobactérioses sont des maladies rares et peu pathogènes ; elles sont causées par des mycobactéries non tuberculeuses et non lépreuses. Ces infections sont très fréquentes chez les sujets porteurs du VIH et avec un taux de CD4 très bas avec donc un système immunitaire affaibli (**Truffot-Pernot *et al.*, 1991**).

1.2.1.2. Épidémiologie

Les infections pulmonaires à mycobactéries atypiques constituent un problème de santé publique à degré variable selon les régions du monde. En France, l'isolement des souches de mycobactéries responsables des infections est 10 fois moins fréquent que celui de *Mycobacterium tuberculosis* (**Truffot-Pernot *et al.*, 1991**). En Amérique du Nord, les taux de l'infection et de la maladie varient de 1 à 15 et de 0,1 à 2 pour 100 000 habitants. En Afrique, les seules études communautaires disponibles ont été réalisées en Afrique du Sud. Plusieurs facteurs de risque spécifique ont été identifiés dans différentes études parmi lesquels le VIH/SIDA, les maladies chroniques pulmonaire, etc. (**Zida *et al.*, 2014**).

Première partie : Synthèse bibliographique

1.2.1.3. Symptômes

Les infections à mycobactérioses atypiques peuvent toucher tous les organes. Elles sont localisées chez les sujets immunocompétents au niveau des poumons et des ganglions (Truffot -Pernot *et al.*, 1991).

- Pulmonaire : toux sèches à une discrète dyspnée ou à une expectoration, décalage thermiques, des sueurs nocturnes, amaigrissement.
- Ganglionnaires : adénopathies légèrement douloureuses.
- Digestives : diarrhée
- Cutanées, sous cutanée ou articulaires.

Mycobacterium avium intracellulaire, *Mycobacterium kansasii* et *Mycobacterium xenopi* représentent les espèces de mycobactéries atypiques les plus couramment associées aux infections humaines. Ces espèces peuvent provoquer diverses manifestations cliniques chez les personnes immunodéprimées, telles que des infections pulmonaires, des infections cutanées et des infections disséminées. Par ailleurs, *Mycobacterium ulcerans* représente une espèce pathogène notable, car elle est la seule souche connue pour la production d'une toxine. Elle est responsable de l'ulcère de Buruli, une maladie infectieuse qui provoque des lésions cutanées graves. En outre, *Mycobacterium marinum* est une autre mycobactérie atypique qui présente un pouvoir pathogène cutané chez l'homme. Elle est souvent associée à des infections cutanées après une exposition à des environnements aquatiques, tels que des aquariums ou des piscines (Frota *et al.*, 2004).

1.2.1.4. Diagnostic

Le diagnostic s'appuie sur l'association des critères cliniques, radiologique et microbiologique. Le diagnostic est plus ou moins probable selon l'espèce isolée (Grosset *et al.*, 1991).

1.2.1.5. Traitement des mycobactérioses atypiques

Le traitement est long et émaillé de problèmes de tolérance. Ainsi, pour *M. avium* intracellulaire et *M. kansasii*, le traitement est bien codifié avec respectivement l'association clarithromycine-rifampicine-ethambutol et l'association isoniazide-rifampicine-ethambutol. Pour *M. xenopi*, le traitement optimal n'est pas connu et l'association clarithromycine-

Première partie : Synthèse bibliographique

rifampicine-ethambutol, avec en alternative la moxifloxacine, est actuellement recommandée (Grosset *et al.*, 1991).

1.3. *Mycobacterium leprae* (bacille de Hansen)

Mycobacterium leprae ou bacille de Hansen est une bactérie à Gram positif et acido-alcool-résistant (BAAR) de 1 à 8 µm / 0,3 à 0,5 µm, bâtonnet rouge (coloration de Ziehl-Neelsen), non cultivable *in vitro*, inoculable à la souris et au tatou. Le séquençage complet du génome de *M. leprae* a été réalisé en 2001 (Bobin, 2007). Sa découverte a permis de mieux connaître *M. leprae*, bacille à croissance intracellulaire obligatoire avec un fort tropisme pour les macrophages et les cellules de Schwann (Flageul, 2011). La transmission de *M. leprae* est essentiellement directe. Le portage nasal (mouche, crachats, aérosol) est à l'origine de la dissémination. La voie de pénétration peut être cutanée, mais c'est la voie respiratoire qui joue un rôle prépondérant (Bobin, 2007).

1.3.1. La lèpre

1.3.1.1. Définition de la lèpre

La lèpre ou maladie de HANSEN est une maladie bactérienne chronique infectieuse causée par l'espèce *Mycobacterium leprae* et *Mycobacterium lepromatosis*. Elle affecte la peau, les nerfs périphériques et les os (Berche, 2019).

1.3.1.2. Épidémiologie

Les principaux foyers infectés sont l'Inde, l'Asie du Sud-Est, la Chine, l'Afrique noire, l'île de Madagascar et l'Amérique latine (Brésil, Mexique) (Berche, 2019).

Selon une étude récente menée au Tchad sur la période de 2015 à 2019, 1896 nouveaux cas de lèpre ont été enregistrés à l'échelle nationale. La moyenne d'âge des patients était de 38 ans. La proportion des patients âgés entre 15 et 70 ans et celle des enfants de moins de 15 ans était respectivement de 92,08% et 7,92%. En outre, pour l'année 2019, 446 nouveaux cas de lèpre, ont été signalés, représentant un taux de prévalence de 0,26/10 000 habitants au niveau national (Kabo *et al.*, 2022).

Une étude antérieure réalisée en Guyane sur la période 2007-2014, avait montré une réémergence de la pathologie, notamment chez des orpailleurs d'origine brésilienne, franchissant le seuil de prévalence de 1/10 000 habitants définissant selon l'OMS un problème de santé publique significatif. Toutefois, la prévalence annuelle de cette maladie ne

Première partie : Synthèse bibliographique

dépassait jamais le seuil de 1/10 000 habitants sur la période 2015-2021, atteignant un pic proche de 1,0 pour les années 2016 et 2019 (Petiot *et al*, 2022).

1.3.1.3. Symptômes

Les symptômes incluent des taches cutanées claires prédominant au visage accompagnées d'une perte de sensibilité cutanée et d'une hypertrophie inflammatoire des gros troncs nerveux aboutissant à des paralysies. Il existe plusieurs formes de la lèpre (Berche, 2019).

- Lèpre tuberculoïde : peu ou pas contagieuse, l'évolution est lente et peu sévère (figure 2 a).
- Lèpre lépromateuse : est une forme plus sévère de la maladie, contagieuse (figure 2 b)
- Lèpre lépromateuse diffuse : est une forme grave de la lèpre lépromateuse.



Figure 2: a) lèpre tuberculoïde avec des taches décolorées insensibles ; b) lèpre lépromateuse avec le faciès léonin (Berche, 2019).

1.3.1.4. Diagnostic

Le diagnostic de la lèpre peut être difficile, car les symptômes peuvent varier d'une personne à l'autre. Dans certains cas, il est posé par un simple critère clinique pathognomonique de la maladie, mais parfois il nécessite la confrontation de deux ou plusieurs critères. La nature de ces critères est directement liée au mécanisme même du développement de la maladie (lésions cutanées, des nodules nerveux, etc.) (Flageul, 2011).

1.3.1.5. Traitement

L'antibiothérapie de la lèpre est très efficace, associant 3 agents antibactériens : rifampicine, clofazimine et disulone (Berche, 2019).

Chapitre 2 : Les milieux de culture

Première partie : Synthèse bibliographique

2.1. Généralités

Un milieu de culture est une préparation ou mélange de substance, sous forme liquide, semi solide ou solide ; il contient des constituants naturels et/ou synthétiques qui répondent aux besoins nutritionnels des micro-organismes en vue de leur croissance et multiplication dans des conditions « *in vitro* ». Dans les conditions naturelles de l'environnement, les microorganismes s'adaptent généralement aux habitats les plus favorables à leurs besoins. En revanche, en laboratoire, ces besoins doivent être satisfaits par un milieu de culture. Il s'agit en fait d'une solution aqueuse à laquelle ont été ajoutés tous les nutriments nécessaires. Les milieux de culture peuvent être préparés à partir de matières premières en fonction de leur composition, mais il existe aujourd'hui des milieux déshydratés et prêts à l'emploi (**Chihan et Jindal, 2020**).

2.2. Composition d'un milieu de culture

Selon **Chihan et Jindan (2020)**, un milieu de culture doit satisfaire les besoins nutritifs du micro-organisme ; bien qu'en fonction du type et de la combinaison des nutriments, différentes catégories de milieux peuvent être créées, la composition générale d'un milieu reste la même et est comme suit :

- Solvant (généralement de l'eau distillée) ;
- Donneurs et accepteurs d'hydrogène ;
- Source de carbone ou source d'énergie (par exemple, glucose) ;
- Source d'azote (par exemple, hydrolysats de protéines ou peptones) ;
- Nutriments inorganiques (par exemple : carbone, hydrogène, oxygène, azote, soufre, phosphore, potassium, sodium, calcium, magnésium et fer) ;
- Oligo-éléments (par exemple : Mn, Mb, Cu, Co, Ni, Zn, V, B, Se, Si, W) ;
- Facteurs de croissance (par exemple : acides aminés, purines, pyrimidines, vitamines, sang, sérum) ;
- Agent de solidification, par exemple agar-agar ;
- Tampons (par exemple : phosphate de sodium ou de magnésium, sels d'acétate ou de citrate sont ajoutés pour maintenir le pH pendant la fermentation, mais peuvent chélater des métaux essentiels comme Fe^{2+}) ;
- Agents sélectifs (par exemple : produits chimiques toxiques, antibiotiques, colorants inhibiteurs) ;

Première partie : Synthèse bibliographique

- Colorants indicateurs (par exemple : rouge de phénol, rouge neutre, violet de bromocrésol pour indiquer les changements de pH des milieux, mais ils ne sont pas utilisés dans les milieux de culture). Toutefois, les colorants peuvent être toxiques pour les cellules sensibles ou stressées.

2.3. Classification

Différents types de milieux de culture sont définis selon le critère de classification utilisé (Vasanthakumari, 2016 ; Chihan et Jindan, 2020).

2.3.1. Selon la consistance (composition physique)

2.3.1.1. Milieu liquide ou bouillon

L'agar n'est pas ajouté lors de la préparation du milieu, la croissance se traduit par un trouble, des dépôts ou des voiles superficiels. Exemple : bouillon nutritif (BN), bouillon trypticase soja (TSB), Brain heart infusion broth (BHIB), etc.

2.3.1.2. Milieu solide ou gélose

Il est obtenu par addition d'un agent gélifiant au milieu liquide ; le gélifiant le plus utilisé est l'agar-agar ou gélose. Il s'agit d'un polygalactoside sulfaté présentant la propriété de former avec l'eau un gel solide à une température inférieure à environ 60 °C. Les milieux solides contiennent généralement 1,5-2% (15-20 g/L) d'agar-agar. Ils peuvent se présenter sous différentes formes : gélose inclinée en tubes à essai, culot en tube droit ou couche mince en boîtes de Pétri. La croissance des microorganismes se traduit par la formation des colonies. Exemple : Gélose nutritive (GN), Gélose trypticase soja (TSA), gélose Mac Conkey.

2.3.1.3 Milieu semi-solide

Les milieux semi-solides contiennent de l'agar-agar comme agent de solidification, mais à une concentration (généralement $\leq 1\%$) qui ne permet pas une solidification complète du milieu. Ces milieux sont utilisés dans les études de fermentation, pour déterminer la mobilité bactérienne, et dans la promotion de la croissance anaérobie.

2.3.1.4 Milieu biphasique

C'est un milieu qui présente une phase liquide (bouillon) et une phase solide (gélose). Exemple : Flacon de Castaneda, système biphasique Middlebrook (Chihan et Jindal, 2020).

Première partie : Synthèse bibliographique

2.3.2. Selon la composition chimique

2.3.2.1. Milieu de culture empirique / Complexe / indéfini

De composition connue seulement avec approximation, le milieu empirique contient des ingrédients complexes, tels que l'extrait de levure ou l'hydrolysate de caséine, dans des proportions inconnues. Ils peuvent être d'origine animale (œuf, lait, sérum, gélatine, etc.), d'origine végétale (peptone de soja, pomme de terre, etc.). On cite comme exemple : Bouillon LB, gélose Columbia, gélose Trypticase soja, Lowenstein Jensen.

2.3.2.2. Milieu de culture semi-synthétique

Ces milieux sont obtenus en ajoutant une substance naturelle à un milieu synthétique (exemple : extrait de levures). Leur composition est donc parfaitement connue que pour certains composés chimiques. Ils sont très nombreux et très utilisés actuellement.

2.3.2.3. Milieu de culture synthétique / défini

De composition exactement connue qualitativement et quantitativement, ces milieux sont surtout utilisés pour l'étude des bactéries autotrophes. Ils sont très utiles pour étudier la physiologie, la nature métabolique et les besoins nutritionnels des bactéries. Exemple : Gélose citrate de Simmons, milieu de glucose minéral.

2.3.3. Selon la fonction

2.3.3.1. Milieu de culture simple

Les milieux de culture simple ou de base, sont ceux qui peuvent être utilisés pour la culture de bactéries non exigeantes. Généralement utilisé dans le diagnostic de routine en laboratoire pour l'isolement primaire des bactéries. Ce type de milieu peut être rendu plus riche par l'ajout de suppléments, ou sélectif par l'ajout de concentrations variables de chlorure de sodium.

Exemple : Bouillon nutritif, gélose nutritive et eau peptonée.

2.3.3.2. Milieu de culture enrichi

Ce sont des milieux utilisés pour l'obtention des bactéries dites « exigeantes » en y ajoutant des suppléments sous forme de sang, de sérum, de jaune d'œuf, etc. Exemple : Gélose au sang frais, gélose au sang cuit.

2.3.3.3. Milieu sélectif et milieu d'enrichissement

- Un **milieu sélectif** est formulé pour inhiber la croissance de certaines espèces bactériennes. Ces milieux peuvent être formulés en ajoutant des agents sélectifs tels qu'une concentration saline élevée pour sélectionner les halophiles, éosine-bleu de méthylène toxique pour les bactéries Gram-positif. Exemple : Gélose MacConkey.

- Un **milieu d'enrichissement** permet également la croissance d'espèces bactériennes spécifiques. Cependant, les milieux d'enrichissement sont complétés par un réactif qui permet, plutôt l'inhibition de la croissance d'une espèce particulière. Exemple : Bouillon Sélénite F (le sélénite est un inhibiteur pour les coliformes et bénéfique pour la récupération des espèces de Salmonella), gélose Thayer Martin.

2.3.3.4. Milieu différentiel

Le milieu de culture dit « différentiel » ou « indicateur » permet de distinguer deux types de microorganismes se développant dans un même milieu. Ce type de milieu utilise les caractéristiques biochimiques d'un micro-organisme se développant en présence de nutriments et/ou d'indicateurs spécifiques (tels que le rouge neutre ou le bleu de méthylène) ajoutés au milieu pour indiquer visiblement les caractéristiques déterminantes d'un micro-organisme. Exemple : Gélose Mac Conkey (par la fermentation du lactose), gélose Chapman (par la fermentation du mannitol).

2.3.3.5. Milieu d'identification

Il permet de mettre en évidence une ou plusieurs propriétés d'une bactérie pour l'identifier : fermentation d'un sucre, production de gaz, présence des enzymes.

2.3.3.6. Milieux de conservation

Ce sont des milieux pauvres qui maintiennent les microorganismes dans un état de vie ralentie. Les milieux adoptés sont la gélose inclinée, ou gélose nutritive en culot.

2.4. Etude de milieu Lowenstein Jensen (Objet de cette étude)

2.4.1. Définition

Première partie : Synthèse bibliographique

Le milieu Lowenstein-Jensen est un milieu de culture solide sous forme de gélose en tube incliné largement utilisé en microbiologie pour l'isolement de *Mycobacterium tuberculosis* (l'agent responsable de la tuberculose), ainsi que d'autres mycobactéries atypiques à partir de produits pathologiques. Ce milieu est également utilisé pour le dénombrement et la différenciation des mycobactéries. Ce milieu peut être utilisé pour mesurer la sensibilité des mycobactéries à des antibiotiques spécifiques, pour la subculture et la conservation à long terme des souches de bacilles mycobactériens. La gélose Lowenstein-Jensen possède des propriétés sélectives basées sur la présence du vert de malachite et de sels minéraux qui inhibent la croissance de la plupart des organismes contaminants (**Ronald, 2004**).

2.4.2 Composition et préparation du milieu Lowenstein-Jensen (pour 1600 mL)

Les différents ingrédients nécessaires à la formulation de ce milieu sont représentés par (**Atlas, 2006**) :

- KH_2PO_4 (Phosphate monopotassique).....2,4g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfate de magnésium).....0,24g
- Citrate de magnésium.....0,6g
- Asparagine anhydre..... 3,6g
- Féculé de pomme de terre.....30g
- Vert de malachite.....0,4g
- Glycérol.....12.0ml
- Suspension d'œufs.....1.0L

La préparation de ce milieu se fait par dissolution de tous les ingrédients cités ci-dessus à l'exception de la suspension d'œufs dans un volume d'eau distillée de 600mL. Le mélange est chauffé doucement tout en remuant et porter à ébullition. Le mélange est autoclavé 15 minutes à 121°C. Après refroidissement, un volume de 1000ml d'une suspension d'œuf (préparée stérilement) est additionné et mélangé soigneusement. Le mélange est alors réparti dans des tubes à essai à bouchon à vis. Ces derniers sont solidifiés en position inclinée (80°) dans l'autoclave pendant 45 minutes (**Atlas, 2006**).

Chapitre 3 : Le sang

3.1. Définition du sang

Le sang est une suspension d'éléments sanguins dans le plasma. Il transporte les gaz du sang, les nutriments, les produits du métabolisme, les hormones et d'autres substances. Les principales fonctions du sang sont le transport des substances énumérées ci-dessus, la distribution de la chaleur, la régulation de divers processus et la protection de l'organisme grâce à l'action des cellules et des éléments immunitaires. Les rôles irremplaçables du sang comprennent le maintien de l'équilibre acido-basique et osmotique, la régulation de la température corporelle et la médiation de nombreuses autres fonctions (Křížková, 2021).

3.2. Composition du sang

Le sang peut être séparé par sédimentation en deux parties principales (Shaller *et al.*, 2008) :

3.2.1. Les cellules sanguines : sont principalement synthétisées dans la moelle osseuse et représentant environ 45 % (en volume) du sang total. Le sang contient trois principaux types de cellules.

- **Globules rouges :** aussi appelés hématies ou érythrocytes, ce sont des cellules biconcaves, aplaties avec une forme discoïde ne contenant pas de noyau. Le sang contient entre 4,5 – 5,5 millions/mm³ de globules rouges. Chez les adultes, les érythrocytes sont produits dans la moelle osseuse. Elles contiennent de l'hémoglobine qui donne au sang sa couleur rouge. Ce sont les cellules du sang chargées du transport de l'oxygène de nos poumons vers les autres organes du corps. Ces cellules sont les plus nombreuses. Un manque de globules rouges se caractérise par un affaiblissement continu et une forte fatigue. C'est ce que l'on appelle une anémie.
- **Globules blancs :** aussi appelés leucocytes, sont des cellules du système immunitaire qui nous protègent des agressions extérieures telles que les bactéries, les virus, etc. Il existe trois types de globules blancs : des granulocytes, lymphocytes et monocytes qui assurent chacun des fonctions de défense. On en dénombre entre 4000 et 10 000 par mm³. Il existe trois sous-types principaux (granulocytes, monocytes ou macrophages, lymphocytes et plaquettes).

Première partie : Synthèse bibliographique

3.2.2. Le plasma sanguin : ou partie liquide du sang représente environ 55 % du sang total. Il est obtenu par une simple centrifugation du sang prélevé dans un tube avec un anticoagulant (Cosson *et al.*, 2023).

Il existe de nombreux types de composants dissous dans le plasma sanguin, à savoir (Shaller *et al.*, 2008) :

1. L'eau : il est de loin le principal composant du plasma sanguin (environ 90 %).
2. Les sels minéraux et les ions. : de nombreux sels et ions sont dissous dans le plasma sanguin. On trouve du NaCl (à concentration physiologique), des sels tampons comme le bicarbonate pour garantir un pH constant ou des ions métalliques comme le calcium, le cuivre ou le fer, essentiels dans de nombreux processus biologiques et contenus dans de nombreuses protéines du plasma sanguin.
3. Composants de faible poids moléculaire : le plasma sanguin contient de nombreux types de composés de faible poids moléculaire, notamment des glucides tels que le glucose et le fructose, l'ensemble des acides aminés, des nucléotides tels que l'ATP et l'AMPc, de nombreuses vitamines, hormones, acides gras, lipides et triglycérides, acides biliaires, urée et ammoniacque et bien d'autres composants encore.
4. Composants de poids moléculaire élevé : des peptides et (glyco)-protéines, des oligonucléotides et polynucléotides, par exemple l'ADN et l'ARN.
5. Gaz sous forme soluble : de nombreux gaz tels que l'oxygène, le dioxyde de carbone et le monoxyde d'azote sont dissous dans le sang.
6. Métabolites : le plasma sanguin sert non seulement à transporter les composants susmentionnés, mais aussi les produits du métabolisme.

3.2.3. Le sérum : est le liquide sanguin débarrassé de ses cellules et des protéines de la coagulation. C'est le liquide surnageant obtenu après coagulation et centrifugation du sang dans un tube sec (sans inhibiteur de la coagulation) (Cosson *et al.*, 2023).

Deuxième partie
Matériel et Méthodes

Matériels et Méthodes

Le présent travail porte sur l'évaluation de la performance de différents milieux de culture Lowenstein-Jensen (LJ) modifiés par enrichissement avec du sang ou dérivé de sang (plasma ou sang) humain ou de cheval dans la culture de souches de référence de mycobacterium (*M. tuberculosis* H37Rv et *M. bovis*) et d'une souche clinique isolée d'un sujet malade.

L'ensemble de ce travail s'est déroulé au laboratoire des milieux de culture de l'Institut Pasteur d'Algérie (Annexe El-Hamma) du mois de mars à juin 2023.

1. Description du laboratoire des milieux de culture (Annexe Pasteur EL-HAMMA)

Le laboratoire des milieux de culture situé au département des réactifs de laboratoires à l'annexe de l'Institut Pasteur d'Algérie EL-HAMMA, est conçu pour la production des milieux de culture hydratés et déshydratés, depuis la préparation jusqu' au contrôle in process.

Chaque étape de production est effectuée dans une unité spécialisée :

- Unité de production des milieux hydratés ;
- Unité de production des milieux déshydratés ;
- Unité de conditionnement et étiquetage ;
- Unité du contrôle in process.

2. Matériel

2.1 Produits biologiques

2.1.1 Souches tests

2.1.1.1 Souches de *Mycobacterium*

Il s'agit de primo-cultures de *Mycobacterium* issues du laboratoire de Mycobactéries et de tuberculose. Ces souches sont utilisées pour l'étude de la fertilité spécifique sur milieu LJ.

- ***Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

La souche H37Rv a été isolée pour la première fois chez un patient atteint de tuberculose pulmonaire en 1905 et a depuis fait l'objet de nombreuses études. Son génome a été séquencé et publié en 1998, ce qui en fait l'un des premiers génomes complets d'un agent pathogène bactérien à être déterminé. La disponibilité de la séquence du génome de H37Rv a grandement facilité la recherche sur la tuberculose et a été une ressource précieuse pour comprendre la biologie et la virulence de *M. tuberculosis*. (Chitale *et al.*, 2022).

- ***Mycobacterium tuberculosis* isolée d'un malade** : cette souche a été isolée à partir d'un prélèvement pulmonaire (crachat) d'un homme de 70 ans. Elle est sensible à tous les antibiotiques.

- ***Mycobacterium bovis*** : souche de référence ATCC 27289.

2.1.2 Le sang : les échantillons de sang utilisés dans cette étude sont d'origine humaine et équine. Nous avons collecté et utilisé du sang humain citraté, du plasma humain, du sang de cheval et du sérum de cheval (voir partie méthodes).

2.1.3 Œufs de poule frais : les œufs de poule frais utilisés ont été achetés du marché.

2.2. Produits non biologique

2.2.1. Poudre de base pour la préparation du milieu standard LJ

La poudre utilisée dans la préparation de base du milieu LJ standard est importée d'Espagne. Conditionnée dans des boîtes en plastique de 500g, sa composition est donnée dans le tableau

Deuxième partie : Matériel et méthodes

Tableau 2 : Composition de la poudre de base de préparation du milieu LJ standard en gramme par litre.

Ingrédient	Quantité	Rôle
Asparagine	3,6	Acide aminé source d'azote
Fécule de pomme de terre	30,0	Source d'amidon
Vert de malachite	0,4	Colorant et inhibiteur de contaminants
Sulfate de magnésium	0,24	Facteur de croissance
Citrate de magnésium	0,6	Facteur de croissance
Dihydrogenophosphate de potassium	2,4	Tampon

- L'ensemble des produits chimiques, réactifs et verreries utilisées dans cette étude sont résumés en annexe 1.

3. Méthodes

3.1. Préparations initiales

3.1.1. Prélèvement et collecte du sang humain

On a prélevé du sang humain à partir d'un sujet male, âge de 40ans et en bonne santé, Les étapes suivies (**Di Lofrenzo et Strasinger, 2016**) pour le prélèvement et collecte de sang humain sont comme suit (Figure 3) :

- Enroulement d'un garrot élastique autour du bras du donneur, juste au-dessus du site de prélèvement prévu ;
- Recherche d'une veine appropriée pour le prélèvement de sang au niveau du bras.
- Désinfection du site de prélèvement à l'aide d'un tampon d'alcool pour minimiser le risque d'infection ;
- Insertion délicatement, d'une aiguille stérile dans la veine choisie ;
- Collecte du sang par la différence de pression entre le tube à hémolyse de collecte du sang et la veine ;
- Retrait de l'aiguille du site de prélèvement et application d'un pansement ;
- Les tubes de sang prélevé sont stockés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation.

Deuxième partie : Matériel et méthodes



Figure 3 : Etapes de prélèvement de sang d'un donneur (photos originales).

3.1.1.2 Préparation de plasma humain

Le plasma est obtenu par centrifugation à 3000 tours pendant 3 minutes (Figure 4) de sang humain collecté selon le même protocole expérimental cité précédemment, mais dans un tube citraté pour éviter toute coagulation.



Figure 4 : Séparation du plasma humain par centrifugation (Photo originale).

3.1.2 Préparation du sang de cheval

Le prélèvement du sang chez les chevaux suit généralement des étapes similaires à celles du prélèvement de sang chez les humains, on a prélevé du sang à partir d'un cheval male de l'Institut Pasteur de Delly Brahim

3.1.2.1 Préparation du sérum de cheval

Le sang entier de cheval prélevé dans des tubes sans anticoagulants est soumis à une centrifugation à 3000 tours pendant 3 minutes (Figure 5) pour récupérer le sérum.

Deuxième partie : Matériel et méthodes



a) Préparation du sang de cheval.



b) Prélèvement de sérum de cheval après centrifugation.



c) dépôt du sérum dans un flacon de 500 ml.

Figure 5 : Les étapes de préparation du sérum de cheval (photos originales).

3.1.3 Préparation de la suspension d'œufs

Une suspension d'œufs est préparée stérilement. Pour cela, les œufs sont lavés et flambés avant de les casser. Le contenu des œufs préparé est mixé dans un Blender puis filtré à travers une gaze.

3.2 Préparation du milieu Lowenstein-Jensen standard de base

La préparation d'un litre de milieu LJ standard se fait en deux étapes nécessaires:

- Préparation de la solution de base :
 1. A l'aide d'une balance électronique de précision, peser 62 g de la poudre de base de composition indiquée dans le tableau 2.2 ci-dessus.
 2. Ajouter 20 ml de glycérol ;
 3. Ajouter 375 mL d'eau distillée et bien mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène ;
 4. Chauffer doucement le mélange sous agitation ;
- Ajout de la suspension d'œuf :
 1. Après refroidissement du mélange ajouter un volume de 625 mL de la préparation d'œuf par filtration ;
 2. Le milieu ainsi préparé est filtré et versé dans un flacon en verre ;

Dans cette étude, les différentes préparations sont réalisées pour obtenir un volume final de milieu LJ de 8L (Figure 6), soit un mélange de 3L d'eau distillée avec 5L de la suspension d'œufs.

Deuxième partie : Matériel et méthodes



Figure 6: Etapes de préparation du milieu Lowenstein-Jensen standard (photos originales).

3.3 Préparation de milieux Lowenstein-Jensen modifiés

La composition des différents milieux de culture LJ modifiés est résumée dans le tableau 3.

Tableau 3 : La composition des milieux de culture LJ standard et modifiés.

Composition Milieu	LJ standard	Sang humain	Plasma humain	Sang de cheval	Sérum de cheval	Pyruvate
LJ standard	100%	0%	0%	0%	0%	0%
LJSH	96%	4%	0%	0%	0%	0%
LJPH	96%	0%	4%	0%	0%	0%
LJSC	96%	0%	0%	4%	0%	0%
LJSrC	96%	0%	0%	0%	4%	0%
LJSHP	96%	3%	0%	0%	0%	1%

LJ : Lowenstein-Jensen ; SH : sang humain; PH: plasma humain; SC: sang de cheval ; SrC : sérum de cheval ; SHP : sang humain et pyruvate.

- On a utilisé des flacons de 500 ml préalablement stérilisés pour la préparation des différentes formulations de milieux LJ modifiés.

Deuxième partie : Matériel et méthodes

3.3.1. Préparation de milieu LJ modifié à base du sang humain et le milieu LJ modifié à base du sang de cheval

Une quantité de 4% du sang humain comme indiqué dans le tableau précédent est inoculé stérilement dans un flacon grâce à une seringue stérile (Figure 7). On a ajouté une quantité de 96% de milieu LJ standard déjà préparé selon les étapes indiqués dans le titre 3.2. Le mélange est homogénéisé puis réparti stérilement dans des tubes à vis à raison de 7 ml par tube à l'aide d'une pompe à répartition. Les tubes ainsi remplis sont coagulés en position inclinée à 80°C dans l'autoclave pendant 45 minutes. Finalement, les tubes préparés sont étiquetés et stockés dans une chambre froide.

Une quantité de 4% du sang de cheval a été également inoculé stérilement dans un flacon et mélangé avec 96% du milieu LJ standard jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène, le reste des étapes est similaire à celle suivies dans la préparation de milieu LJ modifié a base du sang humain.

3.3.2. Préparation de milieu LJ modifié a base du plasma humain et du sérum de cheval

Après centrifugation, 4% du plasma humain est inoculé dans un flacon stérile à l'aide d'une seringue stérile. Puis on a ajouté 96% de milieu LJ standard préalablement préparé et on a mélangé jusqu'à homogénéisation, puis réparti stérilement dans des tubes à vis. Les tubes sont coagulés en position inclinée à 80°C dans l'autoclave pendant 45 minutes. (Figure 7).

Une quantité de 4% du sérum de cheval a été également inoculé stérilement dans un flacon et mélangé avec 96% du milieu LJ standard jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène, le reste des étapes est similaire à celle suivies dans la préparation de milieu LJ modifié a base du plasma humain.

Deuxième partie : Matériel et méthodes



Figure7: Préparation des milieux de culture LJ modifié à base de sang et dérivés de sang (photos originales).

3.3.3. Préparation de milieu LJ standard additionné de sang et de pyruvate

Nous avons commencé par le pesage d'une quantité appropriée de pyruvate en poudre (1% de mélange final) et est introduite dans un flacon de 500 ml stérile auquel est ajouté 3% de sang humain et 97% de milieu LJ standard (Figure 8). Le mélange est homogénéisé puis réparti dans des tubes à essai à vis à raison de 7 ml par tube. Le reste du process est identique aux étapes suivies dans la préparation des milieux LJ modifiés à base du sang ou ses dérivés.



Figure 8 : Préparation de milieu LJ modifié à base de pyruvate et sang humain (photos originales).

3.4. Contrôle de la qualité des milieux de culture Lowenstein-Jensen préparés

3.4.1. Contrôle physico-chimique

- Aspect : clarté et présence d'artéfacts.
- Stabilité et consistance.
- Couleur : vert bleu en milieu LJ standard.

3.4.2. Contrôle de stérilité

Le contrôle de la stérilité du milieu se fait par :

- Incubation de (05) tubes par milieux de culture formulés (LJ standard et modifiés) dans l'étuve à 37°C pendant 24 à 48h.
- Après incubation, examination visuelle des différents milieux de culture pour détecter toute croissance microbienne. Si aucun signe de croissance n'est observé, cela indique une stérilité du milieu.
- La présence de croissance dans les échantillons indique une contamination. Dans ce cas, le milieu est déclaré non conforme, il est nécessaire alors de chercher et d'identifier la source de contamination et d'y remédier.

3.4.3. Contrôle de fertilité

Le contrôle de fertilité du milieu se fait selon la méthode usuelle de laboratoire par ensemencement des souches de référence de mycobacterium (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. bovis*) et une souche *M. tuberculosis* isolée d'un malade pour vérifier la performance

Pour cela, nous avons ensemencé pour chaque souche testée 4 tubes (2 tubes de milieu LJ modifié et 2 tubes de milieu LJ standard (témoin) ce qui fait un total de 72 tubes pour toute l'expérimentation.

3.4.3.1. Méthode d'ensemencement des souches tests

Les étapes suivies pour l'ensemencement des souches tests sont indiquées ci-après :

Deuxième partie : Matériel et méthodes

➤ Préparation de la solution mère

A l'aide de l'anse de platine, on prélève un maximum de colonies de mycobacterium qu'on introduit dans un petit ballon à fond plat contenant des billes en verre. Par des mouvements circulaires, on écrase les colonies prélevées, puis on ajoute 10 ml d'eau distillée stérile et on mélange bien pour obtenir une solution homogène dense (Figure 9).



Figure 9 : méthode de préparation de la solution mère des souches de mycobacteriums à tester.

➤ Mesure de la densité de la solution mère

A partir de la solution mère précédemment obtenue, on prélève stérilement à l'aide d'une pipette un certain volume qu'on dépose dans un tube stérile et on mesure la densité à l'aide d'un densitomètre. La lecture doit être égale à 1 McFarland (Figure 10).



Figure 10 : Détermination de la densité de la solution mère.

➤ Préparation des dilutions de la solution mère

On prélève à partir de la solution mère, un volume de 0,5 ml auquel on ajoute 4,5 ml d'eau distillée stérile pour obtenir la dilution (10^{-1}). Cette dernière sert pour la préparation de la seconde dilution (10^{-2}) en prélevant 0,5 ml qu'on mélange avec 4,5 ml d'eau distillée stérile (voire la Figure 11).

Deuxième partie : Matériel et méthodes

➤ Mise en culture

Les différents milieux de culture LJ modifiés et standard formulés sont ensemencés à partir des souches tests selon le schéma suivant :

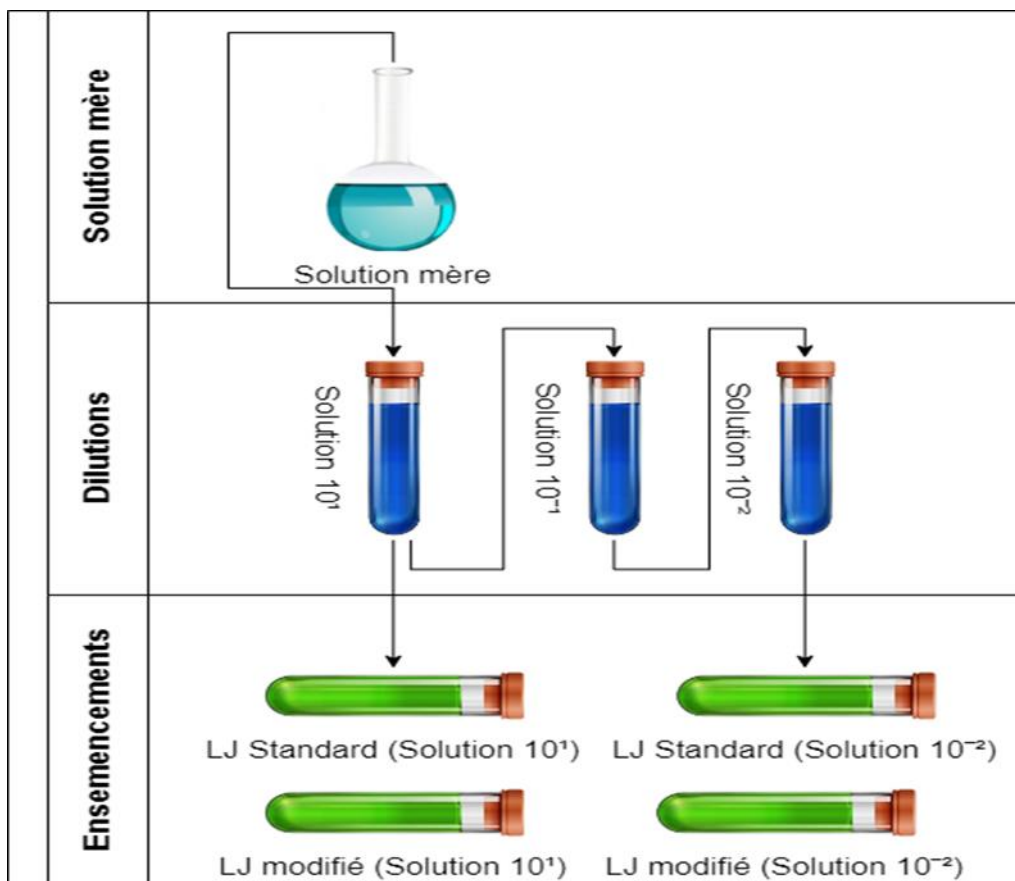


Figure 11 : Préparation des dilutions et l'ensemencement des souches tests.

Pour chaque milieu LJ modifié, 2 tubes de milieu de culture sont ensemencés avec la solution mère et 2 autres avec la dilution 10^{-2} , en parallèle 2 milieux LJ standard sont ensemencés par la solution mère et 2 autres par la dilution 10^{-2} qui vont servir comme témoin. (Voir la figure 11)

L'ensemencement se fait par stries sur la pente de la gélose inclinée solide des tubes qu'on ferme partiellement. Les différents tubes ensemencés incubés à 37°C et contrôlés sur une durée de 48 jours (Figure 12).

Deuxième partie : Matériel et méthodes



Figure 12 : Mise en culture des souches de mycobacteriums (photos originales)

Troisième partie
Résultats et discussion

Troisième partie : Résultats et Discussion





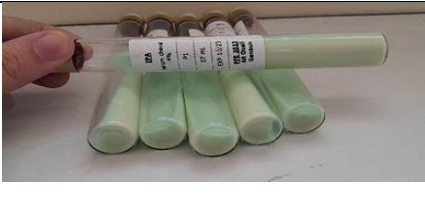

Résultats et Discussion

3. Résultats

3.1. Résultats du contrôle physico-chimique

L'aspect physique des différents milieux de culture formulés (LJ standard et modifiés) est donné dans le tableau 4.

Tableau 4: Résultats du contrôle physique des différents milieux LJ formulés (standard et modifiés).

Type de milieu	Couleur du milieu	Photos
LJ standard	Bleu vert	
LJSH	Marron	
LJSC	Marron	
LJPH	Vert clair	
LJSrC	Vert clair	
LJSHP	Marron	

Troisième partie : Résultats et Discussion

LJ : Lowenstein-Jensen ; SH : sang humain ; SC : sang de cheval ; PH : plasma humain ; SrC : sérum de cheval, SHP : sang humain+pyruvate ; LJs : LJ standard ; LJm : LJ modifié.

3.2. Résultats du contrôle de qualité

3.2.1. Résultats du contrôle de stérilité







Sur l'ensemble des milieux de culture LJ standard et modifiés préparés, aucun signe de croissance microbienne n'a été observé (0% de contamination).

3.2.2. Résultats du contrôle de fertilité des milieux de culture préparés pour les différentes souchesensemencées

- Souche de référence H37Rv

Les résultats de l'ensemencement de la solution mère et de la dilution 10^{-2} de la souche de référence H37Rv (le 24 /04/2023) sur les différents milieux préparés sont résumés dans les tableaux 5 et 6 sur une durée d'incubation de 48 jours.

Tableau 5 : Résultats de l'ensemencement de la solution mère de la souche de référence H37Rv sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés).

	48H		10J		14J		24J		30J		48J	
	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs
LJSHP	-	-	+	-	++	+	++	++	++	++	++	++
LJSH	-	-	+	+	+	+	++	+	++	++	++	++
LJSC	-	-	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++
LJSrC	-	-	+	+	++	+	++	++	++	++	++	++
LJPH	-	-	+	-	+	+	++	+	++	++	++	++
Photos												

LJ : Lowenstein-Jensen ; SH : sang humain ; SC : sang de cheval ; PH : plasma humain ; SrC : sérum de cheval, SHP : sang humain+pyruvate ; LJs : LJ standard ; LJm : LJ modifié ; J : jours.

Troisième partie : Résultats et Discussion

Tableau 6 : Résultats de l'ensemencement de la dilution 10^{-2} de la souche de référence H37Rv sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés).

	48H		10J		14J		24J		30J		48J	
	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs
LJSHP	-	-	+	-	+	+	++	+	++	++	+	++
LJSH	-	-	-	-	++	+	++	+	++	+	++	++
LJSC	-	-	+	+	++	+	++	+	++	++	++	++
LJSrC	-	-	+	+	+	++	+	++	+	++	++	++
LJPH	-	-	-	-	++	+	++	+	++	+	++	++

LJ : Lowenstein-Jensen ; SH : sang humain ; SC : sang de cheval ; PH : plasma humain ; SrC : sérum de cheval, SHP : sang humain+pyruvate ; LJs : LJ standard ; LJm : LJ modifié ; J : jours.

- **Souche de référence *M. bovis***

Les résultats de l'ensemencement de la solution mère et de la dilution 10^{-2} de la souche de référence *M. bovis* (le 2/05/2023) sur les différents milieux préparés sont résumés dans les tableaux 7 et 8 sur une durée d'incubation de 30 jours.

Tableau 7: Résultats de l'ensemencement de la solution mère de la souche de référence *M. bovis* sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés).

	48H		7J		14J		21J		30J	
	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs
LJSHP	-	-	+	-	+	-	+	+	++	++
LJSH	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++
LJSC	-	-	-	-	-	-	+	+	++	+
LJSrC	-	-	-	-	+	-	+	+	++	+
LJPH	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++

Troisième partie : Résultats et Discussion

LJ : Lowenstein-Jensen ; SH : sang humain ; SC : sang de cheval ; PH : plasma humain ; SrC : sérum de cheval, SHP : sang humain+pyruvate ; LJs : LJ standard ; LJm : LJ modifié ; J : jours.

Tableau 8: Résultats de l'ensemencement de la dilution 10^{-2} de la souche de référence *M. bovis* sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés).

	48H		7J		14J		21J		30J	
	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs
LJSHP	-	-	+	-	++	-	++	+	++	++
LJSH	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++
LJSC	-	-	-	-	+	+	+	+	++	+
LJSrC	-	-	-	-	+	-	+	+	++	+
LJPH	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++






LJ : Lowenstein-Jensen ; SH : sang humain ; SC : sang de cheval ; PH : plasma humain ; SrC : sérum de cheval, SHP : sang humain+pyruvate ; LJs : LJ standard ; LJm : LJ modifié ; J : jours.

- **Souche de *M. tuberculosis* isolée d'un malade**

Les résultats de l'ensemencement de la solution mère et de la dilution 10^{-2} de la souche de *M. tuberculosis* isolée d'un malade (23 /05/2023) sur les différents milieux préparés sont résumés dans les tableaux 9 et 10 sur une durée d'incubation de 28 jours.

Troisième partie : Résultats et Discussion

Tableau 9 : Résultats de l'ensemencement de la solution mère de la souche de *M. tuberculosis* isolée d'un malade sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés).

	48H		7J		10J		16J		28J	
	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs
LJSHP	-	-	-	-	++	+	++	++	++	++
LJSH	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++
LJSC	-	-	-	-	+	+	++	+	+	+
LJSrC	-	-	-	-	+	+	++	++	+	++
LJPH	-	-	-	-	+	+	++	+	+	+
Photos										

LJ : Lowenstein-Jensen ; SH : sang humain ; SC : sang de cheval ; PH : plasma humain ;
 SrC : sérum de cheval, SHP : sang humain+pyruvate ; LJs : LJ standard ; LJm : LJ modifié ;
 J : jours

Troisième partie : Résultats et Discussion

Tableau 10 : Résultats de l'ensemencement de la dilution 10^{-2} de la souche de *M. tuberculosis* isolée d'un malade sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés).

	48H		7J		10J		16J		28J	
	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs	LJm	LJs
LJSHP	-	-	-	-	+	-	++	+	++	++
LJSH	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
LJSC	-	-	-	-	-	-	+	+	++	++
LJSrC	-	-	-	-	+	-	++	+	+	+
LJPH	-	-	-	-	+	-	+	+	++	++




LJ : Lowenstein-Jensen ; SH : sang humain ; SC : sang de cheval ; PH : plasma humain ; SrC : sérum de cheval, SHP : sang humain+pyruvate ; LJs : LJ standard ; LJm : LJ modifié ; J : jours

3.3. Caractères cultureux des souches de *Mycobacterium* étudiées sur les différents milieux de culture préparés (LJ standard et modifiés)

Les caractères cultureux des souches de *Mycobacterium* ensemencées sur les différents milieux de culture LJ standard et modifiés sont illustrés dans le tableau 11.

Troisième partie : Résultats et Discussion

Tableau 11 : Caractères culturels des souches de mycobacterium ensemencées.

	H37Rv	<i>M. bovis</i>	Souche <i>M. tuberculosis</i> du malade
LJm (SC, SH, SrC, PH, SHP)	blanc-ivoire, rugueuses et adhérentes au milieu, un aspect en chou-fleur.	blanches, lisses, dysgoniques, petites et arrondies et elles ont des bords irréguliers.	Blanc cassé, rugueuses, aspect de chou-fleur.
Colonies	blanc-ivoire, rugueuses et adhérentes au milieu, un aspect en chou-fleur.	Blanches, lisses, dysgoniques, petites et arrondies et elles ont des bords irréguliers.	Blanc cassé, rugueuses, aspect de chou-fleur.
Photos			

LJ : Lowenstein-Jensen ; SH : sang humain; SC : sang de cheval ; PH : plasma humain ; SrC : sérum de cheval, SHP : sang humain+pyruvate ; LJs : LJ standard ; LJm : LJ modifié ; J : jours.

Troisième partie : Résultats et Discussion

2. Discussion

Les résultats du contrôle physique révèlent une différence dans la couleur des milieux de culture du LJ standard et des milieux LJ modifiés. Ainsi, le mélange du milieu Lowenstein-Jensen standard de couleur cyan (bleu-vert) avec le plasma humain ou sérum de cheval, un liquide jaunâtre, a permis l'obtention de milieux gélosés colorés en vert jaunâtre en accord avec le guide des mélanges de couleur. Selon la littérature, la couleur jaune absorbe la portion de bleu de la couleur cyan laissant uniquement le reflet de la teinte vert obtenu pour les milieux de culture LJPH et LJSrC (**Salvaggio, 2017**). Par ailleurs, le mélange de la couleur rouge du sang humain ou équin avec la teinte bleu-vert du milieu LJ standard conduit à une mixture de couleur marron pour les milieux de culture LJSH, LJSC et le milieu LJSHP additionné de pyruvate. La couleur marron ainsi obtenue répond parfaitement à la théorie du mélange des trois couleurs de base (rouge, bleu et vert) appelées les couleurs primaires. Dans notre cas, le pigment de l'hémoglobine, une protéine riche en fer de coloration rouge vif prédomine et sature le vert du milieu LJ créant une nuance du rouge correspondant à un marron (**Valberg, 2007 ; Salvaggio, 2017**).

Par ailleurs, le test de stérilité effectué pour les différents milieux de culture LJ préparés a montré une absence totale de développement de germes après incubation à 37°C pendant 24 à 48H témoignant ainsi du respect des bonnes pratiques d'hygiène dans leur préparation et de la stérilité du matériel employé à cet effet (**Kumar, 2012 ; Jain et al., 2018**).

Le teste de fertilité

Les résultats de teste de fertilité ont permis de démontrer : une croissance précoce des deux souches de référence *M. tuberculosis* H37Rv et *M. bovis* sur le milieu LJSHP à compter de la première semaine d'incubation (7j – 10 jours) pour les deux concentrations bactériennes inoculées (solution mère et dilution 10^{-2}) contre (14jours et 21jours) respectivement, pour le milieu Lowenstein-Jensen standard (Tableaux 5 et 6). Cette différence observée dans la multiplication des souches de mycobacterium comparé au milieu témoin (LJ standard) démontre une influence de la composition du milieu. Ainsi, l'addition du sang humain, un milieu complexe riche en sels, minéraux, lipides et protéines (**Křížková, 2021**) en présence de pyruvate permet d'augmenter l'efficacité du milieu LJ standard dans l'isolement et la culture de ces deux souches de mycobacterium.

Troisième partie : Résultats et Discussion

D'autre part, la souche de *M. tuberculosis* H37Rv pour sa part, a donné un résultat positif sur le milieu LJPH comparable au milieu LJSHP lorsque la concentration de l'inoculum utilisé pour l'ensemencement est élevée (solution mère). L'ensemencement du milieu LJPH avec la dilution 10^{-2} n'a pas permis la détection et l'isolement de la souche H37Rv qu'à partir du 14^{ème} jour d'incubation (Tableau 6). **Asmar *et al.* (2015)** ont dans le même sens rapporté l'effet dose dépendant entre la concentration de l'inoculum et la durée de détection des souches de mycobacteriums étudiées.

En outre, la souche de *M. bovis* étudiée a poussé et s'est développé plus favorablement sur le milieu LJSHP que sur le milieu LJPH soulignant le besoin pour cette souche en pyruvate en accord avec la bibliographie (**Markey *et al.*, 2013**). Nos résultats sont aussi en corrélation avec ceux d'une étude portant sur la prévalence de la tuberculose bovine chez les chameaux dromadaires et sensibilisation des éleveurs à son importance zoonotique dans l'est de l'Éthiopie. Les auteurs ont démontré que sur les 33 souches de mycobacteriums de l'espèce *M. bovis* isolées, 12% (4/33) ont montré une croissance sur milieu LJ solide additionné de pyruvate (**Ashenafi *et al.*, 2014**).

Un autre milieu s'est révélé plus efficace dans les mêmes conditions expérimentales de la solution mère, ils s'agit de milieu LJSrC a permis un isolement de cette souche au bout de 14 jour contre 21 jour sur LJ standard, les mêmes résultats sont obtenu avec la dilution 10^{-2} la richesse du le milieu par le sérum (qui apporte des nutriments protéine, vitamine...) favorise une meilleur croissance

En ce qui concerne la souche de *M. tuberculosis* isolée du malade, l'ensemble des milieux de culture LJ modifiés sont similaires au milieu LJ standard et permettent l'isolement de la souche au bout de la même période d'incubation et ce à compter du 10^{ème} jour lorsqu'ils sont inoculés avec la solution mère. Toutefois, les milieux de culture LJSHP, LJSrC et LJPH ensemencés avec la dilution 10^{-2} de la souche de mycobacterium isolée du malade se sont montré plus performants que le milieu LJ standard. En effet, un développement de colonies a été observé à partir du 10^{ème} jour avec ces milieux LJ modifiés contre 16 jours pour le milieu LJ standard.

Ainsi, le complément nutritif soit de protéines, hormones, minéraux, vitamines, ou autre, apportés par le sérum ou plasma supplémenté au milieu LJ standard a permis de satisfaire les besoins et exigences de l'espèce bactérienne de mycobacterium isolée du malade induisant un enrichissement de la culture à travers une accélération de la division des cellules pour

Troisième partie : Résultats et Discussion

atteindre une concentration cellulaire suffisante pour être détecté en un laps de temps plus court que sur le milieu LJ standard aux besoins nutritifs limitants.

En outre, les résultats consignés dans le tableau 11 n'ont démontré l'existence d'aucune différence dans l'aspect, la forme, taille, etc., des colonies obtenues pour les trois types de souches de mycobacteriums étudiées quel que soit le milieu de culture considéré LJ standard ou modifié. Les caractères cultureux notés sont en accord avec la littérature (**Grosset *et al.*, 1990**).

Conclusion

Conclusion

La tuberculose pulmonaire causée par les Mycobactéries du complexe Tuberculosis reste un problème mondial de santé publique. La culture sur milieu solide de Lowenstein-Jensen est la méthode universelle pour le diagnostic de laboratoire de la tuberculose. Néanmoins, la durée de détection de ces mycobactéries est longue (plusieurs semaines) retardant la prise en charge thérapeutique du sujet malade.

L'objectif de notre étude, consiste à évaluer la performance du milieu de culture LJ modifiés par addition de sang en présence ou non de pyruvate ou dérivé de sang humain et équien dans la culture de souches de référence de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* et *M. tuberculosis* isolée d'un malade.

Globalement, le milieu de culture LJSHP s'est révélés efficaces et très performants dans la culture et l'isolement des deux souches de référence (*M. tuberculosis* H37Rv et *M. bovis*) en favorisant leur développement et croissance à l'issue de 7 – 10 jours d'incubation contre 14 jours et 21 jours sur le milieu LJ standard, respectivement.

Par ailleurs, la souche H37Rv croît rapidement sur le milieu LJPH lorsque celui-ci est inoculé avec la solution mère riche inversement à la dilution 10^{-2} qui n'a conduit à aucune croissance microbienne dans le même laps de temps

Egalement, nos résultats ont démontré que le milieu LJSrC est plus efficace que le milieu LJ standard dans l'isolement de la souche de *M. bovis*.

En outre, les milieux de culture LJSHP, LJSrC, et LJPH semble supérieur au milieu LJ standard lorsqu'il s'agit de la détection de la souche de *M. tuberculosis* isolée d'un malade., lorsqu'ils sont inoculé avec la dilution 10^{-2} avec une durée de détection de 10jour contre 16 jour pour le milieu LJ standard .

Néanmoins, tous les milieux LJ modifiés produits dans cette étude ont permis d'obtenir des colonies aux caractères cultureux identiques à ceux obtenus sur le milieu LJ standard pour les différentes souches de mycobacterium étudiées.

En conclusion, la supplémentation du milieu LJ avec du sang ou dérivé de sang humain et équien peut constituer une alternative intéressante pour améliorer la détection et l'isolement des souches de mycobacterium du complexe tuberculosis pour une prise en charge précoce du sujet malade et par conséquent, une réduction de la transmission de la maladie.

On peut encore étudier une meilleure formulation possible de notre milieu demandé à être utilisé à plus large aspect ou plus grande dimension dans les hôpitaux là où il y'a des souches et des cas diagnostic.

- Modifier la composition de la base de milieu LJ standard, on peut par exemple changer l'étape de l'ajout des œufs et la remplacer par un apport de lipides
- Améliorer le milieu LJ standard par son enrichissement avec le sang et le plasma au même temps
- Augmentation des pourcentages des suppléments (par exemple 5% du sang, 2% du pyruvate)

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ashenafi F., Keleab Z., Abiy M., Gobena A., Mohammed S. (2014).** Prevalence of bovine tuberculosis in dromedary camels and awareness of pastoralists about its zoonotic importance in Eastern Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health*, 6(4): 109 – 115.
- Asmar A., Chatellier S., Mirande C., van Belkum A., Canard I., Raoult D., Drancourt M. (2015).** A Novel Solid Medium for Culturing Mycobacterium tuberculosis Isolates from Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 53: 2566 –2569.
- Atlas R.M. (2004).** Handbook of Microbiological Media. CRC Press, 2056 pages.
- Atlas R.M. (2006).** The Handbook of Microbiological Media for the Examination of Food. CRC Press, 464 pages.
- Bentata K. (2018).** La tuberculose extra-pulmonaire au niveau de la wilaya de Mostaganem, problème transdisciplinaire de santé publique : quelle stratégie pour une meilleure prise en charge. Thèse de doctorat en sciences médicales, spécialité : Pneumo-Phtisiologie. Université d’Oran 1 Es-Senia, Ahmed Ben Bella, Algérie, 243 pages.
- Berche P. (2019).** Histoire de la lèpre. *Revue de Biologie médicale*. (351) : 51 – 61.
- Bobin P. (2007).** La lèpre. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale : Maladies infectieuses*. Edition Masson, 22 pages.
- Cedenio I., DE Obaldia R., Sanjur O., Bayard V., Ortega- Barria E., Escobar C. (2005).** Use of the polymerase chain reaction for diagnosing bovine tuberculosis in Panama. *Revue Scientifique et Technique*, 24(3): 1067 – 1075.
- Chitale P., Lemenze A., Fogarty E., Shah A., Grady C.A., Odom-Mabey A.R., Johnson W. E., Yang J.H., Eren A.M., Brosch R., Kumar P., Alland D. (2022).** A comprehensive update to the Mycobacterium tuberculosis H37Rv reference genome. *Nature Communications*, 13(1) :7538. doi: 10.1038/s41467-022-35402-2. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34853-x>.
- Churchyard G.J., Kim P.S., Shah N.J., Rustomjee R., Gandhi N.R., Mathema B., Dowdy D.W., Kasmar A., Cárdenas V. (2017).** What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview. *The Journal of Infectious Diseases*, 216(suppl.6), S629-S635.

Cosson A., Rouffey J., (2023). « SANG- Composition et propriétés », Encyclopædia Universalis [en ligne], consulté le 9 mars 2023. <https://www.universalis.fr/encyclopedie/sang-composition-et-proprietes/4-bibliographie/>

Denis F., Ploy M.C., Martin C., Cattoir V. (2016). Bactériologie médicale-techniques usuelles. 3ème édition, Elsevier Masson, 575 pages.

Di Lorenzo M.S., Strasinger S.K. (2016). Blood Collection. A Short Course. 3ème edition, F. A. Davis Company, 153 pages.

Essawy T. S., Saeed A.M., Fouad N.A. (2014). Comparative study between using Lowenstein Jensen, Bio-FM media and mycobacteria growth indicator tube (MGIT) system in identification of Mycobacterium tuberculosis. Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis, 63(2) : 377 – 384.

Flageul B. (2011). Le diagnostic de la lèpre. Revue francophone des laboratoires. 41(431) : 37 – 42.

Frota C.C., Hunt D.M., Buxton R., Rickman L., Hinds J., Kremer K., Colston M. (2004). Genome structure in the vole bacillus, Mycobacterium microti, a member of the Mycobacterium tuberculosis complex with a low virulence for humans. Microbiology. 150(Pt 5):1519 – 1527.

Gomgnimbou M.K., Faye B., Tranchot-Diallo J., Kaboré A., Belem L.R., Zingue D., Sanou A., Hien H., Sangaré L. (2020). Milieu sélectif de Lowenstein-Jensen à base de vancomycine pour la réduction des contaminations de cultures de mycobactéries par les bactéries sporulantes. Pan African medical journal, 37(345). doi.org/10.11604/pamj.2020.37.345.23016.

Grosset J. (1990). Bacteriologic basis for the treatment of tuberculosis. Revue du Praticien, 40 (8) : 715 – 718.

Grosset J., Boisvert H., Truffot P.C. (1990). Mycobactéries. In : Le Minor L., Veron M., ed. Bactériologie médicale. Paris : Flammarion, 965-1017.

Grosset J.H., Truffot-Pernot C., Boisvert H., Lalande V. (1991). Qu'est-ce que les mycobactéries atypiques ? Médecine Et Maladies Infectieuses, 21(2) : 7 – 15.

Huang L., Nazarova E.V., Russell D.H. (2019). Mycobacterium tuberculosis: Bacterial Fitness within the Host Macrophage. *Microbiology spectrum*, 7(2). doi.org/10.1128/microbiolspec.bai-0001-2019.

Kabo A.K., Kaman K., Doungous D.M., Ouedraogo L., Abakar M.F., Godreuil S., Beng V.P. (2022). Epidémiologie de la lèpre au Tchad de 2015 à 2019. *Pan African Medical Journal*, 41(120). doi: 10.11604/pamj.2022.41.120.32283.

Křížková V. (2021). Blood and Blood Components, Hematopoiesis, Selected Methods Used in Cytology, Histology and Hematology. Karolinum Press, 90 pages.

Markey B., Leonard F., Archambault M., Cullinane A., Maguire D. (2013). Clinical Veterinary Microbiology E-Book. Elsevier Health Sciences, 656 pages.

Mouhoub W.A. (2020). Profil épidémiologique de la tuberculose dans une wilaya de l'Est d'Algérie. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*, 12(1) : 268. doi.org/10.1016/j.rmra.2019.11.609

Palange P., Narang R., Kandi V. (2016). Evaluation of Culture Media for Isolation of Mycobacterium Species from Human Clinical Specimens. *Cureus* 8(8): e757. doi:10.7759/cureus.757pages.

Petiot A., Drak Alsibai K., Dossou C., Couppie P., Blaizot R. (2022). Évolution de l'épidémiologie de la lèpre en Guyane, 2015 – 2021. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 1(2) supplément, S117-S118.

Prendki V., Germaud P., Bémer P., Masseur A., Hamidou M. (2008). "Les infections à mycobactéries non tuberculeuses". *La Revue de Médecine Interne*, 29(5) : 370 – 79.

Salvaggio N.L. (2017). Basic Photographic Materials and Processes. Third edition, Taylor & Francis Group. 462 pages.

Schmutz J. (2008). Mycobactérioses atypiques. In: Manifestations dermatologiques des maladies infectieuses, métaboliques et toxiques. *Dermatologie et Médecine*, volume 2, éd. Didier Bessis, Springer, Paris. https://doi.org/10.1007/978-2-287-48494-0_8.

Smith N.H., Kremer K., Inwald J., Dale J.L., Driscoll J.B., Gordon S.B., Van Soolingen D., Hewinson R.G., Smith J.R. (2006). Ecotypes of the Mycobacterium tuberculosis complex. *Journal of Theoretical Biology*, 239(2): 220 – 225.

Suárez I., FUNGER S.M., KRÖGER S., RADMACHER J., FÄTKENHEUER G., RYBNIKER J. (2019). The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Deutsches Ärzteblatt International*, 116: 729 – 35.

Truffot-Pernot C., Maury L., Grosset J. (1991). Le diagnostic microbiologique des infections à mycobactéries atypiques chez les malades atteints de SIDA : Rapport coût-efficacité. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 21(2) : 99 – 104.

Valberg A. (2007). Light vision color. Wiley, 464 pages.

Vasanthakumari R. (2016). Textbook of Microbiology. Third Edition, Wolters kluwer india Pvt Ltd, 469 pages.

Velayati A.A., Farnia P. (2016). Atlas of Mycobacterium Tuberculosis. Elsevier science, 226 pages.

Zida S., Tarnagda Z., Kaboré A., Zingue D., Hien H., Sanou A., Gomgnimbou K.M., Nouctara M., Ouédraogo M., Ouédraogo O., Godreuil S., Meda N. (2014). Current status of atypical mycobacterial infections in Burkina Faso: results of a regional survey. *Pan African Medical Journal*, 17: 188. doi.org/10.11604/pamj.2014.17.188.3639.

Gomgnimbou, M. K., Faye, B., Tranchot-Diallo, J., Kaboré, A., Belem, L. R., Zingue, D., Sanou, A., Hien, H., & Sangaré, L. (2020b). Milieu sélectif de Lowenstein-Jensen à base de vancomycine pour la réduction des contaminations de cultures de mycobactéries par les bactéries sporulantes. *The Pan African medical journal*, 37. <https://doi.org/10.11604/pamj.2020.37.345.23016>

Annexes

Annexe 1 : produits chimiques, appareillage et autres matériels.

Produits chimiques	Appareillage	Autres matériels
<ul style="list-style-type: none"> - Glycérol - Pyruvate. 	<ul style="list-style-type: none"> - Autoclave - Agitateur - Centrifugeuse - Blender - Densimètre - Réfrigérateur - Balance électronique - Etuve - Hotte microbiologique - Chambre froide 	<ul style="list-style-type: none"> - Tubes à vis - Bouchons - Entonnoir - Papier filtre - Seringues - Flacons en verre - Pipettes Pasteur - Ballon à fond plat - Tubes à hémolyse sec - Tubes à hémolyse citratés - Louche - Bec Bunsen - Portoir pour tubes - Plateau des tubes - Eprouvette graduée - Conteneur de déchets Dasri - Récipients en verre - Récipients en plastique

